

Министерство обороны Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное  
военное образовательное учреждение высшего образования  
«Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова»

*На правах рукописи*

Зайцев Александр Евгеньевич

**ПРИМЕНЕНИЕ ВЫСОКОИНТЕНСИВНОГО ЭРБИЕВОГО ЛАЗЕРА  
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДЛИТЕЛЬНО НЕЗАЖИВАЮЩИХ РАН  
(клинико-экспериментальное исследование)**

3.1.9 Хирургия

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**  
кандидат медицинских наук, доцент  
Асанов Олег Николаевич

**г. Москва – 2024 г.**

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	27
2.1 Общая характеристика клинических данных.....	27
2.2 Параметры и методика применения эрбиевого лазера.....	28
2.3 Характеристика экспериментальных исследований.....	30
2.4 Модель трофической гнойной раны.....	32
2.5 Методы анализа раневого процесса.....	34
2.5.1 Оценка визуальных изменений и скорости заживления ран.....	34
2.5.2. Бактериологическое исследование.....	36
2.5.3 Цитологическое исследование.....	37
2.5.4 Морфологическое исследование экспериментальных ран.....	38
2.6 Методы статистической обработки данных.....	39
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЭРБИЕВОГО ЛАЗЕРА.....	40
3.1 Анализ клинико-демографических данных.....	40
3.2 Динамика заживления ран.....	43
3.3 Результаты бактериологического исследования.....	48
3.4 Результаты цитологического исследования.....	52
3.5 Субъективная оценка метода.....	57
3.6 Обсуждение результатов.....	60
ГЛАВА IV. ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ЭРБИЕВОГО ЛАЗЕРА НА ОСЛОЖНЕННЫЙ РАНЕВОЙ ПРОЦЕСС.....	63
4.1 Апробация модели трофической гнойной раны.....	63
4.2 Макроскопическая оценка заживления.....	65
4.3 Анализ бактерицидного эффекта эрбиевого лазера.....	69

4.4 Анализ цитологической картины экспериментальных ран.....	73
4.5 Морфологическое исследование экспериментальных ран.....	76
4.6 Обсуждение результатов.....	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	89
ВЫВОДЫ.....	95
ПАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	96
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	98

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Лечение длительно незаживающих ран, возникших на фоне различных заболеваний и патологических состояний, остается важным вопросом современной хирургии [2; 49; 74]. Хронические раневые дефекты влияют на общее состояние пациентов, снижают качество их жизни и требуют значительных финансовых затрат, чем обусловлен социально-экономический характер проблемы [29; 35; 51; 56; 60; 68; 102; 107; 138].

Длительно незаживающими ранами в мире страдают около 40 миллионов человек. В России не менее 2,5 миллионов пациентов с трофическими язвами нижних конечностей, причина которых в большинстве случаев – венозная недостаточность [8; 10; 13; 16; 31; 45; 60; 121]. Доля трофических язв, возникающих на фоне патологии артериального русла, достигает 20% среди всех хронических ран [28; 82; 111]. До четверти пациентов с сахарным диабетом сталкиваются с синдромом диабетической стопы, 70% из них нуждаются в оперативном вмешательстве [14; 33; 56, 153]. Другими причинами осложненных раневых дефектов являются инфекции области хирургического вмешательства, вынужденное положение больных, аутоиммунные и онкологические заболевания, травмы, ожоги и ранения [12; 55; 109; 118; 147].

Основные принципы ведения пациентов с незаживающими ранами остаются неизменными и заключаются в компенсации фонового заболевания и проведении патогенетически обоснованного местного лечения [6; 59; 103; 130; 152]. Несмотря на применение множества методов локальной терапии, хронические раны по-прежнему требуют длительного лечения, при высокой вероятности рецидива и опасности генерализации инфекции [29; 48; 68; 138].

Среди методов физического воздействия на раневой процесс особую нишу занимают лазерные технологии [15; 19; 47; 132; 140]. Параметры высокоинтенсивного импульсного эрбиевого (Er:YAG) лазера, с длиной волны 2,94

мкм, предполагают возможность эффективно санировать раны, а также ускорять процессы заживления. Особый интерес представляет потенциальная возможность Er:YAG-лазера удалять детрит и разрушать микробные биоплёнки без повреждения жизнеспособных тканей, а также повышать функциональную активность клеток, формирующих грануляционную ткань [40; 75; 76; 92; 93;141].

**Степень разработанности темы исследования.** Высокоинтенсивный эрбиевый лазер, используемый преимущественно в челюстно-лицевой хирургии и эстетической медицине, обладает потенциалом для применения в отношении осложненных раневых дефектов. Между тем сведения о его использовании для лечения пациентов с длительно незаживающими ранами представлены небольшим числом публикаций. Отсутствуют данные о бактерицидном воздействии эрбиевого лазера в отношении биопленочных форм микроорганизмов, характерных для хронических раневых дефектов. Исследования фотобиологических эффектов, возникающих при воздействии оптического излучения на раны, связаны с ограничениями существующих доклинических моделей осложненного раневого процесса, что требует их адаптации к условиям конкретного исследования.

**Цель исследования:** оценить эффективность применения высокоинтенсивного эрбиевого лазера для лечения пациентов с длительно незаживающими ранами.

**Задачи исследования:**

1. Проанализировать результаты применения эрбиевого лазера для лечения пациентов с длительно незаживающими ранами различного генеза.
2. Разработать и апробировать экспериментальную модель трофической гнойной раны.
3. Изучить воздействие высокоинтенсивного эрбиевого лазера на осложнённый раневой процесс в ходе комплексного исследования в условиях эксперимента.

4. На основании морфологического анализа, на клеточном и ультраструктурном уровнях, выяснить характер изменений в экспериментальных ранах под влиянием высокоинтенсивного эрбиевого лазера.

**Научная новизна исследования.** На основании значительного клинического материала получены новые данные об особенностях применения высокоинтенсивного Er:YAG-лазера для лечения длительно незаживающих ран нижних конечностей различного генеза. В условиях эксперимента проведен сравнительный многофакторный анализ влияния Er:YAG-лазера на осложнённый раневой процесс. Разработана оригинальная модель трофической гнойной раны (Патент РФ на изобретение №2753955 от 26.01.2021г.), внедрены 3 рационализаторских предложения по улучшению методов контроля осложненного раневого процесса в эксперименте. Впервые на ультраструктурном уровне зафиксирован эффект воздействия высокоинтенсивного Er:YAG-лазера на раневую микрофлору, включая биопленочные формы, а также описаны морфо-функциональные изменения тканей в процессе заживления.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Проведенные исследования расширяют представления о воздействии оптического излучения на раневой процесс. Научно обоснован saniрующий эффект режима абляции Er:YAG-лазера (плотность мощности 10-15 Дж/см<sup>2</sup>, длительность импульса 100-500 нс, частота импульсов 2-4 Гц) в отношении детрита и раневой флоры без значимого повреждения жизнеспособных тканей. Подтверждены изменения функциональной активности клеток, приводящие к оптимизации течения раневого процесса при воздействии Er:YAG-лазера в режиме стимуляции регенерации (плотность мощности 1,8-4 Дж/см<sup>2</sup>, длительность импульса 100-500 нс, частота импульсов 2-4 Гц). Подобраны необходимые параметры лазерного излучения для исследований на лабораторных животных. Апробирована разработанная модель трофической гнойной раны, позволяющая изучать влияние различных факторов на осложнённый

раневого процесс. Оценена переносимость процедуры применения Er:YAG-лазера у пациентов с длительно незаживающими ранами.

**Методология и методы исследования.** Структура и организация работы определялись целью исследования и заключались в изучении клинической эффективности высокоинтенсивного Er:YAG-лазера для лечения длительно незаживающих ран и фундаментальных основ влияния такого рода оптического излучения на осложнённый раневой процесс.

Диссертационная работа носит клинико-экспериментальный характер. Объект клинической части исследования – пациенты с длительно незаживающими ранами нижних конечностей различного генеза. Экспериментальное исследование проведено на лабораторных животных. Работа выполнена в соответствии с принципами доказательной медицины, с использованием современных методов исследования и статистической обработки клинических и экспериментальных данных.

Диссертационное исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко».

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Применение высокоинтенсивного эрбиевого лазера в двух режимах позволяет улучшить результаты лечения длительно незаживающих ран.
2. Модель трофической гнойной раны обеспечивает стандартные воспроизводимые условия для проведения экспериментальных исследований.
3. Воздействие высокоинтенсивного эрбиевого лазера приводит к очищению и деконтаминации раневых дефектов, а также способствует последовательной смене фаз раневого процесса.
4. Анализ морфофункциональных изменений в ранах подтверждает способность высокоинтенсивного эрбиевого лазера удалять детрит и разрушать микробные биоплёнки без повреждения жизнеспособных тканей, а также повышать активность клеток, формирующих грануляционную ткань.

**Личный вклад автора в результаты исследования.** Автор лично участвовал во всех этапах научной работы: составление обзора литературы, формулирование цели и задач диссертации, планирование дизайна исследования, выполнение экспериментальной и клинической частей исследования. Самостоятельно разработана и запатентована модель трофической гнойной раны, с использованием которой был выполнен эксперимент на 90 лабораторных животных. В ходе клинической работы автор непосредственно принимал участие в лечении 70% пациентов, а также изучал результаты всех проведённых исследований. Самостоятельно проведена статистическая обработка данных, обобщены и интерпретированы результаты экспериментального и клинического исследований, сформулированы общие выводы.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность полученных данных определяется достаточным объёмом выборки, использованием современных методов статистического анализа.

По материалам диссертационного исследования опубликовано 18 научных работ, в том числе 8 статей в журналах из перечня Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, получены 1 патент на изобретение и 3 рационализаторских предложения. Основные положения диссертации обсуждены на выездном Пленуме Российского общества хирургов «Актуальные вопросы хирургии» (г. Махачкала, 2019 г.); на VI Съезде хирургов Юга России с международным участием, посвященном 100-летию со дня рождения члена-корреспондента РАМН, профессора П.П. Коваленко (г. Ростов-на-Дону, 2019 г.); на XIII Съезде хирургов России, (г. Москва, 2020 г.); на Международной научно-практической конференции «Хирургическая обработка и биофизические методы лечения ран и гнойно-некротических очагов у детей и взрослых» (г. Москва, 2021 г.); на научно-практической конференции «Актуальные вопросы последипломной подготовки военных хирургов» (г. Москва, 2021 г.); на научно-практической конференции «Декабрьские научные чтения, посвященные

академикам А.В. Вишневскому и А.А. Вишневскому» (г.о. Красногорск, 2022 г.); на XV Съезде хирургов России совместно с IX Конгрессом московских хирургов (г. Москва, 2023 г.).

Результаты исследования внедрены в практическую работу Национального медицинского исследовательского центра высоких медицинских технологий – Центрального военного клинического госпиталя имени А.А. Вишневского, а также используются в учебном процессе на кафедре хирургии с курсом онкологии и лучевой диагностики Филиала Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова в г. Москве.

**Объём и структура диссертации.** Диссертация изложена на 114 страницах компьютерного текста, Работа со-стоит из введения, четырех глав, включающих обзор литературы, главы о материалах и методах исследования, двух глав собственного исследования, а также заключения, выводов и практических рекомендаций, содержит 42 рисунка, 14 таблиц. Список литературы включает 155 источников, из них 63 отечественных и 92 иностранных.

## ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Согласно современным представлениям, длительно незаживающей или хронической раной является такой дефект мягких тканей, который не заживает в течение периода, нормального для ран подобного типа и локализации. Продолжительность этого периода, по мнению разных авторов, может различаться и составлять от четырёх недель до трёх и более месяцев [29; 99; 104; 114; 138].

Затяжной характер регенерации длительно незаживающих ран обусловлен затруднением последовательной смены фаз раневого процесса, которые могут протекать параллельно и вместе с тем недостаточно эффективно. Одновременное присутствие в ране провоспалительных и анаболических факторов значительно снижает противомикробный потенциал и тормозит процессы своевременного заживления [63; 99; 114; 137]. Такие изменения возникают в связи с локальными нарушениями микроциркуляции и иннервации на фоне различных патологий [58; 65; 101; 136; 146].

В первую очередь длительно незаживающие раны встречаются в виде язв у пациентов с заболеваниями периферических сосудов и сахарным диабетом, что подтверждается многочисленными исследованиями. Повышенное содержание медиаторов воспаления наблюдается в экссудате, полученном из венозных язв [58; 117]. Гипергликемия может приводить к нарушению иммунных реакций, что значительно повышает риск присоединения вторичной инфекции. Кроме того, гликирование белков нарушает их структуру и функцию, что ведет к развитию микрососудистых осложнений сахарного диабета [5; 69].

Причинами неадекватной трофики тканей могут быть травмы, ожоги, аутоиммунные заболевания, неврологические нарушения, вынужденное положение, пожилой возраст, сердечная недостаточность, опухоли и лучевая терапия [29; 109; 118; 147].

Снижение миграции гранулоцитов в рану на фоне неадекватного кровоснабжения уменьшает активность фагоцитоза и снижает количество стимулов, направленных на клетки эндотелия. В результате недостаточного

поступления гуморальных факторов и иммунокомпетентных клеток наблюдается замедленное очищение раны и снижение скорости пролиферации фибробластов [90; 70; 128]. В первую очередь это происходит вследствие уменьшения количества моноцитов и тканевых макрофагов, ответственных за выработку цитокинов и некоторых факторов роста. К последним относят трансформирующий фактор роста-альфа (ТФР- $\alpha$ ), эпидермальный фактор роста (ЭФР), основной фактор роста фибробластов (оФРФ). В норме они выполняют роль активаторов синтеза внеклеточного матрикса, стимулируют эпителизацию и рост новых сосудов [9; 77; 124; 132].

Одним из важнейших факторов, стимулирующих ангиогенез и созревание грануляционной ткани, является сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF). Снижение его концентрации в трофических язвах приводит к уменьшению аэрации тканей и замедлению анаболических процессов [65; 131; 149]. Другой причиной хронизации раневого процесса является изменение протеазной активности. С переходом во II фазу раневого процесса в ране происходит уменьшение выработки матриксных металлопротеиназ (ММП) под влиянием роста концентрации их ингибиторов [84; 90; 91; 108]. Недостаток этих ингибиторов, наблюдаемый в трофических язвах, приводит к повышению протеолитической активности в отношении фибронектина и других компонентов экстрацеллюлярного матрикса [94; 98; 125; 150]. В результате не происходит адекватного взаимодействия фибробластов, миофибробластов и внеклеточных элементов, что препятствует сближению краёв дефекта мягких тканей.

В длительно незаживающих ранах наблюдается общее снижение митотической активности по сравнению с острыми ранами. Клетки соединительной ткани при этом становятся менее подвижными и невосприимчивыми к воздействию стимулирующих факторов [20; 133; 150].

На фоне вышеописанных процессов происходит накопление некротических масс в ране и усиление бактериальной нагрузки, что способствует формированию порочного круга вследствие поддержания воспалительного процесса. Первопричиной трудного заживления может служить высоковирулентная флора,

способная создавать биоплёнки в ране и обладающая резистентностью ко многим противомикробным препаратам [14; 22; 144; 151]. Устойчивость таких бактериальных сообществ обусловлена компонентами их межклеточного вещества и специальными клетками-персисторами, количество которых невелико (менее 0,1%), но именно они ответственны за возникновение резистентных штаммов, вызывающих хроническое воспаление [143; 148]. Происходит это посредством горизонтального переноса в матриксе биопленки генетического материала, содержащего информацию об устойчивости бактерий [80]. Чувствительность такой раневой инфекции к антимикробным средствам может снижаться на несколько порядков [143; 144; 148].

Таким образом, формирование незаживающих ран – сложный и многофакторный процесс. Фоновые заболевания приводят к нарушению локальной трофики тканей, дисбалансу взаимодействия клеточных элементов, цитокинов и факторов роста. В результате раневой процесс теряет упорядоченность, и на фоне персистирования патогенов возникает длительно незаживающий дефект мягких тканей.

Основными характеристиками длительно незаживающих ран являются экссудация, наличие устойчивой инфекции и некроза. Полиэтиологичный характер таких ран объясняет отсутствие универсальной классификации. D.R. Knighton (1986) предложена классификация длительно незаживающих ран по глубине поражения: 1 стадия – поверхностная язва (эрозия) в пределах дермы; 2 стадия – язва достигающая подкожной клетчатки; 3 стадия – поражение фасций; 4 стадия – поражение мышц; 5 стадия – поражение сухожилий, связок и костей; 6 – стадия поражение органов и тканей полостей туловища [78]. По площади поверхности раны различают: малые – до 5 см<sup>2</sup>, средние – от 5 до 20 см<sup>2</sup>, обширные (гигантские) – свыше 50 см<sup>2</sup> [29].

Для описания условий возникновения венозных язв находит применение классификация хронической венозной недостаточности CEAP. При облитерирующем атеросклерозе артерий нижних конечностей гнойно-некротические изменения тканей соответствуют IV степени хронической ишемии

по классификации Фонтейна-Покровского. У больных с синдромом диабетической стопы выраженность поражения определяется с помощью классификации Wagner или классификации Техасского университета [1; 14; 53; 55; 89; 145].

Система MEASURE включает основные параметры, используемые для оценки процесса заживления: M (Measure) – измерение размеров раны, E (Exudate) – характеристика отделяемого, A (Appearance) – внешний вид раневого дефекта, S (Suffering) – интенсивность болевого синдрома, U (Undermining) – степень деструкции тканей, R (Reevaluate) – регулярный контроль всех параметров, E (Edge) – состояние краев раны [53; 83].

Выбор оптимального метода лечения длительно незаживающих ран определяется результатами оценки признаков той или иной фазы раневого процесса. К основным методам диагностики относят визуальное описание раневых дефектов, планиметрию, термометрию, клинический анализ периферической крови, бактериологическое и цитологическое исследования. Морфологическое исследование биоптатов из раны чаще всего проводится в научных целях и дополняется в некоторых случаях иммуногистохимическим анализом или электронной микроскопией.

Современные представления о патофизиологии длительно незаживающих ран и особенностях механизмов репарации тканей на фоне различных заболеваний дают основу для поиска и внедрения патогенетически обоснованных и эффективных методов общего лечения и локальной терапии.

Лечение длительно незаживающих ран является весьма сложной клинической задачей и требует в первую очередь компенсации проявлений первичных заболеваний. Это может достигаться путем нормализации углеводного обмена, улучшения регионарного кровообращения, устранения венозного застоя и прекращения воздействия различных повреждающих факторов. Если не удастся компенсировать влияние первичной патологии, то даже при интенсивном лечении раневой процесс может длительно поддерживаться, а в случае заживления - часто рецидивировать [29; 48].

В основе местного лечения длительно незаживающих инфицированных ран лежит решение нескольких задач: очищение от детрита и некротических тканей, подавление возбудителя инфекции и стимуляция процессов заживления раневого дефекта. Достигается это различными способами, но в каждом случае требуется соблюдение основных принципов: 1) проведение различных манипуляций и терапии в соответствии с преобладающей фазой раневого процесса; 2) приоритет выполнения хирургической обработки раны по сравнению с консервативными методами; 3) комплексное воздействие на все звенья патогенеза раневой инфекции [29; 48; 59].

Подходы, применяемые к лечению длительно незаживающих ран, со временем претерпевали изменения и формулировались в виде различных теорий. В 1962 году был предложен принцип заживления ран во влажной среде (Moist Wound Healing). Концепция получила своё развитие после внедрения в практику мазей на водорастворимой основе, показавших преимущества в сравнении с сухими повязками и средствами на липофильной основе. Стратегия неоднократно пересматривалась, однако не потеряла актуальности [21; 42; 44; 73; 152, 119; 127; 130].

В 2002 г. V. Falanga предложил теорию подготовки раневого ложа (Wound Bed Preparation), ставшую общепринятой стратегией лечения хронических ран. Последовательность и объем проводимых мероприятий описывается системой TIME: Т (Tissue) удаление нежизнеспособных тканей; I (Infection) подавление инфекции; М (Moisture) контроль уровня раневой экссудации; Е (Epitelial) оценка состояния краев раны и стимуляция эпителизации [152]. Подход применим к лечению незаживающих ран вне зависимости от их происхождения и лежит в основе ряда более узких стратегий, таких, как рекомендации международной рабочей группы по диабетической стопе [134].

Раневой детрит и фибринозный налёт служат благоприятной питательной средой для бактерий, поддерживают воспаление и выступают в качестве механического барьера для регенерации тканей и контракции краев ран [139]. В связи с этим очищение (дебридмент) раны является одним из основных элементов

лечения в первой фазе раневого процесса. Удаление гнойного экссудата, фибринозных напластований, некрэктомиа и санация раневых поверхностей проводятся чаще всего «острым путём» по принципу повторной хирургической обработки. Учитывая фоновые трофические нарушения, очищение хронических ран должно проводиться максимально атравматично. Вместе с тем некрэктомиа должна выполняться с позиций анатомичности, с формированием единой раневой поверхности, пригодной для дальнейшего пластического замещения [11]. Несмотря на многообразие различных способов очищения ран, традиционная хирургическая обработка не теряет своей актуальности [48; 87; 116].

Новые методы очищения раневой поверхности могут дополнять технику хирургической обработки ран и даже служить ее альтернативой.

К физическим методам очищения ран относятся: обработка ран пульсирующей струей жидкости, ультразвуковая кавитация, терапия отрицательным давлением, радиочастотная абляция, диатермо- и криодеструкция, высокоинтенсивное лазерное воздействие и другие [15; 29; 32; 48; 49; 59; 66; 72; 95; 115].

Для химических методов очищения ран характерно применение веществ, обладающих гидрофильными, некролитическими и антибактериальными свойствами [21; 29; 48; 62; 105; 110].

Биологические методы некрэктомии и санации гнойных ран применяются реже в силу их специфичности. Среди них стоит отметить применение личинок насекомых (maggot therapy), а также использование бактериофагов, интерес к которым в последнее время значительно возрастает [4; 113; 123].

После очищения ран от детрита и нежизнеспособных тканей основной задачей становится стимуляция регенераторных механизмов, начало которых свидетельствует о переходе во вторую фазу раневого процесса. Среди применяемых на данном этапе методов наибольшее распространение получили: гипербарическая оксигенация, озонотерапия, обработка плазменными потоками, низкоинтенсивное лазерное излучение, фотодинамическая терапия, введение тромбоцитарной аутоплазмы, многочисленные раневые покрытия, а также

применение продуктов клеточных технологий и факторов роста [7; 29; 30; 47; 50; 127].

Лазер (LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) определяется как генератор электромагнитного излучения ультрафиолетового, видимого и инфракрасного участков спектра. Основными свойствами такого вида излучения является монохроматичность (одинаковые длины волн), когерентность (одинаковая волновая частота), направленность (высокая сфокусированность пучка излучения). Приоритет в создании лазера принадлежит отечественным ученым Н.Г. Басову и А.М. Прохорову. За эту разработку в 1964 им, а также американскому ученому Ч. Таунсу присуждена Нобелевская премия по физике. Практически сразу после этого оптическое излучение стало применяться в различных сферах медицины. Наряду с зарубежными коллегами, активное участие в создании и внедрении лазерных хирургических методик приняли видные деятели отечественной медицины: А.А. Арапов, Е.И. Брехов, А.А. Вишневский, Н.Ф. Гамалея, А.И. Головня, С.Д. Плетнев и многие другие. Особый вклад в развитие лазерных медицинских технологий внесен О.К. Скобелкиным и сформированной им научной школой [23].

Специфика биологических эффектов, возникающих в тканях, во многом зависит от типа используемого излучателя и его мощности. Тип излучателя определяется видом активной среды, где под воздействием источника накачки происходит генерация оптических волн с определенными характеристиками. Различают лазеры с газовыми (углекислотный, гелий-неоновый, эксимерный и др.), жидкостными (на различных красителях), твердотельными (эрбиевый, гольмиевый, неодимовый и др.) и полупроводниковыми активными веществами. Излучатели на твердых телах обычно имеют сложную структуру, в которой носителем ионов активных веществ служит кристаллический стержень (рубин, alexandrit, гранат или их синтетический аналог). Многочисленные комбинации активных химических элементов и различных кристаллов создают большое количество разновидностей лазеров со спектром волн от ультрафиолетового ( $\lambda \sim 150$  нм) до дальнего инфракрасного ( $\lambda \sim 300$  мкм) излучения [3; 19; 40].

По мощности медицинские лазеры подразделяют на низкоинтенсивные (от 1 до 5 мВт), средней мощности (от 6 до 500 мВт) и высокоинтенсивные (более 500 мВт). Первые два типа позволяют реализовать биостимулирующее воздействие и используются преимущественно для физиотерапевтических или диагностических процедур. Высокоинтенсивные лазеры обладают деструктивными свойствами и применяются для коагуляции, рассечения и выпаривания мягких тканей проблемной области.

Поскольку энергетические характеристики лазеров зависят в том числе и от временных показателей, то немаловажным аспектом является режим генерации излучения. Различают непрерывный, импульсный и смешанный режимы генерации оптических волн. Непрерывное излучение обеспечивается постоянной накачкой активного вещества, длительность воздействия на биологические ткани в этом случае составляет от секунды и более. Импульсные лазеры обладают способностью фракционного воздействия на биологические ткани. Длительность одиночного импульса при этом может быть минимальной, вплоть до наносекундного диапазона. Энергия, передаваемая тканям в такой короткий промежуток времени, колоссально увеличивает мощность излучения [3; 27; 40].

Первые сообщения о применении лазеров в гнойной хирургии относятся к семидесятым годам прошлого столетия и в большинстве случаев отражают опыт использования высокоэнергетических лазерных систем для бескровного рассечения тканей. Возникающие фотобиологические эффекты, не противореча принципам активной хирургической тактики, обеспечивали возможность удалять гнойно-некротические массы с поверхности ран, уменьшать экссудацию, оптимизируя тем самым процессы заживления. С другой стороны после такого воздействия оставались зоны коагулированных тканей, что в определенной степени тормозило заживление раневых дефектов [19; 44].

Применяемое в современных условиях низкоинтенсивное лазерное излучение в диапазоне от 0,3 до 1,55 мкм с плотностью мощности до 100 мВт/см<sup>2</sup> вызывает комплекс фотохимических реакций, вызывающих возбуждение электронов в молекулах биосубстрата. Происходящее при этом обратимое

изменение пространственной конфигурации мембран клеток и молекул ферментов воздействует на их функциональную активность. За счёт неспецифических фототермических реакций улучшается микроциркуляция в области воздействия.

В некоторых экспериментальных работах показано, что процессы регенерации ран под воздействием низкоинтенсивного лазерного излучения проходят все стадии, однако длительность каждой из них сокращается. Происходит уменьшение нейтрофильной инфильтрации и стимулируется синтез межклеточного матрикса. При этом количество капилляров на единицу площади ткани увеличивается в 1,5 раза по сравнению с группами контроля [34].

Показано, что различные режимы низкоинтенсивного лазерного излучения при трофических язвах приводят к раннему появлению зрелых грануляций и ускоренному заживлению раневых дефектов. К преимуществам метода относят простоту применения, безболезненность, компактность и доступную цену оборудования. Ограничениями использования низкоинтенсивного лазерного излучения являются активный воспалительный процесс и онкологические заболевания. Применение метода после полноценной хирургической обработки ожидаемо приводит к положительным результатам лечения ран во второй фазе раневого процесса [24; 132; 140;]. По данным клинических, планиметрических и морфологических исследований, было показано улучшение микроциркуляции, усиление фагоцитоза, стимуляция пролиферации фибробластов, созревание грануляционной ткани и ускорение эпителизации раневых дефектов после сочетанного применения КВЧ-терапии и низкоинтенсивного инфракрасного лазера [26].

При правильном соблюдении определенных факторов, таких как дозировка, потребляемая мощность, время и интервал между сеансами, лазерная терапия низкой и средней мощности способствует сокращению фазы воспаления, благоприятствуя ангиогенезу и выработке компонентов внеклеточного матрикса, а также его организации, и может расцениваться как эффективный метод при заживлении ран [85; 106]. В ряде исследований было отмечено увеличение

количества фибробластов, сосудистых факторов роста, металлопротеиназ и некоторых цитокинов, влияющих на течение раневого процесса [88; 140].

D. Tang et al. (2023 г.) показали, что низкоинтенсивное лазерное облучение может способствовать заживлению хронических ран и облегчать боль в ранах. В исследование были включены 89 пациентов с хроническими ранами. По сравнению с группой, получавшей традиционную терапию, применение диодного лазера (810 нм) способствовало сокращению времени заживления ран и уменьшению индекса боли [135].

В исследовании, проведенным Lu Q. et al. в 2021 г., оценили эффекты лазерной терапии у пациентов с хроническими ранами при использовании полупроводникового неодимового лазера в режиме биостимуляции. Параметры воздействия ( $\lambda=1064$  нм, мощность 8 Вт) обеспечивали высокую плотность энергии с эффективным проникновением излучения в более глубокие ткани-мишени без перегрева раневой поверхности. В результате отмечено уменьшение воспалительного процесса, увеличение синтеза коллагена, что позволило сократить время заживления ран. Авторы ссылаются на данные о том, что длина волны лазера 1064 нм обеспечивает фотобиомодуляцию, вызывая увеличение потребления кислорода, синтеза эндогенной АТФ и скорости деления клеток [79].

Суть метода фотодинамической терапии, нашедшего применение в гнойной хирургии, заключается в последовательном введении фотосенсибилизатора, обладающего селективным сродством к клеткам возбудителя, с последующей обработкой раневого дефекта низкоинтенсивным оптическим излучением. В результате происходит выделение активных форм кислорода, повреждение клеточных мембран, изменение ферментативной активности и стимуляция фагоцитоза, что в совокупности активизирует процессы клеточного апоптоза, приводя к массовой гибели бактерий в ране [18; 36; 52; 54; 57; 64; 86; 155].

Одними из первых сообщений о применении высокоинтенсивных лазеров для лечения гнойных ран были работы О.К. Скобелкина [19]. В последующем успех применения высокоэнергетических излучателей в гнойной хирургии неоднократно подтверждался данными экспериментов и клинических испытаний [17; 40; 46].

Наибольшее распространение получили аргоновый, углекислотный, неодимовый, эрбиевый, эксимерный и некоторые другие виды лазеров высокой мощности. Основным принципом действия высокоинтенсивных лазеров основан на поглощении оптических волн биологическими тканями с последующим преобразованием электромагнитного излучения в тепло. Интенсивность такого преобразования определяет характер изменений, наблюдаемых в области воздействия. Величина энергии, переданной тканям, пропорциональна степени нагрева субстрата. При повышении температуры до 45°C возникает отек обратимого характера. Нагревание до 60°C вызывает денатурацию белка и формирует зону коагуляции. При 100°C возникает обезвоживание тканей, а при 150°C – карбонизация с образованием зоны обугливания. Эффект абляции или выпаривание тканей становится возможным при увеличении температуры свыше 300°C. В этом случае реализуется фотодеструктивный эффект, позволяющий использовать лазер в качестве оптического скальпеля. При лечении гнойных ран с помощью лазерной абляции можно производить некрэктомию и санацию раневой поверхности [40; 41; 122; 154].

Характер воздействия на ткани определяется не только мощностью лазера, но также зависит от волновых характеристик и режимов генерации излучения, что необходимо учитывать в разных клинических ситуациях. Монохромное излучение определенной длины волны может интенсивно поглощаться целевым субстратом (хромофором), вызывая максимальное высвобождение энергии и, следовательно, термодеструкцию. К примеру, основным хромофором для углекислотного (CO<sub>2</sub>) лазера ( $\lambda=10,6$  мкм) является вода. По этой причине такой тип лазеров чаще применяется для бесконтактного рассечения и удаления массива мягких тканей. Для неодимового (Nd:YAG) лазера ( $\lambda=1,06$  мкм) хромофором служит гемоглобин, поэтому он успешно используется в качестве бесконтактного коагулятора [3; 40; 154].

Высокоинтенсивные лазеры, эффективно очищая гнойные раны от детрита и микробной флоры, превосходят многие другие методики по своему saniрующему

эффекту. В исследовании Ю. А. Седова (2007 г.) с применением углекислотного лазера удавалось достичь стерильности ран более чем в 90% случаев [46].

Известны варианты совместного применения хирургического и физиотерапевтического режимов излучения. В одном из клинических исследований проводилось комбинированное воздействие углекислотного и гелий-неонового лазеров на раны у 164 больных с гнойными осложнениями сахарного диабета. Наблюдалось более быстрое очищение и начало краевой эпителизации ран по сравнению с группой, получавшей стандартное лечение [61].

