

**УСТАНОВЛЕНИЕ ТЕХНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК И ВЫБОР РЕЖИМОВ РАБОТЫ ГЕНЕРАТОРА НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ АРГОНОВОЙ ПЛАЗМЫ (НТАП). РАЗРАБОТКА ПРОГРАММ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ И БИМЕДИЦИНСКИХ ИСПЫТАНИЙ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ САНИРУЮЩЕГО И РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НТАП. (ПО МАТЕРИАЛАМ НАУЧНОГО ОТЧЕТА)**

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино,  
142290, г. Пущино Московской обл. ул. Институтская, 3. Тел. (495) 632-78-69

*телефон: +7(4967) 732648*

*E-mail: eim11@mail.ru*

Маевский Е.И., Богданова Л.А., Селезнева И.И., Давыдова Г.А. Мурашев А.Н. Ермолаева С.А; Варфоломеев А.Ф, Юров Д.С., Петров О.Ф., Васильев М.М., Фортон В.Е., Дидковский Н.А., Малашенкова И.К., Владимиров И.В., Малашенков Д.К.

Учреждение Российской Академии наук Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН – головное учреждение по Госконтракту от 28 июля 2008 года № 02.512.12.2023) с Федеральным агентством по науке и образованию РФ

## РЕЗЮМЕ

В представленной работе описан широкий комплекс подготовительных работ, которые необходимо было выполнить для установления технических характеристик и отбора режима работы генератора низкотемпературной (работающей при 36-40 °С) аргоновой плазмы. Генератор аргоновой плазмы предназначен для безболезненной стерилизации инфицированных длительно незаживающих ран и язв различного генеза. Описана попытка разложить комплексное влияние низкотемпературной плазмы на составляющие, которые могут оказывать наиболее значимые эффекты на биологические объекты. В работе также отражены исследования на биологических моделях разного уровня организации, предназначенных для выявления не только стерилизующего, но и возможного санирующего –заживляющего эффекта плазменного облучения на раневую поверхность. Разработаны программы и методики микробиологических и биомедицинских испытаний, созданы новые и воспроизведены известные экспериментальные модели, необходимые для оценки, стерилизующего, санирующего и ранозаживляющего воздействия низкотемпературной аргоновой плазмы.

**Ключевые слова:** низкотемпературная аргоновая плазма, стерилизация инфицированных ран и язв, резистентные микроорганизмы, биологические модели для испытания действия компонентов плазмы *in vitro* и *in vivo*.

Целью проекта является создание способа и действующего макета устройства, обеспечивающих применение низкотемпературной аргоновой плазмы для санации обширных инфицированных ран и язв: уничтожение микроорганизмов на раневой поверхности и ускорение процессов заживления. Целью первого этапа проекта являлось установление технических характеристик и выбор режимов работы генератора низкотемпературной аргоновой плазмы. Разработка программ и методик микробиологических и биомедицинских испытаний, экспериментальных моделей для оценки saniрующего и ранозаживляющего воздействия низкотемпературной аргоновой плазмы.

В ходе выполнения работ по проекту был выполнен анализ опубликованной научно-технической литературы и нормативно-технической документации и требований Росздрава, относящихся к разрабатываемой теме. По результатам проведенного информационного анализа разработана общая программа проведения исследований.

Проведены расчет состава плазмы при работе генератора и адаптация методов диагностики низкотемпературной плазменной струи, в том числе адаптация зондовых методов определения концентраций электронов и ионов в плазме при атмосферном давлении. Проведены определение ионного состава и исследование спектральных характеристик низкотемпературной аргоновой плазмы при разных режимах работы генератора. На основании проведенных исследований сформулированы и рассчитаны исходные медико-биологические требования к устройству СВЧ-разряда для генерации низкотемпературной аргоновой плазмы. Разработано техническое предложение и осуществлено обеспечение биомедицинских исполнителей действующим макетом генератора низкотемпературной аргоновой плазмы (НТАП), содержащим систему компьютерного управления параметрами плазменной струи, контроля длительности облучения и положения излучателя относительно раневой поверхности, который был предоставлен для обеспечения медико-биологических исследований по проекту. Были проведены оценка и адаптация параметров плазменной струи (температура, скорость протока и ионный состав) в соответствии с медико-техническими требованиями: параметры плазмы гомогенной по площади при диаметре плазменной струи 30 мм. на расстояниях 20 мм от выходного отверстия горелки находятся в безопасном для тканей животных и человека диапазоне, при ненулевой величине плавающего потенциала сетки температура выходящей струи газа ниже 40°C; при использовании чистого аргона (99,9%) в газовом потоке обнаружены микропримеси NO<sub>2</sub>; мощность УФ облучения (309 нм и 316 нм) составляет 80

мкВт/см<sup>2</sup>, излучение в красной и инфракрасных (ИК) областях менее 40 мкВт /см<sup>2</sup>.

Технологические решения, использованные при разработке способа генерации СВЧ-плазмы, основаны на запатентованных ранее изобретениях. Основные сложности и особенности выполненной разработки заключались в создании равномерного по облучаемой площади диаметром не менее 30 мм потока НТАП (в известных в настоящее время аппаратах плазменные лучи имеют диаметр не более 1,5 мм), обладающего бактерицидной активностью, но не поражающего клетки тканей млекопитающих, а также в создании комплекса биомедицинских моделей, позволяющего оценивать действие множества одновременно действующих факторов НТАП на разных уровнях биологической организации и объектах разных биологических видов (от бактерий, культивируемых клеток тканей животных и человека до целостного организма животных).

Проведены экспериментальный отбор антибиотикорезистентных патогенных штаммов микроорганизмов из коллекции патогенных штаммов (грамм-положительные, грамм-отрицательные и полирезистентные бактерии) и оценка влияния аргоновой плазмы на жизнеспособность микроорганизмов в культуре и биопленках. Проведен скрининг вирулентности отобранных 44 штаммов *P. aeruginosa* и *S. Aureus*, включающих более 1000 клинических изолятов, выделенных из клинических образцов. Обнаружена высокая патогенность изолятов: 70% штаммов *P.aeruginosa* резистентны более чем к 5 антибиотикам; 61% штаммов *S. aureus* резистентны к отдельным антибиотикам и 2 штамма обладали множественной устойчивостью.

Исследовано влияние параметров и режимов применения низкотемпературной аргоновой плазмы на жизнеспособность культивируемых *in vitro* патогенных микроорганизмов (грамм-положительных, грамм-отрицательных и полирезистентных бактерий). Показано, что более 99% колоний культивируемых *in vitro* штаммов микроорганизмов, выделенных из клинического материала и из инфицированных модельных ран лабораторных животных, гибнут через 2 мин облучения под воздействием НТАП, генерируемой СВЧ-горелкой. Увеличение экспозиции облучения до 4 мин приводит к увеличению площади микробицидного действия НТАП примерно вдвое.

Разработана программа и проведены в условиях *in vitro* медико-биологические испытания с использованием культур клеток покровных мягких тканей и фагоцитирующих клеток млекопитающих: определены жизнеспособность, функциональное состояние, кислородзависимая и кислороднезависимая бактерицидная активность и интерферонообразование клеток при воздействии на них факторов, определяющих

биологическое воздействие НТАП.

