

УДК: 616. 211+616. 216]—089. 168. 1:615. 847. 8

## НАНОЧАСТИЦЫ В ЛЕЧЕНИИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ НОСА И ОКОЛОНОСОВЫХ ПАЗУХ

К. Г. Добрецов<sup>1</sup>, А. С. Лопатин<sup>2</sup>, С. В. Столяр<sup>3,4</sup>, А. В. Сипкин<sup>1</sup>, В. П. Ладыгина<sup>5</sup>

## NANOPARTICLES IN THE TREATMENT OF WOUND PROCESSES OF NOSE AND PARANASAL SINUS

K. G. Dobretsov<sup>1</sup>, A. S. Lopatin<sup>2</sup>, S. V. Strolyar<sup>3,4</sup>, A. V. Sipkin<sup>1</sup>, V. P. Ladygina<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Дорожная клиническая больница на станции Красноярск  
(Главный врач – Т. А. Иокст)

<sup>2</sup>ГОУ ВПО Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова  
(Ректор – член-корр. РАМН П. В. Глыбочко)

<sup>3</sup>Институт физики СО РАН, г. Красноярск  
(Директор – академик РАН В. Ф. Шабанов)

<sup>4</sup>Сибирский федеральный университет, г. Красноярск  
(Ректор – академик РАН Е. А. Ваганов)

<sup>5</sup>Международный научный центр исследований экстремальных состояний  
организма при Президиуме КНЦ СО РАН, г. Красноярск  
(Исполнительный директор – проф. Р. Г. Хлебопрос)

*Настоящее исследование посвящено изучению эффективности применения магнитных наночастиц в лечении послеоперационных процессов носа и околоносовых пазух. Суть метода заключается в адресной доставке антибиотика в очаг поражения с помощью наночастиц и внешнего магнитного поля. В результате лечения 66 больных после ринохирургических вмешательств, согласно данным эндоскопического, цитологического, бактериологического и иммунологического исследований, было доказано, что применение наночастиц с антибиотиком уменьшает явления воспаления, усиливает элиминацию возбудителя и улучшает состояние клеточного иммунитета вдвое интенсивнее, чем традиционная терапия. Положительные результаты исследования позволяют рекомендовать использование наночастиц к широкому применению в практической оториноларингологии.*

**Ключевые слова:** наночастицы, магнитное поле, ринохирургические вмешательства, раневой процесс, местная антибактериальная терапия.

**Библиография:** 14 источников.

*The research is devoted to study of the wound processes treatment of nose and paranasal sinus after surgery. The principle of method – precise antibiotics delivery in the focus of disease by nanoparticles and external magnetic field. According to the data of endoscopic, cytological, bacteriological and immune researches the use of nanoparticles decreases inflammation, enforces elimination of causative agent and improves the state of cell immunity (case study of 66 patients after surgery). Positive results of the study allow the use of nanoparticles in otorhinolaryngology.*

**Key words:** nanoparticles, magnetic field, rhinosurgery, wound process, local antibacterial therapy.

**Bibliography:** 14 sources.

В последнее время отмечается заметная активность в исследованиях, направленных на поиск новых материалов и изучение путей и возможностей их применения в медицинских целях. Очевидно, что при этом преследуется цель не только удовлетворить академический интерес, связанный с изучением нового материала, но и оценить возможности и перспективы его применения в клинической практике. Возможно, такая направленность исследований объясняется тем, что современная фарминдустрия не может в достаточной мере обеспечить потребности практической медицины в лекарственных средствах. Как отмечают аналитики,



несмотря на постоянный рост финансирования научных работ, нацеленных на получение новых веществ (препаратов) с использованием различных методов химического и биологического синтеза, количество разрабатываемых новых лекарств, тем не менее, постоянно уменьшается [9]. В частности, библиотека создаваемых новых химических соединений пополняется в среднем на 150000 образцов в год. В то же время реальное количество вновь синтезированных веществ, претендующих на роль потенциальных лекарственных средств, за последнее десятилетие значительно снизилось и составляет менее чем один препарат в год на одну компанию [8].

Идея создания лекарственных форм, обеспечивающих направленную доставку лекарственных веществ к месту действия, является одной из наиболее привлекательных и прогрессивных в современной медицине. К настоящему времени весьма интенсивно ведутся исследования о возможности использования носителей лекарственных веществ в виде наночастиц [1, 3, 13, 12, 14].