С появлением импульсных лазеров на иттрий-алюминиевом гранате, легированном эрбием (Er:YAG), обладающих необходимыми абляционными характеристиками и минимальным, либо полностью отсутствующим, эффектом карбонизации, связаны перспективы в лечении различной патологии кожи и мягких тканей, в том числе длительно незаживающих ран.

Длина волны Er:YAG-лазера составляет 2,94 мкм, что приходится на пик спектра поглощения воды. Таким образом, коэффициент поглощения такого излучения мягкими тканями максимален, а возникающий эффект фотодеструкции превышает даже углекислотный лазер [81].

Другой важной особенностью Er:YAG-лазера является возможность генерации отдельных импульсов в наносекундном (100-500 нс) диапазоне, что позволяет значительно увеличить мощность передаваемой энергии. При плотности мощности до 20 Дж/см<sup>2</sup> происходит моментальный нагрев биологических тканей до 300 °С и их выпаривание (абляция). Импульсный режим работы Er:YAG-лазера с частотой (2-4 Гц) позволяет прецизионно удалять биологический субстрат на заданную глубину (~ 50 мкм за 1 импульс) без визуальных признаков повреждения подлежащих тканей. Это обусловлено кратковременностью импульса, в результате чего окружающие ткани не успевают принять тепло от испарившегося участка [3; 40; 154].

Излучатели, работающие в непрерывном режиме, не способны к столь быстрому нагреву субстрата. По этой причине углекислотный и многие другие лазеры оставляют зоны нежизнеспособных тканей (карбонизации, обезвоживания,

коагуляции) в области воздействия, что значительно тормозит процессы заживления (рис.1.1).

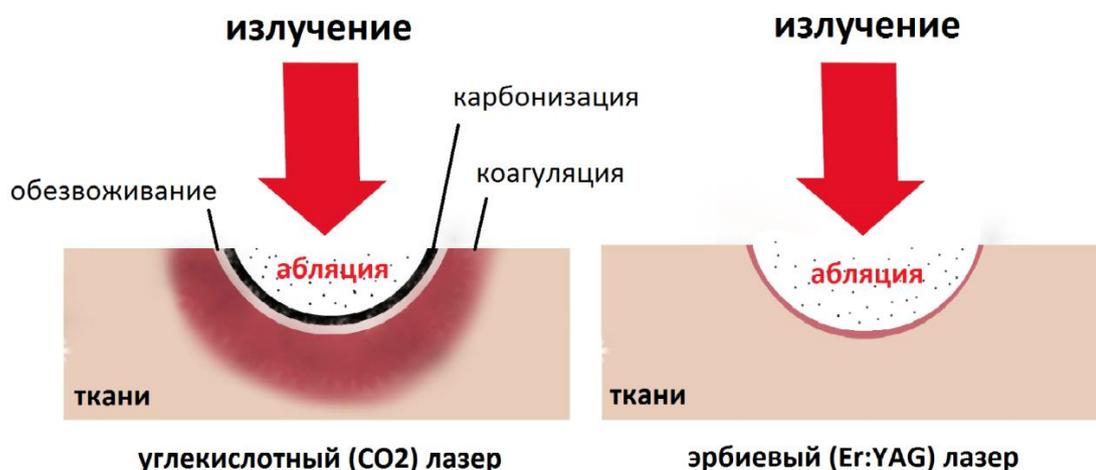


Рисунок 1.1 – Сравнение воздействия на ткани CO<sub>2</sub>-лазера и Er:YAG-лазера

Наряду с возможностью оптического дебридмента, в Er:YAG-лазере существует возможность работы в более «мягком» режиме стимуляции регенерации. Это достигается за счет рассеивания светового пучка с помощью специальной насадки и уменьшения плотности мощности ( $<5 \text{ Дж/см}^2$ ). В результате такого излучения происходят множественные микроабляции на поверхности тканей. Возникшие за счет этого акустические волны распространяются на глубину до 6 мм, образуя в тканях участки микросотрясения и микродеструкции (рис. 1.2).

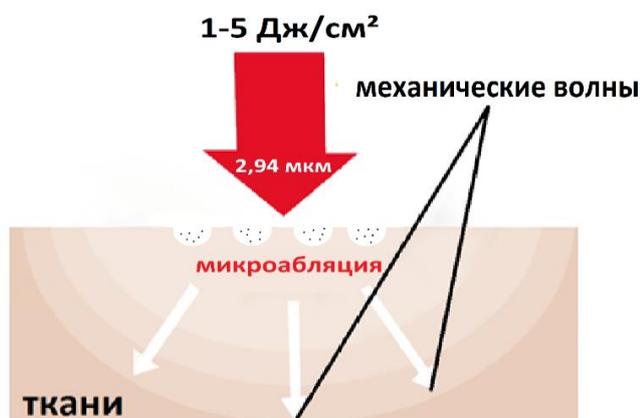


Рисунок 1.2 – Воздействие на ткани Er:YAG-лазера в режиме стимуляции регенерации

В результате происходит активация ферментов, повышение активности нейтрофилов, макрофагов и фибробластов, а также улучшается микроциркуляция в зоне воздействия [40].

Отмечены клинические случаи, в которых после применения многочисленных методов лечения длительно незаживающая рана продолжала существовать, но стимулирующее воздействие Er:YAG-лазера приводило к должному результату [71].

В некоторых исследованиях сообщается о молекулярных изменениях и усиленной экспрессии генов, влияющих на анаболические процессы, после применения Er:YAG-лазера в режима стимуляции регенерации [112].

Примечательно, что микродефекты тканей, возникшие после обработки лазером в стимулирующем режиме, не подвергаются фиброзу, а заменяются функциональными клетками. Это было продемонстрировано в экспериментальном исследовании, проведенном на 70 крысах. Воздействие Er:YAG-лазера на модель цирроза печени приводило к появлению признаков регенерации клеток, сокращению количества соединительной ткани и уменьшению признаков портальной гипертензии [39].

В другом исследовании была оценена эффективность Er:YAG-лазера при лечении гипертрофических рубцов в эксперименте. Модель послеожогового рубца была выполнена на красных свиньях, после чего применялись различные методы лазерной обработки. В результате более эффективным методом оказалась обработка рубцовых тканей Er:YAG-лазером по сравнению с углекислотным. Происходило более выраженное ремоделирование рубца, в тканях увеличивалось содержание матричных металлопротеиназ, а также белка декорина, угнетающего гиперпродукцию соединительной ткани [67]. Положительные результаты были отмечены и в некоторых клинических наблюдениях [126; 142].

Можно предположить, что аналогичные процессы могут происходить при обработке Er:YAG-лазером кожных краев длительно незаживающих ран, где увеличение количества функционально активных клеток приводит к ускоренной контракции и уменьшению размеров дефекта за счёт краевой эпителизации.

В свою очередь лазерная обработка тканей в режиме стимуляции усиливает продукцию компонентов грануляционной ткани, что было подтверждено в некоторых экспериментальных и клинических работах. При воздействии высокоинтенсивного Er:YAG-лазера на модель раны у крыс наблюдалось увеличение количества коллагена I и III типов, а также уменьшение сроков заживления в сравнении с группами, в которых лазерное излучение не применялось [129]. Похожие изменения в виде усиленного синтеза коллагеновых волокон, увеличения количества тропоэластина и утолщения эпидермиса были отмечены в одном клиническом исследовании при обработке Er:YAG-лазером здоровых участков кожи у двенадцати добровольцев [98].

В исследовании, проведённом на базе испанской клиники Viamed Monagal, было отобрано 18 пациентов, страдающих трофическими язвами нижних конечностей различной этиологии при сроках не менее одного года. Воздействие Er:YAG-лазера на раны осуществлялось в режиме абляции, а после очищения раневой поверхности в режиме стимуляции регенерации. Оценивали скорость заживления язв, проводили морфологический анализ и определение степени болевого синдрома до и после лечения. В результате после 16 процедур заживление наступило более чем у половины больных. В структуре тканей отмечали исчезновение поверхностного детрита, формирование новых волокон коллагена, обилие противовоспалительного инфильтрата с множественными полиморфноядерными клетками, базофильными клетками и четкой неформацией новых капилляров. Пациенты удовлетворительно переносили процедуру и отмечали снижение болевого синдрома [141].

В одном из недавних исследований проведен анализ результатов лечения диабетических язв высокоинтенсивным Er:YAG-лазером у 59 пациентов с 2017 г. по 2023 г. Аппарат применялся в двух стандартных режимах, а количество сеансов достигало 11. В результате размеры раневых дефектов уменьшались с каждым сеансом применения лазера. К концу лечения диабетические язвы полностью зажили, что свидетельствовало об эффективности двухрежимного применения лазерного воздействия [76].

В 2019 г. М. J. Johnson et al. изучили воздействие Er:YAG-лазера на диабетические язвы, не поддающиеся стандартному лечению. Лечение Er:YAG-лазером состояло из 2 компонентов (санации и стимуляции) и к 12 неделе привело к заживлению 50% ран [93].

Е. Caliskan et A. Botsali (2022 г.) оценили результаты лечения Er:YAG-лазером гетерогенной группы пациентов с хроническими ранами. При этом отмечена деликатность обработки в отношении грануляционной ткани. Использование двух режимов лазера способствовало заживлению ран, в том числе на фоне артериопатии голени [75].

Najhosseini V. et al. (2020 г.) на основании клинического исследования, оценивающего боль во время хирургической санации, размеры ран до и после обработки, бактериальную нагрузку и предпочтения пациента, делают вывод о том, что Er: YAG лазер служит многообещающей технологией для лечения хронических ран в качестве потенциальной альтернативы стандартным способам санации [92].

В настоящее время наибольший опыт использования Er:YAG-лазера для лечения раневых дефектов (трофических язв, пролежней, посттравматических ран, осложненных лапаротомных и стернотомных ран) обобщен кафедрой трансплантологии Белорусской медицинской академии последипломного образования на базе Минского научно-практического центра хирургии, трансплантологии и гематологии. Анализ проведенной работы показал, что воздействие лазера в импульсном режиме позволило эффективно удалять нежизнеспособные ткани и санировать раневую поверхность с хорошим визуальным контролем. В комплексе со стимулирующим режимом удавалось уменьшить болевой синдром и сократить сроки заживления ран [38; 40].

Обобщая вышеизложенное, можно сделать вывод о перспективности применения Er:YAG-лазера для лечения раневых дефектов различного генеза, что обусловлено специальными физическими свойствами оптического излучения. Во-первых, импульсный режим абляции позволяет проводить дозированную некрэктомию и санацию раневой поверхности без формирования коагуляционных некрозов. Во-вторых, стимулирующий режим нормализует процессы заживления

ран, не вызывая фиброза тканей. При этом проведение процедуры не сопровождается дискомфортом, а болевой синдром уменьшается уже через несколько сеансов.

\*\*\*

Оптимальный подход к лечению длительно незаживающих (хронических) ран определяется сочетанием устранения или компенсации основных причинных факторов и эффективного локального лечебного воздействия на осложненный раневой дефект. В дополнение к основным задачам лечения, таким, как полноценная санация раны, следует рассматривать возможность регенераторной терапии ран. Такими возможностями обладает воздействие высокоинтенсивного Er:YAG-лазера, однако его влияние на осложнённый раневой процесс изучено недостаточно. Наряду с обоснованной необходимостью анализа клинических результатов применения Er:YAG-лазера, представляется важным изучить особенности его взаимодействия с тканями на ультраструктурном уровне как в режиме абляции, так в режиме стимуляции регенерации, что возможно только в эксперименте. В связи с этим для решения конкретных задач исследования возникает необходимость разработки экспериментальной модели, воспроизводящей патологию, приближенную к хроническим ранам. Все это стало основанием для проведения настоящего клинико-экспериментального исследования.

## ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Общая характеристика клинических данных

В основе клинической части работы лежат материалы Национального медицинского исследовательского центра высоких медицинских технологий – Центрального военного клинического госпиталя имени А.А. Вишневского Минобороны России, являющегося клинической базой Филиала Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова Министерства обороны в г. Москве.

В период с ноября 2018 года по декабрь 2021 года проведено проспективное когортное исследование, в котором проанализированы результаты лечения 144 пациентов. Среди них было 94 (65,3%) мужчины и 50 (34,7%) женщин, средний возраст составил  $55,8 \pm 13,3$  лет (от 27 до 84 лет). Протокол исследования одобрен на заседании комитета по этике ФГБУ «Главного военного клинического госпиталя им. Н.Н. Бурденко» Минобороны России.

Количество больных с различными формами СДС составило 75 (52,1%) человек, с венозными язвами 45 (31,3%) человек и с язвами на фоне облитерирующего атеросклероза 24 (16,7%) человека. У всех пациентов были длительно незаживающие раневые дефекты нижних конечностей, существующие от 3 до 53 месяцев.

Критериями исключения из исследования служили: острые инфекционные заболевания; острый гнойный процесс; тяжелое состояние и вынужденное положение больного; декомпенсация хронических заболеваний; онкологический диагноз; иммунодефицит; беременность; глубокие раны с труднодоступными зонами, а также использование других методов физического воздействия на раневой процесс.

Все пациенты получали современное стандартное лечение. Лечебная программа 1-й (основной) группы (71 пациент) отличалась применением высокоинтенсивного Ег:YAG-лазера для санации и стимуляции процессов заживления ран. Во 2-й группе (сравнения) у 73 пациентов раневые дефекты подвергались традиционной хирургической обработке (удаление фибрина,

некротических тканей «острым путём»). Период наблюдения составлял 30 суток, а лазерную обработку ран и перевязки осуществляли 3 раза в неделю.

Результаты лечения оценивали с помощью планиметрии раневых дефектов (см. раздел 2.5.1), качественных и количественных микробиологических исследований (см. раздел 2.5.2), а также цитологического анализа мазков-отпечатков (см. раздел 2.5.3). Выраженность болевого синдрома, обусловленного наличием трофических язв, оценивали с помощью 10-бальной визуально-аналоговой шкалы (ВАШ) боли, с опросом пациентов до лечения и в конце периода наблюдения. Переносимость процедуры применения высокоинтенсивного эрбиевого лазера и традиционной хирургической обработки сравнивали с помощью специальной 4-бальной шкалы (1-безболезненно, 2-легкая болезненность, 3-умеренная болезненность, 4-выраженная болезненность).

## 2.2 Параметры и методика применения эрбиевого лазера

Лазерная установка на базе платформы «Мультилайн» (Регистрационное удостоверение РФ №ФСЗ 2010/08046) представляет собой многофункциональное устройство, способное работать с использованием нескольких видов оптического излучения (рис. 2.1).



Рисунок 2.1 – Система «Мультилайн» и параметры излучения высокоинтенсивного Er:YAG-лазера (1 – манипулятор; 2 – лазерные излучатели; 3 – контрольная панель; 4 – стыковочный узел; 5 – выносной Er:YAG-лазер).

В состав системы входят высокоинтенсивные: рубиновый, alexandритовый, неодимовый и эрбиевый лазеры. Конструкция прибора включает контрольную панель, стыковочный узел, специальный манипулятор и набор из нескольких выносных лазерных излучателей. В контрольной панели находится система охлаждения и система управления, состоящая из компьютера и сенсорного экрана для отображения данных и управления режимами аппарата. Через стыковочный узел к контрольной панели подключается один из излучателей в зависимости от клинической необходимости.

Исходя из задач настоящего исследования, применяли только Er:YAG-лазер, параметры излучения которого представлены на рисунке 2.1. Принципиальная схема генерации светового пучка не отличается от большинства других твердотельных лазеров и включает в себя кристалл активного вещества (алюмоиттриевый гранат, активированный ионами эрбия), источник накачки и зеркала резонатора, заключенные в единый корпус (рис. 2.2).

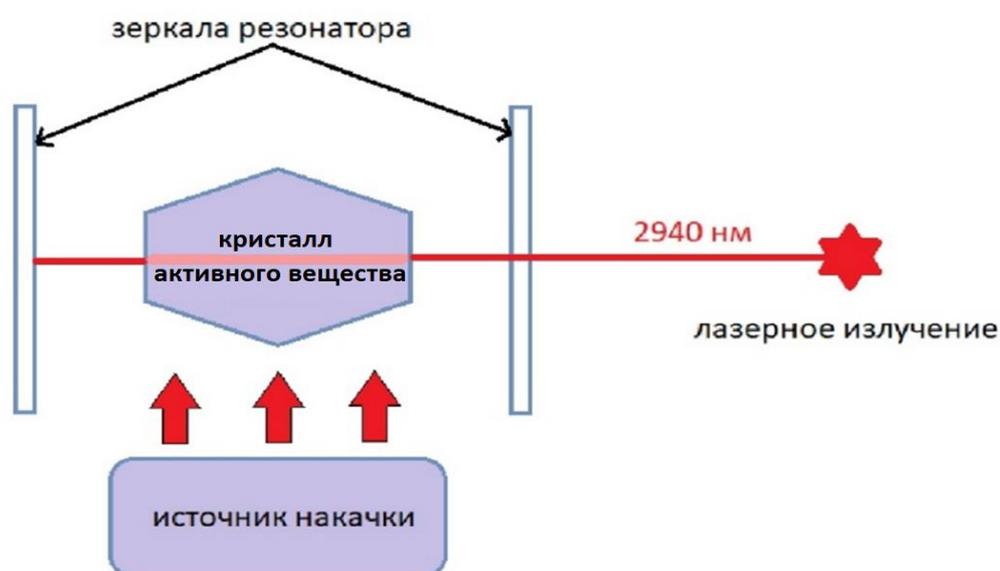


Рисунок 2.2 – Схема генерации излучения Er:YAG-лазером

Er:YAG-лазер применяли с использованием двух основных режимов: абляции и стимуляции регенерации.

Режим абляции применяли для обработки раневых дефектов с целью их санации, удаления фибрина и участков некроза. Плотность мощности излучения

при этом составляла 15 Дж/см<sup>2</sup>. Абляцию проводили до очищения раневых поверхностей, которое, как правило, наступало через несколько процедур.

Режим стимуляции регенерации применяли с целью нормализации процесса заживления незаживающих ран. Для этого к излучателю подключали специальный модуль и уменьшали плотность мощности до 4 Дж/см<sup>2</sup>. Данный режим применяли с первых суток и до конца периода наблюдения.

Частота импульсов в обоих режимах составляла 2-4 Гц. Лазерную обработку проводили через день, в среднем 3 раза в неделю. В ходе проведения процедуры, с целью защиты глаз использовали специальные защитные очки, а для поглощения испарений применяли дымоулавливатель (рис. 2.3).



Рисунок 2.3 – Процесс применения высокоинтенсивного Er:YAG-лазера у пациентки с диабетической язвой

### **2.3 Характеристика экспериментальных исследований**

Экспериментальная часть в виде сравнительного исследования на животных выполнена на базе экспериментальной лаборатории ФГБУ «Главного военного клинического госпиталя им. Н.Н. Бурденко» Минобороны России в период с апреля по июль 2019 года.

Для эксперимента были отобраны здоровые нелинейные белые крысы (самцы) массой от 180 г до 210 г – всего 90 животных. Из них 10 были использованы в пилотном исследовании для апробации модели раны и подбора необходимых режимов работы лазерного аппарата.

В эксперименте применяли один из стандартных вариантов наркоза (Кетамин 5% 0,1-0,2 мг/кг в/м; Реланиум 0,5% 0,1-0,2 мг/кг в/м; Дроперидол 0,25% 0,15-0,2 мг/кг в/м).

Все манипуляции выполняли с соблюдением требований «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 1986 г.), декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (Хельсинки, 2000 г.), а также в соответствии с требованиями приказа №267 МЗ РФ от 19.06.2003 г. «Правила по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных». Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «Главного военного клинического госпиталя им. Н.Н. Бурденко» Минобороны России.

Животные были разделены на четыре группы, по 20 в каждой. В 1-й (контрольной) группе лечебные средства не применяли, а в раневой дефект закладывали марлевую салфетку 2,0×2,0 см, смоченную 0,9% раствором хлорида натрия. Во 2-й группе аналогичным образом в экспериментальные раны закладывали салфетку, смоченную антисептиком (0,1% р-р полигексанида). В 3-й группе применяли высокоинтенсивный Er:YAG-лазер в двух режимах по специально разработанной методике, суть которой заключалась в уменьшении мощности излучения с учетом размеров животного. В 4-й группе аналогичным образом проводили лазерную обработку раны, а также закладывали салфетку с антисептиком.

Плотность мощности Er:YAG-лазера для работы с животными уменьшали до 10 Дж/см<sup>2</sup> в режиме абляции и до 1,8 Дж/см<sup>2</sup> в режиме стимуляции регенерации, при частоте импульсов 2-4 Гц. Лазерную обработку ран проводили каждые 48 часов.

Для оценки эффективности лечения использовали описание визуальных изменений ран, цифровую планиметрию, бактериологическое, цитологическое и морфологическое исследования (см. разделы 2.5.1; 2.5.2; 2.5.3; 2.5.4).

## 2.4 Модель трофической гнойной раны

С целью оптимизации методов лечения длительно не заживающих ран создаются и совершенствуются экспериментальные модели, имитирующие осложнённый раневой процесс. Важными элементами при этом являются: создание нарушений локальной трофики тканей, предотвращение естественной контракции краёв раны, инфицирование раневой поверхности и воспроизводимость стандартизированной модели [25; 37; 96; 100; 120;].

Несмотря на множество существующих моделей гнойных ран, в подавляющем большинстве способов не предусмотрена возможность формирования одинаковых по форме и размеру раневых дефектов, что не отвечает требованиям повторяемости эксперимента. Другим важным аспектом является обеспечение защиты раневого дефекта от внешних воздействий.

Учитывая вышеописанные особенности, нами была разработана оригинальная экспериментальная модель трофической гнойной раны (Патент РФ на изобретение №2753955 от 26.01.2021 г.).

Формирование модели проводили с использованием пластинки из термостойкого силикона в форме диска толщиной 2 мм и диаметром 40 мм. В центре пластинки вырезали отверстие диаметром 24 мм таким образом, чтобы выкраиваемая часть оставалась соединённой с основой (рис. 2.4А). После введения в наркоз, животных фиксировали спинкой кверху, а в межлопаточной области очищали от шерсти участок размером 6×4 см. Далее наносили спиртовым маркером контуры раны диаметром 16 мм и в асептических условиях иссекали полнослойный лоскут до фасции по нанесённым контурам (рис. 2.4Б). Края раны фиксировали узловыми швами к краям центрального отверстия силиконового диска. Наружный край приспособления подшивали к коже узловыми швами до прилегания, вокруг

диска накладывали третий ряд швов через кожу с захватом подлежащих мягких тканей (рис. 2.4 В,Г).

Таким образом, благодаря разности диаметров дефекта и центрального отверстия диска края раны равномерно растягивались, что позволяло создавать заданную площадь и форму, а также вызывать ишемию тканей вследствие натяжения. Второй и третий ряд швов способствовали нарушению локальной микроциркуляции. Центральная часть силиконового диска обеспечивала защиту раны от внешних факторов.

Далее на дне раны пересекали фасцию диаметральным разрезом, после чего мягкие ткани однократно раздавливали зажимом Кохера (рис. 2.4Д). В сформированный дефект вносили суточную культуру *St. aureus* (АТСС 25923) в количестве  $2,5 \times 10^7$  КОЕ (рис. 2.4Е) и укладывали фрагмент марлевой салфетки  $2 \times 2$  см, после чего закрывали и фиксировали крышку силиконового диска стерильным пластырем.

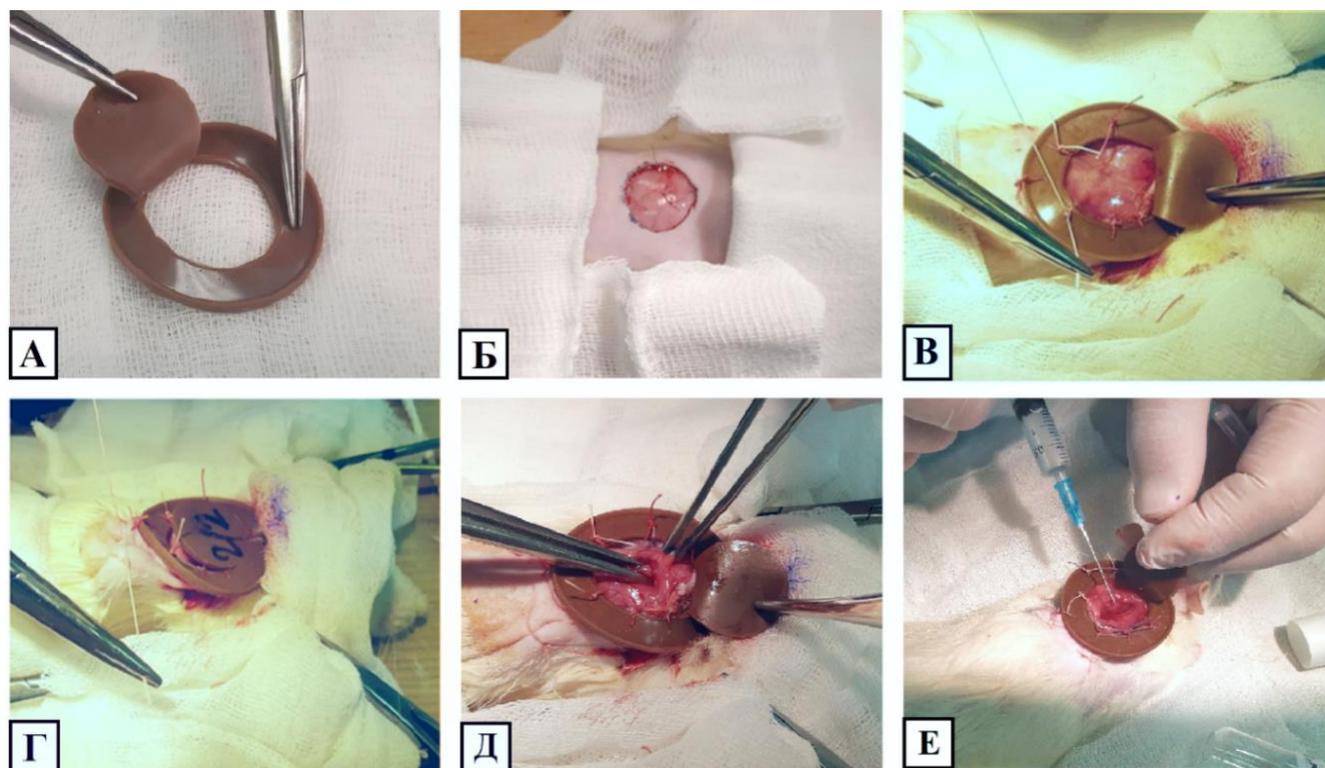


Рисунок 2.4 – Моделирование экспериментальной раны: А – силиконовый диск; Б – кожный дефект; В – подшивание силиконового диска; Г – наложение ишемизирующих швов вокруг раны; Д – раздавливание тканей зажимом Кохера; Е – внесение культуры *St. aureus*.

Развитие локальной ишемии в ранах и паравульнарной зоне у животных (n=10) подтверждали с помощью средств объективного контроля (дистанционная термометрия и люминесцентный анализ).

С помощью портативного тепловизора RGK TL-80 (рис. 2.5А) определяли температуру на поверхности раны до и после формирования трофических нарушений с точностью до десятых долей градуса Цельсия. (Рационализаторское предложение «Способ регистрации трофических нарушений в экспериментальной ране с помощью тепловизора» ВМедА им. С.М. Кирова, 2022).

С использованием интраоперационного люминесцентного щупа (рис. 2.5Б), разработанного в АО «НПО ГОИ им. С.И. Вавилова», регистрировали интенсивность вторичной флуоресценции тканей экспериментальных ран после внутривенного введения в хвостовую вену крысы раствора флуоресцеина натрия в стандартной дозе 5 мг/кг массы животного. Это позволило осуществить контроль развития ишемии в раневом дефекте. (Рационализаторское предложение «Способ количественной оценки трофических нарушений в экспериментальной ране с помощью люминесцентного анализа» ВМедА им. С.М. Кирова, 2022).

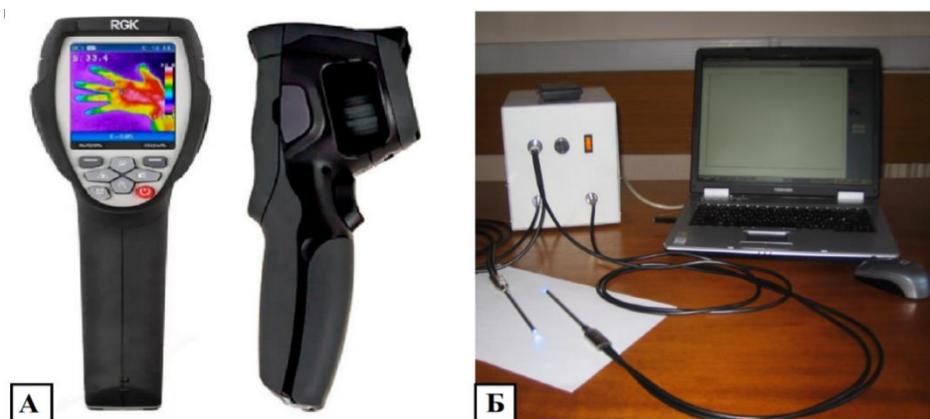


Рисунок 2.5 – Средства объективного контроля нарушения микроциркуляции в тканях: А – портативный тепловизор; Б – люминесцентный щуп

## 2.5 Методы анализа раневого процесса

### 2.5.1 Оценка визуальных изменений и скорости заживления ран

Визуальную оценку ран у пациентов проводили во время перевязок, с первых по тридцатые сутки наблюдения. Оценивали, на какие сутки происходило очищение раневой поверхности от фибрина и некротических тканей, появлялась

зрелая грануляционная ткань и возникали очевидные признаки краевой эпителизации. Аналогичным образом оценивали экспериментальные раны в период с первых по двадцатые сутки наблюдения. Все клинические наблюдения фиксировали в историях болезни, а данные эксперимента вносили в карту, заведенную на каждое животное.

Определение площади раневых дефектов проводили методом цифровой планиметрии (Рационализаторское предложение «Способ вычисления площади кожных ран по электронному изображению с помощью программы ImageJ» ВМедА им. С.М. Кирова, 2022).

Для этого вели съёмку с расстояния 20 см на фотокамеру Sony α6000 с объективом f/3.5-4.5 15-55 мм. Рядом с ранами располагали контрольный измерительный прибор (миллиметровую линейку), а полученные цифровые изображения обрабатывали на персональном компьютере с помощью программы ImageJ. Возможности программы позволяли с высокой точностью контурировать края раны и, задавая значения масштаба с помощью линейки, получать результат в квадратных сантиметрах или миллиметрах (рис. 2.6).

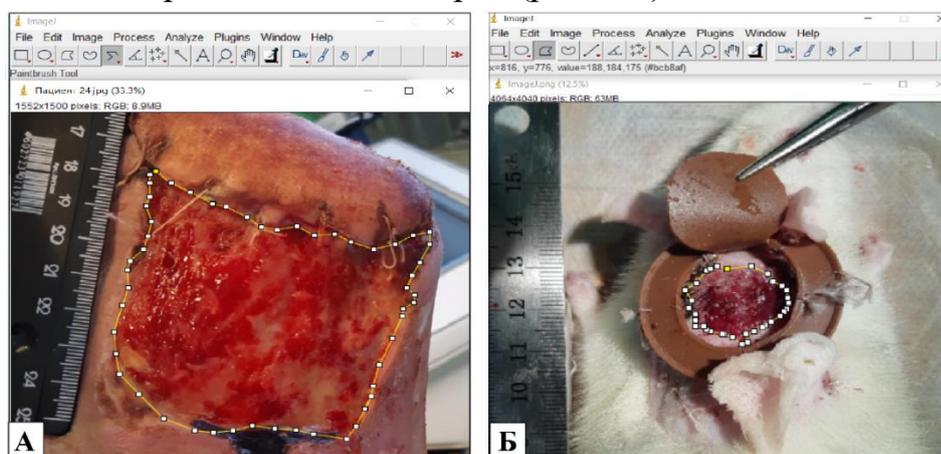


Рисунок 2.6 – Измерение площади ран с помощью компьютерной программы ImageJ: А – у пациента с диабетической стопой; Б – у экспериментального животного

У пациентов определяли площадь ран до лечения и на тридцатые сутки наблюдения. Раневые дефекты разделяли на малые до 5 см<sup>2</sup>, средние от 5 до 20 см<sup>2</sup>, крупные от 20 до 50 см<sup>2</sup> и обширные более 50 см<sup>2</sup>. Также определяли долю

полностью эпителизированных ран в обеих группах в конце периода наблюдения и лечения.

Глубину ран рассчитывали как среднее значение между самой глубокой и самой поверхностной зонами раневой поверхности относительно кожного покрова. Замеры осуществляли с помощью стерильного пуговчатого зонда и миллиметровой линейки.