Проведено исследование влияния режимов применения низкотемпературной аргоновой плазмы (по факторам, определяющим биологическую активность НТАП) на параметры клеточного иммунитета: функциональное состояние фагоцитирующих клеток, включая оценку кислородзависимой бактерицидной активности, а также интерферонообразование в тестах *in vitro*. Выполнено исследование *in vitro* показателей ответной реакции иммунной защиты 71 образца периферической крови людей: 39 образцов взяты у больных с вторичной иммунной недостаточностью и 32 - у практически здоровых лиц. Впервые выделено 5 типов ответов на «контрольное» низкоинтенсивное лазерное облучение, в зависимости от дозы и исходного уровня продукции активных форм кислорода нейтрофилами и моноцитами. Показано, что вторичный иммунодефицит на фоне инфекционно-воспалительного синдрома у больных с незаживающими ранами и язвами характеризуется недостаточностью свободно-радикальной ответной реакции периферической крови и снижением кислороднезависимой бактерицидности (продукции катионных белков и альфа-интерферона) при тестирующей функциональной нагрузке

Исследовано влияние параметров и режимов применения таких компонентов низкотемпературной аргоновой плазмы, как УФ- и ИК- излучение, на жизнеспособность, пролиферативную активность культивируемых *in vitro* клеток млекопитающих. Показана применимость *in vitro* модели репарации ран, основанной на контракции коллагенового геля иммобилизованными в его объеме фибробластами, и культивируемых клеток эпителия почек и фибробластов подкожной соединительной ткани животных и человека для исследования влияния таких компонентов НТАП, как УФ- и ИК- излучение на жизнеспособность (окраске трипановым синим), пролиферативную и функциональную активность клеток (оцениваемую по митохондриально-тетразолиевому тесту), на скорость и степень реорганизации фибробластами коллагенового матрикса.

Проведены медико-биологические испытания при моделировании раневого процесса у животных (патофизиологические модели медленно заживающих механических и ожоговых ран у крыс) с инфицированием сапрофитными и условно патогенными микроорганизмами. Осуществлена адаптация методов оценки микробного обсеменения раневых поверхностей *in vivo* в экспериментах на животных. Показано, что у старых животных, в отличие от молодых, наблюдается вторичная альтерация, сопровождающаяся увеличением площади ран и значительной задержкой заживления ран. Дополнительное искусственное инфицирование резаных ран у животных золотистым стафилококком и гемолитическими энтерококками

задерживает заживление в среднем на 40%.

За счет внебюджетных средств в ИТЭБ РАН было проведено оснащение автономного рабочего помещения оборудованием и расходными материалами, обеспечивающими необходимое качество и безопасность работ, проводимых с использованием сапрофитной, условно-патогенной и патогенной микрофлоры. Денежные средства на приобретение данного оборудования и расходных материалов в количестве одного миллиона девятисот тысяч рублей предоставила организация ООО «Диал-Трейдинг», заинтересованная в последующем внедрении результатов исследований, проводимых по настоящему контракту.

Таким образом, в ходе выполнения проекта было осуществлено обеспечение биомедицинских исполнителей действующим макетом генератора низкотемпературной аргоновой плазмы, разработан и апробирован комплекс медико-биологических моделей для оценки воздействия *in vitro* и *in vivo* НТАП в целом и отдельных компонентов плазменного облучения (УФ- и ИК- излучения, продуктов взаимодействия плазменного луча с окружающим воздухом и биологическим объектом) по бактерицидной активности в отношении различных видов колонизирующих раневую поверхность микроорганизмов, по иммунному ответу периферической крови человека, по функциональной и пролиферативной активности культивируемых клеток тканей животных и человека, по течению заживления ожоговых и резаных ран у животных. Разработанный комплекс биомедицинских моделей для тестирования воздействия НТАП имеет признаки научной новизны, которые могут стать предметом последующего патентования.

Все задачи, поставленные на первом этапе проекта, выполнены полностью.

За счет внебюджетных средств в ИТЭБ РАН было проведено оснащение автономного рабочего помещения оборудованием и расходными материалами, обеспечивающими необходимое качество и безопасность работ, проводимых с использованием условно-патогенной и патогенной микрофлоры. Денежные средства на приобретение данного оборудования и расходных материалов в количестве одного миллиона девятисот тысяч рублей предоставила организация ООО «Диал-Трейдинг», заинтересованная в последующем внедрении результатов исследований, проводимых по настоящему ту.

## СОДЕРЖАНИЕ

### Введение

1. Анализ научно-технической литературы, нормативно-технической документации и других материалов, относящихся к разрабатываемой теме и разработка общей программы проведения исследований.

### 2. Материалы и методы

### 3. Результаты и обсуждение

3.1. Разработка технического предложения и обеспечение биомедицинских исполнителей действующей моделью генератора низкотемпературной аргоновой плазмы, содержащего систему компьютерного управления параметрами плазменной струи, контроля длительности облучения и положения излучателя и относительно раневой поверхности. Оценка и адаптация параметров плазменной струи (температура, скорость протока и ионный состав) в соответствии с медико-техническими требованиями.

3.2. Расчет состава плазмы при работе генератора, адаптация методов диагностики низкотемпературной плазменной струи при атмосферном давлении. Адаптация зондовых методов определения концентраций электронов и ионов в плазме при атмосферном давлении. Определение ионного состава и спектральных характеристик низкотемпературной аргоновой плазмы при разных режимах работы генератора.

3.3. Экспериментальный отбор антибиотикорезистентных патогенных штаммов микроорганизмов, полученных из коллекции патогенных штаммов (грамм-положительные, грамм-отрицательные, полирезистентные бактерии), для последующей оценки влияния аргоновой плазмы на жизнеспособность микроорганизмов в культуре и биопленках.

3.4. Исследование влияния параметров и режимов применения низкотемпературной аргоновой плазмы на жизнеспособность культивируемых *in vitro* патогенных микроорганизмов (грамм-положительные, грамм-отрицательные и полирезистентные бактерии).

3.5. Разработка программы и проведение медико-биологических испытаний с использованием культур клеток покровных мягких тканей и исследование функционального состояния фагоцитирующих клеток млекопитающих (кислородзависимая и кислороднезависимая бактерицидная активность, интерферонообразование) *in vitro*;

3.5.1. Исследование влияния параметров и режимов применения низкотемпературной аргоновой плазмы на жизнеспособность, пролиферативную активность культивируемых *in vitro* клеток млекопитающих.

3.5.2. Исследование влияния режимов применения низкотемпературной аргонной плазмы на параметры клеточного иммунитета: функциональное состояние фагоцитирующих клеток, включая оценку кислородзависимой бактерицидной активности, а также интерферонообразование в тестах *in vitro*.

3.6. Проведение медико-биологических испытаний при моделировании раневого процесса у животных (модельные ожоги и механические раны) с инфицированием сапрофитными или патогенными микроорганизмами. Адаптация методов оценки микробного обсеменения раневых поверхностей *in vivo* в экспериментах на животных

3.7. Работы, выполненные за счет внебюджетных средств

Заключение

Литература

Приложение В. Программа и методика биомедицинских и микробиологических испытаний

Приложение Г. Программа и методика биомедицинских испытаний

Приложение Д. Динамика заживления ожоговой раны по срокам наблюдения

Приложение Е. Гистологическое исследование динамики заживления ожоговой раны по срокам наблюдения

Приложение Ж. Гистологическое исследование динамики заживления ожоговой раны по срокам наблюдения

Приложение З. Гистология тканей селезенки при моделировании механической раны

Приложение И. Гистология тканей тимуса при моделировании механической раны.

**НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ:** При выполнении работ по данному проекту и оформлении отчета были использованы следующие нормативные документы:

ГОСТ 7.9-95 Реферат и аннотация. Общие требования. (ИСО 214-76).

ГОСТ 15.101-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Порядок выполнения научно-исследовательских работ.

ГОСТ 7.32-2001 Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения.

ГОСТ Р 15.013— 94 Система разработки и постановки продукции на производство.

Медицинские изделия.

ПРИКАЗ N 63 Минобрнауки от 22 марта 2006 г. Об утверждении методических рекомендаций, необходимых для государственного учета результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ гражданского назначения, выполняемых за счет средств федерального бюджета.