Под термином наночастицы принято понимать коллоидные частицы размером от 10 до 1000 нанометров, состоящее из макромолекулярного биodeградирующего и биосовместимого материала, в который активно внедрено лекарственное вещество. Вместе с наночастицами ассоциированное лекарственное вещество может попадать непосредственно во внутриканальную и внутриклеточную среду [2, 11, 10].

Это наиболее актуально для antimicrobial препаратов в противобактериальной химиотерапии при различных воспалительных и раневых процессах.

В последнее десятилетие произошел выраженный прогресс в области ринохирургии, который обусловлен широким внедрением эндоскопической техники, принципов минимальной инвазивности и совершенствованием анестезиологического пособия. Однако способы лечения раневых послеоперационных процессов в полости носа и околоносовых пазух не отличаются разнообразием. Более того, на наш взгляд, является недооцененной и роль микроорганизмов на течение раневого процесса, скорости заживления и вероятности осложнений в раннем послеоперационном периоде при ринохирургических вмешательствах.

Для повышения направленного действия антибактериальных средств при раневых процессах носа и околоносовых пазух нами сделана попытка использовать магнитные наночастицы и внешнее магнитное поле в качестве их движущей силы.

**Целью** исследования явилось повышение эффективности лечения раневых процессов носа и околоносовых пазух за счет направленного действия антибиотиков с помощью магнитных наночастиц.

**Пациенты и методы.** С 2006 по 2009 г. г в ЛОР отделении Дорожной клинической больницы на ст. Красноярск было пролечено 66 человек с послеоперационными процессами носа и околоносовых пазух (42 мужчины – 63,6% и 24 женщины – 36,4%).

Таблица 1

Распределение больных по оперативным вмешательствам (N=66)

Нозология	Наименование операции	Группа сравнения, n=34 абс. (%)	Группа I, n <sub>1</sub> =32 абс. (%)
Искривление перегородки носа	Эндоскопическая подслизистая резекция или септопластика	20 (58,8)	18 (56,3)
Хронический полипозный риносинусит	Эндоскопическая полипэктомия носа	9 (26,5)	9 (28,1)
Вазомоторный ринит	Эндоскопическая подслизистая вазотомия/латеро-позиция нижних носовых раковин	4 (11,8)	3 (9,4)
Хронический гипертрофический ринит	Эндоскопическая частичная конхотомия	1 (2,9)	2 (6,2)

Послеоперационные процессы были обусловлены оперативными вмешательствами по поводу различных патологических состояний полости носа и околоносовых пазух (искривление перегородки носа, вазомоторный ринит, хронический гипертрофический ринит, хронический полипозный риносинусит). Наиболее часто выполнялись оперативные вмешательства на перегородке носа – подслизистая резекция или септопластика – 38 случаев (57,6%) (табл. 1).

Таким образом, в исследуемые группы включались пациенты, которым проводились хирургические вмешательства в полости носа и околоносовых пазухах, попадавшие по современной классификации в категорию «условно чистых» [7].

Все операции выполнялись под общим обезболиванием, по одинаковой методике, одной и той же хирургической бригадой. В послеоперационном периоде все пациенты получали внутримышечные инъекции анальгетика (кетонал 10мг 2 раза в день 3 дня), смазывание слизистой оболочки носа мазью «Левомеколь» (2 раза в день – 5 дней), физиопроцедуры (магнитотерапия аппаратом «Полюс-101», 1 раз в день – 5 дней), а также ежедневно проводился туалет полости носа, с удалением фибрина и геморрагических корок.

В зависимости от методов местного лечения все больные были распределены на 2 группы.

I группа состояла из 32 больных после ринохирургических вмешательств, которым в послеоперационном периоде применялось местное лечение магнитными наночастицами, ассоциированными с антибиотиком «Амоксиклав» (1 раз в день в течение 7 дней).

Группа сравнения состояла из 34 больных, которым в послеоперационном периоде проводилось традиционное местное лечение без использования наночастиц.