Планиметрию экспериментальных ран проводили на 1, 3, 5, 7 и 12-е сутки наблюдения. Скорость заживления вычисляли по методу Л.Н. Поповой с использованием формулы:

$$\frac{(S_3 - S_{12}) \times 100\%}{S_3 \times T} *$$

\*S<sub>3</sub> – площадь раны на 3 сутки; S<sub>12</sub> - площадь раны на 12 сутки; T – количество дней между измерениями (в данном случае 9).

### 2.5.2 Бактериологическое исследование

Исследование выполняли на базе микробиологических лабораторий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр высоких медицинских технологий – Центральный военный клинический госпиталь имени А.А. Вишневского» Минобороны России, г.о. Красногорск (заведующий отделением – врач-бактериолог Копейка Анатолий Алексеевич); ГБУЗ «Городская клиническая больница № 23 имени И.В. Давыдовского», г. Москва (заведующая отделением – канд. мед. наук, врач-бактериолог Бурова Анна Анатольевна).

Материал для микробиологического исследования из ран пациентов забирали перед началом лечения, на 15-е сутки и в конце периода наблюдения, на 30-е сутки. В эксперименте бактериологическое исследование проводили на 1, 3, 5, 7 и 12-е сутки наблюдения. Дополнительно с целью определения непосредственного эффекта лазерного воздействия на экспериментальную рану в первые сутки наблюдения у животных 3-й группы материал брали до и сразу после лазерной обработки.

Забор материала осуществляли путем пропитывания стерильной салфетки раневым экссудатом и помещением ее в пробирку с транспортной средой Эймса.

Для исследования использовали плотные питательные среды: кровяной колумбийский агар с добавлением 5% бараньей крови, молочно-солевой агар, стафилококкагар, Сабуро, Эндо, дополнительно – Клигlera и молочно-ингибиторную среду. Термостатирование проводили по стандартной методике при температуре 37,0 °С в течение 48 часов. Культуры окрашивали по Граму, Романовскому-Гимзе, метиленовой синью и анализировали под иммерсионным объективом с увеличением  $\times 1000$  на микроскопе МИКМЕД-6. Для определения вида микроорганизмов использовали бумажные системы идентификации, биохимические пластины и реакцию плазмокоагуляции. Верификацию проводили с учётом морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических свойств бактерий. Полученные результаты выражали в качественной видовой оценке возбудителя с определением количества из расчета на 1 грамм материала.

Уровень обсемененности экспериментальных ран интерпретировали полуколичественным методом с диапазонами: 1) отсутствие роста; 2) до  $10^3$  КОЕ/гр – низкая степень обсеменённости; 3) от  $10^3$  КОЕ/гр до  $10^5$  КОЕ/гр – средняя степень обсеменённости; 4) более  $10^5$  КОЕ/гр – высокая степень обсеменённости.

### **2.5.3 Цитологическое исследование**

Исследование выполняли на базе цитологической лаборатории ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр высоких медицинских технологий – Центральный военный клинический госпиталь имени А.А. Вишневского» Минобороны России, г.о. Красногорск (заведующая отделением – врач клинической лабораторной диагностики Миляева Ольга Геннадиевна).

Мазки-отпечатки, полученные из ран пациентов по методу М.П. Покровской и М.С. Макарова, оценивали до начала лечения, на 15-е сутки и на 30-е сутки наблюдения. В эксперименте аналогичным образом забор материала для цитологического анализа осуществляли на 1, 3, 5, 7 и 12-е сутки.

Предварительно удалив излишки гнойного экссудата, сухое стерильное предметное стекло с несильным нажатием прикладывали к поверхности раневого дефекта для получения нескольких тонких отпечатков. После высыхания на

воздухе мазки-отпечатки фиксировали и окрашивали по Паппенгейму. Полученные препараты изучали при увеличении  $\times 400$  на микроскопе Микромед 2.

Оценивали процентное содержание основных клеточных элементов: лейкоцитов (с определением доли разрушенных клеток), лимфоцитов, моноцитов с макрофагами, полибластов и фибробластов. В зависимости от полученной картины, различали один из пяти основных типов цитограмм: некротический, дегенеративно-воспалительный, воспалительный, воспалительно-регенераторный и регенераторный. Количество лейкоцитов в поле зрения, а также долю их деструкции анализировали в клинической части исследования для дополнительной оценки влияния лечения на раневой процесс.

#### **2.5.4 Морфологическое исследование экспериментальных ран**

Морфологические исследования были проведены на базе патологоанатомического отделения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А.В. Вишневского», г. Москва (заведующая лабораторией электронной микроскопии, д-р. биол. наук Чекмарёва Ирина Александровна).

Комплексный морфологический анализ проводили с помощью светомикроскопического и электронно-микроскопического исследований материала, полученного в ходе эксперимента. Маркировка материала не позволяла морфологам определить метод локального воздействия на экспериментальные раны, таким образом, исследование было заслепленным.

Забор биоптатов ( $\sim 1 \text{ мм}^3$ ) осуществляли на 1, 3, 5, 7 и 12-е сутки наблюдения и далее фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида и 1% растворе четырехоксида осмия. После доставки в лабораторию материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (50, 70, 96 и 100%), после чего пропитывали в смеси окись пропилена-аралдитовой смолы. Затем материал помещали в капсулы и помещали в термостат при температуре  $60^\circ\text{C}$  на двое суток. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1,5-2 мкм, после чего окрашивали толуидиновым синим.

Светомикроскопическое исследование полутонких срезов проводили с использованием микроскопа Leica DM 1000. Наиболее показательные участки материала фотографировали с помощью камеры Leica ICC50E. Далее из блоков вырезали пирамидки с таким расчетом, чтобы поверхность среза приходилась на интересующий участок. Ультратонкие срезы толщиной 100-200 нм получали на ультрамикротоме фирмы LKB V (Швеция). Ультраструктурное изучение препаратов проводили при помощи электронного микроскопа JEM 100-CX (JEOL, Япония) в трансмиссионном режиме при ускоряющем напряжении 80КВ.

## 2.6 Методы статистической обработки данных

Все изложенные демографические, клинические и экспериментальные показатели представляли в виде количественных распределений и простых процентных соотношений. Для определения нормальности распределения использовали критерий Шапиро-Уилка, критерий Колмогорова-Смирнова, а также показатели асимметрии и эксцесса. При сравнении двух связанных выборок с нормальным распределением рассчитывали парный критерий Стьюдента с указанием среднего арифметического значения со стандартным отклонением ( $M \pm \sigma$ ). Для несвязанных совокупностей количественных признаков использовали t-критерий Стьюдента. При сравнении двух независимых групп с ненормальным распределением использовали U-критерий Манна-Уитни, значения медианы ( $Me$ ) с нижним и верхним квартилями ( $Q1$ ;  $Q3$ ) и графической визуализацией в виде диаграммы размаха. При сравнении двух связанных выборок с ненормальным распределением использовали критерий Уилкоксона. Для оценки связи рангового показателя с групповым фактором использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $R_S$ ). Для качественных признаков применяли  $\chi^2$  Пирсона (с поправкой Йетса при менее 10 единиц наблюдения и двусторонним критерием Фишера при менее 5 единиц). Статистически достоверными различия считали при уровне  $p < 0,05$ . Статистическую обработку данных производили с помощью программы Statistica 12.0.

## ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЭРБИЕВОГО ЛАЗЕРА

### 3.1 Анализ клинико-демографических данных

Проанализированы результаты обследования и лечения 144 пациентов, разделённых на две группы. В 1-й группе оценивали результаты применения высокоинтенсивного Er:YAG-лазера в двух режимах и перевязок с мазями на водорастворимой основе. Полученные данные сравнили с результатами традиционной хирургической обработки и аналогичных перевязок у пациентов 2-й группы. В качестве критериев сравнения использовали описание визуальных изменений раневых дефектов, планиметрию, бактериологическое и цитологическое исследования, а также выраженность болевого синдрома и переносимость процедуры лазерной и традиционной хирургической обработок.

Анализ выборки пациентов показал сопоставимость обеих групп по таким демографическим показателям, как пол, средний возраст, распределение по возрастным группам (табл. 3.1).

Таблица 3.1 – Сравнение демографических показателей

Показатели		Общая группа (n=144)	1 группа (n=71)	2 группа (n=73)	<i>p</i>
Пол, абс. (%)	М	94 (65,3)	45 (63,4)	49 (67,1)	0,64
	Ж	50 (34,7)	26 (36,6)	24 (32,9)	
Средний возраст, лет, (min-max)		55,2 (26-84)	52,9 (26-84)	57,5 (29-82)	0,06
Возрастные группы, абс.(%)	до 44	35 (24,3)	16 (22,5)	19 (26,0)	0,50
	45-59	52 (36,1)	30 (42,3)	22 (30,1)	
	60-74	45 (31,3)	20 (28,2)	25 (34,2)	
	75-89	12 (8,3)	5 (7,0)	7 (9,6)	

Среди причин возникновения длительно незаживающих ран были сахарный диабет, а также патологии венозного и артериального русла. В большинстве случаев это были диабетические язвы I и II степени по Wagner, которые наблюдали у 75 пациентов с сахарным диабетом I и II типов. Венозные трофические язвы наблюдали у 45 пациентов с варикозной и посттромботической болезнями, чаще всего после операций по коррекции венозной гемодинамики (флебэктомия, кроссэктомия, эндовенозная коагуляция, склерооблитерация). Трофические язвы на фоне облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей наблюдали у 24 пациентов с хронической артериальной недостаточностью, после выполнения различных шунтирующих и рентгенэндоваскулярных вмешательств, а также проведения вазоактивной терапии.

В результате сравнения группы оказались сопоставимы по основным показателям, характеризующим основной диагноз как причину возникновения незаживающих ран. Исключением было различие в соотношении сахарного диабета I и II типов в группах, что не влияло на итоговые результаты (табл. 3.2).

Таблица 3.2 – Сравнение групп по основным заболеваниям

Показатели		Общая группа (n=144)	1 группа (n=71)	2 группа (n=73)	<i>p</i>	
Диабетические язвы, абс. (%)	Всего	75 (52,1)	35 (49,3)	40 (54,8)	0,51	
	тип СД	I	9 (12,0)	7 (20,0)	1 (2,5)	0,02
		II	66 (88,0)	28 (80,0)	39 (97,5)	
	степень по Wagner	I	31 (41,3)	14 (40,0)	17 (42,5)	0,83
II		44 (58,7)	21 (60,0)	23 (57,5)		
Венозные язвы абс. (%)	Всего	45 (31,3)	23 (32,4)	22 (30,1)	0,77	
	ВБ	41 (91,1)	20 (87,0)	21 (95,5)	0,32	
	ПТБ	4 (8,9)	3 (13,0)	1 (4,5)		
Артериальные язвы, абс. (%)	Всего	24 (16,7)	13 (18,3)	11 (15,1)	0,60	

Основные показатели характеризующие раны были сопоставимы в 1-й и 2-й группах. Наблюдали одиночные, сливные и множественные раневые дефекты общей площадью от 3 до 65 см<sup>2</sup> со средней глубиной от 1 до 16 мм, существующие от 3 до 53 месяцев (табл. 3.3).

Таблица 3.3 – Характеристики раневых дефектов

Показатели		Общая группа (n=144)	1 группа (n=71)	2 группа (n=73)	<i>p</i>
Средняя площадь, см <sup>2</sup>		13,9±13,4	14,2±11,4	13,7±10,6	0,77
Вид ран по размеру, абс. (%)	Малые, до 5 см <sup>2</sup>	33 (22,9)	14 (19,7)	19 (26,0)	0,36
	Средние, от 5 до 20 см <sup>2</sup>	81 (56,3)	38 (53,5)	43 (58,9)	
	Крупные, от 20 до 50 см <sup>2</sup>	25 (17,4)	16 (22,5)	9 (12,3)	
	Обширные, более 50 см <sup>2</sup>	5 (3,5)	3 (4,2)	2 (2,7)	
Средняя глубина, мм		4,9±1,2	4,5±0,9	5,4±1,4	0,76
Длительность раны, мес.		9,3±4,8	9,8±5,1	8,7±4,5	0,19

Сопутствующие заболевания у пациентов были объединены в блоки: сердечно-сосудистые, эндокринные, желудочно-кишечные, мочеполовые, а также другие хронические заболевания. В тех случаях, когда наблюдали несколько патологий, приведших к образованию длительно незаживающих ран нижних конечностей, выясняли, какая из них была первичной, и выносили её как основной диагноз. Вторичную патологию при этом рассматривали как сопутствующее заболевание.

Статистически значимых различий в соотношении блоков сопутствующих заболеваний у пациентов в группах выявлено не было (табл. 3.4).

Таблица 3.4 – Сравнение групп по сопутствующим заболеваниям

Показатели		Общая группа (n=144)	1 группа (n=71)	2 группа (n=73)	<i>p</i>
Сопутствующие заболевания, абс. (%)	Сердечно-сосудистые	120 (83,3)	58 (81,7)	62 (84,9)	0,60
	Эндокринные	86 (59,7)	38 (53,5)	48 (65,8)	0,13
	Желудочно-кишечные	58 (40,3)	27 (38,0)	31 (42,5)	0,59
	Мочеполовые	39 (27,1)	20 (28,2)	19 (26,0)	0,77
	Другие хронические заболевания	52 (36,1)	24 (33,8)	28 (38,3)	0,57

\*Показатели процентного соотношения по сопутствующим заболеваниям у пациентов обеих групп превышают 100, так как общее количество сопутствующих заболеваний превышает количество пациентов.

### 3.2 Динамика заживления ран

Описание внешних изменений раневых дефектов – простой, но информативный способ оценки заживления ран. Смену фаз раневого процесса можно отслеживать по таким критериям как: очищение раневых дефектов, созревание грануляционной ткани и краевая эпителизация.

Дебридмент раневых дефектов в основной группе выполняли с помощью высокоинтенсивного Er:YAG-лазера в режиме абляции. Санирующий эффект аппарата обусловлен параметрами фракционного оптического излучения. За счёт краткосрочности (100-500 нс) отдельного импульса кратно возрастала мощность светового пучка и происходило выпаривание тканей в зоне интереса. При этом окружающие ткани не успевали нагреться и подвергнуться коагуляции ввиду моментального воздействия, о чем можно судить по возникновению «кровоавой росы» на поверхности раны. Эта особенность лазера позволила проводить щадящее и дозированное удаление фибринозного налёта и некротических тканей, соответствуя базовым принципам лечения хронических ран (рис. 3.1)

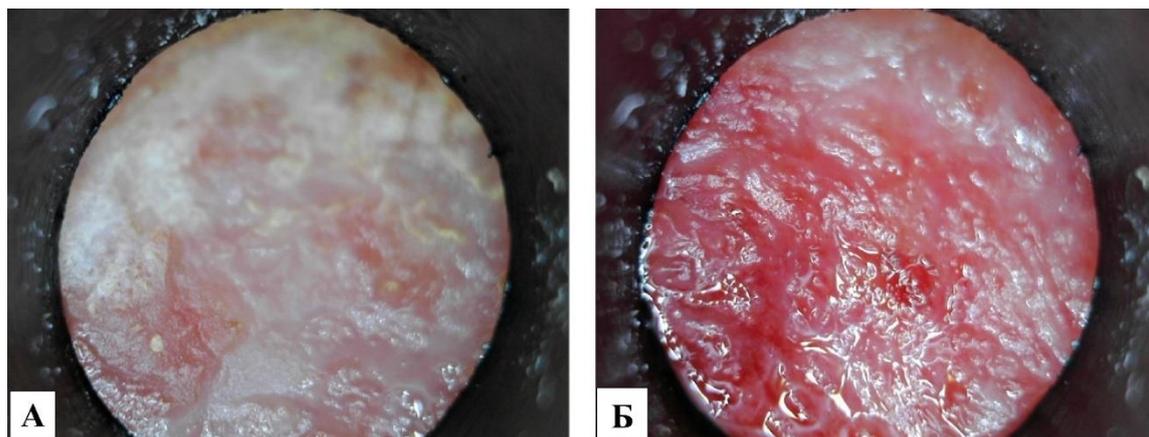


Рисунок 3.1 – Раневая поверхность до (А) и после (Б) обработки Er:YAG-лазером в режиме абляции

Полное очищение раневой поверхности чаще наступало после 1-2 процедур лазерной абляции, в среднем на  $3,9 \pm 1,4$  сутки наблюдения.

Во 2-й группе после проведения хирургической обработки ран острым путём фибриновый налёт сохранялся в течение 2-3 перевязок, а очищение ран происходило в среднем  $5,4 \pm 2,2$  сутки ( $p < 0,05$ ) (рис. 3.2).

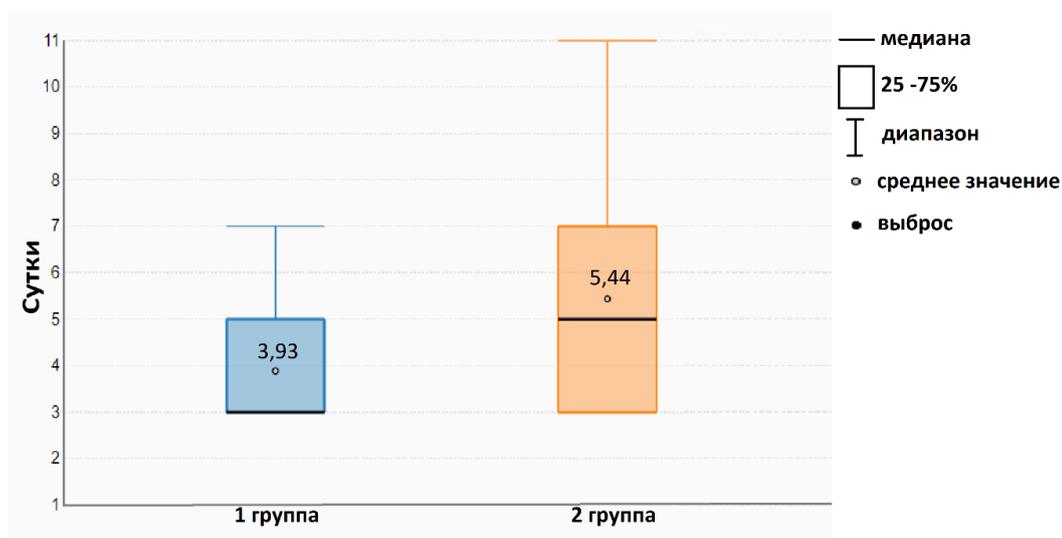


Рисунок 3.2 – Сроки очищения ран

Режим стимуляции регенерации применяли с первых процедур, непосредственно после абляционной обработки, а по мере очищения раневых дефектов в монорежиме. Стимулирующий эффект реализован за счёт рассеивания светового пучка и возникновения эффекта пространственно-модулированной

микроабляции. В результате такого воздействия лазерные лучи создают множественные (до 10000 на см<sup>2</sup>) микродефекты, вследствие чего образуются механические волны, распространяющиеся вглубь тканей. Интерференция таких волн создаёт участки микросотрясения на глубине до 6 мм и запускает ряд процессов, стимулирующих регенерацию.

Явным визуальным признаком заживления ран становилось созревание грануляционной ткани. В основной группе это происходило после очищения раневых дефектов в среднем на  $6,2 \pm 1,5$  сутки наблюдения. В группе сравнения появление зрелых грануляций наблюдали позднее, в среднем на  $7,7 \pm 2,2$  сутки ( $p < 0,05$ ) (рис. 3.3).

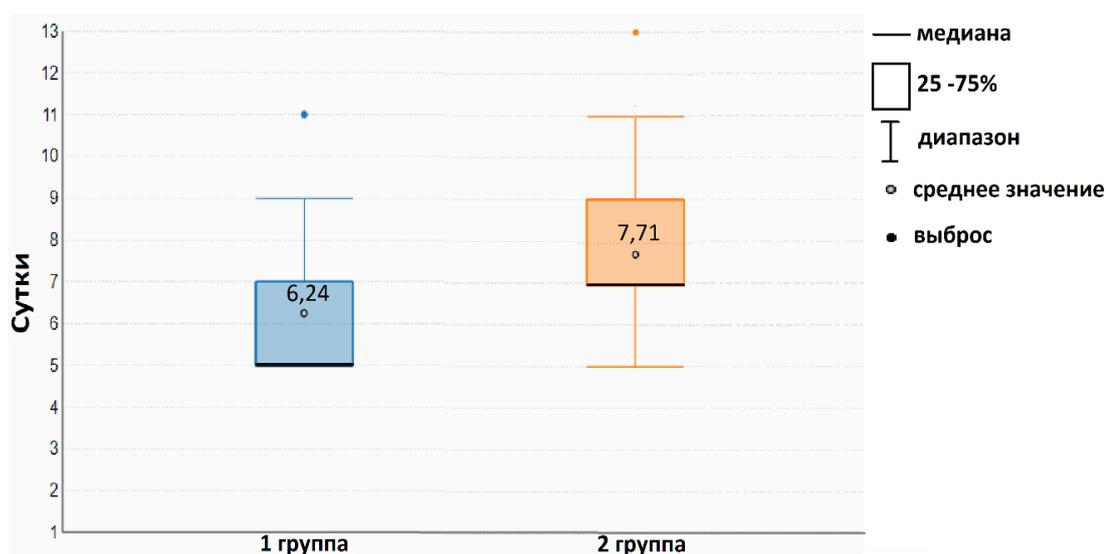


Рисунок 3.3 – Сроки появления грануляционной ткани

Процесс эпителизации раневых дефектов служит наиболее явным признаком эффективности лечения. Как известно, он начинается с момента очищения раны и происходит параллельно с развитием грануляционной ткани. Заметный рост эпидермиса по краю дефекта можно наблюдать спустя несколько суток после появления грануляций. В 1-й группе это происходило в среднем на  $8,5 \pm 1,9$  сутки, а во 2-й – на  $10,4 \pm 3,1$  сутки наблюдения и лечения пациентов ( $p < 0,05$ ) (рис. 3.4).

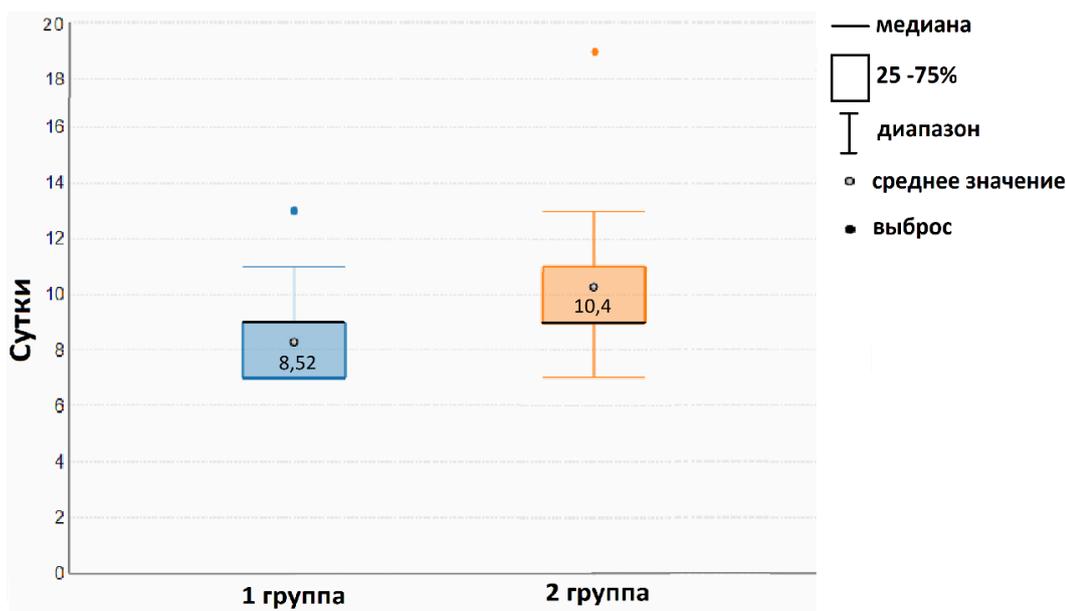


Рисунок 3.4 – Сроки начала краевой эпителизации

Небольшие по размеру раневые дефекты полностью закрывались с формированием рубца к тридцатым суткам наблюдения. В основной группе это произошло у 40 пациентов, а в группе сравнения у 19 ( $p < 0,001$ ) (рис. 3.5). Однако это не означало двухкратного преимущества Er:YAG-лазера, а указывало на приближение сроков заживления к физиологическим, тогда как во 2-й группе сохранялись признаки хронического раневого процесса. Об этом свидетельствовало и преобладание малых ран в группе сравнения, которые не успели зажить к концу периода наблюдения. Соотношение других размеров ран оставалось сопоставимым в группах ( $p > 0,05$ ), а среди обширных дефектов сохранялся лишь один, который наблюдали в группе традиционного лечения (таб. 3.5).

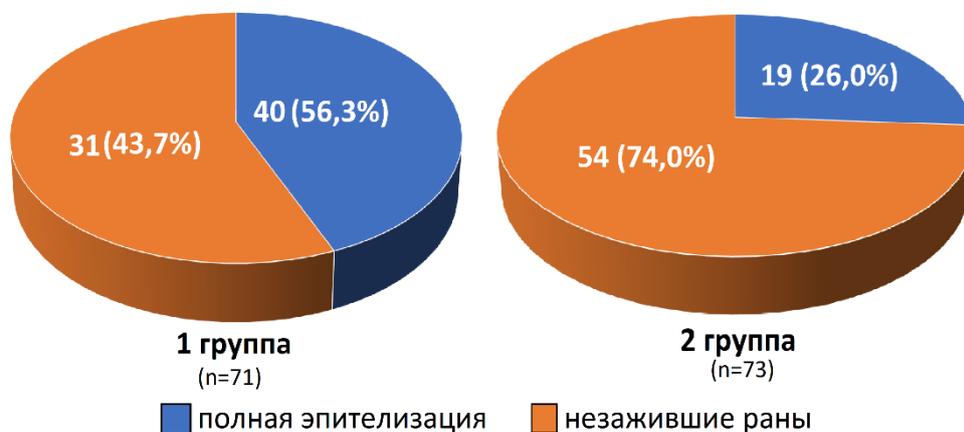


Рисунок 3.5 – Сравнение групп по исходам лечения

Таблица 3.5 – Размеры незаживших ран

Показатели		Общая группа (n=85)	1 группа (n=31)	2 группа (n=54)	<i>p</i>
Вид ран по размеру, абс. (%)	Малые, до 5 см <sup>2</sup>	41 (48,2)	13 (41,9)	28 (51,9)	0,66
	Средние, от 5 до 20 см <sup>2</sup>	35 (41,2)	15 (48,4)	20 (37,0)	
	Крупные, от 20 до 50 см <sup>2</sup>	8 (9,4)	3 (9,7)	5 (9,3)	
	Обширные, более 50 см <sup>2</sup>	1 (1,2)	-	1 (1,9)	

К концу периода наблюдения показатели средней площади и средней глубины среди незаживших ран в основной группе превосходили аналогичные показатели в группе сравнения, однако статистически значимых различий между ними выявлено не было ( $p > 0,05$ ) (табл. 4.6).

Таблица 4.6 – Сравнение групп по величине средней площади и средней глубины незаживших ран

Показатели	Общая группа (n=85)	1 группа (n=31)	2 группа (n=54)	<i>p</i>
Средняя площадь незаживших ран, см <sup>2</sup>	8,7±2,9	8,5±2,5	8,9 ±3,1	0,11
Средняя глубина незаживших ран, мм	2,6±1,8	2,4±1,8	2,7±1,8	0,46

Совокупность данных планиметрии указывала на то, что процессы заживления происходили в обеих группах на фоне лечения, однако лазерная обработка ускоряла нормализацию течения раневого процесса.

Динамика заживления ран под воздействием Er:YAG-лазера имела некоторые различия в зависимости от основного заболевания. Полностью эпителизовались к концу лечения около 60% диабетических язв, что несколько превышало долю заживших ран другого происхождения. Как правило, полное

заживление наступало среди малых по площади дефектов, как в клиническом наблюдении на рисунке 3.6.



Рисунок 3.6 – Пациент Я., 52 года, амбулаторная карта № 211 (2019 г.). Диагноз: СД II типа. СДС, нейропатическая форма. Трофическая язва пяточной области левой стопы (Wagner II). Сахарный диабет II типа с 2009 г. Длительность существования язвы 17 месяцев. В январе 2019 г. обратился за помощью, скорректирована сахароснижающая терапия, назначено местное лечение с использованием высокоинтенсивного Er:YAG-лазера (11 сеансов). Площадь раны до лечения – 4 см<sup>2</sup>, средняя глубина – 2 мм (А). Посев из раны - *S. Aureus* ( $3,4 \times 10^4$  КОЕ/гр), дегенеративно-воспалительный тип цитогаммы. В течение месяца рана полностью эпителизировалась (Б).

### 3.3 Результаты бактериологического исследования

Важным показателем эффективности местного лечения было определение степени бактериальной обсеменённости раневых дефектов в динамике. Результаты микробиологических исследований до лечения, на 15-е сутки и в конце периода наблюдения наглядно показали возможности высокоинтенсивного Er:YAG-лазера в борьбе с раневой инфекцией.

До начала лечения раны всех пациентов имели визуальные признаки инфицирования. Анализ микрофлоры, полученный из ран обеих групп, позволил судить о качественном и количественном составе микроорганизмов, представленных преимущественно монокультурами грамположительных и грамотрицательных бактерий (рис. 3.7).

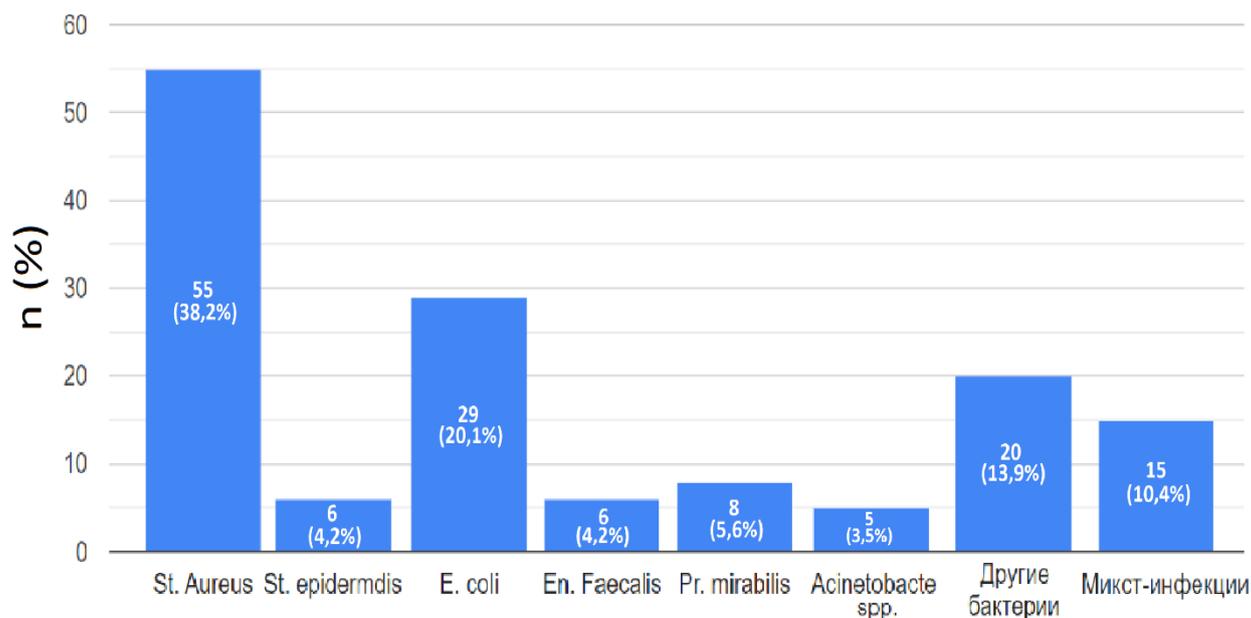


Рисунок 3.7 – Видовой спектр раневой флоры (n=144)

По результатам посевов наиболее часто встречались: *St. aureus*, *St. epidermidis*, *E. coli*, *En. Faecalis*, *Pr. mirabilis*, *Acinetobacter spp.* В ряде случаев выявляли микст-инфекции, включавшие 2 и более возбудителей. В целом обе группы были сопоставимы по видовому составу микроорганизмов, полученных из раневых дефектов ( $p > 0,05$ ) (табл. 3.7).