ПРИКАЗ N 312 Минобрнауки России от 22 декабря 2005 г. Об утверждении форм учетных документов для государственного учета результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ гражданского назначения, выполняемых за счет средств федерального бюджета

### **ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ**

НТАП - низкотемпературная аргоновая плазма.

УФ-излучение – ультрафиолетовое излучение

СВЧ-излучение – сверхвысокочастотное излучение

GLP - протоколы международных правил добросовестных лабораторных испытаний

СОД - супероксиддисмутаза

АФА – активные формы азота

АФК - активные формы кислорода

КБ - катионные белки

ЛК-тест - лизосомально-катионный тест

МПО - миелопероксидаза

НФ - нейтрофилы

МТТ – митохондриальный тетразолиевый тест

Клс - коэффициент лазерной стимуляции

### **ВВЕДЕНИЕ**

Основанием для проведения НИР, выполняемой в рамках федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы, является Государственный контракт от 28 июля 2008 г. № 02.512.12.2023.

На первом этапе был подготовлен промежуточный отчет по теме: «Установление технических характеристик и выбор режимов работы генератора низкотемпературной аргонной плазмы. Разработка программ микробиологических и биомедицинских испытаний, экспериментальных моделей для оценки дезинфицирующего и ранозаживляющего воздействия низкотемпературной аргонной плазмы».

Основные задачи, решаемые на первом этапе проекта по разработке способа использования низкотемпературной аргонной плазмы (НТАП) для санации незаживающих инфицированных ран и язв, состояли в установлении технических характеристик и выборе режимов работы генератора НТАП, разработке программ микробиологических и биомедицинских испытаний, создании адекватных экспериментальных моделей для последующей оценки дезинфицирующего и ранозаживляющего воздействия НТАП на уровне микроорганизмов и культивируемых клеток животных и человека *in vitro*, ключевых факторов клеточного иммунитета изолированных клеток крови человека и поврежденных тканей животных *in vivo*.

Определялся перечень нормативных документов, необходимых для последующей сертификации указанного способа использования и генератора НТАП прежде всего с целью создания проекта медико-технических требований

Выполненный нами анализ научно-технической литературы, нормативно-технической документации, а также других материалов (патентов, интернетовских обзоров и публикаций, инструкций), относящихся к разрабатываемой теме показал, что в готовом виде приемлемых решение для последующей сертификации и регистрации разрабатываемых способа и аппаратуры не существует. Сложность решения заключается в том, что НТАП является многофакторным воздействием, требующим разработки и использования множества биологических и медико-биологических моделей. Соответственно необходимо в процессе разработки, при подготовке и проведении доклинических исследований необходимо оценивать как безопасность, так и функциональную активность множества факторов на объектах разного уровня организации и разной видовой принадлежности. Ключевые действующие факторы НТАП включают воздействие электромагнитных полей и облучений, различных химических агентов. Это не только СВЧ, ультрафиолетовое (УФ) и инфракрасное (ИК) излучение, но и потоки свободных электронов, ионов, нейтральных атомов и молекул, продуктов взаимодействия плазменного луча с окружающим воздухом и образование ряда (в том числе не идентифицированных) химических соединений в результате воздействия на биологические ткани. В частности под воздействием воздушной плазмы образуется ряд свободных радикалов кислорода и азота. Поэтому нами выбрана аргонная плазма, минимальным образом активирующая образование свободных радикалов. При уничтожении микроорганизмов под влиянием НТАП неизбежным является воздействие на раневую поверхность и организм в целом продуктов распада микроорганизмов. Описанные исследования воздействия низкотемпературной плазмы, получаемой при атмосферном давлении, ограничены и касаются в первую очередь дезинфекции небиологических объектов и изучения ее разрушающего воздействия при хирургическом рассечении и коагуляции тканей. Имеются единичные данные, полученные при «интуитивно найденном» в клинике способе сканирующего «дистантного» использования низкотемпературных плазменных резаков, свидетельствующие о том, что при воздействии НТАП можно получить saniрующий, заживляющий эффект одновременно с дезинфицирующим. Соответственно, до сих пор не разработан способ, который мог бы реализовать одновременно дезинфицирующе и ранозаживляющее действие НТАП при контроле параметров плазмы и одномоментном облучении не узкого линейного участка, захватываемого «плазменным скальпелем», а достаточно поля раневой поверхности.

В связи с насущной потребностью поиска средств, эффективно обезвреживающих и способствующих заживлению острых и хронических ран и язв основной целью настоящего проекта является **создание способа и устройства, обеспечивающих применение низкотемпературной аргоновой плазмы для санации обширных инфицированных ран и язв: уничтожения микроорганизмов на раневой поверхности и ускорения процессов заживления.**

Основная идея, лежащая в основе настоящей разработки, заключается в создании широкозахватного низкотемпературного потока плазмы, однородного на относительно обширной поверхности, не повреждающего клетки и ткани животных и человека, но эффективно уничтожающего микроорганизмы, полирезистентные к действию антибиотиков и средств химической дезинфекции. Согласно предварительным данным авторов проекта и выполненному анализу экспериментального и клинического материала различных исследовательских групп такими свойствами должна обладать низкотемпературная аргоновая плазма, генерируемая СВЧ излучателем. Более того, именно параметры СВЧ плазмы можно варьировать и контролировать в широком диапазоне в зависимости от конструкции генератора.

Для достижения поставленной цели были выполнены расчеты и измерения состава плазмы при работе модели СВЧ-генератора, адаптация методов диагностики низкотемпературной плазменной струи при атмосферном давлении, зондовых методов определения концентраций электронов и ионов в плазме при атмосферном давлении, определен ионный состав и спектральных характеристик низкотемпературной аргоновой плазмы при разных режимах работы генератора. Для оценки дезинфицирующей активности НТАП на данном этапе проекта был проведен экспериментальный отбор антибиотикорезистентных патогенных штаммов микроорганизмов в культуре и биопленках, полученных из коллекции патогенных штаммов (грамм-положительные, грамм-отрицательные, полирезистентные бактерии) и из клинических изолятов, выделенных из инфицированных ран и язв. Для последующей оценки безопасности и функциональной активности НТАП на обсеменение раневых поверхностей *in vivo* были разработаны и воспроизведены в экспериментах на животных патофизиологические модели раневого процесса (ожог и механическая резанная рана), спонтанно инфицированные типичной каловой микрофлорой животных. Были выполнены модельные медико-биологических испытаний с использованием культур клеток покровных мягких тканей (первичные и перевиваемые культуры клеток животных и человека) и создана биологическая модель

«заживления раны in vitro». Проведен комплекс исследований по адаптации метода оценки физического воздействия (на примере лазерного облучения) на функциональное состояние фагоцитирующих клеток млекопитающих in vitro, включая кислородзависимую и кислороднезависимую бактерицидную активность фагоцитов, обусловленную генерацией активных форм кислорода нейтрофилами периферической крови, продукцией катионных пептидов, и образованием альфа-интерферона. Разработан протокол и проведены имитационные медико-биологических испытания при модели раневого процесса у животных (модельные ожоги и механические раны со спонтанным инфицированием сапрофитными или патогенными микроорганизмами) в соответствии с протоколами международных правил добросовестных лабораторных испытаний (GLP). Разработанное техническое предложение для способа генерации НТАП реализовано в действующем физическом устройстве и проведены первые микробиологические генератора НТАП при контроле параметров плазменной струи (температуры, скорости потока аргона, электронной плотности и мощности излучения, молекулярного состава плазменного луча, величины плавающего заряда сети) в соответствии с медико-техническими требованиями. Показано, что выбранный режим генерации плазмы НТАП эффективно уничтожает культивируемые патогенные микроорганизмы.