Магнитные наночастицы были получены в результате культивирования бактерий *Klebsiella oxytoca*, выделенных из сапропеля озера Боровое Красноярского края. Ранее выполненные исследования свидетельствовали о том, что в процессе жизнедеятельности бактерии синтезировали наночастицы минерала ферригидрита  $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ . Было доказано, что при воздействии внешним магнитным полем наночастицы диффузно проникают в толщу тканей. Кроме этого, они не токсичны и могут связывать лекарственные препараты ковалентной связью, либо простой адсорбцией [6].

Полученные наночастицы ассоциировали с ингибиторозащищенным полусинтетическим пенициллином «Амоксиклав» в дозе 1,2г. Антибиотик растворяли в 5мл воды для инъекций с добавлением 5 мл раствора наночастиц.

Для создания внешнего магнитного поля применялся переносной аппарат для низкочастотной магнитотерапии «Полюс-101». С учетом анатомических особенностей полости носа и околоносовых пазух, согласно инструкции по применению, аппарат был использован с градиентом магнитного поля 4–6 мТл/мм и величиной магнитной индукции 10,14–19,56мТл.

После удаления тампонов на вторые сутки после операции ежедневно пациентам I-ой группы 1 раз в день в полость носа вводились марлевые турунды, смоченные наночастицами с антибиотиком, в течение 20 минут с воздействием внешним магнитным полем. Курс лечения составил 7 дней.

В качестве оценки результатов исследования нами применялись анкетирование, эндоскопия полости носа, цитологическое, хемилюминесцентное, бактериологическое и иммунологическое исследования.

Для цитологического контроля за течением раневого процесса использовался метод, предложенный М. Ф. Камаевым (1954) [4]. Мазок со слизистой оболочки полости носа переносился на предметное стекло, затем его фиксировали в абсолютном метаноле в течение 5 минут, высушивали на воздухе и окрашивали по Романовскому-Гимза в течение 40 минут. Подсчет в мазках производился под микроскопом на 500 клеточных элементов при увеличении в 40 и 90 раз. Цитологическое исследование проводилось на 2-е, 5-е и 8-е сутки после операции.

Хемилюминесцентный анализ проводился для определения функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов крови по методу P. De Sole (1983) [5]. Оценка спонтанной и индуцированной хемилюминесценции осуществлялась в течение 90 минут на 36-каналь-



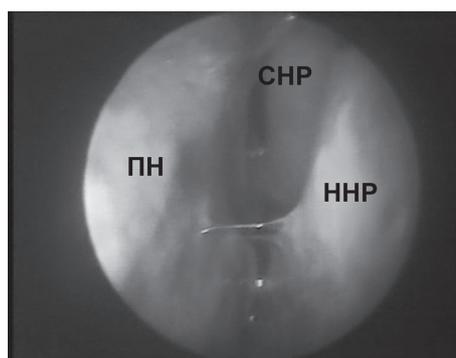
ном хемилюминесцентном анализаторе. Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум ( $T_{max}$ ), максимальное значение ( $I_{max}$ ), площадь кривой ( $S^2$ ). Регистрация результатов и управление хемилюминесцентным анализатором осуществлялась через микроЭВМ IBM/ PC/ AT. Забор крови проводился на 2-е и 5-е сутки после операции.

Выделение микроорганизмов проводили на трех питательных дифференциально-диагностических средах. Для выделения микрофлоры использовали желточно-солевой агар, кровяной агар и агар Эндо. При микроскопировании нативного материала использовали окраску по Граму. Выросшие колонии изолировали в чистую культуру для дальнейшей идентификации. На скошенный мясопептонный агар отсеивали изолированные колонии для получения чистых культур и изучения признаков, используемых при идентификации. О чистоте культуры судили с помощью визуального и микроскопического контроля. Бактериологическое исследование проводилось путем забора раневого отделяемого из полости носа на 2-е и 5-е сутки после операции.

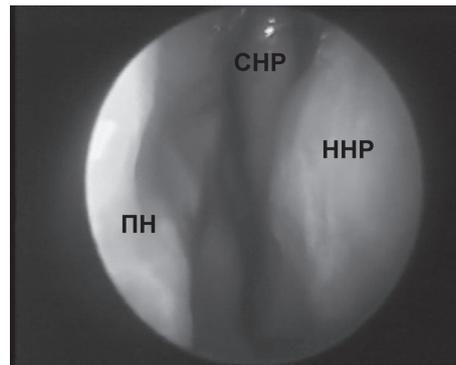
В проведение иммунологического метода включалось изучение числа лимфоцитов, его популяционного и субпопуляционного состава. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, HLA-DR. Иммунологическое исследование проводилось в 1 сутки и 5-е сутки после операции.