Таблица 3.7 – Сравнение групп по видовому составу раневой инфекции

№ группы	Видовой состав микроорганизмов, абс. (%)							
	St. Aureus	St. epidermidis	E. coli	En. Faecalis	Pr. mirabilis	Acinetobacter spp.	Другие бактерии	Микст инфекции
1 группа (n=71)	24 (33,8)	4 (5,6)	12 (16,9)	4 (5,6)	5 (7,0)	3 (4,2)	11 (15,5)	8 (11,3)
2 группа (n=73)	31 (42,5)	2 (2,7)	17 (23,3)	2 (2,7)	3 (4,1)	2 (2,7)	9 (12,3)	7 (9,6)
<i>p</i>	0,28	0,38	0,34	0,38	0,44	0,63	0,58	0,74

Результаты посевов, выполненных в первые сутки наблюдения, показали преобладание высокой степени обсеменённости в обеих группах. В меньшей степени встречали средний и низкий уровень микробного загрязнения, а в

единичных случаях наблюдали стерильные раны, что, вероятнее всего, было связано с применением антисептиков самими пациентами перед началом исследования. Различий по обсеменённости ран на этом этапе между группами не выявлено ( $p > 0,05$ ).

Применение Er:YAG-лазера в режиме абляции приводило к физическому удалению раневой флоры на поверхности дефектов, а в режиме стимуляции регенерации способствовало активации неспецифических процессов местного иммунитета, что подтверждалось результатами посевов.

На пятнадцатые сутки наблюдения отсутствие роста бактерий наблюдали в 66,2% случаев в 1-й группе, что практически на 20% превышало этот показатель во 2-й группе ( $p < 0,05$ ). Низкую степень обсеменённости наблюдали в равных долях в обеих группах ( $p > 0,05$ ). Средняя степень микробного загрязнения была характерна для изначально крупных и загрязнённых дефектов, преимущественно в группе традиционного лечения ( $p < 0,05$ ). Раны с высокой степенью обсеменённости отсутствовали в основной группе, но были у 2 пациентов группы сравнения ( $p > 0,05$ ).

На тридцатые сутки результаты посевов оценивали в случаях, когда раны не заживали к концу периода наблюдения, т.е. у 31 пациента 1-й группы и у 54 2-й группы. При этом отсутствие роста бактерий фиксировали в 74% посевов в основной группе и в 61% в группе сравнения ( $p > 0,05$ ), а показатели низкого микробного загрязнения практически не отличались. В обеих группах отсутствовали раны с высокой степенью обсеменённости, среднюю наблюдали лишь у 4 пациентов 2-й группы ( $p > 0,05$ ).

В целом показатели в группах оказались сопоставимы, но, учитывая большее количество заживших ран в основной группе, полученные результаты свидетельствовали о более эффективном противомикробном эффекте лазерной обработки по сравнению с традиционным лечением (табл. 3.8).

Таблица 3.8 – Результаты бактериологического исследования

Сроки наблюдения	№ группы	Обсеменённость ран, абс. (%)			
		высокая	средняя	низкая	отсутствие роста
1 сутки	Общая группа (n=144)	95 (66,0)	34 (23,6)	12 (8,3)	3 (2,1)
	1 группа (n=71)	51 (71,8)	14 (19,7)	4 (5,6)	2 (2,8)
	2 группа (n=73)	44 (60,3)	20 (27,4)	8 (11,0)	1 (1,4)
	<i>p</i>	0,14	0,28	0,25	0,54
15 сутки	Общая группа (n=144)	2 (1,4)	20 (13,9)	41 (28,5)	81 (56,3)
	1 группа (n=71)	0	4 (5,6)	20 (28,2)	47 (66,2)
	2 группа (n=73)	2 (2,7)	16 (21,9)	21 (28,8)	34 (46,6)
	<i>p</i>	0,16	<0,001	0,94	0,02
30 сутки	Общая группа (n=85)	0	4 (4,7)	25 (29,4)	56 (65,9)
	1 группа (n=31)	0	0	8 (25,8)	23 (74,2)
	2 группа (n=54)	0	4 (7,4)	17 (31,5)	33 (61,1)
	<i>p</i>	-	0,12	0,58	0,22

В ходе анализа saniрующего эффекта Er:YAG-лазера на раны в зависимости от их этиологии было выявлено более выраженное воздействие на раневую флору диабетических язв. До лечения высокую степень обсеменённости раневых дефектов на фоне сахарного диабета встречали более чем в 80% случаев, а визуально наблюдали гнойно-фибринозную экссудацию. К пятнадцатым суткам у 71,4% пациентов уже фиксировали отсутствие роста бактерий, а к концу периода наблюдения этот показатель составлял 82,0%, что превосходило аналогичные результаты посевов из ран другого генеза. Подтверждением выраженного антимикробного эффекта эрбиевого лазера в отношении раневой инфекции у пациентов с СДС может служить клиническое наблюдение на рисунке 3.8.

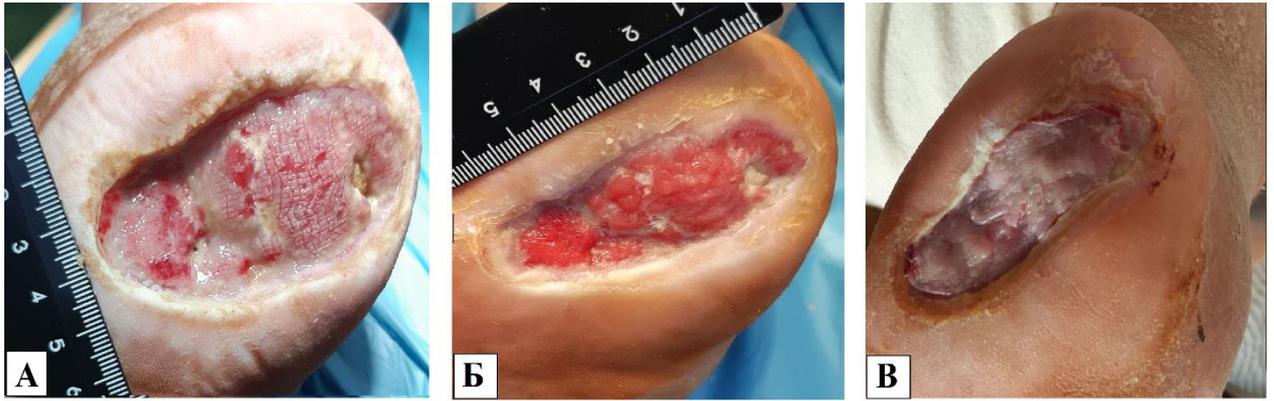


Рисунок 3.8 – Пациентка Л., 72 года, карта стационарного больного № 28373/640 (2018 г.). Диагноз: СД II типа. СДС, нейропатическая форма. Диабетическая остеоартропатия левой стопы. Трофическая язва пяточной области левой стопы (Wagner II). Сахарный диабет II типа с 2002 года, длительность существования язвы 9 месяцев. Госпитализирована в ноябре 2018 года, назначены препараты инсулина и местное лечение с использованием высокоинтенсивного Er:YAG-лазера (13 сеансов). Площадь раны до лечения – 24 см<sup>2</sup>, средняя глубина – 5 мм (А). Посев из раны - *S. Aureus* ( $2,1 \times 10^5$  КОЕ/гр), дегенеративно-воспалительный тип цитогаммы. На тридцатые сутки сокращение площади раны в ~2,5 раза (Б), отсутствие бактериального роста, регенераторный тип цитогаммы. Выполнена аутодермопластика (В).

Применение высокоинтенсивного Er:YAG-лазера в двух режимах способствовало более эффективной борьбе с раневой флорой, что ускорило процессы заживления по сравнению с группой сравнения. Результаты, полученные в ходе анализа раневой флоры у пациентов, соотносились с экспериментальными данными, где была продемонстрирована противомикробная активность лазера в отношении свободных и биоплёночных форм бактерий (см. главу IV).

### 3.4 Результаты цитологического исследования

Цитологический анализ позволил оценить динамику заживления в процессе местного лечения. Полученные данные о наличии микрофлоры, характере фагоцитоза, степени деструкции лейкоцитов и соотношении клеточных элементов в поверхностном слое раневых дефектов объективизировали результаты применения Er:YAG-лазера.

Одним из основных показателей цитологической картины раневого процесса является количество лейкоцитов в поле зрения и доля их деструкции. В связи с этим данные показатели сравнивали в группах отдельно. До начала лечения количество лейкоцитов превышало 100 в поле зрения и было сопоставимо в обеих группах ( $p>0,05$ ). Количество клеток уменьшалось, и на пятнадцатые сутки число лейкоцитов в 1-й группе было вдвое меньше, чем во 2-й ( $p<0,05$ ). Такое соотношение свидетельствовало о стихании воспалительного процесса, преимущественно после применения лазера. На тридцатые сутки среди незаживших ран количество лейкоцитов было минимальным, без значимых различий в обеих группах ( $p>0,05$ ) (рис. 3.9).

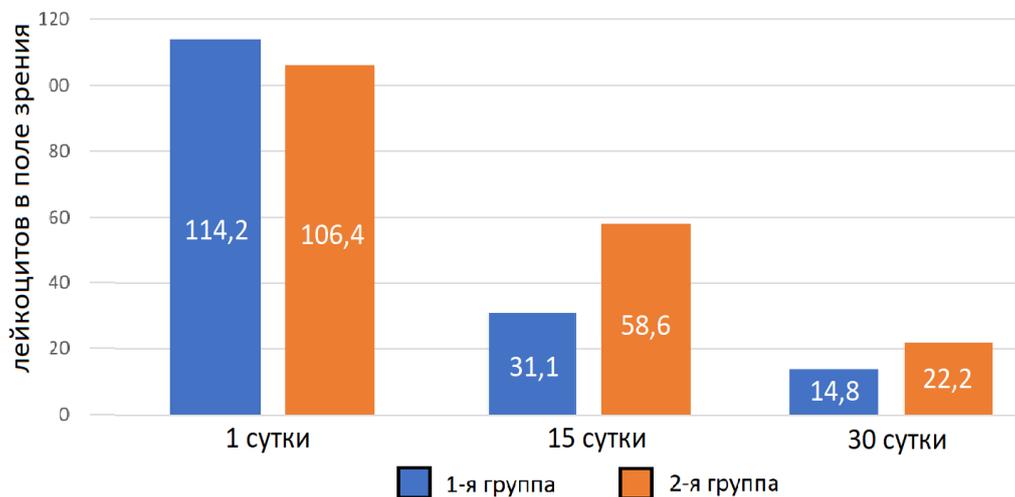


Рисунок 3.9 – Сравнение количества лейкоцитов

Дополнительные сведения о ходе раневого процесса сообщал такой показатель, как степень деструкции лейкоцитов. До лечения доля разрушенных клеток в мазках-отпечатках была высокой, в среднем около 90%, без различий в зависимости от группы ( $p>0,05$ ). Такая степень деструкции характерна для бактериального воспаления, которое длительно поддерживается в хронических ранах. На пятнадцатые сутки доля разрушенных лейкоцитов снижалась до 7 % в основной группе и до 24% в группе сравнения ( $p<0,05$ ). Снижение показателя является следствием завершения процессов борьбы с раневой инфекцией. На тридцатые сутки степень деструкции лейкоцитов в 1-й группе несколько увеличивалась по сравнению с предыдущим значением, а во 2-й группе снижалась

( $p>0,05$ ). Такая тенденция характеризовала отсутствие необходимости в фагоцитозе в заживающих ранах (рис. 3.10).

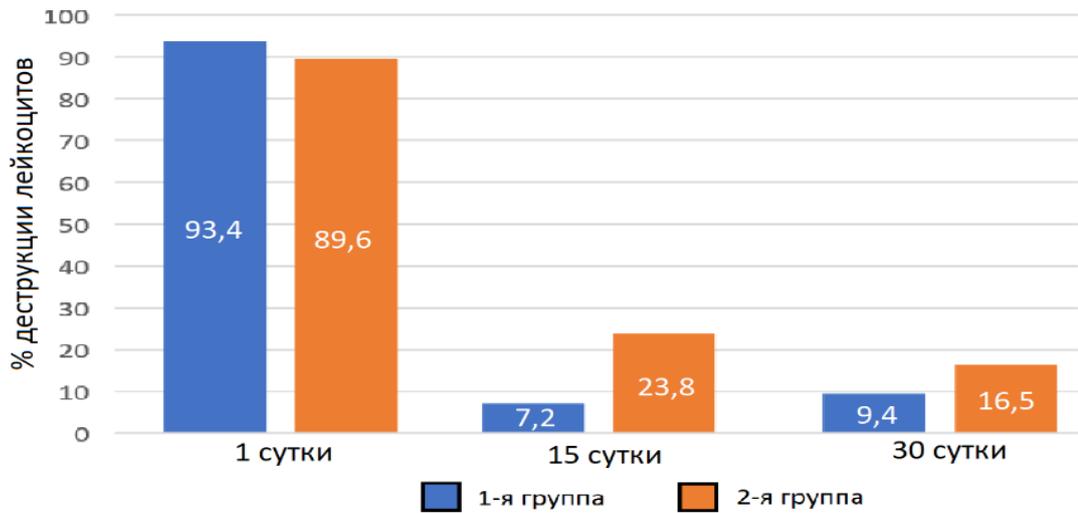


Рисунок 3.10 Сравнение доли деструкции лейкоцитов

Помимо лейкоцитов определяли количество эозинофилов, плазмоцитов, лимфоцитов, гигантских многоядерных клеток, макрофагов, клеток соединительной ткани (профибробластов, фибробластов), эпителиальных и эндотелиальных клеток. Соотношение всех элементов в мазках выражалось виде одного из пяти типов цитогрaмм.

В первые сутки наблюдения в обеих группах преобладал дегенеративно-воспалительный тип, что отражало вялотекущий характер раневого процесса. Некротический и воспалительный типы цитогрaмм одинаково часто встречали в обеих группах ( $p>0,05$ ).

На пятнадцатые сутки наблюдения дегенеративно-воспалительный тип наблюдали в 7,1% случаев в основной группе и в 21,9% в группе сравнения ( $p<0,05$ ). В обеих группах преобладал воспалительно-регенераторный тип, который на 20% чаще встречали у пациентов после применения Er:YAG-лазера ( $p<0,05$ ).

На тридцатые сутки мазки-отпечатки брали из незаживших ран у 31 пациента 1-й группы и у 54 пациентов 2-й группы. Преобладающим типом по-прежнему был воспалительно-регенераторный, примерно в половине случаев в обеих группах ( $p>0,05$ ). Цитогрaммы регенераторного типа наблюдали чаще у пациентов в основной группе, а воспалительного – в группе сравнения ( $p<0,05$ ) (табл. 3.9).

Таблица 3.9 – Результаты цитологического исследования

Сроки наблюдения	№ группы	Типы цитограмм, абс. (%)				
		НТ	ДВТ	ВТ	ВРТ	РТ
1 сутки	Общая группа (n=144)	12 (8,3)	112 (77,8)	20 (13,9)	0	0
	1 группа (n=71)	5 (7,1)	53 (74,6)	13 (18,3)	0	0
	2 группа (n=73)	7 (9,6)	59 (80,8)	7 (9,6)	0	0
	<i>p</i>	<i>0,58</i>	<i>0,37</i>	<i>0,13</i>	-	-
15 сутки	Общая группа (n=144)	0	21 (14,6)	48 (33,3)	70 (48,6)	5 (3,5)
	1 группа (n=71)	0	5 (7,1)	21 (29,6)	41 (57,8)	4 (5,6)
	2 группа (n=73)	0	16 (21,9)	27 (37,0)	29 (39,7)	1 (1,4)
	<i>p</i>	-	<i>0,01</i>	<i>0,35</i>	<i>0,03</i>	<i>0,18</i>
30 сутки	Общая группа (n=85)	0	0	19 (22,4)	46 (54,1)	20 (23,5)
	1 группа (n=31)	0	0	3 (9,7)	16 (51,6)	12 (38,7)
	2 группа (n=54)	0	0	16 (29,6)	30 (55,5)	8 (14,8)
	<i>p</i>	-	-	<i>0,03</i>	<i>0,73</i>	<i>0,01</i>

\*НТ – некротический тип; ДВТ – дегенеративно-воспалительный тип; ВТ – воспалительный тип; ВРТ – воспалительно-регенераторный тип; РТ – регенераторный тип

Анализ цитологической картины раневых дефектов, которые обрабатывали эрбиевым лазером, не выявил каких-либо закономерностей в зависимости от первичного заболевания. Однако в ряде случаев у пациентов с венозными язвами наблюдали замедленную смену типов цитограмм при визуальных признаках заживления раневых дефектов. Вероятно, такая особенность была обусловлена патофизиологическими особенностями венозного застоя в тканях и задержкой в них провоспалительных факторов, как в клиническом наблюдении на рисунке 3.11.



Рисунок 3.11 – Пациентка О., 73 года, амбулаторная карта №346(2019 г.). Диагноз: ВБ. Варикозное расширение вен нижних конечностей, С1,4b,6s,Ер,As,Pr. Трофическая язва правой голени. Операция: эндовазальная термическая абляция БПВ справа в январе 2019 г. Длительность существования язвы 6 месяцев. Обратилась за помощью марте 2019 года, назначено местное лечение с использованием высокоинтенсивного Er:YAG-лазера (12 сеансов). Площадь раны до лечения – 10 см<sup>2</sup>, средняя глубина – 3 мм (А). Посев из раны - *St. epidermidis* ( $3,4 \times 10^3$  КОЕ/гр), воспалительный тип цитогаммы. На тридцатые сутки сокращение площади раны до 1 см<sup>2</sup> (Б), отсутствие бактериального роста, воспалительный тип цитогаммы.

Изменения клеточного состава на поверхности дефектов в большинстве случаев отражали последовательную смену этапов раневого процесса под влиянием лечебных средств. При этом использование высокоинтенсивного Er:YAG-лазера способствовало более эффективному заживлению трофических и диабетических язв у пациентов. Различия цитологической картины в группах выявляли с пятнадцатых суток наблюдения, что не противоречило общим результатам визуальной оценки, планиметрии и бактериологического исследования.

Учитывая гетерогенность ран и невозможность создания стандартных клинических условий, более объективно влияние Er:YAG-лазера на раневой процесс было проанализировано в экспериментальной части исследования (см. главу IV).

### 3.5 Субъективная оценка метода

В большинстве случаев процедура обработки раны с помощью высокоинтенсивного Er:YAG-лазера является безболезненной даже в «жестком» режиме абляции. В рамках исследования сравнивали переносимость лазерного воздействия на раны и традиционную хирургическую обработку с помощью специально разработанной четырёхбалльной шкалы.

На отсутствие болезненности при обработке ран Er:YAG-лазером указали около 70% пациентов. Традиционная хирургическая обработка не вызывала боли лишь в трети случаев ( $p < 0,05$ ). Лёгкую боль отмечал каждый четвертый пациент в основной группе и 42,5% в группе сравнения ( $p < 0,05$ ). Об умеренной боли заявили 11 пациентов, которым очищали раны инструментами, и всего 4 из группы лазерного лечения ( $p < 0,05$ ). На максимально выраженную боль во время хирургической обработки пожаловались 5 пациентов из 2-й группы ( $p > 0,05$ ), в связи с чем потребовалось дополнительное (местное и/или общее) обезболивание (табл. 3.10).

Таблица 3.10 – Сравнение переносимости обработки ран

№ группы	Переносимость, абс. (%)			
	безболезненно	лёгкая боль	умеренная боль	выраженная боль
Лазерная обработка ран 1 группа (n=71)	49 (69,0)	18 (25,4)	4 (5,6)	0
Хирургическая обработка ран 2 группа (n=73)	26 (35,6)	31 (42,5)	11 (15,1)	5 (6,8)
<i>p</i>	<i>&lt; 0,001</i>	<i>0,03</i>	<i>0,06</i>	<i>0,02</i>

В ходе анализа переносимости лазерной обработки у пациентов с ранами различного происхождения выявлены некоторые особенности. Наиболее благоприятно лазерную абляцию переносили пациенты с диабетическими язвами, об отсутствии боли во время процедуры заявили 80% из них. Умеренную боль при

использовании Er:YAG-лазера чаще наблюдали у пациентов с артериальными язвами, в 15,4% случаев. При данной патологии и обширных дефектах приходилось прибегать к дополнительному обезболиванию, как в клиническом наблюдении на рисунке 3.12



Рисунок 3.12 – Пациент К., 64 года, карта стационарного больного №2274 (2019 г.). Диагноз: ОАСНК. ХАН IV ст. Обширная трофическая язва правой голени. Операция: реканализация, баллонная ангиопластика подколенной артерии, малоберцовой, передней и задней большеберцовых артерий справа в октябре 2018 г. Длительность существования язвы 53 месяца. Госпитализирован в феврале 2019 года, назначено местное лечение с использованием высокоинтенсивного Er:YAG-лазера (14 сеансов). Суммарная площадь ран до лечения – 65 см<sup>2</sup>, средняя глубина – 5 мм (А). Посев из раны - *St. aureus* и *En. Faecalis* (более 10<sup>5</sup> КОЕ/гр), некротический тип цитогаммы. Лазерная обработка сопровождалась умеренной болезненностью, в связи с чем перед началом процедуры применяли спрей «Лидокаин» на раневую поверхность и использовали системные анальгетики. В течение месяца площадь раневой поверхности уменьшилась вдвое (Б), по результату посева – низкая степень обсеменённости, воспалительно-регенераторный тип цитогаммы.

Одним из важнейших факторов, определяющих качество жизни пациентов с хроническими ранами, является выраженность болевого синдрома. В исследовании уровень боли у пациентов оценивали с помощью опросника 10-балльной визуально-аналоговой шкалы оценки боли. Полученные результаты позволили сравнить степень болевого синдрома в группах до и после лечения, что предоставило дополнительные сведения о применении высокоинтенсивного Er:YAG-лазера в клинической практике.

Пациентам с зажившими ранами к концу периода наблюдения также предлагалось оценить уровень боли, который мог сохраняться в области рубца.

До лечения диапазон выраженности болевого синдрома у всех был от «2» до «7». При этом значимых различий в группах не наблюдалось ( $p>0,05$ ). Наиболее часто отмечали боль с интенсивностью «5», о которой заявили 33,8% пациентов основной группы и 41,1% в группе сравнения ( $p>0,05$ ).

После лечения отмечали снижение уровня боли по сравнению с изначальными показателями. Диапазон выраженности болевого синдрома уже находился от «0» до «5». Чаще всего в конце периода наблюдения испытуемые отмечали боль с интенсивностью «2»: в 40,8% в 1-й группе и в 38,4% во 2-й ( $p>0,05$ ). Отсутствие болевого синдрома наблюдали у 14 пациентов в основной группе и у 10 в группе сравнения ( $p>0,05$ ).

Таблица 3.11 – Сравнение групп по выраженности болевого синдрома до и после лечения

Период	№ группы	Степень выраженности болевого синдрома							
		«0»	«1»	«2»	«3»	«4»	«5»	«6»	«7»
До лечения, абс. (%)	Общая группа (n=144)	0	0	1 (0,7)	34 (23,6)	30 (20,8)	54 (37,5)	21 (14,6)	4 (2,8)
	1 группа (n=71)	0	0	1 (1,4)	18 (25,4)	17 (23,9)	24 (33,8)	11 (15,5)	0
	2 группа (n=73)	0	0	0	16 (21,9)	13 (17,8)	30 (41,1)	10 (13,7)	4 (5,5)
	<i>p</i>	-	-	0,31	0,63	0,36	0,37	0,76	0,05
После лечения, абс. (%)	Общая группа (n=144)	24 (16,6)	19 (13,2)	57 (39,6)	38 (26,4)	5 (3,5)	1 (0,7)	0	0
	1 группа (n=71)	14 (19,7)	12 (16,9)	29 (40,8)	16 (22,5)	0	0	0	0
	2 группа (n=73)	10 (13,7)	7 (9,6)	28 (38,4)	22 (30,1)	5 (6,8)	1 (1,4)	0	0
	<i>p</i>	0,33	0,19	0,76	0,30	0,02	0,32	-	-

Данные опросников позволили провести сравнительную оценку лазерной и инструментальной обработки ран, а также выраженность болевого синдрома у пациентов в начале лечения и после его завершения. В результате были подтверждены данные об относительно безболезненном применении Er:YAG-лазера по сравнению с хирургической обработкой «острым путём». Это объясняется параметрами лазерного излучения, при котором абляция происходит в наносекундном диапазоне, а окружающие ткани не успевают перенять выделившуюся энергию. Степень болевого синдрома в большинстве случаев не отличалась в группах, однако в единичных случаях фиксировали более выраженную остаточную боль у пациентов после традиционного лечения.

### **3.6 Обсуждение результатов**

Результаты клинической части исследования показали возможность применения высокоинтенсивного Er:YAG-лазера для лечения длительно незаживающих ран нижних конечностей различного генеза, включая язвы на фоне сахарного диабета, венозной и артериальной недостаточности.

В результате комплексного использования основных режимов излучения наблюдали очищение раневых дефектов за 1-2 процедуры, а также развитие грануляционной ткани и краевую эпителизацию на несколько дней раньше, чем в группе стандартного лечения.

В наших наблюдениях полное заживление происходило у пациентов с небольшими по площади ранами. В основной группе это наблюдали в 2 раза чаще, чем в группе сравнения. При этом, анализируя размеры незаживших дефектов, было выявлено преобладание малых ран (<5 см<sup>2</sup>) после стандартного лечения. Это указывало на то, что процессы заживления происходили в обеих группах, но в ряде случаев они завершались раньше в группе применения Er:YAG-лазера.

Динамика изменения размеров раневых дефектов была схожей с результатами исследований, проведённых Alcolea J.M. et al. в 2017 г. и Caliskan E. et al. в 2022 г., где после применения Er:YAG-лазера наступала полная или значительная эпителизация большинства длительно незаживающих ран [75;141].

Исходные данные бактериологического и цитологического исследований соответствовали картине хронического воспалительного процесса с условно-патогенной флорой.

На пятнадцатые сутки фиксировали различия в группах по основным показателям. Отсутствие бактериального роста в ранах чаще наблюдали в основной группе, а среднюю степень обсеменённости в группе сравнения. Результаты цитологического анализа также указывали на более высокую эффективность местного лечения с помощью Er:YAG-лазера.

В конце периода наблюдения показатели бактериологического исследования и цитологической картины незаживших ран были в целом сопоставимы, но, учитывая большее количество эпителизированных дефектов в основной группе, преимущество оставалось за лазерным лечением.

Пациенты лучше переносили санацию ран с помощью Er:YAG-лазера, чем традиционную хирургическую обработку «острым путём». Аналогичные результаты сравнения субъективного восприятия лазерной и традиционной обработки ран были представлены в статье Najhosseini B. в 2020 г. [92]. Выраженность болевого синдрома до и после лечения была сопоставима в обеих группах и снижалась в среднем на 3 балла в соответствии со шкалой боли.

Первичный анализ результатов лазерного воздействия на раны различного генеза показал некоторые преимущества метода у пациентов с СДС. При данной патологии отмечена более эффективная деконтаминация раневых дефектов и безболезненность процедуры. Подтверждением может служить исследование Chilgar R.M. 2023 г., где после 11 сеансов применения Er:YAG-лазера удавалось

добиться заживления всех раневых дефектов у пациентов с сахарным диабетом. В свою очередь, в работе Johnson M.J. 2019 г. было отмечено двукратное увеличение скорости заживления диабетических язв по сравнению со стандартным вариантом лечения [76; 93].

Наряду с местной терапией длительно незаживающих ран важное значение придавалось компенсации основного и сопутствующих заболеваний. У большинства пациентов был нормализован уровень глюкозы, а также снижены проявления венозной и артериальной недостаточности, в т.ч. и оперативным путём. Таким образом, все полученные результаты являлись следствием комплексного лечения, где местное воздействие на хронические раны с помощью Er:YAG-лазера выступало одним из компонентов.

Благодаря полученным данным и имеющимся в литературе сведениям, были сделаны предположения о фотобиологических эффектах, возникающих в осложнённых ранах под воздействием Er:YAG-лазера на клеточном и субклеточном уровнях. На основании этого были сформулированы вопросы о возможностях предложенного метода в борьбе с микробными биоплёнками, влиянии излучения на функциональную активность клеток и процессы заживления в целом.

С целью изучения выдвинутых вопросов было предпринято экспериментальное исследование на модели трофической гнойной раны, чему будет посвящена следующая глава.

## ГЛАВА IV. ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ЭРБИЕВОГО ЛАЗЕРА НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАНЫ

### 4.1 Апробация модели трофической гнойной раны

Моделирование раневого процесса, осложненного ишемией, гипергликемией или другими факторами, является трудной задачей, о чем говорит множество описанных способов. Варианты формирования раневых дефектов могут различаться, но в итоге должны приводить к одному результату – затяжному воспалению тканей, которое можно многократно воспроизводить в условиях эксперимента.

Для решения этой задачи нами была разработана экспериментальная модель трофической гнойной раны (Патент РФ на изобретение №2753955, приоритет от 26.01.2021 г.). Особенность модели заключалась в выполнении пособий, вызывающих ишемию и инфицирование тканей, а использование силиконового диска позволяло создавать единообразные дефекты, защищенные от внешних воздействий.

Развитие нарушений микроциркуляции в ранах было зарегистрировано с помощью методов дистанционной термометрии и люминесцентного анализа.

С помощью портативного тепловизора было зафиксировано снижение температуры на поверхности раневых дефектов, что объективно показывало уменьшение локального кровотока в нужной зоне (рис. 4.1 А,Б). Среднее значение температуры на поверхности раневых дефектов у экспериментальных животных до выполнения пособий, вызывающих ишемию тканей, составляло  $37,7^{\circ}\text{C}$  ( $37,5$ ;  $37,8$ ). Через 15 минут после подшивания силиконового диска и наложения кругового кисетного шва показатели температуры снижались до  $35,8^{\circ}\text{C}$  ( $35,7^{\circ}\text{C}$ ;  $36,0^{\circ}\text{C}$ ), что подтверждало ухудшение микроциркуляции в экспериментальной ране ( $p < 0,05$ ).

В процессе люминесцентного анализа (рис. 4.1 В) средний уровень вторичной флуоресценции тканей раневой поверхности в среднем составлял  $25,2 \pm 3,4$  усл. ед. до формирования условий ишемии. Контрольное исследование, проведенное через 30 минут после подшивания силиконового диска и наложения

кругового кисетного шва, показало достоверное снижение флуоресценции тканей до  $5,7 \pm 2,3$  усл. ед. на поверхности раны ( $p < 0,05$ ) (рис. 4.1 Г). Изучение динамики накопления и выведения индикатора из тканей выявило замедленную элиминацию флуорохрома, что также указывало на локальное нарушение гемомикроциркуляции.

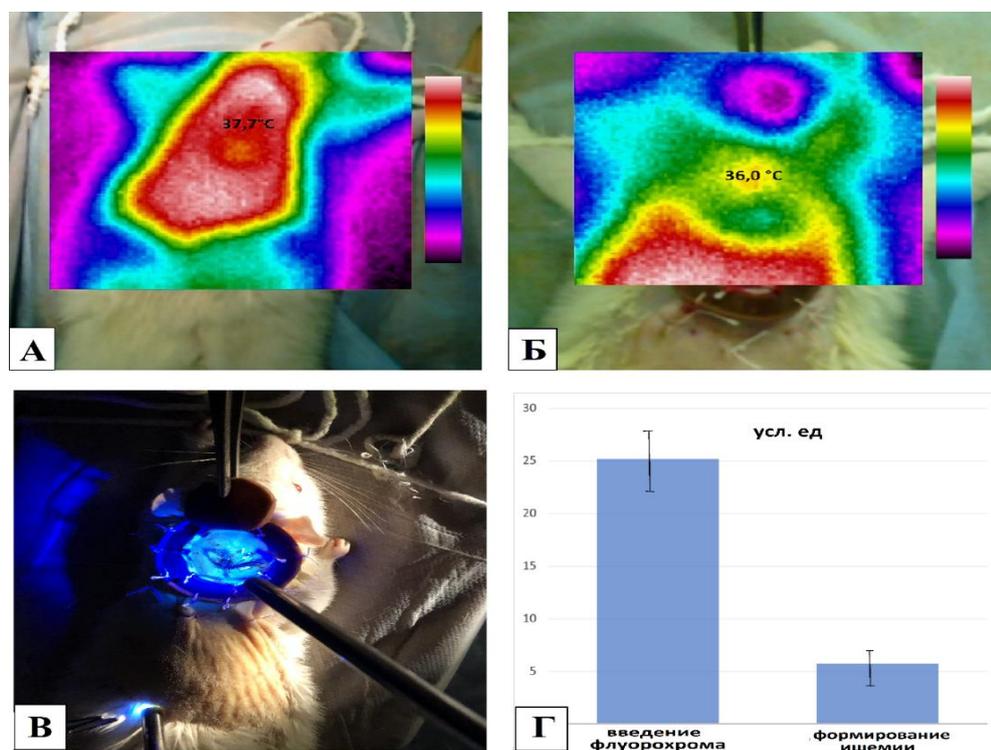


Рисунок 4.1 – Результаты контроля нарушений микроциркуляции в экспериментальных ранах: А – дистанционная термометрия до формирования ишемии; Б – дистанционная термометрия после формирования ишемии; В – регистрация вторичной флуоресценции; Г – изменение интенсивности флуоресценции

Экспериментальные раны спустя 48 часов после моделирования обладали признаками осложнённого воспалительного процесса с характерным гнойно-фибринозным налётом, очагами некрозов и отёком кожных краёв (рис. 4.2). Объективно это подтверждалось с помощью бактериологического, цитологического и морфологического методов исследования. Наличие силиконового диска препятствовало естественной контракции, защищало раневые дефекты, что вместе с другими осложняющими факторами, в определенной степени, приближало её к клиническим формам трофических язв.