# **1. Анализ научно-технической литературы, нормативно-технической документации и других материалов, относящихся к разрабатываемой теме и разработка общей программы проведения исследований**

## ***Микрофлора ран и язв.***

С точки зрения микробиологии, одними из наиболее важных задач кожного покрова являются контроль микробной популяции, населяющей поверхность кожи, и защита нижележащих тканей от колонизации патогенными и условно патогенными (оппортунистическими) микроорганизмами. Нарушение целостности кожного покрова в результате раневых поражений открывает доступ к влажному, теплему и богатому питательными веществами пространству, которое является идеальным местом для размножения микроорганизмов.

Населенность и разнообразие микробных сообществ раневых поверхностей определяется как условиями первичного и вторичного заражения, так и типом раны и эффективностью иммунного ответа пациента. Раны, связанные с травматическими поражениями, контактом с загрязненными предметами, часто подвергаются первичному

инфицированию возбудителями оппортунистических инфекций, такими как *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp* и другими широко распространенными в окружающей среде микроорганизмами. В условиях, когда антимикробная терапия не начата непосредственно сразу после получения раны, эти микроорганизмы эффективно колонизируют раневую поверхность, часто образуя биопленки, что делает их значительно более устойчивыми к стандартной антимикробной терапии. Особую проблему составляют хронические раны, связанные с эндогенными механизмами, приводящими к нарушениям целостности дермальных и эпидермальных тканей, в частности, нарушения венозного и/или артериального кровоснабжения, нарушения метаболизма при диабете. Инфицирование таких ран происходит более чем в 90% случаев, а часто сопровождающие перечисленные заболевания факторы, такие как пожилой возраст, курение, нарушения питания, иммуносупрессия, ухудшают иммунный статус, сводя на нет эффект применения антибиотиков и антимикробных препаратов.

### ***Источники микробной контаминации***

Основными источниками контаминации раневых поверхностей являются:

(1) Окружающее пространство в самом широком смысле. Так, например, источниками носокомиальных (внутрибольничных) инфекций часто являются постельное белье и принадлежности, стены и пол, ванны и туалеты. Условно патогенные бактерии могут попадать на раневые поверхности с током воздуха, с предметами, послужившими источником раны, с плохо простерилизованными инструментами, повязками и бельем.

(2) Кожа. Нормальная микрофлора кожной поверхности включает микрококков, кожных дифтероидов и ряд других непатогенных или условно-патогенных бактерий, которые, попадая на открытые ткани, способны размножиться и способствовать хронизации раны. Кроме того, в кожных фолликулах обитают стафилококки, в частности *S. epidermis* и даже *S. aureus*, и стрептококки, вызывающие безобидную прищевую сыпь, но которые являются одними из наиболее серьезных возбудителей, связанных с хроническими ранами. В случае ожоговых поражений кожи, грам-положительные кокки, находящиеся в глубине кожного покрова, не погибают от температурного фактора, и в случае отсутствия сразу начатого антибактериального лечения способны с высокой плотностью колонизировать ожоговую поверхность в течение первых 48 часов.

(3) Другие эндогенные источники, такие как кишечный и верхний дыхательный тракты.

Нормальная микрофлора этих источников рано или поздно попадает на поверхность хронических ран и способствует установлению смешанных микробных сообществ.

### *Раневые микробные сообщества*

Микробные сообщества присутствуют на поверхностях хронических ран, даже если клинические признаки инфекции отсутствуют (Bowler et al., 2001). Состав микробных сообществ, образующихся на поверхности хронических ран, в подавляющем большинстве случаев является смешанным и включает грам-положительных и грам-отрицательных аэробов, микроаэрофилов и даже анаэробов (Bowler et al., 2001; Church et al., 2006). В составе сообществ есть как индивидуальные различия для разных пациентов, так и различия, определяемые типом раны (Табл. 1), однако в подавляющем большинстве случаев хронические раны заселяют стафилококки и, в частности, *S. aureus*, альфа- и бета-гемолитические стрептококки. Также часто встречаются колиформы, анаэробные *Bacteroides* spp и *Peptostreptococcus*.

Таблица 1. Состав микробиоты хронических раневых поверхностей без клинической картины инфекции

| Характеристика раневого поражения<br>(количество исследованных пациентов) | Доминирующие микроорганизмы                                                                                                     | Ссылка                 |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Трофические язвы (10)                                                     | <i>Enterococcus</i> spp, <i>Staphylococcus</i> spp,                                                                             | (Dowd et al., 2008)    |
| Ожоги (180)                                                               | <i>Enterobacter</i> spp, <i>Pseudomonas</i> spp<br><i>S. aureus</i> , <i>S. epidermis</i> , альфа-гемолитические стрептококки,  | (Brook et al., 1981)   |
| Диабетические язвы (10)                                                   | <i>Peptostreptococcus</i><br><i>Pseudomonas</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp, <i>Morganella</i> spp | (Dowd et al., 2008)    |
| Пролежни (25)                                                             | <i>P. aeruginosa</i> , <i>Bacteroides</i> spp, колиформы                                                                        | (Sapico et al., 1986)  |
| Раны различного происхождения (584)                                       | <i>S. aureus</i> , <i>Bacteroides</i> spp, <i>Peptostreptococcus</i>                                                            | (Brook et al., 1990)   |
| Язвы на ногах (58)                                                        | <i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterobacter</i> spp, <i>Peptostreptococcus</i>                            | (Hansson et al., 1995) |
| Язвы на ногах (30)                                                        | <i>S. aureus</i> , коагулазо-отрицательные стафилококки, колиформы, фекальные стрептококки                                      | (Bowler et al., 2001)  |

Клинические признаки инфекционного процесса, такие как покраснение, болезненность, отек, повышение температуры, наблюдаются в тех случаях, когда факторы патогенности одного или нескольких микроорганизмов подавляют иммунную защиту и происходит размножение и распространение микроорганизмов, сопровождающееся локальным и системным иммунным ответом. Развитие раневой инфекции включает комплексное взаимодействие целого набора факторов, определяемых как пострадавшим, так и инфицирующими агентами. Этот набор включает тип, размер, местоположение и глубину раны, степень экзогенных включений, значительность кровотечения, общее здоровье и иммунный статус пострадавшего, микробную нагрузку, комбинацию микроорганизмов, попавших на раневую поверхность, и общую токсическую нагрузку, определяемую продуцируемыми ими факторами патогенности. Большинство инфицированных ран включают смешанные популяции аэробных и анаэробных организмов, как показано в таблице 2.

Табл. 2. Состав микробиоты ран с клинической картиной инфекции

| Характеристика поражения                        | раневого (количество исследованных пациентов) | Доминирующие микроорганизмы                                                                                                                                       | Ссылка                 |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Инфицированные травматические повреждения       | (166)                                         | <i>S. aureus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Prevotella</i>                                                                                                  | (Brook et al., 1998)   |
| Инфицированные ожоги                            | (127)                                         | <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Klebsiella spp</i>                                                                                                   | (Mousa et al., 1997)   |
| Инфицированные диабетические язвы               | (252)                                         | <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Streptococcus spp</i>                                                                   | (Pathare et al., 1998) |
| Инфицированные диабетические язвы               | (130)                                         | <i>Peptostreptococcus spp</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterococcus spp</i> , <i>Peptostreptococcus spp</i>                       | (Wheat, 1986)          |
| Некротизирующие инфекции мягких тканей          | (198)                                         | <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp</i> , <i>Pseudomonas spp</i> , <i>Enterococcus spp</i> , <i>Peptostreptococcus spp</i> , <i>Bacteroides spp</i> | (Elliott et al., 1996) |
| Инфицированные ожоги (данные из 10 независимых) |                                               | <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella spp</i> , <i>Candida spp</i>                                                             | (Church et al., 2006)  |

исследований)

Острые инфекции мягких тканей включают кожные абсцессы, травмы и некротизирующие инфекции. Микробиологические исследования показали, что *S. aureus* является причиной кожных абсцессов приблизительно в 25-30% случаев, и этот же микроорганизм чаще всего выявляется в случае моноинфекций раневых поверхностей (Bowler et al., 2001; Шагинян и др., 2003). В большинстве других случаев раневые инфекции связаны с полимикробными сообществами. В разных исследованиях это показано для кожных абсцессов в 30-50 % случаев, приблизительно в 50 % травматических повреждений, приблизительно в половине некротизирующих инфекций мягких тканей.