**Результаты и обсуждение.** Изучение жалоб показало, что в первые сутки после операции всех больных беспокоили выделения из носа, заложенность носа, ухудшение или потеря обоняния, слабость. Применение магнитных наночастиц с антибиотиком значительно уменьшало явления воспаления и ускоряло заживление слизистой оболочки. В результате на восьмые сутки после операции вышеуказанные жалобы у больных I группы отмечались в 3 раза реже, чем в группе сравнения ( $p < 0,05$ ).

При эндоскопическом исследовании в первые сутки болезни у всех больных отмечались гиперемия, отек, влажность, обильные геморрагические выделения из носа. Применение магнитных наночастиц с амоксиклавом у больных I группы приводило к положительным изменениям эндоскопической картины быстрее, чем в группе сравнения. В первую очередь это связано со способностью наночастиц доставлять лекарственное вещество в толщу кости и хряща. Эффективная местная антибактериальная терапия у больных I группы исследования способствовала более раннему очищению полости носа и восстановлению носового дыхания по сравнению с группой сравнения (рис 1, 2).



**Рис. 1.** Эндоскопическая картина полости носа пациента Г., 17 лет, группы сравнения на 8 день после септопластики и двухсторонней вазотомии. Умеренный отек, гиперемия слизистой оболочки носа, наличие слизистого отделяемого и небольшого количества фибриновых наложений.



**Рис. 2.** Эндоскопическая картина полости носа пациента 3., 52 лет, группы I на 8 день после септопластики. Минимальные воспалительные изменения. Носовой ход широкий.

При цитологическом исследовании мазков-отпечатков слизистой оболочки носа выявлено, что в первые сутки лечения во всех группах исследования цитограммы были дегенеративно-воспалительного и воспалительного типа. На пятый день лечения в группе сравнения этот тип цитограмм сохранялся. Применение магнитных наночастиц с антибиотиком привело к уменьшению воспалительной реакции и стимуляции элементов регенерации. Тип цитограмм у больных I группы приобретал воспалительно-регенеративный характер ( $p < 0,001$ ). Элиминация возбудителя из очага воспаления приводила к усилению макрофагальной реакции, завершению фагоцитоза и раннему появлению фибробластов и эпителиальных клеток. На восьмой день лечения цитологическая картина у больных группы сравнения сохраняла признаки воспаления, а цитограммы больных I группы исследования соответствовали регенеративному варианту ( $p < 0,05$ ). Таким образом, использование магнитных наночастиц с амоксиклавом достоверно снижало интенсивность воспалительных проявлений и ускоряло регенеративные процессы у больных с явлениями послеоперационного ринита.

По данным хемилюминесцентной реакции в первые сутки после операции у всех больных показатели (время выхода на максимум ( $T_{max}$ ), максимальное значение ( $I_{max}$ ), площадь кривой ( $S^2$ )), были ниже нормы. Это объясняется угнетением активности нейтрофилов за счет роста и размножения бактериальной микрофлоры, а также последствиями хирургического воздействия на ткани. Элиминация бактериального агента и продуктов тканевого распада (за счет сорбции наночастицами) с помощью магнитных наночастиц приводила к повышению активности ферментов миелопероксидазы, NADPH-оксидазы и других активных форм кислорода. Это проявлялось повышением основных показателей хемилюминесцентной реакции:  $sT_{max}$  ( $p < 0,01$ ),  $iI_{max}$  ( $p < 0,01$ ) и  $iS_{max}/sS_{max}$  у больных I группы на пятые сутки. Аналогичные показатели у больных групп сравнения были ниже.

Таким образом, использование наночастиц с антибиотиком, с одной стороны, эффективно уменьшало бактериальную нагрузку на пораженные ткани, а с другой стороны, значительно усиливало активность нейтрофилов, что приводило к активации внутренних механизмов борьбы с инфекцией.