Рисунок 4.2 – Вид экспериментальной раны через 48 часов

Состоятельность модели можно было оценить в течение всего эксперимента анализируя динамику санации, заживления и цитологическую картину ран у животных в 1-й (контрольной) группе, где лечение не проводилось.

Визуально в ранах этой группы признаки очищения наблюдали к  $11,6 \pm 0,2$  суткам, появление грануляций – к  $13,7 \pm 0,2$  суткам, что происходило значительно позже, чем в остальных группах ( $p < 0,05$ ). Средняя площадь дефектов сокращалась с  $441,5 \pm 0,9$  мм<sup>2</sup> до  $263,8 \pm 5,2$  мм<sup>2</sup> за двенадцать суток, а скорость заживления составила  $4,0 \pm 0,1$  %/сут, что также уступало аналогичным показателям 2-й, 3-й и 4-й групп ( $p < 0,05$ ) (см. раздел 4.2).

По результатам бактериологических посевов высокая степень обсеменённости (более  $10^5$  КОЕ/гр) ран 1-й группы преобладала с первых по двенадцатые сутки, в то время как в остальных группах в конце периода наблюдения большинство посевов были отрицательными ( $p < 0,05$ ) (см. раздел 4.3).

Изменения цитологической картины в контрольной группе были также минимальны. В течение периода наблюдения в большинстве мазков-отпечатков наблюдали дегенеративно-воспалительный и воспалительный типы цитограмм, тогда как в других группах к двенадцатым суткам преобладали воспалительно-регенераторный и регенераторный типы ( $p < 0,05$ ) (см. раздел 4.4).

#### **4.2 Макроскопическая оценка заживления**

О динамике раневого процесса судили по критериям визуальной оценки (сроки очищения ран и заполнения дефектов грануляциями), а также по

результатам цифровой планиметрии, которая позволила объективно фиксировать изменение площади ран.

Под воздействием Er:YAG-лазера в 3-й и 4-й группах явные признаки очищения ран от детрита и участков некроза наблюдали фактически одновременно, на 5 сутки ( $p > 0,05$ ). Для сравнения: во 2-й группе аналогичные признаки отмечены на  $7,9 \pm 0,3$  сутки ( $p < 0,05$ ) (рис. 4.4).

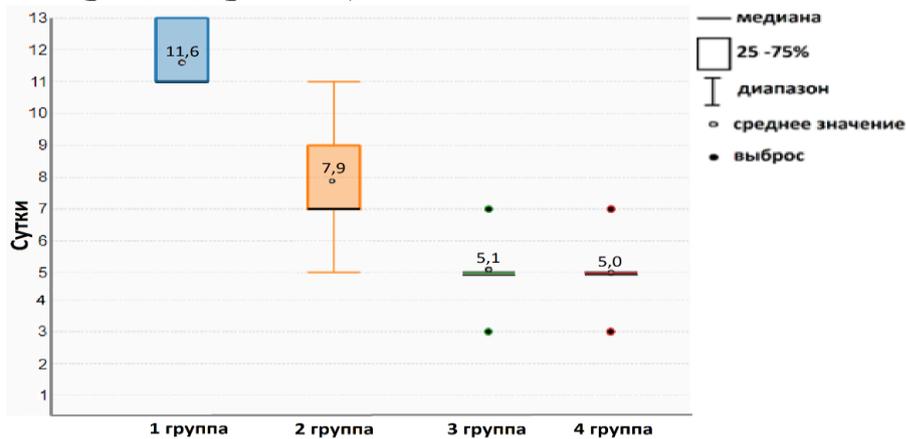


Рисунок 4.4 – Сроки очищения ран

Таким образом, можно было судить о выраженном saniрующем эффекте лазера в режиме абляции, что приводило к полному очищению ран после 1-2 процедур. Во 2-й группе хирургической обработки не проводилось, поэтому очищение ран происходило только за счёт действия антисептика (0,1% р-ра полигексанида) на раневую флору.

Заполнение раневых дефектов зрелой грануляционной тканью в 3-й и 4-й группах видели в среднем к 7 суткам ( $p > 0,05$ ), а во 2-й группе – к  $9,0 \pm 0,3$  суткам наблюдения ( $p < 0,05$ ) (рис. 4.5).

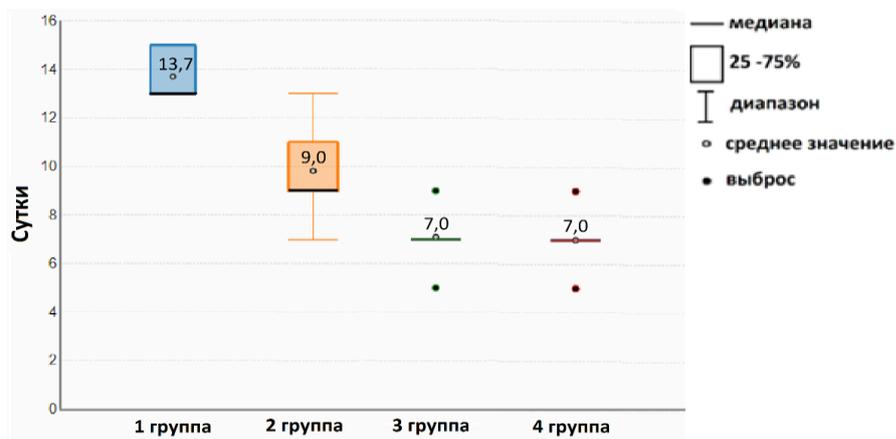


Рисунок 4.5 – Сроки появления грануляционной ткани в ранах

Процессы заживления в очищенных ранах происходили более активно в 3-й и 4-й группах под воздействием режима стимуляции Er:YAG-лазера, который применялся с первых суток вместе с режимом абляции. Вместе с ростом грануляционной ткани запускались процессы краевой эпителизации раневых дефектов. В свою очередь, во 2-й группе раствор антисептика оказывал только saniрующий эффект и непосредственно не влиял на анаболические процессы в ранах.

Результаты цифровой планиметрии отражающие динамику заживления ран в течение периода наблюдения представлены в таблицах 4.1, 4.2.

Таблица 4.1 – Данные планиметрии экспериментальных ран

№ группы	Показатели	Площадь ран, мм <sup>2</sup>				
		1 сутки	3 сутки	5 сутки	7 сутки	12 сутки
1 группа (n=20)	M±σ	441,5±0,9	413,6±0,9	380,8±2,3	329,2±2,3	263,8±5,2
	Me (Q1; Q3)	440,5 (438,5; 445,5)	414,0 (408,5; 419,5)	380,5 (373,5; 388,5)	327,5 (323,0; 333,0)	263,5 (241,5; 286,0)
2 группа (n=20)	M±σ	441,2±0,9	407,5±2,3	363,6±2,6	307,8±3,2	195,8±5,6
	Me (Q1; Q3)	440,5 (438,0; 444,5)	414,0 (408,5; 419,5)	365,0 (355,0; 373,0)	310,5 (396,5; 319,0)	197,0 (178,5; 214,0)
3 группа (n=20)	M±σ	440,3±0,9	402,0±2,4	330,6±4,5	234,3±4,1	112,4±6,5
	Me (Q1; Q3)	439,5 (438,5; 443,0)	402,5 (393,0; 410,0)	326,5 (318,5; 342,5)	231,0 (220,0; 247,0)	107,5 (94,0; 132,0)
4 группа (n=20)	M±σ	439,1±1,8	398,0±2,3	323,7±4,9	228,7±6,1	105,0±9,4
	Me (Q1; Q3)	439,0 (437,0; 444,5)	399,0 (388,5; 406,0)	319,5 (310,5; 341,0)	224,5 (210,5; 244,5)	103,0 (69,0; 135,5)

Таблица 4.2 – Значимость данных планиметрии в зависимости от группы

	1 сутки	3 сутки	5 сутки	7 сутки	12 сутки
р-критерий при сравнении результатов планиметрии в группах	1vs2=0,82	1vs2=0,05	1vs2=0,00	1vs2=0,00	1vs2=0,00
	1vs3=0,50	1vs3=0,00	1vs3=0,00	1vs3=0,00	1vs3=0,00
	1vs4=0,32	1vs4=0,00	1vs4=0,00	1vs4=0,00	1vs4=0,00
	2vs3=0,68	2vs3=0,12	2vs3=0,00	2vs3=0,00	2vs3=0,00
	2vs4=0,46	2vs4=0,02	2vs4=0,00	2vs4=0,00	2vs4=0,00
	3vs4=0,73	3vs4=0,30	3vs4=0,26	3vs4=0,31	3vs4=0,55

Размеры раневых дефектов во всех группах в первые сутки наблюдения не различались ( $p>0,05$ ) и соответствовали габаритам внутреннего кольца силиконового диска (~440 мм<sup>2</sup>).

На третьи сутки происходило сокращение площади ран в среднем на 30-40 мм<sup>2</sup>, однако значимых различий между 1-й и 2-й, 2-й и 3-й, а также 3-й и 4-й группами выявлено не было ( $p>0,05$ ).

Статистически значимое уменьшение площади ран в группах применения Er:YAG-лазера, в сравнении со 2-й группой, отмечено с пятых суток наблюдения ( $p<0,05$ ). Такая же тенденция сохранялась и на седьмые сутки наблюдения, а на двенадцатые сутки достигала максимальных значений. В 3-й и 4-й группах площадь ран в среднем сократилась вчетверо от начальных размеров, в то время как во 2-й группе – в 2,3 раза. Результаты планиметрии наглядно представлены на рисунке 4.6.

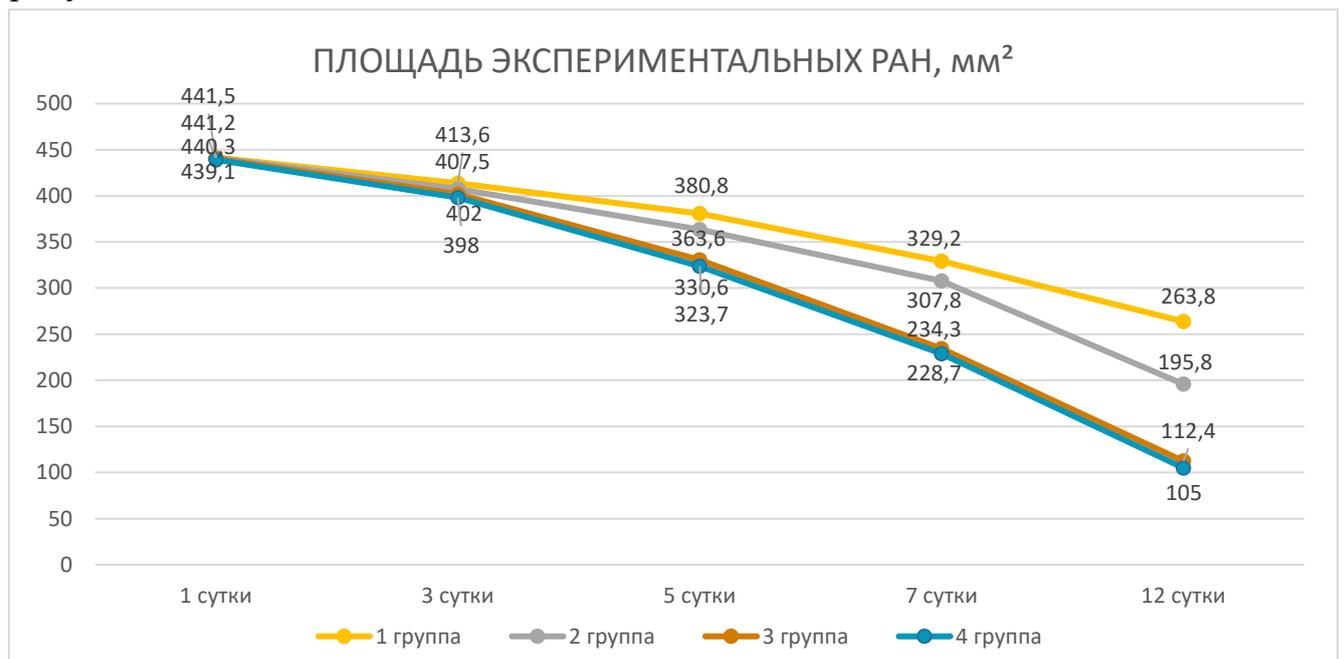


Рисунок 4.6 – График изменения площади экспериментальных ран

Таким образом, изменение площади ран соотносилось с результатами визуальной оценки. Процессы эпителизации под воздействием Er:YAG-лазера начинали протекать активнее после очищения раневых дефектов, начиная с пятых суток.

На рисунке 4.7 отражена динамика изменения площади экспериментальных ран, выраженная в виде средней скорости заживления, рассчитанной по методу Л.Н. Поповой в период наблюдения с третьих по двенадцатые сутки. Как и результаты планиметрии, отмечали более высокое значение данного показателя в 3-й и 4-й группах по сравнению со 2-й ( $p < 0,05$ ).

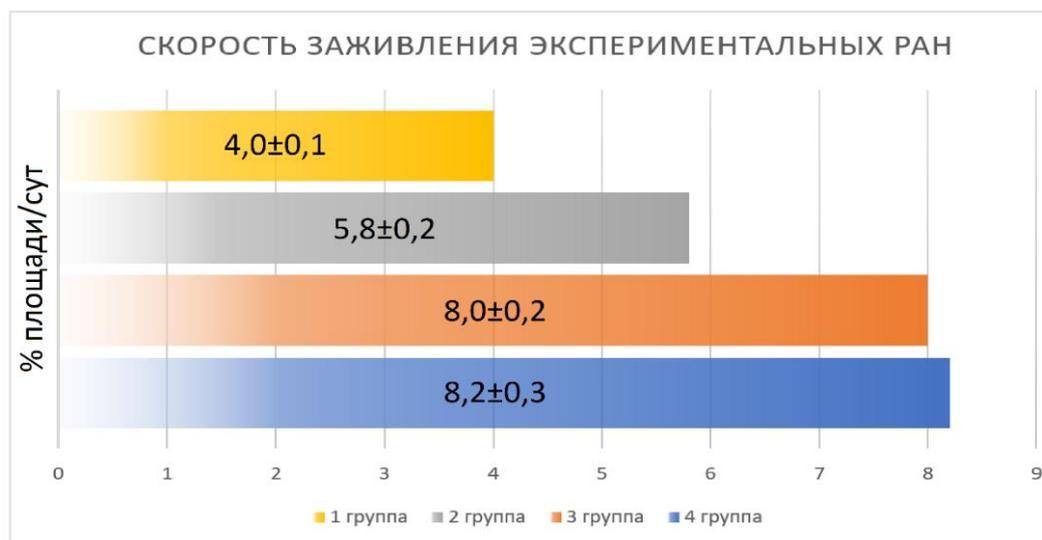


Рисунок 4.7 – Скорость заживления экспериментальных ран

### 4.3 Анализ противомикробного эффекта эрбиевого лазера

Одним из основных критериев оценки эффективности лазерного излучения в эксперименте было микробиологическое исследование с качественным и количественным анализом микрофлоры. Результаты посевов на 1, 3, 5, 7 и 12 сутки наблюдения позволили оценить в динамике saniрующую роль высокоинтенсивного Er:YAG-лазера, антисептика и их комбинации при воздействии на раневые дефекты.

В начале исследования у всех животных раны имели признаки инфицирования, а показатели микробного загрязнения во всех группах не различались ( $p > 0,05$ ). Качественный состав флоры в течение всего периода наблюдения закономерно был представлен монокультурой *St. Aureus* (ATCC 25923), внесенной ранее в рамках эксперимента. В первые сутки во всех группах преобладала высокая степень обсеменённости, в остальных случаях наблюдали среднюю степень (рис. 4.8).

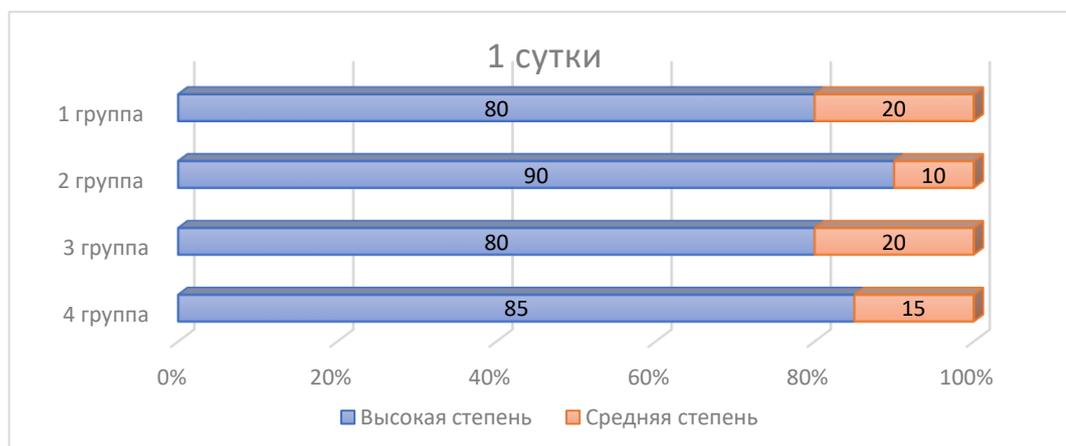


Рисунок 4.8 – Обсеменённость экспериментальных ран (первые сутки наблюдения)

На третьи сутки уровень микробного загрязнения ран значительно различался в зависимости от группы ( $R_S=0,64$ ;  $p<0,001$ ). После применения Er:YAG-лазера среднюю степень обсеменённости встречали в половине случаев, низкую – в 35% в 3-й и в 45% в 4-й группах. Высокую степень обсеменённости наблюдали в единичных случаях в обеих группах лазерного лечения. Во 2-й группе высокую и среднюю степени инфицирования наблюдали в равных долях. (рис. 4.9).

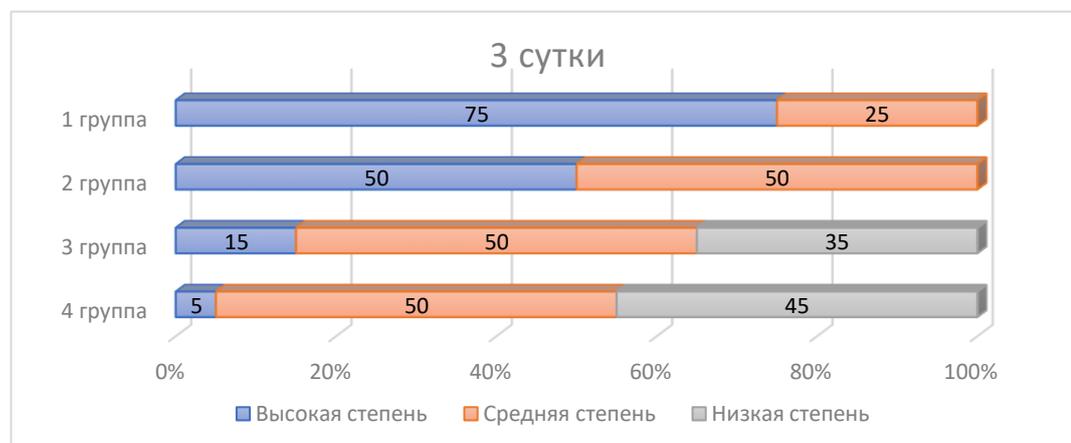


Рисунок 4.9 – Обсеменённость экспериментальных ран (третьи сутки наблюдения)

На пятые сутки различия в группах становились более очевидными ( $R_S=0,70$ ;  $p<0,001$ ). В группах, где применял Er:YAG-лазер, чаще встречали низкую степень обсеменённости, в 55% случаев, а во 2-й группе – среднюю, в 65%. У 3 животных из группы комбинированного лечения отмечены отрицательные посеы из ран (рис. 4.10).

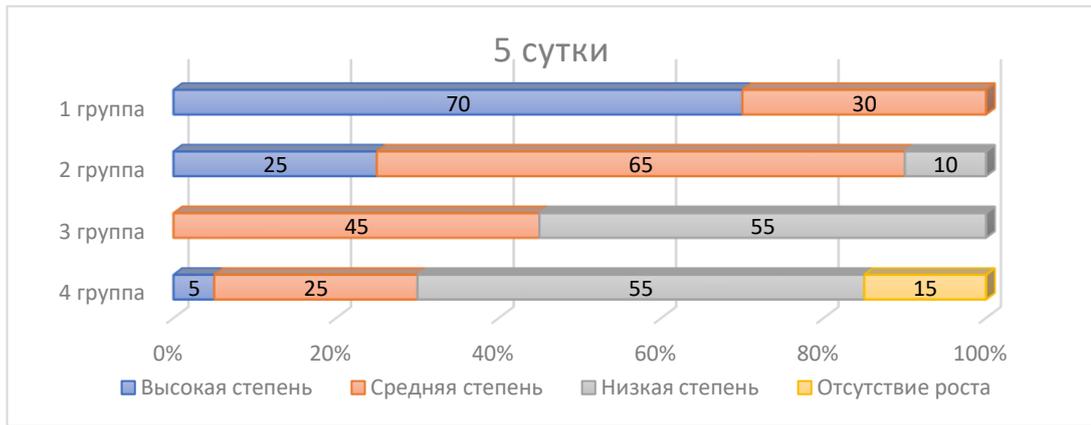


Рисунок 4.10 – Обсеменённость экспериментальных ран (пятые сутки наблюдения)

На седьмые сутки различия в группах были максимальными ( $R_s=0,84$ ;  $p<0,001$ ). В 3-й группе 65% посевов соответствовали низкой степени микробного загрязнения, среднюю степень наблюдали в 20%, а у 3 животных посева были отрицательными. В 4-й группе в 60% был низкий уровень обсеменённости, во всех остальных случаях бактериальный рост отсутствовал. Во 2-й группе наблюдали возрастание случаев низкой обсеменённости ран, что указывало на saniрующий эффект антисептика. (рис. 4.11).

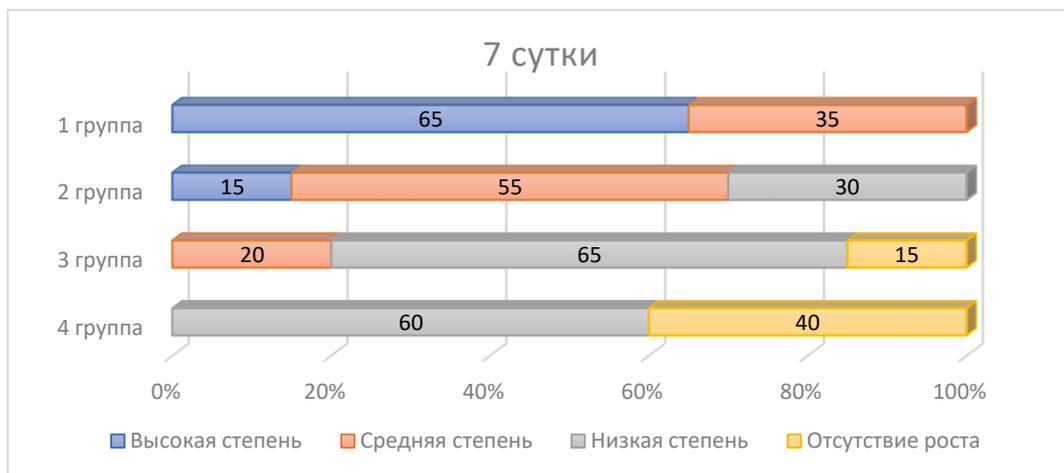


Рисунок 4.11 – Обсеменённость экспериментальных ран (седьмые сутки наблюдения)

На двенадцатые сутки сохранялась тенденция к деконтаминации экспериментальных ран в группах, где проводилось лечение. При этом значимые различия оставались между всеми группами ( $R_s=0,76$ ;  $p<0,001$ ). В группах, где применяли Er:YAG-лазер, преобладали чистые раны, в 65% в 3-й и в 70% в 4-й, а в

остальных случаях выявляли низкую степень микробного загрязнения. Во 2-й группе высокая степень обсеменённости была выявлена у 2 животных, средняя встречалась в 40%, а низкая степень и отсутствие микробного роста наблюдали в половине случаев (рис. 4.12).

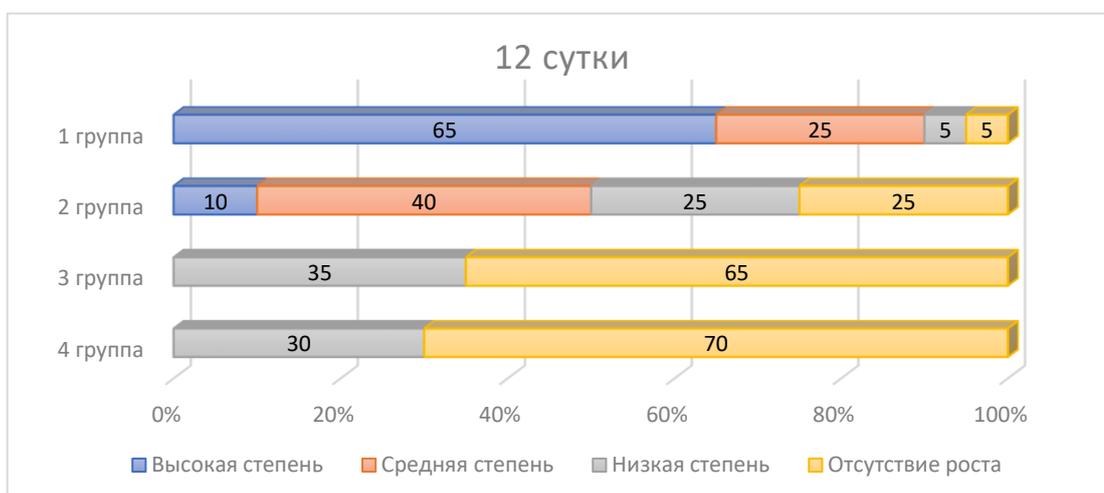


Рисунок 4.12 – Обсеменённость экспериментальных ран (двенадцатые сутки наблюдения)

Непосредственный эффект лазерного воздействия оценивали в 3-й группе в первые сутки наблюдения, сразу после обработки экспериментальных ран (рис. 4.13).

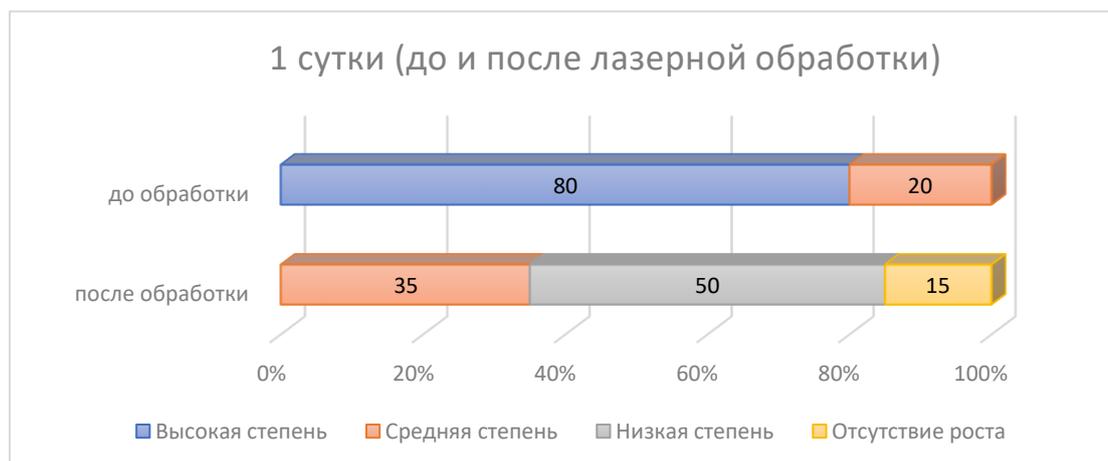


Рисунок 4.13 – Изменение обсеменённости экспериментальных ран в 3-й группе непосредственно после применения эрбиевого лазера

Полученные данные подтвердили выраженные saniрующие свойства высокоинтенсивного Er:YAG-лазера в ближайшем отрезке времени после его применения ( $R_s=0,80$ ;  $p<0,001$ ). Эти результаты были выше, чем на третьи сутки в

этой же группе ( $p < 0,001$ ), что можно объяснить способностью к воспроизводству, сохранившейся даже в небольшом количестве популяции бактерий.

Результаты бактериологического исследования подтвердили противомикробный эффект при воздействии Er:YAG-лазера на экспериментальные раны. Резкое снижение бактериальной обсеменённости в первые сутки наблюдения возникало сразу же после обработки раневого дефекта в режиме абляции. Фактически происходило выпаривание раневой флоры. На третьи сутки количество бактерий в ранах в среднем было больше, чем непосредственно после лазерной обработки. Однако последующее применение лазера приводило к деконтаминации большинства раневых дефектов уже к 5-7 суткам наблюдения, что совпадало со сроками визуального очищения ран.

Применение антисептика во 2-й группе также способствовало снижению бактериальной нагрузки в экспериментальных ранах. Однако это происходило с некоторым запозданием по сравнению с 3-й и 4-й группами. Это можно объяснить отсутствием физической санации (аналогичной режиму абляции Er:YAG-лазера или традиционной хирургической обработки) и, как следствие, более поздним очищением ран.

В целом результаты бактериологического исследования соотносились с результатами визуальной оценки и планиметрии. Санирующий эффект оптического излучения превосходил аналогичный эффект антисептика, но комбинированный вариант воздействия на раны в итоге был сопоставим с монотерапией Er:YAG-лазером.

#### **4.4 Анализ цитологической картины экспериментальных ран**

Изменения клеточного состава на поверхности экспериментальных ран под воздействием Er:YAG-лазера были проанализированы с помощью цитологического исследования в динамике. О характере раневого процесса судили по одному из пяти типов цитограмм, выявленных в мазках-отпечатках.

Результаты изменения цитологической картины в динамике представлены в таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Результаты цитологического исследования

Сроки наблюдения	№ группы	Тип цитограммы, %					p-критерий
		Н	ДВ	В	ВР	Р	
1 сутки	1	40	60	0	0	0	p>0,05
	2	40	60	0	0	0	
	3	45	55	0	0	0	
	4	40	60	0	0	0	
3 сутки	1	5	85	10	0	0	R <sub>s</sub> =0,46; p<0,001
	2	10	55	35	0	0	
	3	0	45	55	0	0	
	4	0	30	70	0	0	
5 сутки	1	0	75	25	0	0	R <sub>s</sub> =0,63; p<0,001
	2	5	10	75	10	0	
	3	0	5	70	25	0	
	4	0	5	45	50	0	
7 сутки	1	0	55	45	0	0	R <sub>s</sub> =0,61; p<0,001
	2	0	10	45	45	0	
	3	0	0	35	50	15	
	4	0	0	30	60	10	
12 сутки	1	0	35	50	15	0	R <sub>s</sub> =0,76; p<0,001
	2	0	0	25	60	15	
	3	0	0	10	55	35	
	4	0	0	5	60	35	

\*Н – некротический; ДВ – дегенеративно-воспалительный; В – воспалительный; ВР – воспалительно-регенераторный; Р – регенераторный

В первые сутки наблюдения во всех группах наблюдали схожую цитологическую картину, соответствующую гнойно-воспалительному процессу. В мазках-отпечатках встречали некротический и дегенеративно-воспалительный типы цитограмм.

Начиная с третьих суток при воздействии Er:YAG-лазера цитологическая картина менялась, и в большинстве мазков определяли воспалительный тип, который отражал начавшуюся смену фаз раневого процесса. Воспалительный тип встречали и во 2-й группе, где применяли антисептик, но преобладающим оставался дегенеративно-воспалительный.