Некротизирующие инфекции мягких тканей представляет собой группу инфекций с высокой летальностью, требующих интенсивного и длительного лечения. Развитие некротизирующих инфекций мягких тканей в подавляющем большинстве случаев связано с интенсивным размножением *S. aureus*, коагулазо-отрицательных стафилококков, *P. aeruginosa*, гемолитических стрептококков и *Clostridium perfringens* (Eliott et al., 1996). Терапия некротизирующих инфекций мягких тканей требует ранней диагностики, регулярного удаления дебриса и интенсивной антибиотикотерапии. Несмотря на применение этих подходов, смертность в случае развития некротизирующих инфекций достигает 25-30%, что является свидетельством необходимости расширения методических подходов к лечению этой группы инфекций.

Рваные раны, являющиеся следствиями укусов, являются инфицированными более чем в 70 % случаев, причем основным микроорганизмом, вызывающим инфекционные осложнения укусов также является *S. aureus* (Brook, 1987).

Инфекции рассматриваются как основное осложнение ожоговых поражений. Инфекционные осложнения являются причиной 75 % смертей от общего числа летальных исходов вследствие ожогов. Основными патогенами, связанными с ожоговыми ранами, являются *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella spp*, *Enterococcus spp* и *Candida spp* (Church et al., 2006).

Хронические раны, являющиеся следствием эндогенных нарушений, в частности диабета и варикозных изменений сосудов, подвергаются развитию инфекций в результате сбоя в работе иммунной системе, которая не справляется с контролем микрофлоры, заселяющей раневые поверхности. Основными возбудителями инфекций диабетических ран являются *S. aureus*, и колиформы (Wheat, 1986; Pathare et al., 1998). Золотистый стафилококк также является наиболее частой причиной инфекций трофических язв. Чаще всего к *S. aureus*

присоединяются ко-инфекция *Streptococcus spp*, *Enterococcus spp*, *P. aeruginos* и анаэробных *Peptostreptococcus spp*, *Bacteroides spp* (Bowler et al, 2001).

#### **Клиническое значение качественного и количественного состава раневых микробных сообществ.**

Эффект отдельных видов бактерий на течение и тяжесть раневой инфекции было широко исследовано, что позволило установить роль *S. aureus*, *P. aeruginosa* и бета-гемолитических стрептококков как наиболее важных агентов инфекции, приводящих к значительному утяжелению процесса заживления (Brook, 1998; Bowler et al., 2001; Church et al., 2006). На совместном митинге European Tissue Repair Society и European Wound Management Association в 1998 было принято общее положение о том, что выявление в хронических ранах *S. aureus*, *P. aeruginosa* и бета-гемолитических стрептококков (стрептококки группы А) является показанием для проведения антимикробной терапии. Для этих бактерий на большом числе исследованных образцов была доказана способность вызывать развитие инфекционного процесса в монокультуре. В то же время, в случае полимикробного инфицирования зачастую трудно доказать роль того или иного микроорганизма в качестве этиологического агента. Вследствие этого, диагноз инфекции в большинстве случаев ставится на основании клинических симптомов, таких как боль, покраснение, отек, лихорадочное состояние. В этом случае, микробиологическая оценка может быть полезна, но также может отчасти вводить в заблуждение, если многочисленные патогены входят в состав микробного сообщества. В случаях же, когда клинические симптомы выражены не столь явно, большее внимание при решении об адекватной терапии должно быть сосредоточено на результатах микробиологического анализа. Важное наблюдение, сделанное при анализе заживления ран в случае полимикробной инфекции, касается взаимодействия между отдельными членами сообщества. Так, значительно худшее заживление хронических инфицированных ран наблюдалось, когда микробное сообщество включало четыре и более видов микроорганизмов (Trenkove et al., 1996). Аналогично, при изучении микробного состава трофических язв, большее разнообразие микробов наблюдалось в случае язв с клиническими симптомами инфекции, чем случае «спокойных» изъязвлений.

Синергизм между отдельными видами микроорганизмов может быть обусловлен несколькими механизмами. Прежде всего, специфические нутриенты и/или сигнальные молекулы, производимые одними бактериями, могут стимулировать рост других

микроорганизмов. Характерным примером синэргизма такого рода является стимуляция *P. aeruginosa* образования биопленок другими бактериями, например, *Burkholderia cepacia* (Чернуха и др., 2004; Данилина и др., 2007). Другим важным механизмом является подавление патогенными микроорганизмами локального иммунного ответа, что стимулирует рост условно-патогенных и непатогенных микробов (Чернуха и др., 2005). Изучение экологии патогенных микроорганизмов, в том числе синергизма возбудителей смешанных инфекций является одним из основных направлений исследований ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН.

Помимо видового состава, была показана важность количественной оценки микробных раневых сообществ для прогноза развития инфекционных осложнений. Так, в 1964 г. Bendy и соавторами было показано, что заживление варикозных язв возможно только в случае, если суммарная бактериальная нагрузка не превышает  $10^6$  КОЕ/мл жидкости в ране (Bendy et al., 1964). В этом исследовании количественная оценка была проведена на основании изучения поверхностных мазков. Позже, вывод о необходимости количественной оценки для прогноза заживляемости ран был подтвержден в многочисленных исследованиях поверхностных мазков и биопсийного материала клинических образцов не только варикозных язв, но и инфицированных хирургических ран, диабетических язв, а также экспериментальных моделей инфицированных ран лабораторных животных (Robson and Heggers, 1970). На базе наблюдений, проводившихся в течение более чем трех десятилетий было сделано заключение о постановке диагноза раневой инфекции в случае, если суммарная микробная нагрузка превышает  $10^5$  КОЕ/г (Bowler et al., 2001).

#### **Клиническая роль микробных биопленок, образуемых на раневых поверхностях**

Биопленки – это ассоциации бактериальных клеток, в большинстве случаев закрепленных на биотической или абиотической поверхности и покрытых слоем полисахаридов, являющихся экзогенным продуктом самих бактерий (Романова и др. 2006). В Институте Гамалеи достаточно давно занимаются изучением механизмом формирования биопленок. Образование биопленок начинается с образования монослоя бактериальных клеток, а заканчивается формированием толстой многоклеточной структуры, хорошо защищенной от доступа химически активных молекул (рис.1).