Эффективность местного антибактериального действия комплекса феррогидрит/амоксилав достоверно доказана микробиологическим исследованием. Так, адресная доставка антибиотика в очаг поражения с помощью магнитных наночастиц, приводила к выраженному обеднению микробного пейзажа на пятые сутки лечения у больных I группы исследования ( $p < 0,001$ ) (табл. 2).



Таблица 2

**Бактериологический анализ раневого отделяемого больных после ринохирургической вмешательства на 5 сутки (N=66, M±m)**

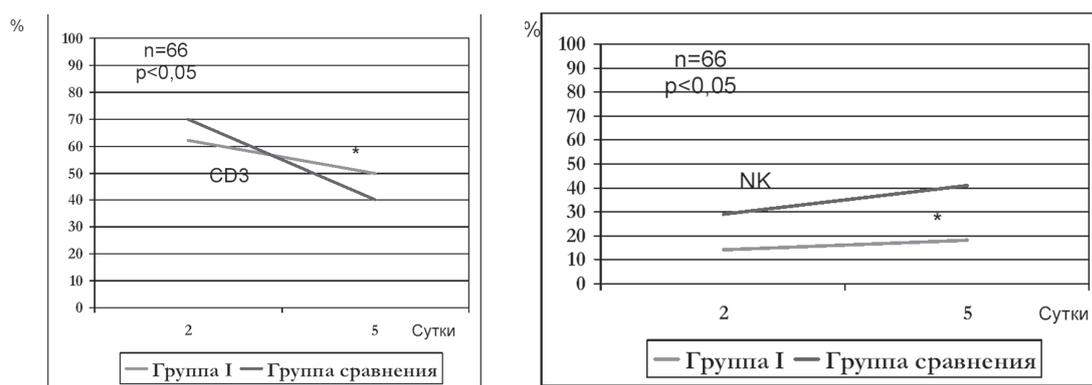
Микроорганизмы (КОЕ/мл)	Группа сравнения	I группа
Staphylococcus	1000000,0	100000,0***
Streptococcus	10000,0	5005,0**
Enterococcus	20000,0	1000,0***
Micrococcus	1000,0	0,00***
Enterobacteriaceae	1250,0	1000,0**

**Примечание:** \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  относительно группы сравнения

Высокая местная антибактериальная активность комплекса наночастицы/антибиотик способствовала купированию воспалительной реакции и снижению токсемии у больных после ринохирургических вмешательств. В результате только 5 пациентам группы I (15,6%; против 19; 55,9% в группе сравнения) в послеоперационном периоде, в связи с сохранением субфебрильной температуры более 3 дней после операции, были назначены системные антибактериальные средства (Цефотаксим 1,0г в/м х 2 раза в день, №7).

Не вызывает сомнения, что нарушение целостности защитного покрова слизистой оболочки полости носа нарушает баланс компонентов иммунной системы, что приводит (с той или иной степенью) к ее перенапряжению, истощению и далее к срыву. Клинические проявления этого срыва независимо от вызвавших его причин и, соответственно, характера нарушений в основном однотипны, поэтому суть его можно охарактеризовать как иммунную недостаточность организма. Все эти состояния иммунной системы, находят свое отражение в характере различных иммунологических показателей.

В проведенном исследовании при определении популяций и субпопуляций лимфоцитов в обеих группах оперированных отмечалось снижение основных показателей клеточного иммунитета в первые сутки болезни. Эффективное антибактериальное воздействие в очаге поражения с помощью направленной атаки наночастиц, в отличие от группы сравнения, привело к сдерживанию падения уровня Т-клеток (CD3) и резкого роста натуральных киллеров (NK) у больных I группы на пятые сутки терапии ( $p < 0,05$ ) (рис. 3).



**Рис. 3.** Динамика популяций и субпопуляций лимфоцитов у пациентов после ринохирургических вмешательств на 5 сутки: а) Т-клетки (CD3), б) натуральные киллеры (NK).

Необходимо подчеркнуть, что применение магнитных наночастиц с антибиотиком является неинвазивной и абсолютно безболезненной процедурой. Ни у одного пациента не возникло непереносимости или аллергических реакций на наночастицы. Использование наночастиц возможно и в амбулаторных условиях.