На пятые сутки у животных 3-й и 4-й групп на поверхности ран фиксировали увеличение количества фибробластов, что характерно для воспалительно-регенераторного типа цитограммы. Такие изменения свидетельствовали о регенераторной фазе раневого процесса в экспериментальных ранах. Тем временем

во 2-й группе в единичных случаях также встречали воспалительно-регенераторный тип, но преобладающим оставался воспалительный.

На седьмые сутки сохранялась положительная динамика цитологической картины в группах, где проводилось лечение. Работа Er:YAG-лазера в стимулирующем режиме способствовала росту грануляций, а в большинстве мазков наблюдали воспалительно-регенераторный тип. На фоне применения антисептика в эти сроки было равное количество мазков с воспалительным и воспалительно-регенераторным типами цитограмм.

К двенадцатым суткам более чем у 90% животных 3-й и 4-й групп в схожем соотношении наблюдали воспалительно-регенераторный и регенераторный типы цитограммы, что отражало тенденцию к полному заживлению. Во 2-й группе сохранялся воспалительный тип, но у большинства животных отмечали благоприятное течение раневого процесса с преобладанием цитограмм воспалительно-регенераторного типа.

Результаты проведённого в динамике цитологического исследования отражены графически на рисунке 4.14

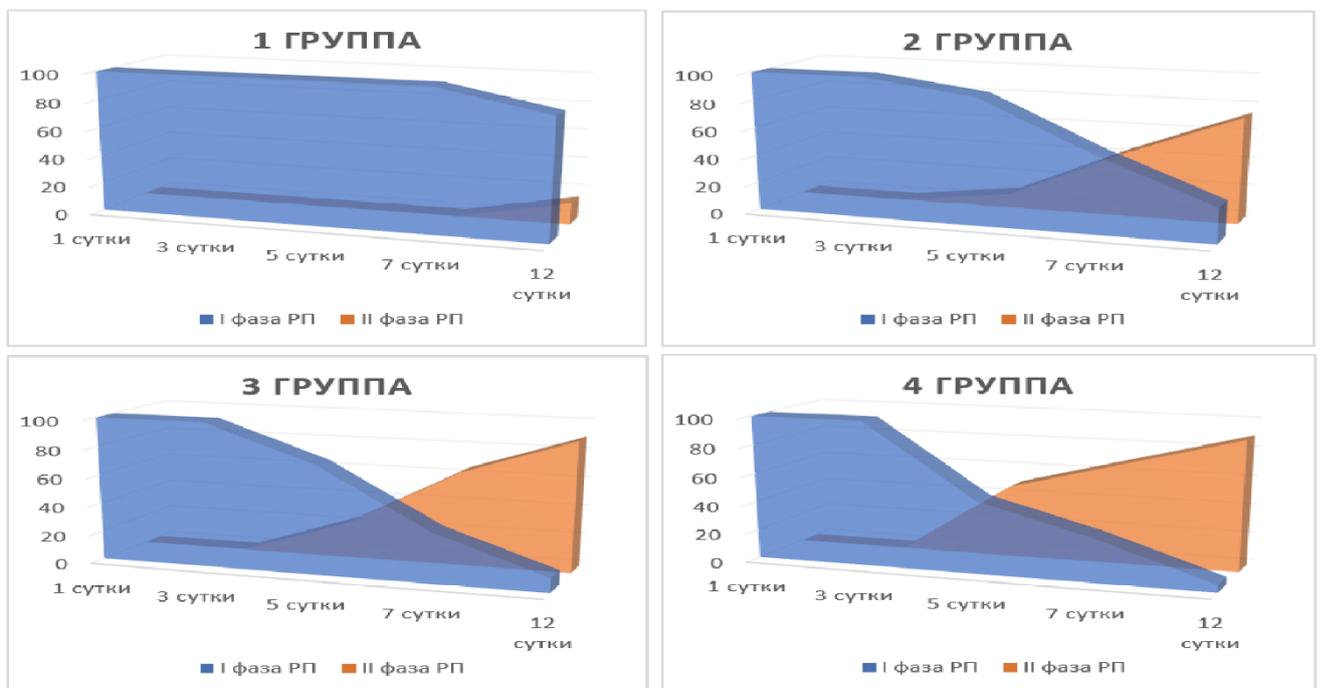


Рисунок 4.14 – Динамика раневого процесса в экспериментальных ранах на основании цитологической картины\*

\*данные приведены при условии, что некротический, дегенеративно-воспалительный и воспалительный типы цитограмм характерны для I фазы раневого процесса, а воспалительно-регенераторный и регенераторный для II фазы раневого процесса

Смена типов цитогрaмм наиболее динамично проявлялась в группе комбинированного лечения, где уже на 5 сутки в половине случаев наблюдали наличие фибробластов в поверхностных слоях раневых дефектов. Во 2-й и 3-й группах признаки заживления ран фиксировали позднее, однако к двенадцатым суткам наблюдения наиболее благоприятный регенераторный тип отмечали чаще в группах, где применяли Er:YAG-лазер. В целом это свидетельствовало о положительном влиянии стимулирующего режима лазера, антисептика и их сочетания на раневой процесс.

#### **4.5 Морфологическое исследование экспериментальных ран**

Основные структурные изменения в тканях экспериментальных ран были изучены и описаны в ходе комплексного морфологического анализа, проведённого с помощью световой и электронной микроскопии. Результаты полученной гистологической и ультраструктурной картины сравнивали до лечения и в ходе эксперимента на 3, 5, 7 и 12-е сутки. В первые сутки наблюдения оценивали непосредственный эффект сразу после обработки Er:YAG-лазером раневых дефектов. Особую роль играли электронограммы, которые на ультраструктурном уровне позволяли оценивать воздействие лечебных средств на микробные биоплёнки, фиксировать признаки изменения функциональной активности клеток на уровне органелл, а также наблюдать за развитием грануляционной ткани.

В первые сутки наблюдения при морфологическом анализе материала во всех группах отмечали выраженную воспалительную реакцию. Поверхность ран была густо инфильтрирована лейкоцитами, лимфоцитами, эритроцитами и микробными клетками. В подлежащей ткани наблюдали явления отека, нейтрофильной и лимфомакрофагальной инфильтрации (рис. 4.15А).

В изменённых полиморфноядерных лейкоцитах (ПМЯЛ) микробные клетки находились как в фагосомах, так и в цитоплазме, без образования фагоцитарных вакуолей. В целом о снижении фагоцитарной функции клеток можно было судить по небольшому количеству фагосом, фаголизосом, единичным цитоплазматическим выростам, а также деструкции органелл. Бактерии не теряли

способности делиться даже в фагосомах, на что указывало наличие перегородок из двойной мембраны, что характерно для состояния митоза (рис. 4.15Б). Незавершённость фагоцитоза и снижение функциональной активности иммунокомпетентных клеток являлось достаточным условием для дальнейшего распространения бактерий в окружающих тканях и поддержания гнойно-воспалительного процесса.

На поверхности раны формировались типичные биоплёнки с наличием специфической упорядоченности структур и элементов внеклеточного матрикса, характерных для микробных сообществ такого типа. На электронограммах наблюдали многослойную мембрану с неровными контурами, грибовидными выростами, участками уплотнения и разволокнения. Заключенные в биоплёнку бактериальные клетки имели четкий контур и были окружены экзополисахаридным матриксом в виде хлопьевидных элементов (рис. 4.15В).

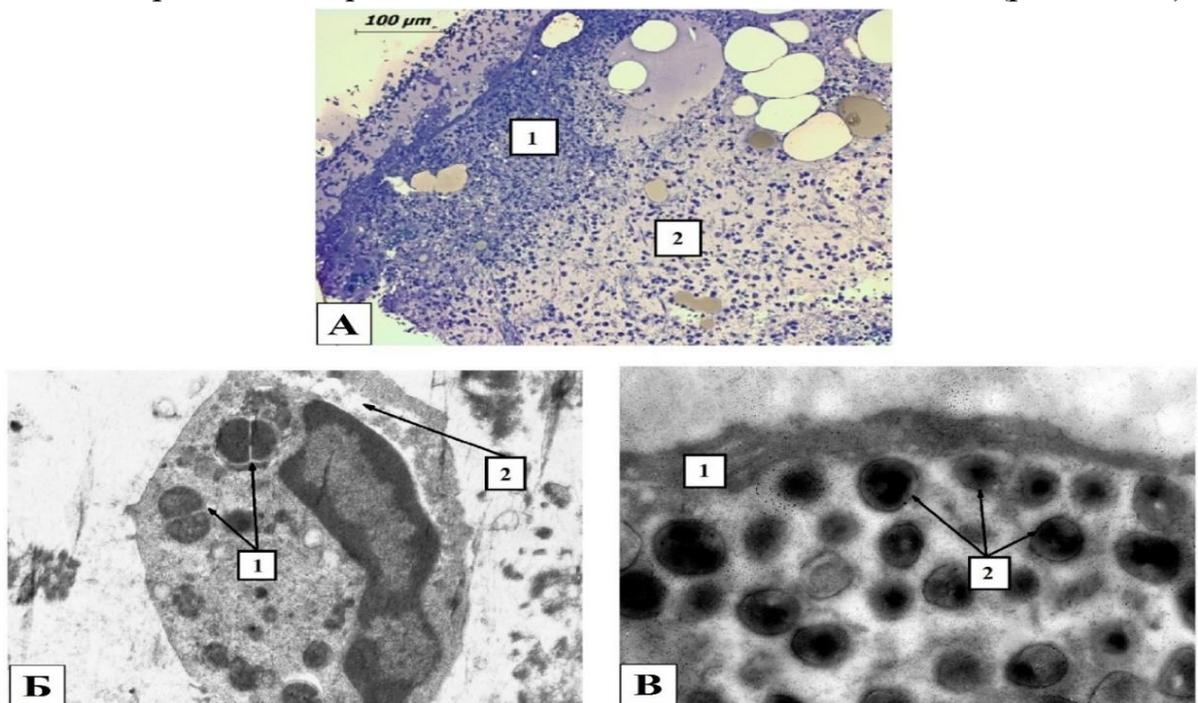


Рисунок 4.15 – Морфология экспериментальных ран до лечения в первые сутки наблюдения. А – биоптат из раны: 1 – лейкоцитарно-некротический слой, 2 – зона воспаления; Б – изменённый ПМЯЛ в первые сутки наблюдения: 1 – микробные клетки вне фагоцитарных вакуолей с признаками деления, 2 – зоны лизиса в околоядерной зоне; В – микроорганизмы в составе биоплёнки: 1 – многослойная мембрана биоплёнки; 2 – бактериальные клетки. (окраска толуидиновым синим: А –  $\times 100$ ; электронограммы: Б –  $\times 14000$ , В –  $\times 23000$ )

С целью изучения непосредственного воздействия высокоинтенсивного Er:YAG-лазера на экспериментальные раны в первые сутки наблюдения в 3-й группе был осуществлён дополнительный забор материала сразу после манипуляции. При анализе гистологической картины в препаратах наблюдалось значительное уменьшение поверхностного лейкоцитарно-некротического слоя при сохранении воспалительной реакции подлежащих тканей, в которых отсутствовали явные признаки термического повреждения клеток. На ультраструктурном уровне наблюдали различную степень деструкции бактерий, расположенных вне биоплёнки: одни подвергались тотальному разрушению, у других фиксировали нарушение целостности плазматических мембран с вытеканием цитоплазмы и прочие деформации. Также нарушалась и целостность микробных биопленок с набуханием, фрагментацией и разрывами их мембран и, как следствие, полным или частичным разрушением бактерий, находящихся внутри экстрацеллюлярного матрикса (рис. 4.16).

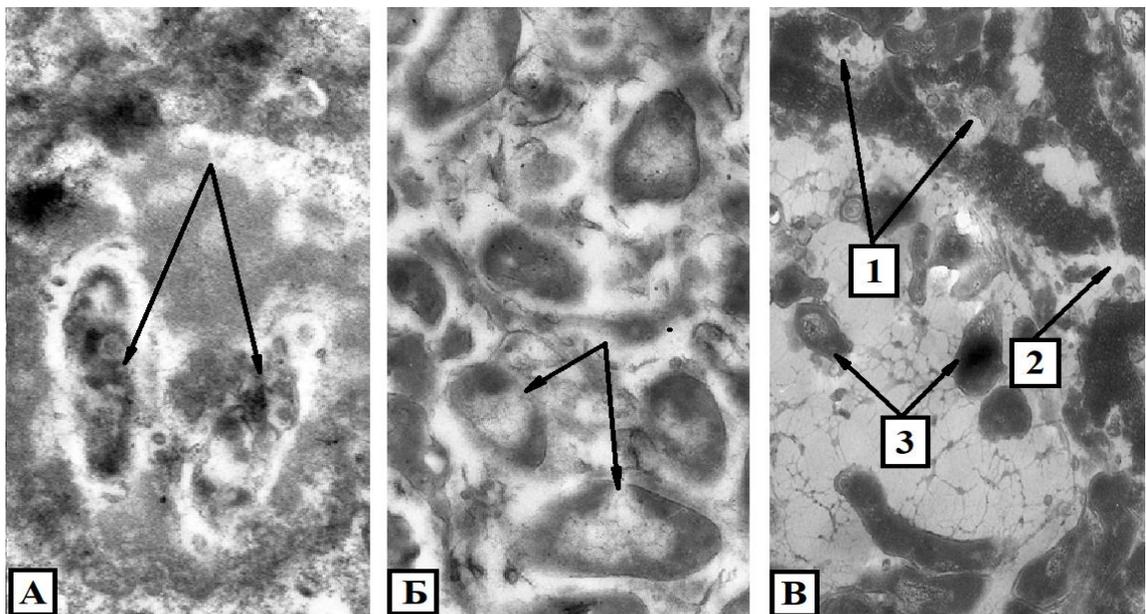


Рисунок 4.16 – Морфологические изменения в экспериментальных ранах сразу после воздействия эрбиевого лазера в первые сутки наблюдения в 3-й группе. А – полное разрушение бактерий; Б – частичное разрушение плазматической мембраны бактерий; В – повреждение биоплёнки: 1 – повреждение мембраны, 2 – разрыв мембраны, 3 – повреждение бактерий (электроннограммы: А,Б –  $\times 23000$ ; В –  $\times 6000$ )

На третьи сутки наблюдения в 1-й группе сохранялись морфологические признаки выраженной воспалительной реакции. В ранах преобладали клетки

острой фазы: ПМЯЛ, эозинофильные лейкоциты, активные моноциты с крупным ядром (рис. 4.17А). Микробные клетки находились как внеклеточно, в детрите, так и внутриклеточно, сохраняя при этом признаки жизнеспособности (рис. 4.17В). Во всех биоптатах в поверхностном слое ран обнаруживали биоплёнки различной толщины и плотности с характерным межклеточным матриксом и без явных признаков нарушения целостности их защитных мембран (рис. 4.17Г). В более глубоких слоях препарата отсутствовали элементы формирования грануляционной ткани. Единичные фибробласты были небольших размеров, чаще овальной или удлинённой формы, с крупным ядром. В цитоплазме наблюдали небольшое количество органелл – мелких митохондрий и коротких фрагментов эндоплазматического ретикулума. Такая ультраструктурная организация фибробластов свидетельствовала о низкой функциональной активности, характерной для молодых форм клеток. Наличие макрофагов, тучных клеток и эозинофилов, наблюдаемых во всех слоях препарата, свидетельствовало о поддержании воспалительного процесса на всю толщину тканей. Признаки ангиогенеза были минимальны, а капилляры встречались единично, с обилием ПМЯЛ вокруг них.

Во 2-й группе на третьи сутки наблюдения на поверхности ран наблюдали невыраженный слой клеточного детрита с ПМЯЛ и макрофагами (рис. 4.17Б). На активацию фагоцитарной активности клеток указывало обилие фагосом и фаголизосом с микробными клетками, а также наличие цитоплазматических выростов. Внеклеточно расположенные микробы встречались с явными признаками повреждения (рис. 4.17Д). Биопленка участками теряла плотность, расслаивалась, а заключённые в неё микробные клетки были в разной степени деструктивно изменены (рис. 4.17Е). Элементы грануляционной ткани встречали чаще, чем в контрольной группе. Веретеновидные фибробласты имели признаки функциональной активности и способности синтеза коллагена. Более юные, способные к пролиферации фибробласты были округлой формы и находились в поверхностных слоях биоптатов.

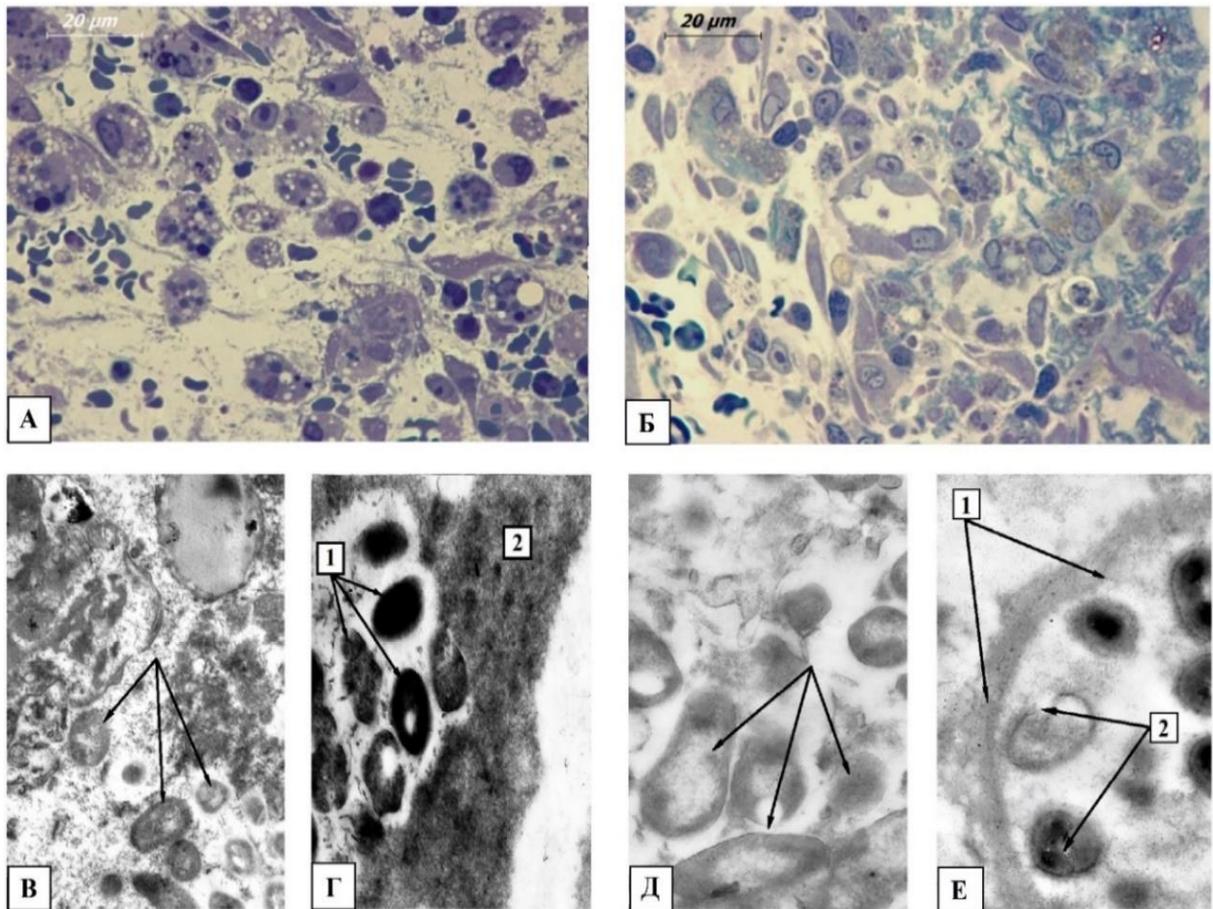


Рисунок 4.17 – Морфология экспериментальных ран 1-й и 2-й группы на третьи сутки наблюдения. А,В,Г – биоптат из раны 1-й группы; Б,Д,Е – биоптат из раны 2-й группы; В – бактериальные клетки в детрите; Г – микробная биоплёнка: 1 – бактерии в экстрацеллюлярном матриксе, 2 – сохраняющая мембрана биоплёнки; Д – деформация бактериальных клеток в детрите; Е – микробная биоплёнка: 1 – расслоение и истончение мембраны биоплёнки, 2 – деформация бактерий внутри биоплёнки. (окраска толуидиновым синим: А –  $\times 500$ , Б –  $\times 500$ ; электронограмма: В –  $\times 14000$ , Г –  $\times 28000$ , Д –  $\times 14000$ , Е –  $\times 28000$ )

В 3-й и 4-й группах на третьи сутки наблюдения очищение ран от детрита и бактериальных клеток, а также инициация репаративных процессов происходили более активно, чем в первых двух группах. На это указывало практически полное отсутствие лейкоцитарно-некротического слоя на поверхности ран, значительно меньшее число бактериальных клеток как в межклеточном пространстве, так и в фагосомах ПМЯЛ, а также деградация структурных частей биоплёнок. Деконтаминация и уменьшение некротических масс закономерно способствовали ускорению процессов формирования грануляционной ткани (рис. 4.18А,Б). Веретенообразные фибробласты в окружении коллагеновых фибрилл наблюдались

во всей толще биоптатов. О различной степени функциональной активности фибробластов судили по выраженности гранулярной цитоплазматической сети, а также по количеству развитых комплексов Гольджи (рис. 4.18В). Наряду с этим в 4-й группе отмечали усиление пролиферативной активности фибробластов в верхних слоях грануляционной ткани, где они встречались в состоянии митоза (рис. 4.18Г). В более глубоких слоях происходило активное формирование волокнистых структур. В обеих группах фиксировали первые признаки ангиогенеза. Появлялись мелкие капилляры со щелевидным просветом, вокруг которых обнаруживали наибольшее количество функционально активных фибробластов.

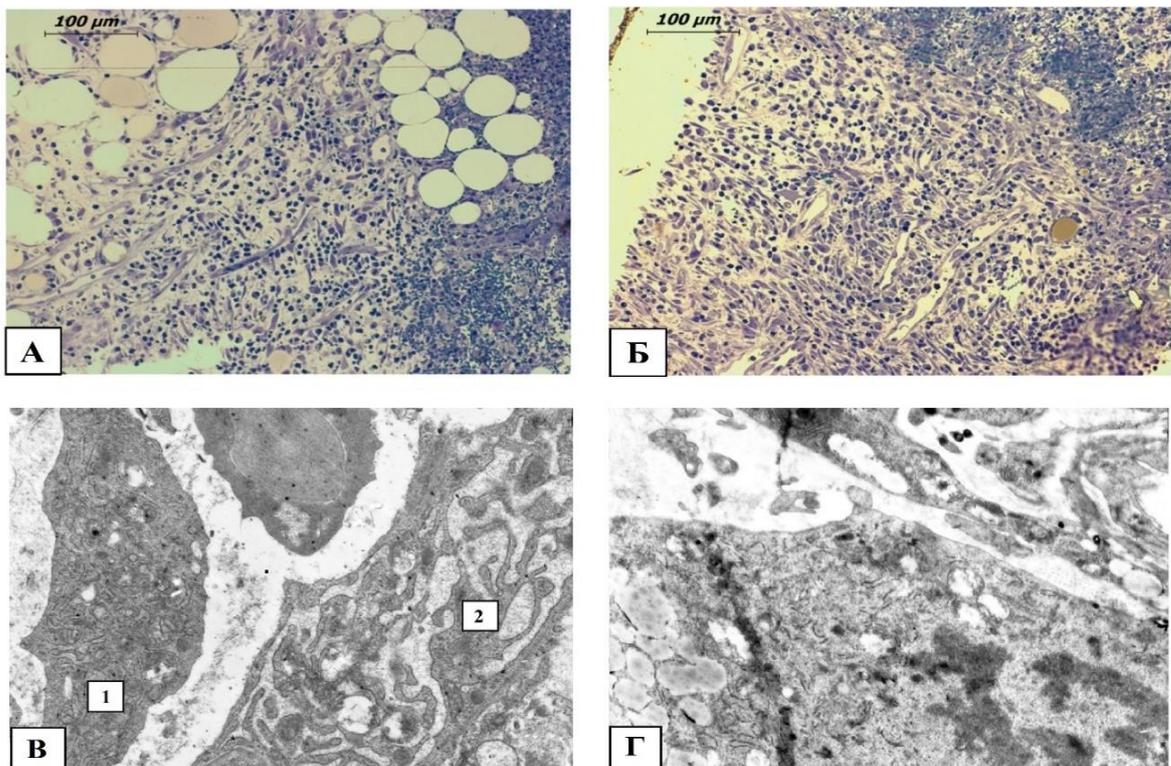


Рисунок 4.18 – Морфология экспериментальных ран 3-й и 4-й групп на третьи сутки наблюдения. А – биоптат из раны 3-й группы; Б – биоптат из раны 4-й группы; В – фибробласты в 3-й группе: 1– фибробласт с умеренной функциональной активностью; 2 – фибробласт с высокой функциональной активностью; Г – фибробласт в стадии митоза в 4-й группе. (окраска толуидиновым синим: А,Б –  $\times 100$ ; электронограмма: В –  $\times 12000$ , Г –  $\times 9000$ )

На пятые сутки в 1-й группе на поверхности раны сохранялся детрит и бактериальная флора, что поддерживало воспаление и препятствовало своевременному созреванию грануляционной ткани (рис. 4.19А). В ране

наблюдали большое количество функционально-активных макрофагов с обилием фагосом в цитоплазме (рис. 4.19В). Активность ПМЯЛ была выше, чем в третьей сутки наблюдения, однако недостаточной для эффективной элиминации раневой флоры. Зарождающаяся грануляционная ткань характеризовалась незрелостью: преобладали молодые формы фибробластов с невысокой степенью активности, а количество коллагеновых волокон было низким (рис. 4.19Г).

Во 2-й группе на пятые сутки наблюдения отмечали отсутствие детрита и микробной флоры, а зрелость грануляционной ткани была выше, чем в 1-й группе. Количество ПМЯЛ и макрофагов уменьшалось, а число активных фибробластов и синтезированных ими коллагеновых волокон наоборот увеличивалось. В глубоких слоях выявляли новообразованные сосуды, врастающие в горизонтально упорядоченные слои фибробластов (рис. 4.19Б).

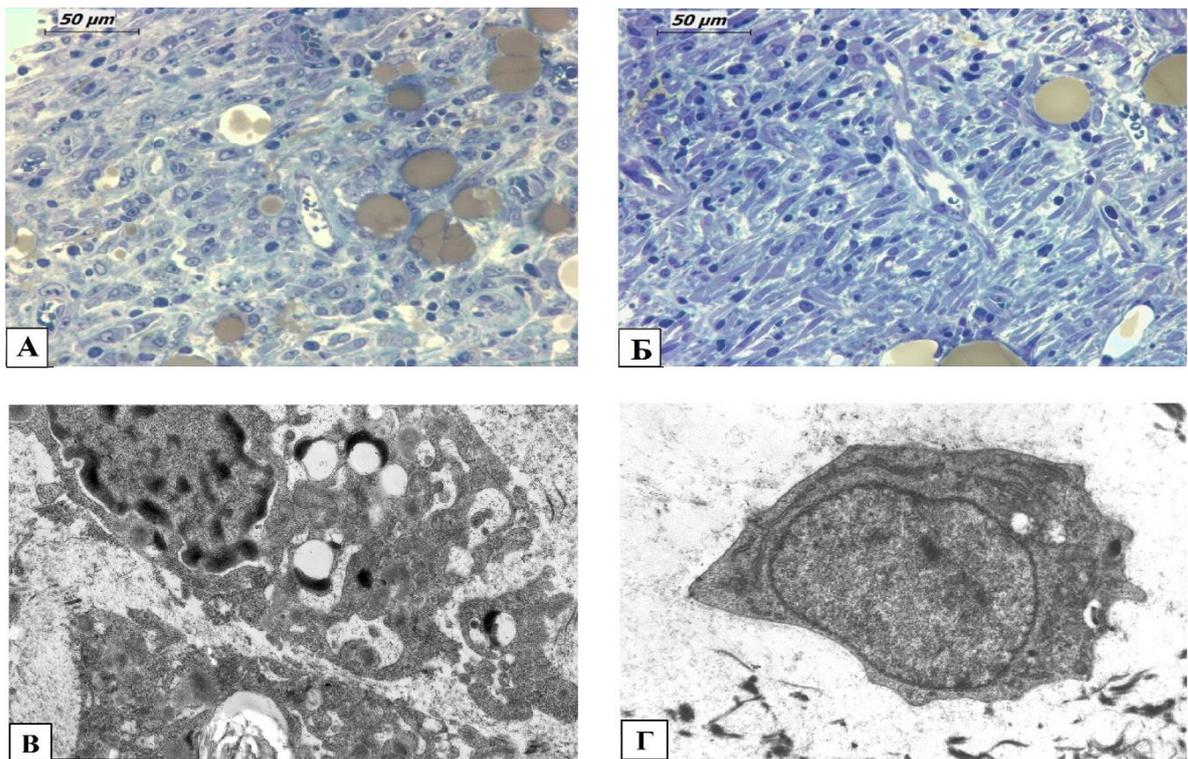


Рисунок 4.19 – Морфология экспериментальных ран 1-й и 2-й групп на пятые сутки наблюдения. А – биоптат из раны 1-й группы; Б – биоптат из раны 2-й группы; В – функционально-активный макрофаг с фагосомами в 1-й группе; Г – молодой фибробласт с невысокой степенью активности в 1-й группе. (окраска толуидиновым синим: А,Б –  $\times 200$ ; электронограмма: В –  $\times 14000$ , Г –  $\times 12000$ )

В 3-й и 4-й группах в эти же сроки грануляционная ткань частично заполняла рану, а её зрелость была выше, чем в 1-й и 2-й группах (рис. 4.20А,Б). Фибробласты были окружены синтезированными коллагеновыми волокнами, расположение которых приобретало четкую горизонтальную ориентацию (рис. 4.20В). В обеих группах наблюдали необходимые для формирования новой ткани признаки ангиогенеза: капилляры со щелевидным просветом, эндотелиоциты с крупными ядрами и скопление функционально-активных фибробластов в зоне формирования молодых сосудов. (рис. 4.20Г).

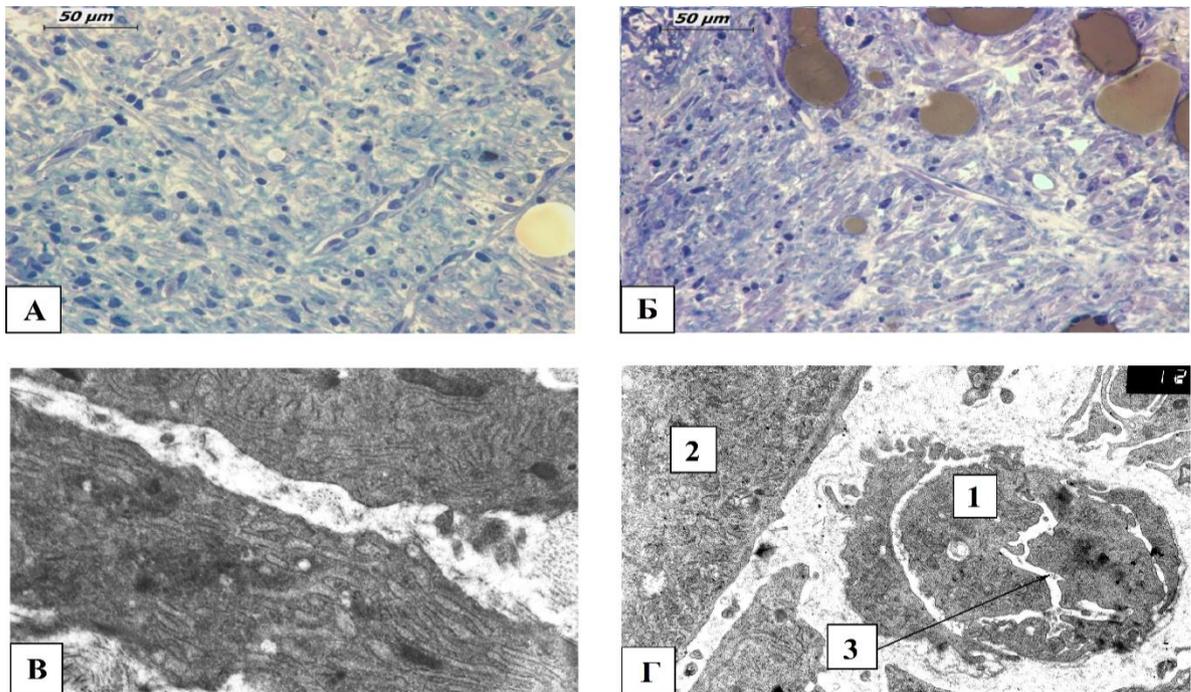


Рисунок 4.20 – Морфология экспериментальных ран 3-й и 4-й групп на пятые сутки наблюдения. А - биоптат из раны 3-й группы; Б – биоптат из раны 4-й группы; В – горизонтально ориентированные фибробласты синтезирующие коллаген из раны 4-й группы; В – фибробласты окруженные коллагеновыми волокнами; Г – новообразованный капилляр грануляционной ткани из раны 3-й группы: 1 – эндотелиоцит, 2 – фибробласт, 3 – просвет капилляра. (окраска толуидиновым синим: А,Б –  $\times 200$ ; электронограмма: В –  $\times 14000$ , Г –  $\times 12000$ )

На седьмые сутки в препаратах 1-й группы сохранялись микробные клетки на поверхности ран. На фоне признаков формирования грануляционной ткани наблюдали функционально-активные макрофаги, т.е. поддерживалась воспалительная реакция (рис. 4.21А).