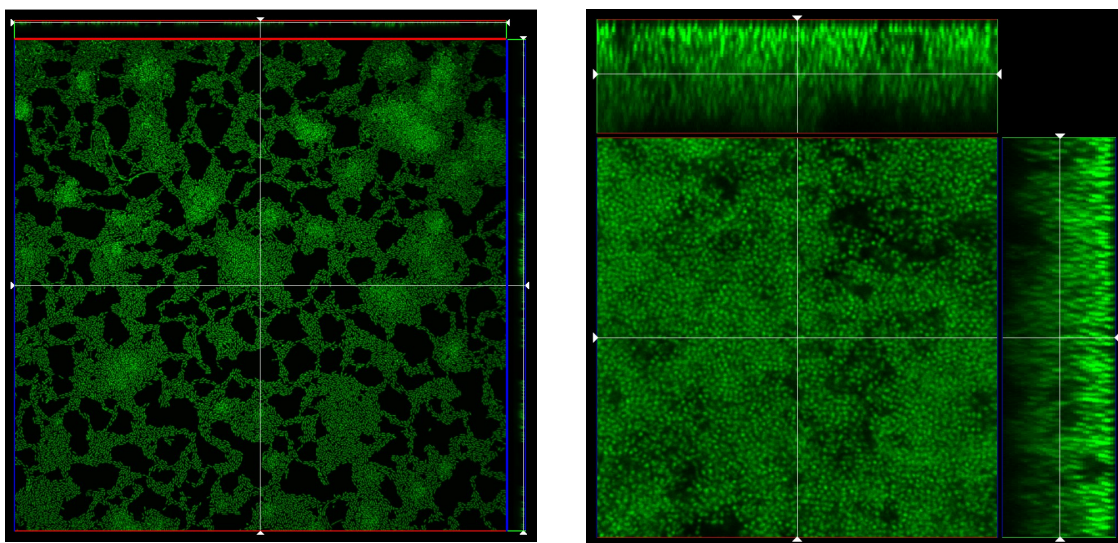


Рис. 1. Образование патогенными бактериями биопленок.

Слева – начальный этап формирования биопленки *P. aeruginosa*. Справа – сформированная биопленка *P. aeruginosa*. Бактерии окрашены акридиновым оранжевым и сняты методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Увеличение  $\times 1200$ . Каминская А.А. Пушкарева В.И., Ермолаева С.А. 2007 г.

При образовании биопленок даже антибиотикочувствительные бактерии становятся существенно более устойчивы к антибиотикотерапии. Считается, что биопленки играют основную роль в защите бактерий от иммунных свойств организма и антимикробных медицинских препаратов. В настоящее время биопленки рассматриваются как основная форма существования бактерий на раневых поверхностях, особенно в случае хронических инфицированных ран.

Davis и соавторы получили микроскопические и физиологические доказательства существования биопленок на ранах *in vivo* на свиной модели (Davis et al., 2008). Исследователи брали образцы с определенной глубины раны у свиней и изучали их с помощью световой, сканирующей электронной и эпифлюоресцентной микроскопии. Они обнаружили, что *S. aureus* образуют микроколонии, упакованные в экзополисахаридный матрикс, т.е. биопленки. Часть пробы из ран помещалась *in vitro*, где биопленки наблюдались уже через 48 часов. После взятия образца, раны обрабатывали антибиотиками. Антибиотики также добавлялись к планктонным и биопленочным популяциям *S. aureus* *in vitro*. При сравнении устойчивости *S. aureus* к антибиотикам во всех вариантах эксперимента выявилось увеличение резистентности бактерий в биопленке, в сравнении с планктонными стафилококками и, таким образом, подтвердилась гипотеза, что бактериальные биопленки играют роль раневой колонизации и хронической инфекции.

Для понимания механизмов развития раневой инфекции проводили эксперименты, в которых показали, что естественными медиаторами адгезии бактерий на раны являются

ранева жидкость, сыворотка, которые ослабляли прикрепление бактерий на ранах. Фибронектин не влиял на адгезию бактерий (Mertz et al., 1987).

Было показано, что культура *P. aeruginosa*, выделенная из ожоговых ран пациентов *in vitro*, формировала раннюю биопленку через 5 часов, а зрелая биопленка обнаруживалась уже через 10 часов (Harrison-Balestra et al., 2003). Авторы предполагают, что такой быстрый рост биопленок *P.aeruginosa* в ранах происходит в начале инфекционного процесса и биопленка - как ширма, защищает бактерии от воздействия иммунных клеток организма и антибиотиков. Поэтому защищать (обрабатывать) раны необходимо как можно быстрее, т.е. как только они возникают. Для изучения последовательного развития биопленок авторы применяли модифицированный метод окраски Конго красным, который, как отмечают авторы, замедляет и прерывает формирование биопленок *P.aeruginosa*, что можно использовать в дальнейших исследованиях.

Очень большое количество литературных источников посвящено методам лечения хронических ран. Хорошо известно, что именно биопленки увеличивают резистентность к любым антимикробным препаратам. Обсуждаются новые и не традиционные методы воздействия (разрушения) биопленок. Однако универсального метода борьбы с биопленками не существует.

Так, при исследовании влияния серебросодержащих перевязочных материалов на биопленочный популяции *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *Enterobacter cloacae*, и их биопленочные сообщества, пришли к выводу, что не всегда эти вещества демонстрируют хорошую ингибирующую активность к биопленкам.

Экскретируемые и секретируемые вещества личинки *Lucilia sericata* успешно используются для лечения хронических ран. Однако, клинический анализ влияния этих веществ на биопленки *P.aeruginosa*, *S.aureus* показал, что планктонные бактерии и бактерии в биопленках обладают различной чувствительностью к этому препарату (Plus et al., 2008).

В статьях существенная роль отводится модификациям уже традиционных методик. Такая тенденция связана с тем, что стандартные методы не отображают реальное видовое, количественное соотношение микроорганизмов в ранах, а также не отображают истинную чувствительность биопленок к антимикробным препаратам.

Clutterbuck и соавторы подбирали подходящий метод для тестирования антибиотической чувствительности бактериальных биопленок 28 клинических изолятов, выделенных из ран (*P.aeruginosa*, *S.aureus*, *Propteus mirabilis*, *Acinetobacter junii*). Исследователи показали, что традиционный метод определения чувствительности биопленок

к антибиотикам (диски с антибиотиками) не отображает реальную картину – он показывает большую зону чувствительности, чем есть на самом деле, что может привести к не правильному результату в лечении.

### **Методы оценки микробной нагрузки и видового состава раневых микробных сообществ.**

Для оценки микробной нагрузки предлагалось использовать разные методы. Наиболее точным в количественном отношении, по-видимому, является взятие биопсийного материала, включающего нижележащие ткани. Альтернативой этому методу является взятие поверхностных образцов с помощью ватных тампонов. Ряд авторов приводили аргументы в пользу биопсии как основного метода, позволяющего количественно и качественно выявить инфекционного агента. Следует, однако, иметь в виду, что инфицирование раневых поверхностей, в том числе связанное с эндогенной микрофлорой, происходит извне. В результате, внешняя поверхность раны несет разнообразное сообщество микроорганизмов, один или несколько из которых могут проникнуть вглубь лежащих тканей. Таким образом, анализ собранных с раневой поверхности образцов позволяет оценить микробное сообщество в целом, что позволяет осуществлять более объективный анализ ситуации (Bowler et al., 2001). Ряд исследований подтверждают наличие корреляции в количественном и качественном отношении между образцами, взятыми с поверхности и биопсийным материалом. Так, Levine и соавторы наблюдали тесную корреляцию между количествами оценками высевов поверхностных мазков и биопсией, полученными от пациентов с ожогами (Levine et al., 1976). Аналогично, Armstrong и соавторы не наблюдали различий в количественном и качественном составе микроорганизмов, полученных при сборе поверхностного материала и биопсии у 112 пациентов с диабетическими изъязвлениями (Armstrong et al., 1995). На модели экспериментальных ран у крыс, Bornside и Bornside продемонстрировали, что концентрация  $10^5$  КОЕ/г в образцах ткани соответствует приблизительно  $10^3$  КОЕ/мл, высеянных из образцов, взятых смоченным тампоном, и сделали вывод о том, что взятие поверхностных образцов представляет собой надежную альтернативу трудоемкому и болезненному для пациента взятию биопсийного материала (Bornside and Bornside, 1979). Для образцов, взятых у ожоговых больных, Thomson продемонстрировал корреляцию между полуколичественным методом оценки поверхностных образцов (от 1+ до 4+) и полностью количественной оценкой: рост, оцениваемый как 1+, соответствовал от  $10^2$  до  $10^3$  КОЕ/г ткани, а рост 4+ соответствовал

приблизительно  $10^7$  КОЕ/г биопсийного материала (Thompson and Smith, 1994). Также, было показано, что выявление единичных микроорганизмов в окрашенных по Грамму отпечатках соответствует микробной нагрузке  $10^6$  КОЕ/г биопсийного материала (Levine et al., 1976).