**Выводы:**

Таким образом, направленная местная антибактериальная терапия с помощью магнитных наночастиц при ранних процессах в полости носа и околоносовых пазух уменьшает явления воспаления, восстанавливает пораженную слизистую оболочку и развивает регенеративные моменты вдвое интенсивнее, чем традиционная терапия. Положительные результаты исследования позволяют рекомендовать использование наночастиц к широкому применению в практической оториноларингологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ-ККФН 09-04-98038-р\_сибирь\_a и Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 г. г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Активность рифампицина увеличивается при включении его в наночастицы / Байсагатов С. Т. [и др.] // Здравоохранение Казахстана. – 1999. – №11–12. – С. 73–76.
2. Антибиотики, связанные с наночастицами проявляют хороший эффект на экспериментальных моделях очаговой гнойной инфекцией А. Е. / Гуляев [и др.]. Мат. межд. конгресса по иммунореабилитации и реабилитации в медицине, Израиль. – 1999, С. 150.
3. Васильев А. Е. Наночастицы лекарственных веществ // Новая аптека. – 2003. – №1. – С. 64–67.
4. Граков Б. С., Селезов Е. А., Швецкий А. Г. Полупроницаемые мембраны в лечении и профилактике хирургической инфекции / Изд. Красноярского университета, 1988. 158 с.
5. Грачева Т. А. Совершенствование хемилюминесцентного метода исследования функциональной активности фагоцитирующих клеток // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – №2. – С. 54–55.
6. Изучение свойств магнитных наночастиц в оториноларингологии (экспериментальное исследование) / К. Г. Добрецов [и др.] // Рос. оторинолар. – 2009. – №3. – С. 51–56.
7. Лопатин А. С., Георгиевский И. В. Оценка эффективности периоперационной профилактики биопароксом при хирургических вмешательствах в полости носа и на околоносовых пазухах // Вестн. оторинолар. – 2006. – №6. – С. 63–64.
8. О возможности внутривенного введения стерильных золь модифицированных наноалмазов / А. П. Пузырь [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2005. – №1. – С. 20–24.
9. Страчунский Л. С. Антибактериальная терапия. М.: Фармединфо, 2000. 184 с.
10. Alexiou C., Jurgons R., Seliger C. Medical applications of magnetic nanoparticles // J. Nanosci. Nanotechnol. – 2006. – Vol. 6, N 9–10. – P. 2762–2768.
11. Kreuter J. Nanoparticles - a historical perspective // Int. J. Pharm. – 2007. – Vol. 333, N 1–2 – P. 1–10.
12. Lu A. H., Salabas E. L., Schuth F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2007. – Vol. 46, N 8. – P. 1222–1244.
13. Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications / M. J. Kogan [et al.] // Nanomedicine. – 2007. – Vol. 2, N 3. – P. 288–306.
14. Yao L., Xu S. Long-range, high-resolution magnetic imaging of nanoparticles // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2009. – Vol. 48, N 31. – P. 5679–5682.

**Добрецов Константин Григорьевич**, к. м. н., врач-ординатор ЛОР отделения Дорожной клинической больницы на станции Красноярск. 660058, г. Красноярск, ул. Ломоносова, 47; тел. 8-391-248-88-34; тел. моб. 8-913-507-01-41, e-mail: ekdobretsov@rambler. ru; **Лопатин Андрей Станиславович**, профессор, заведующий кафедрой ЛОР болезней Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова. 119435, Москва, ул. Большая Пироговская, 6. Тел.: 8-495-248-66-33; э/п. lopatin@mma. ru; **Столяр Сергей Викторович**, докторант Сибирского федерального университета (Красноярск), старший научный сотрудник института физики СО РАН (Красноярск). 660036, Красноярск, Академгородок, 50, стр. 38. Тел. 8-301-243-26-35, моб. Тел. 8-923-293-85-86; э/п. rauf@iph. krasn. ru; **Сипкин Александр Валентинович**, врач-ординатор ЛОР отделения Дорожной клинической больницы на станции Красноярск. 660058, Красноярск, ул. Ломоносова, 47. тел. 8-391-248-88-34. э/п. sipkin@inbox. ru; **Ладыгина Валентина Петровна**, ст. н. с. Международного научного центра исследований экстремальных состояний организма при Президиуме КНЦ СО РАН. 660036, Красноярск, Академгородок, 50. тел. 8-391-249-57-39, э/п. cnb@post. krascience. rssi. ru