Во 2-ой группе в этот же период степень зрелости грануляционной ткани была выше, чем в контрольной группе. Клетки-маркеры воспалительной реакции

были единичными в полях зрения. Наблюдались фибробласты и синтезированные ими волокна коллагена с горизонтальной ориентацией относительно поверхности раны, а также новообразованные сосудистые петли (рис. 4.21Б).

В 3-й и 4-й группах на седьмые сутки количество белковых волокон было больше, чем в 1-й и 2-й группах, а количество функционально-активных фибробластов становилось меньше (рис. 4.21В,Г). В толще препаратов обнаруживали миофибробласты с характерными миофиламентами в цитоплазме (рис. 4.21Д). Эти клетки способствовали пространственной ориентации соединительной ткани и, как следствие, эффективной контракции краёв раны. Перпендикулярно ориентированные сосудистые петли осуществляли питание растущего рубца, а их количество в целом сохранялось прежним.

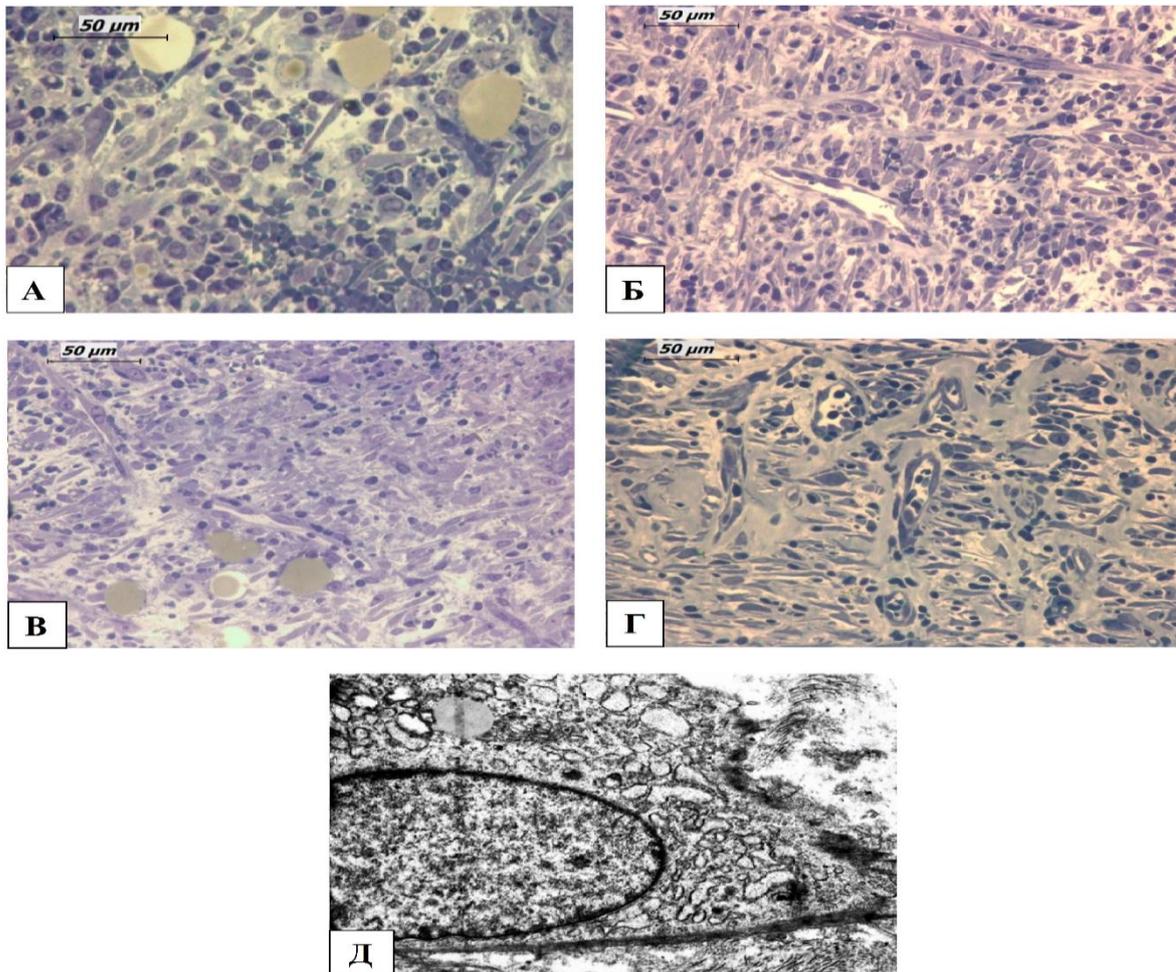


Рисунок 4.21 – Морфология экспериментальных ран на седьмые сутки наблюдения. А – биоптат из раны 1-й группы; Б – биоптат из раны 2-й группы; В – биоптат из раны 3-й группы; Г – биоптат из раны 4-й группы Д – миофибробласт из грануляционной ткани в 4-й группе (окраска толуидиновым синим: А,Б,В,Г –  $\times 200$ ; электронограмма: Д –  $\times 12000$ )

На двенадцатые сутки наблюдения в препаратах 1-й группы сохранялись признаки бактериальной воспалительной реакции. Отмечали рост грануляционной ткани, но наличие макрофагов и фибробластов свидетельствовало о задержанной смене фаз раневого процесса. Коллагеновые волокна наблюдали лишь в базальных слоях раневого дефекта, а вокруг новых капилляров сохранялись инфильтраты со значительным количеством иммунокомпетентных клеток (рис. 4.22А).

Во 2-й группе в конце периода наблюдения выявляли зрелую грануляционную ткань. В отличие от контрольной группы, элементы раневой флоры и воспалительной реакции полностью отсутствовали. Соотношение фибробластов и коллагеновых волокон было значительно смещено в пользу последних. Миофибробласты обеспечивали горизонтальное распределение белкового каркаса соединительной ткани (рис. 4.22Б).

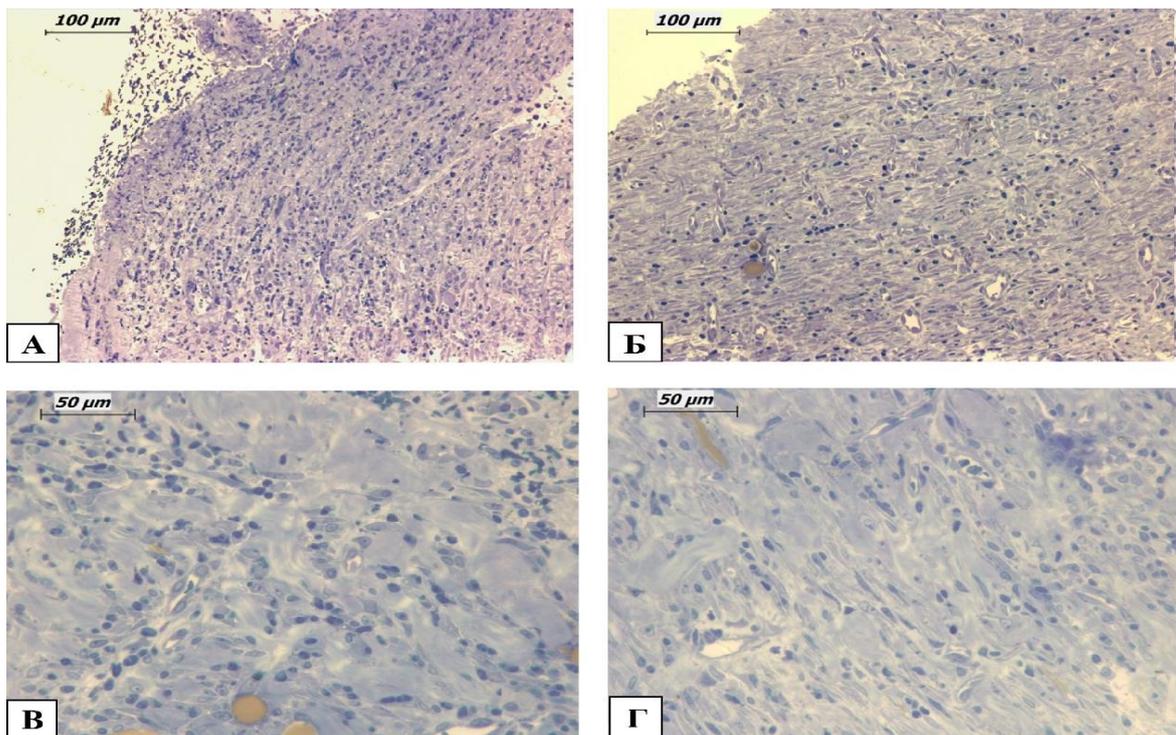


Рисунок 4.22 Морфология экспериментальных ран на двенадцатые сутки наблюдения. А – биоптат из раны 1-й группы; Б – биоптат из раны 2-й группы; В – биоптат из раны 3-й группы; Г – биоптат из раны 4-й группы (окраска толуидиновым синим: А,Б –  $\times 100$ , В,Г –  $\times 200$ )

В 3-й и 4-й группах на двенадцатые сутки наблюдали схожую картину ремоделирования практически полностью созревшего рубца. Содержание

волокнутого компонента было выше, чем в 1-й и 2-й группах (рис. 4.22В,Г). Белковый каркас грануляционной ткани состоял не только из плотно уложенных коллагеновых волокон, но и включал в себя важный компонент зрелого рубца - мукополисахариды (гликозаминогликаны). Количество сосудов, обеспечивающих питание соединительной ткани, уменьшалось, а в верхних слоях препарата наблюдались эпителиальные клетки.

Описание морфологических изменений в ранах совместно с другими методами исследования объединило в целостную картину результаты эксперимента. Было подтверждено наличие гнойно-воспалительного процесса у всех животных в первый день наблюдения и наличие биоплёночных форм бактерий, которые элиминируются при воздействии Er:YAG-лазера и полигексанида. Ультраструктурные изменения свидетельствовали о достаточно высокой активности в первые несколько суток провоспалительных клеток, а потом фибробластов, обеспечивающих формирование грануляционной ткани. Напротив, в контрольной группе в ходе наблюдения сообщества микроорганизмов сохраняли свою жизнеспособность, а процессы репарации были в значительной степени снижены.

#### **4.6 Обсуждение результатов**

Результаты эксперимента в целом подтвердили эффективность применения высокоинтенсивного Er:YAG-лазера в двух режимах при воздействии на осложнённый раневой процесс. В рамках дизайна исследования удалось сравнить в динамике все четыре группы с помощью визуальной оценки, планиметрии, а также анализа бактериологической, цитологической и морфологической картины. Изучение ультраструктурных изменений в тканях под воздействием Er:YAG-лазера было проведено впервые.

Модель трофической гнойной раны, разработанная для исследования, позволила стандартизировать исходные условия эксперимента, что явилось

важным условием для получения объективных результатов. У всех животных были воспроизведены одинаковые по форме, размерам и характеру воспаления раневые дефекты. Искусственное создание ишемии в тканях в ходе выполнения модели было подтверждено с помощью дистанционной термометрии и люминесцентного анализа. В пользу состоятельности модели говорили данные и других видов исследований контрольной группы, где лечение не проводилось. В этих ранах к концу периода наблюдения сохранялся гнойно-фибринозный налёт, площадь дефектов была в среднем в 2,5 раза больше, чем в опытных группах, посевы показывали наличие раневой инфекции, цитологическая картина и морфологический анализ указывали на одновременное, но недостаточно эффективное течение нескольких фаз раневого процесса. Предложенная модель в полной мере не может соответствовать хроническим ранам, которые можно наблюдать у пациентов с сосудистыми и эндокринными нарушениями. Однако совокупность вышеописанных условий, которые выполнялись при создании модели, в достаточной мере приближали экспериментальные раны к традиционной трофической язве.

Применение Er:YAG-лазера в режиме абляции эффективно saniровало раны, удаляя участки некроза, напластования фибрина, а визуальное очищение наступало после 1-2 процедур. Моментальной оптической деструкции подвергались и микроорганизмы, о чем свидетельствовали результаты посевов и анализ цитологической и морфологической картины. При этом зафиксирован факт разрушения биоплёнок и отдельных форм бактерий без повреждения жизнеспособных тканей. Эффективное очищение и деконтаминация ран, а также режим стимуляции регенерации Er:YAG-лазера способствовали росту грануляционной ткани и краевой эпителизации. Лейкоциты и макрофаги после выполнения своей роли сменялись на функционально-активные фибробласты, о чем свидетельствовали преобладающий воспалительно-регенераторный тип

мазков и данные морфологии. Признаком заживления на ультраструктурном уровне являлось увеличение функциональной активности клеток соединительной ткани и их органелл, которое регистрировали за несколько дней до макроскопических изменений.

Результаты комбинированного лечения ран у животных 4-й группы в течение эксперимента в ряде случаев превосходили результаты монотерапии Er:YAG-лазером по некоторым критериям. Однако к концу периода наблюдения статистически значимых различий между 3-й и 4-й группой по итогу всех видов исследований выявлено не было. Вероятнее всего, эффекты лазерной и лекарственной санации накладывались без значимого синергизма.

В группе применения антисептика процессы очищения ран, деконтаминации, созревания грануляций и эпителизации происходили дольше, чем в группах, в которых применялся Er:YAG-лазер. Во-первых, это объяснялось отсутствием активного физического воздействия на раневой детрит как используемый в 3-й и 4-й группах режим абляции, а во-вторых – отсутствием прорегенераторных свойств раствора полигексанида. Тем не менее полученные результаты подтвердили известную эффективность антисептика в отношении раневой инфекции, в т.ч. и биоплёночных её форм.

Полученные в ходе эксперимента данные могут служить основой для дальнейшего всестороннего изучения влияния высокоинтенсивного Er:YAG-лазера на раневой процесс.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Множество существующих способов локального воздействия на длительно незаживающие раны говорит об отсутствии универсального метода, позволяющего в короткие сроки в составе комбинированного лечения добиваться полного заживления дефектов мягких тканей.

Настоящее исследование посвящено оценке эффективности высокоинтенсивного импульсного эрбиевого (Er:YAG) лазера для лечения незаживающих ран различного генеза, а также изучению особенностей его влияния на осложнённый раневой процесс.

Необходимо отметить, что встречаются лишь единичные работы, посвящённые данной теме. Сведения о фотобиологических реакциях в ранах под воздействием Er:YAG-лазера на клеточном и субклеточном уровнях в доступной литературе отсутствуют. Основываясь на недостаточной разработанности темы и предполагаемых эффектах воздействия Er:YAG-лазера на осложнённый раневой процесс, были сформулированы цель и основные задачи диссертационного исследования.

Научная работа выполнена в клинико-экспериментальной форме, на основе материалов обследования и лечения пациентов с длительно незаживающими ранами различного генеза и данных эксперимента, проведённого на лабораторных крысах.

Комплексный характер воздействия Er:YAG-лазера заключался в последовательном применении режима абляции до момента очищения раневых дефектов и режима стимуляции регенерации с первых процедур и до окончания лечения.

Санитарный эффект Er:YAG-лазера реализуется за счёт краткосрочности импульсов и кратному увеличению мощности переданной энергии. В результате происходит моментальный нагрев и испарение (абляция) биологического субстрата без термического повреждения подлежащих тканей. Эта особенность позволяет

прецизионно удалять некротические ткани и раневую микрофлору, что ставит метод в ряд хирургических способов обработки раны.

Анализ клинических данных показал, что в режиме абляции удавалось добиться очищения ран за 1-2 процедуры, в среднем на 4 сутки наблюдения, что превосходило результаты обработки ран хирургическим инструментарием. Таким образом, хронические раны как бы переводили в состояние «острых», создавая предпосылки для течения раневого процесса в нужном направлении.

О санирующем эффекте Er:YAG-лазера можно было судить по результатам бактериологического исследования. К 15 суткам лечения отсутствие роста бактерий отмечали в 66% посевах из ран, а в конце периода наблюдения у 74% пациентов с незажившими ранами.

Работа Er:YAG-лазера в режиме стимуляции регенерации реализована за счёт снижения мощности и возможности рассеивания светового пучка. Вследствие этого происходит эффект множественных микроабляций на поверхности раны, а интерференция возникших механических волн стимулирует процессы регенерации в толще тканей до 6 мм.

Наиболее явным клиническим проявлением перехода во вторую фазу раневого процесса являлось появление в раневом дефекте грануляционной ткани и признаков краевой эпителизации. Под воздействием Er:YAG-лазера это происходило в среднем к 6-8 суткам лечения, на несколько дней раньше, чем у пациентов на фоне стандартного лечения.

На клеточном уровне динамика заживления отражалась в снижении количества лейкоцитов и смене дегенеративно-воспалительного типа цитограмм на воспалительно-регенераторный у большинства пациентов основной группы к концу периода наблюдения.

Полное заживление ран с формированием рубца наступало при небольших по площади дефектах. В группе применения Er:YAG-лазера это происходило на 21% чаще, чем в группе сравнения. Средние размеры незаживших ран были сопоставимы в группах, однако большее число эпителизированных дефектов в основной группе указывало на преимущество лазерного лечения.

Оценка отдаленных результатов лечения пациентов не входила в задачи исследования, тем не менее во многих случаях была зафиксирована отчетливая тенденция к полному заживлению ран и готовность раневой поверхности к пластическому замещению. В последующем периоде некоторые из ран были подвергнуты аутодермопластике расщепленным трансплантатом с удовлетворительными результатами.

Процедура лазерной обработки ран субъективно оценивалась большинством пациентов как безболезненная, а потребность в местных или системных обезболивающих средствах возникала в редких случаях. Степень болевого синдрома после курса лечения снижалась в среднем на 3 единицы в соответствии с визуально-аналоговой шкалой боли.

Таким образом, опыт применения двух режимов Er:YAG-лазера в клинических условиях показал достаточно высокую эффективность местной терапии длительно незаживающих ран, по крайней мере, не уступающую стандартному лечению. Стоит отметить, что в исследовании участвовали пациенты, у которых были полностью или частично компенсированы заболевания, приведшие к образованию хронических ран. Следовательно, результаты локального воздействия Er:YAG-лазера на раневые дефекты следует рассматривать в составе комплексного патогенетически обоснованного лечения.

Фундаментальные аспекты влияния режимов Er:YAG-лазера на раневой процесс были изучены в ходе экспериментального исследования.

Для решения задач эксперимента была разработана и успешно апробирована модель трофической гнойной раны с использованием специального силиконового диска. Стоит отметить, что важным было соблюдение ряда условий, имеющих методическое значение: формирование расстройств локальной микроциркуляции, внедрение в раны бактериальной культуры, предотвращение естественной контракции и возможность воспроизведения единообразных и защищенных дефектов. В созданных по этой методике ранах были соблюдены все вышеописанные условия. Локальные нарушения микроциркуляторного русла были подтверждены с помощью средств объективного контроля (дистанционная

термометрия и люминесцентный анализ) и приближали экспериментальные дефекты к клиническим формам длительно незаживающих ран. В пользу состоятельности модели говорили результаты и других видов исследований контрольной группы животных. В этих ранах к концу периода наблюдения сохранялся гнойно-фибринозный налёт, площадь дефектов была в среднем в 2,5 раза больше, чем в опытных группах, посевы показывали наличие раневой инфекции, а цитологическая картина и морфологический анализ указывали на одновременное, но недостаточно эффективное течение нескольких фаз раневого процесса.

Не проводя прямых аналогий, отмечали некоторое сходство внешних изменений в экспериментальных ранах с данными клинической картины у пациентов. Комплексное применение основных режимов излучения приводило к очищению раневых дефектов в первые 5 суток наблюдения и появлению грануляционной ткани в среднем к 7 суткам.

На выраженный бактерицидный эффект Er:YAG-лазера указывала последовательная деконтаминация ран и отсутствие у большинства животных бактериального роста к двенадцатым суткам наблюдения.

При анализе гистологической картины в ранах наблюдали значительное уменьшение поверхностного лейкоцитарно-некротического слоя при сохранении воспалительной реакции подлежащих тканей, непосредственно после лазерной обработки в режиме абляции. На ультраструктурном уровне выявляли деструкцию как отдельных бактерий, так и микробных сообществ. Был зафиксирован факт повреждения микробных биопленок с разрывами их мембран и разрушением бактерий, находящихся внутри экстрацеллюлярного матрикса. От раневого детрита и элементов раневой флоры раны очищались в среднем за 1-2 процедуры абляционной обработки.

Как правило, большинство методов термодеструкции тканей приводят к формированию зон вторичных коагуляционных некрозов, что затягивает период регенерации. В отличие от этого, применение Er:YAG-лазера характеризовалось

отсутствием признаков повреждения жизнеспособных тканей в экспериментальных ранах на протяжении всего периода наблюдения.

Динамика процессов заживления отражалась в последовательном изменении цитологической картины в мазках-отпечатках. Комплексное применения двух режимов Er:YAG-лазера способствовало более ранней смене фаз раневого процесса.

На клеточном уровне это отражалось в повышении количества провоспалительных клеток (лейкоцитов, макрофагов) в первые несколько суток, а затем элементов соединительной ткани.

Начиная с третьих суток наблюдения, по данным электронной микроскопии, отмечали повышение функциональной активности фибробластов. Об этом свидетельствовала веретенообразная форма клеток, выраженный эндоплазматический ретикулум и обилие развитых комплексов Гольджи. Фибробласты активно синтезировали коллагеновые волокна с четкой горизонтальной ориентацией относительно поверхности ран. Появление молодых капилляров и сосудистых петель указывало на процессы ангиогенеза, всегда сопровождающие развитие грануляционной ткани. К концу периода наблюдения отмечали признаки формирования рубцовой ткани с преобладанием неклеточных компонентов и наличием эпителиоцитов в поверхностных слоях раны.

В свою очередь, процессы деконтаминации и заживления наблюдали также в группе применения антисептика, однако они наступали в более поздние сроки по сравнению с лазерным лечением. Тем не менее полученные результаты подтвердили известную эффективность раствора полигексанида в отношении раневой инфекции, в т.ч. и биопленочных её форм.

Результаты комбинированного применения антисептика и Er:YAG-лазера в целом не отличались от лазерной монотерапии, что скорее всего говорит об отсутствии взаимного потенцирования эффектов.

Стоит отметить, что в исследовании не стояло прямой задачи сравнивать физический метод воздействия на раны и местную лекарственную терапию, но полученные клинические данные и результаты эксперимента показали

возможность применения Er:YAG-лазера с мазями на водорастворимой основе и раствором антисептика.

Сравнение эффективности Er:YAG-лазера в отношении ран различного генеза также не было предусмотрено дизайном и мощностью исследования. Тем не менее предварительные данные указывали на более высокие результаты лечения ран, возникших на фоне сахарного диабета. Это можно связать с более действенными способами патогенетической компенсации основного заболевания по сравнению с сосудистыми проблемами.

Обобщая данные клинико-экспериментального исследования, можно сделать вывод об эффективности применения высокоинтенсивного Er:YAG-лазера для лечения длительно незаживающих ран различного генеза. Лазерная обработка удовлетворительно переносится пациентами и может быть дополнена другими средствами местного лечения ран. Полученные результаты могут служить основой для широкого клинического применения метода как в стационарной, так и в амбулаторной практике. Выявленные особенности влияния Er:YAG-лазера на раневой процесс носят универсальный характер, что делает обоснованным применение метода для лечения пролежней, ожоговых ран, послеоперационных и посттравматических дефектов, в том числе после огнестрельных ранений.

В заключение отметим, что любой новый метод, позволяющий повысить эффективность лечения длительно незаживающих ран и улучшить качество жизни пациентов, заслуживает тщательного изучения и анализа. Перспективы дальнейших исследований можно видеть в изучении комбинаций оптических и иных методов локального воздействия на раны. Хочется надеяться, что выполненное исследование послужит улучшению результатов лечения пациентов со «сложными» ранами и станет поводом для более широкого применения эрбиевого лазера в клинической практике.

## ВЫВОДЫ

1. Применение высокоинтенсивного эрбиевого лазера в двух режимах улучшает результаты лечения пациентов с длительно незаживающими ранами. Воздействие в режиме абляции позволяет достичь очищения ран за 1-2 процедуры. Режим стимуляции регенерации способствует активному формированию грануляционной ткани и краевой эпителизации.

2. Разработанная модель трофической гнойной раны позволяет воспроизводить в эксперименте раневые дефекты с характерными признаками осложненного гнойно-воспалительного процесса, приближенного к клиническим формам длительно незаживающих ран.

3. Воздействие высокоинтенсивного эрбиевого лазера в основных режимах обеспечивает эффективную санацию и ускоренное заживление экспериментальных ран, а динамика цитологической картины указывает на оптимизацию течения фаз раневого процесса.

4. Данные морфологического исследования доказывают способность излучения высокоинтенсивного эрбиевого лазера разрушать лейкоцитарно-некротический слой и подавлять раневую инфекцию, включая биопленочные формы без формирования вторичных некрозов, а также повышать функциональную активность клеток, обеспечивающих регенерацию тканей.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для санации раневой поверхности рекомендуется использовать режим абляции высокоинтенсивного эрбиевого лазера с плотностью мощности 10-15 Дж/см<sup>2</sup> и частотой импульсов 2-4 Гц. Режим стимуляции регенерации эрбиевого лазера с плотностью мощности 1,8-4 Дж/см<sup>2</sup> и частотой импульсов 2-4 Гц целесообразно применять, начиная с первых процедур непосредственно после абляции, а во второй фазе раневого процесса – в монорежиме до полной эпителизации. Оптимальная кратность процедур составляет 2-3 раза в неделю. Метод в большинстве случаев не требует дополнительного обезболивания и применим как в стационарных, так и в амбулаторных условиях.

2. Разработанная модель трофической гнойной раны применима для изучения особенностей влияния различных факторов на осложнённый раневой процесс в условиях эксперимента. Предотвращение естественной контракции и защиту раневых дефектов обеспечивает силиконовый диск, фиксированный отдельными швами к краям раны. Нарушение локальной микроциркуляции в тканях создают дополнительные швы, наложенные в паравульнарной зоне. Гнойно-воспалительный процесс инициируется путем внесения стандартной дозы бактериальной культуры в раневые дефекты. Надежность формирования вышеописанных условий, осложняющих заживление экспериментальных ран, необходимо подтверждать с помощью средств объективного контроля.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ВАШ – визуально-аналоговая шкала (боли)

КВЧ – крайне высокочастотная (терапия)

оФРФ – основной фактор роста фибробластов

ПМЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты

СДС – синдром диабетической стопы

ТФР- $\alpha$  – трансформирующий фактор роста-альфа

ФДТ – фотодинамическая терапия

ЭФР – эпидермальный фактор роста

СО<sub>2</sub> – углекислотный (лазер)

Er:YAG – эрбиевый (лазер)

Nd:YAG – неодимовый (лазер)

VEGF - сосудистый эндотелиальный фактор роста

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Аметов, А. С. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения: монография / А. С. Аметов. - 3-е изд., перераб. и доп. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2017. - 336 с.
2. Ацербин в комплексном лечении длительно незаживающих ран / Л. А. Блатун, Н. Г. Аскеров, И.А. Чекмарева [и др.] // Раны и раневые инфекции. Журнал имени профессора Б. М. Костючёнка. - 2018. - Т. 5, № 2. - С. 32-40.
3. Баграмов, Р. И. Лазеры в стоматологии, челюстно-лицевой и реконструктивно-пластической хирургии / Р. И. Баграмов, М. Т. Александров, Ю. Н. Сергеев. - Москва: Техносфера, 2010. - 576 с.
4. Бактериофаги в условиях поглощающей антибиотикорезистентности / А. В. Есипов, А. В. Алехнович, А.М. Кисленко [и др.] // Госпитальная медицина: наука и практика. - 2018. - Т. 1, № 2. - С. 39-42.
5. Белозерцева, Ю.П., Синдром диабетической стопы: этиология, патогенез, классификации и лечение / Ю. П. Белозерцева, П. П. Курлаев, В. А. Гриценко // Человек и его здоровье. - 2016. - №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sindrom-diabeticheskoy-stopy-etiologya-patogenez-klassifikatsii-i-lechenie>.
6. Блатун, Л. А. Местное медикаментозное лечение ран / Л. А. Блатун // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. - 2011. - № 4. - С. 51-59.
7. Богдан, В. Г. Проспективное рандомизированное клиническое исследование эффективности применения аутологичных тромбоцитарных концентратов для стимуляции регенерации трофических язв венозной этиологии / В. Г. Богдан, Д. А. Толстов // Новости хирургии. - 2014. - Т. 22, № 3. - С. 344-350.
8. Венозные трофические язвы: современное состояние вопроса / П. Ю. Туркин, С. В. Родионов, Н. О. Сомов [и др.] // Лечебное дело. - 2018. - № 1. - С. 41-45.
9. Глухов, А.А., Патология длительно незаживающих ран и современные методы стимуляции раневого процесса / А. А Глухов, М. В. Аралова

// Новости хирургии. - 2015. - №6. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/patofiziologiya-dlitelno-nezazhivayuschih-ran-i-sovremennye-metody-stimulyatsii-ranevogo-protssesa>.

10. Григорьян, А. Ю. Венозные трофические язвы / А. Ю. Григорьян, А. Г. Терехов // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. - 2022. - № 1. - С.73-80.

11. Дерматопластика раневых дефектов: руководство / Хрупкин В. И., Зубрицкий В. Ф., Ивашкин А. Н. [и др.]. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 190 с.

12. Десять хирургических уроков начального этапа военной операции / И. М. Самохвалов, Е. В. Крюков, В. Ю. Маркевич [и др.] // Военно-медицинский журнал. - 2023. - Т. 344, № 4. - С. 4-10.

13. Длительно не заживающие раны и язвы: патогенез, клиника, лечение: монография / П. И. Толстых, О. Б. Тамразова, В. В. Павленко [и др.]. - Москва: Дипак, 2009. - 167 с.

14. Клинико-экономический анализ применения препарата эпидермального фактора роста (Эберпрот-П®) у больных с синдромом диабетической стопы / Г. Р. Галстян, В. И. Игнатьева, М. В. Авксентьева, И. И. Дедов // Эндокринная хирургия. - 2013. - № 1. - С. 4-15.

15. Комбинированная ультразвуковая терапия и лазерофорез в лечении больных трофическими язвами венозного генеза / О. В. Жукова, Л. С. Круглова, А. Н. Панина [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. Электронный журнал. - 2014. - № 1. - 4 с.

16. Комплексный подход в лечении обширных трофических язв голени в многопрофильном стационаре / Ю. Л. Шевченко, Ю. М. Стойко, В. Г. Гудымович, А. К. Иванов // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. - 2014. - Т. 7, № 3. - С. 221-227.

17. Лазерная терапия в лечении больных с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы / Е. Л. Исмаилов, Р. Р. Гайсин, А. Н. Баймаханов [и др.] // Вестник Казахского Национального медицинского университета. - 2016. - № 1. - С. 347-349.