В настоящее время на смену число бактериологическим методам стали все более активно приходить современные молекулярно-генетические методы. Так, [Kirketerp-Møller K](#) и соавторы собрали и исследовали образцы из ран от 22 различных пациентов ([Kirketerp-Møller K et al., 2008](#)). Исследуя образцы стандартными культуральными методами и PNA FISH они получили следующие результаты: культуральным методом во всех ранах обнаруживался *S. aureus*, в то время как *P. aeruginosa* обнаруживалась не всегда. Используя метод PNA FISH авторы обнаруживали большое содержание *P. aeruginosa*. Таким образом был сделан вывод об отсутствии корреляции результатов по количеству *P. aeruginosa*, при использовании этих двух методов и ставится вопрос о новой более точной диагностике *P. aeruginosa* в хронических ранах. Кроме того, методом PNA FISH изучили организационную структуру бактерий в ранах и пришли к выводу, что в ранах они находятся в виде биопленок.

Dowd и соавторы для определения бактериальных популяций биопленок в 3-х различных типах ран использовали молекулярно-генетические методы пиросиквенс, Sanger sequencing, электрофорез в денатурированном градиентном геле и сравнивали их с стандартными культуральными методами. Сравнение методов выявило количественную и видовую разницу в 2-х типах ран из трех, что наводит также на мысль о необходимости модификации уже существующих стандартных культуральных методов (Dowd et al., 2008).

#### **Антибиотикотерапия и другие способы терапии инфицированных ран**

На сегодняшний день основным способом терапии и профилактики раневых инфекций является антибиотикотерапия. Поскольку проведение анализа антибиотикочувствительности требует достаточно продолжительного времени, в случае необходимости немедленного начала антибиотикотерапии, а также при профилактике раневых инфекций в случае травматических повреждений, связанных с контаминацией раневой поверхности, попадании в рану чужеродных предметов и т.д. рекомендуется назначение антибиотиков широкого спектра. Весьма эффективным показало себя комбинирование аминогликозидов (например, гентамицина) или цефалоспоринов (например, цефотаксима или цефуроксима) с препаратами, активными в отношении анаэробных микроорганизмов (например, метронидазолом). Высокую эффективность для предотвращения развития инфекции имеют поверхностные антибактериальные мази и кремы. Эффективным средством предотвращения развития синегнойной инфекции,

вызываемой *P. aeruginosa*, является 0,5% раствор нитрата серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) (Robson и Hegggers, 1970). Ингибирующий эффект осуществляется за счет взаимодействия ионов серебра с тиоловыми группами ферментов бактериальной дыхательной цепи. Также отмечалось взаимодействие серебра с некоторыми структурными белками и с нуклеотидными основаниями ДНК, что предотвращает ее репликацию. По этой последней причине применение серебро-содержащих препаратов может быть токсично для кератиноцитов и фибробластов и, в некоторых случаях, отрицательно влиять на заживление раны. Наиболее широко используемым в настоящее время поверхностным антибактериальным средством является сульфадиазин серебра, который является комбинацией нитрата серебра и натриевой соли сульфадиазина (Trengove et al., 1996). Ионы серебра связывается с ДНК микроба, освобождая тем самым сульфадиазин, который взаимодействует с метаболизмом микроорганизма. Сульфадиазин серебра эффективен для контроля развития инфекции *P. aeruginosa* и других грам-отрицательных бактерий, а также грибов рода *Candida*. Однако этот препарат мало эффективен против грам-положительных патогенных бактерий, включая *S. aureus*. Также неэффективен против *S. aureus* противобактериальная мазь на основе ацетата мафенида (Phillips and Davey, 1997). Показано, однако, что поверхностные препараты эффективны преимущественно для профилактики инфекций. В то время как инфекции хронических ран с трудом поддается антибиотикотерапии. Во многом это связано с образованием патогенными бактериями биопленок на раневой поверхности.

Особые трудности при антибиотикотерапии инфицированных ран создает широкое распространение антибиотикорезистентности среди основных возбудителей раневых инфекций, *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Большинство штаммов *P. aeruginosa* характеризуются множественной антибиотикоустойчивостью, в том числе к часто используемым аминогликозидам широкого спектра действия, таким как гентамицин и амикацин, а в последнее время отмечается устойчивой рост числа клинических изолятов, устойчивых к кинолонам, таким как ципрофлоксацин, которые являлись основными антибиотиками при лечении инфекций, вызываемых псевдомонадами (Таблица 3). Особенно высокий процент антибиотикоустойчивых штаммов наблюдается в развитых странах, где число изолятов, устойчивых к перечисленным лекарствам, достигает 50%. Среди изолятов, выделенных в развивающихся странах, число антибиотикоустойчивых несколько ниже. В нашей стране распространение антибиотикоустойчивых псевдомонад находится на уровне 20-45 % (Шагинян и др, 2003).

Другим важнейшим возбудителем инфекций мягких тканей является *S. aureus*. Это широко распространенная бактерия, передающаяся контактным путем от бессимптомных носителей. Широко распространено носительство стафилококка на кожных покровах, поэтому при раневых поражениях стафилококк оказывается одним из первых контаминантов открытых ран. Среди штаммов *S. aureus* в последние годы получили широкое распространение так называемые метициллин-резистентные (MRSA), также характеризующиеся повышенной устойчивостью к основным антибиотикам, используемым в лечении послеожоговых и посттравматических инфекций (табл. 3). Кроме того, распространяются штаммы, устойчивые к макролидам, так называемые MLSB стафилококки, и начали встречаться изоляты, устойчивые к ванкомицину, являющемуся практически единственным препаратом при лечении инфекций, вызванных метициллин-устойчивыми стафилококками (MRSA) (Шагинян и Дмитренко, 2003; Дмитренко и др., 2004). Повышенной устойчивостью к антибиотикам характеризуются бактерии, находящиеся в составе биопленок. О ведущей роли биопленок в развитии хронических инфекций говорилось выше.

Таким образом, лечение инфекций раневых поверхностей, особенно хронических ран, связанных с размножением антибиотикоустойчивых псевдомонад и стафилококков, настоятельно требует развития новых подходов.

Таблица 3. Антибиотикорезистентность среди клинических штаммов *P. aeruginosa* и *S. aureus*

| Возбудитель           | Антибиотик     | % устойчивых штаммов<br>среди клинических<br>изолятов |
|-----------------------|----------------|-------------------------------------------------------|
| <i>P. aeruginosa</i>  | гентамицин     | 28 % - 51%                                            |
|                       | амикацин       | 11 % - 40 %                                           |
|                       | ципрофлоксацин | 12 % - 45 %                                           |
|                       | β-лактамы      |                                                       |
| <i>S. aureus</i> MRSA | цефалоспорины  | до 40 %                                               |
|                       | карбапенемы    |                                                       |
| <i>S. aureus</i> MLSB | макролиды      | 2 % -5 %                                              |

|                       |            |                            |
|-----------------------|------------|----------------------------|
| <i>S. aureus</i> VRSA | ванкомицин | в настоящее время<br>редко |
|-----------------------|------------|----------------------------|

Среди бактерий рода *Pseudomonas* *P.aeruginosa* является наиболее значимым патогеном, вызывающим заболевания у человека (Bowler P.G., et al, 2001). Это связано с многообразием клинического течения инфекции, а также с высокой заболеваемостью и смертностью. Спектр заболеваний, вызываемых этим агентом, простирается от поверхностной кожной инфекции до сепсиса (Данилина Г.А. и др., 2007; Шагинян И.А., Дмитренко О.А., 2003).