18. Лазерная фотодинамическая терапия гнойных ран с фотосенсибилизатором хлоринового ряда / П. И. Толстых, В. А. Дербенев, И. Ю. Кулешов [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. - 2010. - № 12. - С. 17-22.
19. Лазеры в хирургии / В. И. Корепанов, Б. Н. Малышев, О. К. Скобелкин [и др.] // Под ред. О. К. Скобелкина. - Москва: Медицина, 1989. - 254 с.
20. Мантурова, Н. Е. Старение кожи: механизмы формирования и структурные изменения / Н. Е. Мантурова, Р. В. Городилов, А. В. Кононов // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. - 2010. - № 1. - С. 88-92.
21. Местное лечение ран и раневой инфекции по результатам анонимного анкетирования хирургов России / В. В. Привольнев, Ю. С. Пасхалова, А. В. Родин, В. А. Митиш // Раны и раневые инфекции. Журнал имени профессора Б. М. Костюченка. - 2016. - Т. 3, № 1. - С. 19-24.
22. Методы исследования биопленок / Х. М. Галимзянов, О. А. Башкина, Э. Г. Досмуханова [и др.] // Астраханский медицинский журнал. - 2019. - Т. 14., № 3. - С. 8-20.
23. Минаев, В. П. У истоков использования лазерного излучения в отечественной медицине / В. П. Минаев // Биофотоника. - 2017. - Т. 62, № 2. - С. 104-110.
24. Мнихович, М. В. Экспериментально-морфологический анализ гистогенеза кожной раны под влиянием низкоинтенсивного лазерного излучения / М. В. Мнихович, Н. Р. Еремин // Вестник новых медицинских технологий. - 2013. - Т. 20, № 2. - С. 113-120.
25. Моделирование раневого процесса в экспериментальной хирургии / С. Е. Гуменюк, Т. В. Гайворонская, А.С. Гуменюк [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. - 2019. - Т. 26, № 2. - С. 18-25.
26. Набиев, В. Ф. Лазерная и крайневысокочастотная терапия гнойных ран: специальность 14.01.17 «Хирургия»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Набиев Адил Фахрадин оглы; Государственный научный центр лазерной медицины. - Москва, 2010. - 144 с.

27. Неворотин, А. И. Введение в лазерную хирургию: учебное пособие / А. И. Неворотин. - Санкт-Петербург: СпецЛит, 2000. - 175 с.
28. О лечении трофической язвы Марторелла / Ю. Л. Шевченко, Ю. М. Стойко, В. Г. Рябов [и др.] // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова. - 2010. - Т. 5, № 1. - С. 128-132.
29. Оболенский, В. Н. Современные методы лечения хронических ран / В. Н. Оболенский // Медицинский совет. - 2016. - № 10. - С. 148-154.
30. Опыт использования клеточных технологий в комплексном лечении венозных трофических язв / А. В. Гавриленко, О. В. Павлова, А. А. Иванов [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. - 2011. - № 1. - С. 27-31.
31. Опыт комплексного лечения венозных трофических язв / Ю. Стойко, В. Гудымович, К. Мазайшвили [и др.] // Врач. - 2015. - №7. - С. 32-34.
32. Османов, Э. Г. Современные принципы лечения гнойно-некротических заболеваний мягких тканей с большой площадью поражения / Э. Г. Османов, Г. Ю. Анчиков // Медицинские науки. - 2006. - Т. 1, № 13. - С. 37-39.
33. Особенности лечения больного с синдромом диабетической стопы с учетом изменений в мягких тканях / С. Н. Стяжкина, Н. А. Кирьянов, Э. Д. Байрамкулов [и др.] // Вестник современной клинической медицины. - 2018. - Т. 11, № 2. - С. 55-58.
34. Оценка морфологии микроциркуляторного русла и его клеточного микроокружения под влиянием низкоинтенсивного лазерного излучения в условиях экспериментальной раны кожи / М. В. Мнихович, В. А. Грачев, Н. В. Еремин [и др.] // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н. И. Пирогова. - 2012. - Т. 7, № 1. - С. 112-117.
35. Павленко, И. В. Дозированное тканевое растяжение при подготовке донорской области к свободной аутодермопластике хронических ран / И. В. Павленко, В. В. Бесчастнов, М.Г. Рябов // Раны и раневые инфекции. Журнал имени проф. Б.М. Костючѐнка. - 2019. - Т. 6, № 1. - С. 25-33.
36. Пантелеев, В. С. Антимикробная фотохимическая терапия в сочетании с лазеро- и антибиотикотерапией у больных с гнойно-септическими

осложнениями острого деструктивного панкреатита / В. С. Пантелеев // Лазерная медицина. - 2012. - Т. 16, № 2. - С. 35-41.

37. Патент № 2764361 С1 Российская Федерация, МПК G09В 23/28. Способ моделирования трофической раны в эксперименте: № 2013102627/14 : заявл. 21.01.2013: опубл. 20.03.2014 / Р. М. Зинатуллин, Т. Р. Гизатуллин, В. Н. Павлов [и др.]; заявители Р. М. Зинатуллин, Т. Р. Гизатуллин.

38. Первый опыт клинического применения высокоинтенсивного лазерного излучения в лечении длительно незаживающей постстернотомной раны / И. И. Пикиреня, Н. Л. Добровольский, В. В. Хомченко [и др.] // Медицинские новости. - 2022. - № 2. - С. 88-90.

39. Пикиреня, И. И. Возможность регенерации печени у экспериментальных животных с индуцированным циррозом при воздействии пространственно модулированного излучения эрбиевого лазера / И. И. Пикиреня, А. Н. Земляник, В. В. Хомченко // Новости хирургии. - 2015. - Т. 23, № 2. - С. 131-137.

40. Пикиреня, И. И. Высокоинтенсивные лазеры в медицине / И. И. Пикиреня, В. В. Хоменко. - Минск: БелМАПО, 2017. - 190 с.

41. Пономаренко, Г.Н. Высокоинтенсивная лазерная терапия в клинической медицине: наукометрический анализ доказательств эффективности / Г.Н. Пономаренко // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2023. – Т. 100, № 1., -С. 18-26.

42. Привольнев, В. В. Основные принципы местного лечения ран и раневой инфекции / В. В. Привольнев, Е. В. Каракулина // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2011. - Т. 3, № 13. - С. 214-222.

43. Применение плазменных потоков у пациентов с хирургической инфекцией мягких тканей / А. М. Шулутко, Э. Г. Османов, Т. Р. Гогохия, С. Е. Хмырова // Вестник хирургии имени И.И. Грекова. – 2017. - Т. 176, № 1. - С. 65-69.

44. Раны и раневая инфекция: руководство для врачей / Под ред. М. И. Кузина, Б. М. Костючонка. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва: «Медицина», 1990. - 592 с.
45. Савельев, В. С. Венозные трофические язвы. Мифы и реальность / В. С. Савельев, А. И. Кириенко, В. Ю. Богачев // Флебологическая. - 2000. - № 11. - С. 5-10.
46. Седов, Ю. А. Лечение гнойных заболеваний пальцев кисти и стопы с применением углекислотного лазера: специальность 14.01.17 «Хирургия»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Седов Юрий Анатольевич; Тверская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию. - Тверь, 2007. - 142 с.
47. Сергеев, Н. А. Лечение трофических язв нижних конечностей венозной этиологии с применением низкоинтенсивного лазерного излучения / Н. А. Сергеев, М. С. Шестаков // Российский медицинский журнал. - 2013. - № 5. - С. 36-38.
48. Современные принципы лечения гнойных ран: учебное пособие / С. Я. Ивануса, П. Н. Зубарев, Б. В. Рисман, О. А. Литвинов. – Санкт-Петербург: «Онли-Пресс», 2017. - 36 с.
49. Стойко, Ю. М. Применение метода локального отрицательного давления в комплексном лечении пациентов с раневой инфекцией / Ю.М. Стойко, А.Л. Левчук, О.Ю. Сысоев // Вестник СурГУ. Медицина. - 2021. - Т.48., № 2. - С. 8-14.
50. Табуйка, А. В. Опыт применения плазменного воздействия в сочетании с NO-терапией при лечении хронических ран разной этиологии / А. В. Табуйка // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. - 2023. - № 10. - С. 143-149.
51. Табуйка, А. В. Первый опыт применения российских коллагеновых покрытий / А. В. Табуйка, Е. Н. Щитова, М. В. Труфанова // Раны и раневые инфекции. Журнал имени проф. Б.М. Костюченка. - 2022. - Т. 9, №2. - С.18-23.

52. Теоретические и практические аспекты лазерной фотохимии для лечения гнойных ран / П. И. Толстых, В. А. Дербенев, И. Ю. Кулешов [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. - 2008. - Т. 7, № 4. - С. 20-24.
53. Токмакова, А. Ю. Современная концепция диагностики и лечения хронических ран у больных с синдромом диабетической стопы / А. Ю. Токмакова // Сахарный диабет. - 2009. - Т. 12, № 1. - С. 14-17.
54. Толстых, П. И. Перспективные способы лазерной фотохимии для лечения некоторых онкологических и хирургических заболеваний / П. И. Толстых // Медицинский вестник. - 2008. - № 16. - С. 15.
55. Трофические язвы нижних конечностей - обзор проблемы / В. Н. Оболенский, Г. В. Родоман, В. Г. Никитин, М. А. Карев // Русский медицинский журнал. - 2009. - Т. 17, № 25. - С. 1647-1662.
56. Фактическая стоимость комплексного хирургического лечения больных нейроишемической формой синдрома диабетической стопы / В. А. Митиш, Ф. Т. Махкамова, Ю. С. Пасхалова [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. - 2015. - № 4. - С. 48-53.
57. Фотодинамическая терапия трофических язв венозного генеза / О. Б. Тамразова, А. В. Молочкова, Г. Э. Баграмова, О. Н. Померанцев // Клиническая дерматология и венерология. - 2013. - Т. 11, № 4. - С. 62-67.
58. Функциональная активность клеток гранулоцитарного звена больных с длительно незаживающими ранами на фоне хронической венозной недостаточности / Ю. С. Винник, Г. Э. Карапетян, Л. В. [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. - 2019. - №1. - С.37-42.
59. Хирургические инфекции кожи и мягких тканей: российские национальные рекомендации / Под ред. Б. Р. Гельфанда, В. А. Кубышкина, Р. С. Козлова, Н. Н. Хачатрян. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва: Изд-во МАИ, 2015. - 109 с.
60. Хронические, длительно не заживающие язвы и раны кожи и подкожной клетчатки / Н. Н. Потекаев, Н. В. Фриго, А. В. Миченко [и др.] // Клиническая дерматология и венерология. - 2018. - Т. 17, № 6. - С. 7-12.

61. Хуршудян, А. Г. Применение углекислотного и гелий-неонового лазеров в лечении гнойно-воспалительных заболеваний при сахарном диабете / А. Г. Хуршудян // Клиническая диабетология. - 1999. - № 2. - С. 21-22.
62. Чмырёв, И. В. Использование пронтосана после поздней некрэктомии при глубоких ожогах / И. В. Чмырёв, Ю. Р. Скворцов, С. Х. Кичемасов // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова. - 2010. - Т. 5, № 2. - С. 49-54.
63. Ярец, Ю.И. Острый и хронический раневой процесс: патогенетические особенности / Ю. И. Ярец // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. - 2016. - №2. – С.21-34.
64. Accelerating skin regeneration and wound healing by controlled ROS from photodynamic treatment /K. Khorsandi, R. Hosseinzadeh, H.S. Esfahani [et al.] //Inflamm. Regen. – 2022. –42(1):40.
65. Adipose-Derived Stem Cells Improve Angiogenesis and Lymphangiogenesis in a Hypoxic Dermal Regeneration Model In Vitro / B. Fuchs, A. Birt, N. Moellhoff [et al.] // Medicina (Kaunas). - 2023. - Vol. 59, № 4. - P. 706.
66. An alternative treatment strategy for complicated chronic wounds: negative pressure therapy over mesh skin graft / M. Maruccia, M. G. Onesti, V. Sorvillo [et al.] // BioMed Research International. - 2017. - Vol. 2017. - P. 8395219
67. Assessment of ablative fractional CO<sub>2</sub> laser and Er: YAG laser to treat hypertrophic scars in a red duroc pig model / L. Rodriguez-Menocal, S. S. Davis, S. Becerra [et al.] // Journal of Burn Care & Research. - 2018. - Vol. 39, № 6. - P. 954-962.
68. Atkin, L. Chronic wounds: the challenges of appropriate management / L. Atkin // British journal of community nursing. - 2019. - Vol. 24, № 9. - P. 26-32.
69. Baltzis, D. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights / D. Baltzis, I. Eleftheriadou, A. Veves // Advances in therapy. - 2014. - Vol. 31, № 8. - P. 817-836.

70. Blood vessel occlusion with erythrocyte aggregates causes burn injury progression-microvasculature dilation as a possible therapy / R. A. F. Clark, J. Fenner, A. Sasson [et al.] // *Exp Dermatol.* – 2018. - Vol. 27, № 6. - P. 625-629.
71. Botsali, A. The Beneficial Effects of Erbium:Yttrium-Aluminum-Garnet Laser in an Ulcer Caused by Lower Leg Arteriopathy / A. Botsali, E. Caliskan, M. Tunca // *Journal of the American Podiatric Medical Association.* - 2021. - Vol. 111, № 6.
72. Breakthrough treatments for accelerated wound healing / B. R. Freedman, C. Hwang, S. Talbot [et al.] // *J. Sci Adv.* - 2023. - Vol. 9, № 20. - P. eade7007.
73. Bryan, J. Moist wound healing: a concept that changed our practice / J. Bryan // *Journal of Wound Care.* - 2004. - Vol. 13, № 6. - P. 227-228.
74. Burnham, J. P. Treatment of severe skin and soft tissue infections: a review / J. P. Burnham, M. H. Kollef // *Current opinion in infectious diseases.* - 2018. - T. 31, № 2. - C. 113-119.
75. Caliskan, E. Combination of Full-Field and Fractional Erbium: YAG Laser for Nonhealing Wounds / E. Caliskan, A. Botsali // *Dermatologic Surgery.* - 2022. - Vol. 48, № 1. - P. 114-119.
76. Chilgar, R. M. Spatially modulated erbium YAG laser as a treatment for diabetic ulcer / R. M. Chilgar, S. P. Andurkar // *Journal of Wound Care.* - 2023. - Vol. 32, № 10. - P. 21-29.
77. Chronic wounds / V. Falanga, R. R. Isseroff, A. M. Soulika [et al.] // *Nat Rev Dis Primers.* – 2022. - Vol. 8, № 1. - P. 50.
78. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF) / D. R. Knighton, K. F. Ciresi, V. D. Fiegel [et al.] // *Annals of surgery.* - 1986. - Vol. 204, № 3. - P. 322-330.
79. Clinical effects of high-intensity laser therapy on patients with chronic refractory wounds: a randomised controlled trial/ Q. Lu, Z. Yin, X. Shen [et al.] // *BMJ Open.* – 2021. – Jul 12;11(7):e045866.

80. Cole, S. J. Host suppression of quorum sensing during catheter-associated urinary tract infections / S. J. Cole, C. L. Hall, M. Schniederberend // *Nature Communications*. - 2018. - VOL. 9, № 1. - P. 4436.
81. Comparative ex vivo investigations on the cutting quality of the CO2 laser and the diode pumped Er:YAG laser/ H. Wurm, P. J. Schuler, F. Hausladen [et al.] // *Front Surg*. - 2021. - № 8. - e764450.
82. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis / F. G. Fowkes, D. Rudan, I. Rudan [et al.] // *Lancet*. - 2013. - Vol. 382, № 9901. - P. 1329-1340.
83. Contents: MEASURE: A proposed assessment framework for developing best practice recommendations for wound assessment / D. H. Keast, C. K. Bowering, A. W. Evans [et al.] // *Wound Repair and Regeneration*. - 2004. - Vol. 12, № 3. - P. s1-s17.
84. Cook, H. Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2, and MMP-2 activity / H. Cook, P. Stephens, K. J. Davies // *Journal of Investigative Dermatology*. - 2000. - Vol. 115, № 2. - P. 225-233.
85. Diabetic foot wound ulcer management by laser therapy: A meta-analysis / H. Liu., X. Ya-Qing, Y. Cai-Feng. [et al.] // *Int. Wound J*. - 2023. - Vol.20, №10. - P.4208–4216.
86. Dougherty, T. J. An update on photodynamic therapy applications / T. J. Dougherty // *Journal Clinical Laser Medical Surgery*. - 2012. - Vol. 20, № 1. - P. 3-7.
87. Effectiveness of moist dressings in wound healing after surgical suturing: A Bayesian network meta-analysis of randomised controlled trials / W. Sun, M. Chen, D. Duan [et al.] // *Int Wound J*. – 2023. - Vol. 20, № 1. - P. 69-78.
88. Effects of neodymium-yttrium-aluminum garnet (Nd:YAG) pulsed high-intensity laser therapy on full thickness wound healing in an experimental animal model / S. E. Hong, M. K. Hong, S. R. Kang [et al.] // *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. - 2016. - Vol. 18, № 8. - P. 432-437.

89. Eklof, B. Revision of the CEAP classification. 10 years after its introduction in 1994 / B. Eklof // *Medicographia*. - 2006. - Vol. 28, № 2. - P. 175-180.
90. Electrical Stimulation to Enhance Wound Healing / S. B. Rajendran, K. Challen, K. L. Wright [et al.] // *J Funct Biomater*. - 2021. - Vol. 12, № 2. - P. 40.
91. Elevated levels of matrix metalloproteinases and chronic wound healing: an updated review of clinical evidence / J. L. Lazaro, V. Izzo, S. Meaume [et al.] // *J Wound Care*. -2016. - Vol. 25 № 5. - P. 277-287.
92. Er:YAG laser vs. sharp debridement in management of chronic wounds: effects on pain and bacterial load / B. Hajhosseini, G. J. Chiou, G. Dori [et al.] // *Wound Repair and Regeneration*. - 2020. - Vol. 28, Suppl. 1. - P. 118-125.
93. Erbium: yttrium aluminum garnet laser accelerates healing in indolent diabetic foot ulcers / M. J. Johnson, P. A. Crisologo, D. H. Truong [et al.] // *The Journal of Foot and Ankle Surgery*. - 2019. - Vol. 58, Suppl. 6. - P. 1077-1080.
94. Evolution of the Chronic Venous Leg Ulcer Microenvironment and Its Impact on Medical Devices and Wound Care Therapies. / G. A. Coelho, P. H. Secretan, L. Tortolano [et al.] // *J Clin Med*. - 2023. - Vol. 12, № 17. - P. 5605.
95. EWMA document: negative pressure wound therapy: overview, challenges and perspectives / J. Apelqvist, C. Willy, A.-M. Fagerdahl [et al.] // *Journal of wound care*. - 2017. - T. 26. - № 3. – C. 151-154.
96. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment / D. S. Masson-Meyers, T. A. M. Andrade, G. F. Caetano [et al.] // *International journal of experimental pathology*. - 2020. - Vol. 101, № 1-2. -P. 21-37.
97. Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds / G. Lauer, S. Sollberg, M. Cole [et al.] // *Journal of Investigative Dermatology*. - 2000. - Vol. 115, № 1. - P. 12-18.
98. Fractional versus ablative erbium: yttrium-aluminum-garnet laser resurfacing for facial rejuvenation: an objective evaluation / M. El-Domyati, T. Abd-El-Raheem, H. Abdel-Wahab [et al.] // *Journal of the American Academy of Dermatology*. - 2013. - Vol. 68, № 1. - P. 103-112.

99. Frykberg, R. G. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds / R. G. Frykberg, J. Banks // *Advances in wound care*. - 2015. - Vol. 4, № 9. - P. 560-582.
100. Galiano, R. D. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing / R. D. Galiano, J. Michaels, V. M. Dobryansky // *Wound repair and regeneration*. - 2004. - VOL. 12, № 4. - P. 485-492.
101. Gibson, D. J. Chronic wound diagnostic for matrix metalloproteinase / D. J. Gibson, G. Schultz // *Wound healing Southern Africa*. - 2009. - Vol. 2, № 2. - P. 68-70.
102. Guest, J. F. Cohort study evaluating the burden of wounds to the UK's National Health Service in 2017/2018: update from 2012/2013 / J. F. Guest, G. W. Fuller, P. Vowden // *BMJ Open*. - 2020. - Vol.10, № 12. - P. e045253.
103. Haalboom, M. Chronic wounds: innovations in diagnostics and therapeutics / M. Haalboom // *Current medicinal chemistry*. - 2018. - Vol. 25, № 41. - P. 5772-5781.
104. Healing Time of Skin Ulcers in Homecare Residents in the Province of Reggio Emilia, Northern Italy / I. Iamandii, A. B. Kouassi, D. Simonazzi [et al.] // *Life (Basel)*. – 2022. - Vol. 12, № 12. - P. 1989.
105. Horrocks, A. Prontosan wound irrigation and gel: management of chronic wounds / A. Horrocks // *British Journal of Nursing*. - 2006. - Vol. 15, № 22. - P.1222-1228.
106. Houreld, N. Healing effects of photobiomodulation on diabetic wounds/ N. Houreld // *Appl. Sci*. - 2019. - 9(23): 5114.
107. Kirsner, R. S. The Wound Healing Society chronic wound ulcer healing guidelines update of the 2006 guidelines-blending old with new / R. S Kirsner // *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. - 2016. - Vol. 24, № 1. - P. 110-111.
108. Krishnaswamy, V.R. Matrix metalloproteinases: The sculptors of chronic cutaneous wounds / V. R. Krishnaswamy, D. Mintz, I. Sagi. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. -2017. - Vol. 1864, № 11 Pt B. - P. 2220-2227.

109. Lam, G. Nonhealing ulcers in patients with tophaceous gout: a systematic review / G. Lam, F. L. Ross, E. S. Chiu // *Advances in Skin & Wound Care*. - 2017. - Vol. 30, № 5. - P. 230-237.
110. Maitz, E. Treatment of chronic hard-to-heal wounds with hyaluronic acid ester: a case series of six patients / E. Maitz, B. Binder // *Wiener Medizinische Wochenschrift*. - 2021. - Vol. 172. - P. 1-5.
111. Mayrovitz, H. N. Venous, Arterial, and Neuropathic Leg Ulcers With Emphasis on the Geriatric Population / H. N. Mayrovitz, S. Wong, C. Mancuso // *Cureus*. - 2023. - Vol. 15, № 4. - P. e38123.
112. Molecular effects of fractional ablative erbium: YAG laser treatment with multiple stacked pulses on standardized human three-dimensional organotypic skin models / L. Schmitt, P. M. Amann, Y. Marquardt [et al.] // *Lasers in medical science*. - 2017. - Vol. 32. - P. 805-814.
113. Morris, D. Larval Therapy and Larval Excretions/Secretions: A Potential Treatment for Biofilm in Chronic Wounds? A Systematic Review / D. Morris, M. Flores, L. Harris // *Microorganisms*. - 2023. - Vol. 11, № 2. - P. 457.
114. Need for improved definition of «chronic wounds» in clinical studies / B. Kyaw, K. Jaerbrink, L. Martinengo [et al.] // *Acta dermato-venereologica*. - 2017. - Vol. 98, № 1. - P. 157-158.
115. Negative pressure wound therapy for treating foot wounds in people with diabetes mellitus / Z. Liu, J. C. Dumville, R. J. Hinchliffe [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev*. - 2018. - Vol. 10, № 10. - P. CD010318.
116. Niederstätter, I. M. Surgical Strategies to Promote Cutaneous Healing / I. M. Niederstätter, J. L. Schiefer, P. C. Fuchs // *Med Sci (Basel)*. - 2021. - Vol. 9, № 2. - P. 45.
117. No More Venous Ulcers-What More Can We Do? / A. Stanek, G. Mosti, T.S. Nematillaevich [et al.] // *J Clin Med*. - 2023. - Vol. 12, № 19. - P. 6153.
118. Novel autoantibody against the  $\beta$ 2-glycoprotein I/human leucocyte antigen-DR complex in patients with refractory cutaneous ulcers / N. Arase, K. Tanimura, H. Jin [et al.] // *The British journal of dermatology*. - 2017. - Vol. 178, № 1. - P. 272-275.

119. Orchestrating the Dermal/Epidermal Tissue Ratio during Wound Healing by Controlling the Moisture Content / A. C. Tuca, I. Bernardelli de Mattos, M. Funk [et al.] // *Biomedicines*. – 2022. - Vol. 10, № 6. - P. 1285.
120. Parnell, L. K. S. The Evolution of Animal Models in Wound Healing Research: 1993-2017 / L. K. S. Parnell, S. W. Volk // *Advances in wound care*. - 2019. - Vol. 8, № 12. - P. 692-702.
121. Patel, S. K. Venous Insufficiency / S. K. Patel, S. M. Surowiec. - Treasure Island (FL) StatPearls [Internet], 2023. - URL: <https://europepmc.org/article/NBK/nbk430975> (date of access: 10.02.2024).
122. Periodontopathogen levels following the use of an Er: YAG laser in the treatment of chronic periodontitis / T. J. Milne, D. E. Coates, J. W. Leichter [et al.] // *Australian dental journal*. - 2016. - Vol. 61, № 1. - P. 35-44.
123. Phage Therapy for Diabetic Foot Infection: A Case Series / M. J. Young, L. M. L. Hall, M. Merabishvili [et al.] // *Clinical Therapeutics*. - 2023. - Vol. 45, № 8. - P. 797-801.
124. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system / Z. Julier, A. J. Park, P. S. Briquez, M. M. Martino // *Acta Biomater*. - 2017. - № 53. - P. 13-28.
125. Protease activity as a prognostic factor for wound healing in venous leg ulcers / M. J. Westby, J. C. Dumville, N. Stubbs [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev*. – 2018. - Vol. 9, № 9. - P. CD012841.
126. Rapid healing of scar-associated chronic wounds after ablative fractional resurfacing / P. R. Shumaker, J. M. Kwan, E. V. Badiava [et al.] // *Archives of dermatology*. - 2012. - Vol. 148, № 11. - P. 1289-1293.
127. Research progress of adipose-derived stem cells in the treatment of chronic wounds / Z. Hao, W. Qi, J. Sun [et al.] // *Frontiers in Chemistry*. - 2023. - Vol. 13, № 11. - P. 1094693.
128. Schultz, G. S. Extracellular matrix: review of its roles in acute and chronic wounds / G. S. Schultz, G. Ladwig, A. Wysocki // *World wide wounds*. - 2005. - Vol. 2005.-URL:[https://www.researchgate.net/profile/GregorySchultz2/publication286916509\\_Extracellular\\_matrix\\_Review\\_of\\_its\\_roles\\_in\\_acute\\_and\\_chronic\\_wounds/links/58](https://www.researchgate.net/profile/GregorySchultz2/publication286916509_Extracellular_matrix_Review_of_its_roles_in_acute_and_chronic_wounds/links/58)

7d54b108ae4445c06b6d55/Extracellular-matrix-Review-of-its-roles-in-acute-and-chronic-wounds.pdf (date of access: 10.02.2024).

129. Skin healing and collagen changes of rats after fractional erbium:yttrium aluminum garnet laser: observation by reflectance confocal microscopy with confirmed histological evidence / J. Yang, S. Wang, L. Dong [et al.] // *Lasers in medical science*. - 2016. - Vol. 31, № 6. - P. 1251-1260.

130. Special Considerations in Wound Bed Preparation 2011: An Update<sup>©</sup> / R. G. Sibbald, L. Goodman, K. Y. Woo [et al.] // *Advances in skin & wound care*. - 2011. - Vol. 24, № 9. - P. 415-436.

131. Synergistic action of protease-modulating matrix and autologous growth factors in healing of diabetic foot ulcers. A prospective randomized trial / D. D. Kakagia, K. J. Kazakos, K. C. Xarchas [et al.] // *Journal of Diabetes and its Complications*. - 2007. - Vol. 21, № 6. - P. 387-391.

132. Taradaj, J. Effect of laser therapy on expression of angio-and fibrogenic factors, and cytokine concentrations during the healing process of human pressure ulcers / J. Taradaj, B. Shay, R. Dymarek // *International journal of medical sciences*. - 2018. - Vol. 15, № 11. - P. 1105.

133. Telgenhoff, D. Cellular senescence mechanisms in chronic wound healing / D. Telgenhoff, B. Shroot // *Cell death and differentiation*. - 2005. - Vol. 12, № 7. - P. 695-698.

134. The 2015 IWGDF guidance documents on prevention and management of foot problems in diabetes: development of an evidence-based global consensus / K. Bakker, J. Apelqvist, B. A. Lipsky [et al.] // *Diabetes/metabolism research and reviews*. - 2016. - Vol. 32, № 1. - P. 2-6.

135. The associations between diode laser (810 nm) therapy and chronic wound healing and pain relief: Light into the chronic wound patient's life / D. Tang., C. Liu., X. Chen [et al.] // *Wound Repair Regen*. - 2023. - Vol.31, №2. – P.227-232.

136. The Bioactive Core and Corona Synergism of Quantized Gold Enables Slowed Inflammation and Increased Tissue Regeneration in Wound Hypoxia / L.C. Yeh, S.P. Chen, F.H. Liao [et al.] // *Int J Mol Sci*. - 2020. - Vol. 21, № 5. - P. 1699.

137. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review / K. Järbrink, G. Ni, H. Sönnergren [et al.] // Systematic reviews. - 2017. - Vol. 6, № 15. - P. 1-7.
138. The humanistic and economic burden of chronic wounds: A systematic review / M. Olsson, K. Järbrink, U. Divakar [et al.] // Wound Repair and Regeneration. - 2019. - Vol. 27, № 1. - P. 114-125.
139. The inhibition of matrix metalloproteinase activity in chronic wounds by a polyacrylate superabsorber / S. A. Eming, H. Smola, B. Hartmann [et al.] // Biomaterials. - 2008. - Vol. 29, № 19. - P. 2932-2940.
140. Tissue responses to postoperative laser therapy in diabetic rats submitted to excisional wounds / C. de Loura Santana, D. de Fátima Teixeira Silva, A. M. Deana [et al.] // PLoS One. - 2015. - Vol. 10, № 4. - P. e0122042.
141. Treatment of Chronic Lower Extremity Ulcers with A New Er:Yag Laser Technology / J. M. Alcolea, E. Hernández, P. A. Martínez-Carpio [et al.] // Laser Therapy. - 2017. - Vol. 26, № 3. - P. 211-222.
142. Treatment of ulcers with ablative fractional lasers / L. M. Morton, J. S. Dover, T. J. Phillips [et al.] // Semin Cutan Med Surg. - 2015. - Vol. 34, Suppl. 1. - P. 37-41.
143. Tursi, S. A. Curli-containing enteric biofilms inside and out: matrix composition, immune recognition, and disease implications / S. A. Tursi, Ç. Tükel // Microbiology and Molecular Biology Reviews. - 2018. - Vol. 82, № 4. - P. 8-18.
144. Unravelling host-pathogen interactions by biofilm infected human wound models / J. Wächter, P. K. Vestweber, V. Planz, M. Windbergs // Biofilm. 2023. - № 6. - P. 100164.
145. Updated terminology of chronic venous disorders: the VEIN-TERM transatlantic interdisciplinary consensus document / B. Eklof, M. Perrin, K. T. Delis [et al.] // Journal of vascular surgery. - 2009. - VOL. 49, № 2. - P. 498-501.

146. Use of photosynthetic transgenic cyanobacteria to promote lymphangiogenesis in scaffolds for dermal regeneration / M. N. Chávez, B. Fuchs, N. Moellhoff [et al.] // *Acta Biomater.* – 2021. -№126. P.132-143.

147. Vasculitic and autoimmune wounds / V. K. Shanmugam, D. Angra, H. Rahimi [et al.] // *Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders.* - 2017. - Vol. 5, № 2. - P. 280-292.

148. Vergidis, P. Novel approaches to the diagnosis, prevention, and treatment of medical device-associated infections / P. Vergidis, R. Patel // *Infectious disease clinics.* - 2012. - Vol. 26, № 1. - P. 173-186.

149. Werner, S. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines / S. Werner, R. Grose // *Physiological reviews.* - 2003. - Vol. 83, № 3. - P. 835-870.

150. Why Venous Leg Ulcers Have Difficulty Healing: Overview on Pathophysiology, Clinical Consequences, and Treatment / J. D. Raffetto, D. Ligi, R. Maniscalco [et al.] // *J Clin Med.* – 2020. - Vol. 10, № 1. - P. 29.

151. Wolcott, R.D. Biofilms and chronic wound inflammation / R. D. Wolcott, D. D. Rhoads, S. E. Dowd // *Journal of wound care.* - 2008. - Vol. 17. - P. 333-341.

152. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management / G. S Schultz, R. G. Sibbald, V. Falanga [et al.] // *Wound repair and regeneration.* - 2003. - Vol. 11. - P. S1-S28.

153. Yang, L. Diabetic foot ulcer: Challenges and future / L. Yang, G. C. Rong, Q. N. Wu // *World Journal of Diabetes.* - 2022. - Vol. 13, № 12. - P. 1014-1034.

154. Yao, W. In-depth analysis of antibacterial mechanisms of laser generated shockwave treatment / W. Yao, E. C. Kuan, Y. H. Chung // *Lasers in Surgery and Medicine.* - 2019. - Vol. 51, № 4. - P. 339-344.

155. Zhao, H. Research Progress of Photodynamic Therapy in Wound Healing: A Literature Review / H. Zhao, J. Sun, Y. Yang // *Journal of Burn Care & Research.* - 2023. - Vol. 44, № 6. - P. 1327-1333.