Бактеремия и септический шок, причиной которых является синегнойная палочка продолжают оставаться большой проблемой у госпитализированных больных с онкологическими заболеваниями, сердечно-лёгочными болезнями, почечной недостаточностью или диабетом. Смертность у онкологических больных колеблется от 5% до 50% у больных с полимикробной бактеремией при обнаружении *P.aeruginosa* среди прочих возбудителей (Шагинян И.А., Дмитренко О.А., 2003). *P.aeruginosa* является ведущей причиной нозокомиальных инфекций дыхательного тракта. Пациенты, находящиеся на искусственной вентиляции лёгких в 20 раз чаще инфицированы *P.aeruginosa*. У таких больных смертность при синегнойной инфекции составляет 40-50% (Bowler P.G., et al, 2001). Синегнойная палочка также вызывает нозокомиальные инфекции мочеполового тракта, раневые инфекции и перитониты у пациентов, находящихся на амбулаторном перитонеальном диализе.

Бактерии *P.aeruginosa* с необычным мукоидным фенотипом вызывают хронические инфекции у 70-80% больных кистозным фиброзом (КФ) (Шагинян И.А., Дмитренко О.А., 2003). Получив однажды этот возбудитель, больные редко избавляются от него. Бактеремия при синегнойной инфекции у больных КФ наблюдается редко, возможно благодаря высокому уровню циркулирующих антител к различным факторам вирулентности.

Первоначальная классификация рода *Pseudomonas*, состоящего из пяти соответствующих rRNA групп, подверглась радикальному пересмотру, закончившемуся изменением классификации многих видов рода *Pseudomonas* и объединением в отдельные роды. Эти роды включают *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Comamonas*, *Shewanella*, *Ralstonia*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Acidovorax* и *Brevundimonas* (Шагинян И.А. и др., 2003). Род *Pseudomonas* (sensu stricto) включает соответствующую rRNA группу 1 и объединяет 11 видов: *Pseudomonas aeruginosa*, *P.fluorescens*, *P.putida*, *P.veronii*, *P.monteilii*, *P.stutzeri*, *P.mendocina*, *P.pseudoalcaligenes*, *P. alcaligenes*, *P. luteola*, *P. oryzae*. Псевдомонады являются аэробными неспорообразующими грамотрицательными палочками, которые могут

быть прямыми или слегка изогнутыми (Шагинян И.А., Дмитренко О.А., 2003). Они составляют от 1,5 до 5 мкм в длину и от 0,5 до 1,0 мкм в ширину и обладают строгим дыхательным метаболизмом с использованием кислорода как конечного акцептора электронов. Некоторые изоляты могут расти в анаэробных условиях с использованием нитратов или аргинина в качестве конечных акцепторов электронов. Псевдомонады подвижны благодаря присутствию одной или более полярных флагелл. Клинические изоляты являются оксидазоположительными (за исключением *P.luteola*, *P.oryzihabitans*) и каталазоположительными, а также растут на агаре МакКонки как лактозонегативные колонии. Большинство видов разлагают глюкозу окислением и переводят нитраты в нитриты или в азотистый газ. Отдельные виды имеют характерную морфологию колоний или пигментацию. Что касается источников питания, то псевдомонады – универсалы, различные виды псевдомонад способны утилизировать различные простые и сложные углеводы, спирты и аминокислоты, как источники углерода. Определённые виды могут делиться при 4°C, но большинство являются мезофильными с оптимальной температурой выращивания между 30 -37° С.

Псевдомонады имеют такую же морфологию, как и другие грамотрицательные бактерии, поэтому их необходимо отличать от других неферментирующих глюкозу грамотрицательных палочек. Описано несколько методов ПЦР для прямого определения *P.aeruginosa* в клинических образцах, особенно от больных КФ. Из-за быстрого роста и лёгкости фенотипической идентификации бактерий *P.aeruginosa*, а также необходимости проводить определение чувствительности к антибактериальным препаратам клинически значимых образцов, молекулярные методы для выявления *P.aeruginosa* в настоящее время применяют для идентификации штаммов, у которых отсутствует продукция пигмента. Серологическая диагностика псевдомонадных инфекций не используется в клинической практике.

С целью выделения *P.aeruginosa* из образцов, содержащих смешанную флору, используются селективные среды. Агар МакКонки – наиболее часто используемая селективная среда для выделения большинства псевдомонад, включая мукоидные штаммы *P.aeruginosa* от больных кистозным фиброзом. Селективные среды, содержащие селективные агенты такие как цетримид, ацетамид, нитрофурантоин и 9-хлор-9-[4-(диэтиламино) фенил]-9, 10- дигидро-10-фенилакридин гидрохлорид (С390) также могут быть использованы для изоляции *P.aeruginosa* из клинических образцов и образцов окружающей среды (Шагинян И.А., Дмитренко О.А., 2003).

По морфологическим признакам псевдомонады разделяют на две группы флуоресцентную и нефлуоресцентную. Члены флуоресцентной группы псевдомонад продуцируют пиовердин, водорастворимый жёлто-зелёный или жёлто-коричневый пигмент, который флуоресцирует под короткими ультрафиолетовыми волнами. Большинство изолятов *P.aeruginosa* легко распознаются на первичной изоляционной питательной среде на основе морфологических характеристик колоний, продукции диффундирующего пигмента, а также характерного запаха культуры (Шагинян И.А., Дмитренко О.А., 2003). Однако, если выделяется штамм, не продуцирующий пигмент, необходимо проследить основные биохимические характеристики, включая рост при 42°, гидролиз ацетамида, редукцию нитратов с образованием нитрогенного газа, а также дополнительные характеристики, включающие резистентность к комбинации C390 и фенантролина, присутствие гена экзотоксина А ( у 95% штаммов ) и наличие жирной кислоты C<sub>19</sub> : 0 cyc11-12 .

Многие лаборатории используют коммерческие тест-системы для идентификации псевдомонад. Общепринятые методы типирования, такие как серотипирование, типирование с помощью определения профиля антибиотикочувствительности, фаготипирование, бактерицин-типирование, и, наконец, биотипирование практически не применяются в связи с появлением генотипирования (Чернуха М.Ю. и др., 2004, 2005).

### **Устойчивость к антимикробным препаратам.**

Известно, что действие антимикробных препаратов может блокироваться вследствие следующих процессов: ферментативной инактивации препарата, образования альтернативных метаболических путей, нарушения проницаемости внешних структур микробной клетки, изменения мишени действия. Любой из этих механизмов устойчивости детерминируется генами, во многих случаях локализованными на конъюгативных R-плазмидах, реже, трансдуцирующих бактериофагах, и способных как к внутривидовому, так и к межвидовому обмену среди циркулирующих в стационарах штаммов.

Еще один механизм устойчивости, который становится все более важным, включает мембранные системы активного выведения (эффлюкса), которые транспортируют токсические для микроорганизма продукты, в том числе и антибиотики из микробной клетки (Романова Ю.М. и др., 2006).

Большинство антимикробных препаратов, как природных, так и синтетических, могут являться субстратами для систем эффлюкса (фторхинолоны, хлорамфеникол, тетрациклины,

$\beta$ -лактамы, аминогликозиды, а также некоторые антисептики, например хлоргексидин).

Также к настоящему времени описано большое число транспортных белков, включенных в системы активного выброса из клетки широкого круга антимикробных препаратов, и, таким образом, обеспечивающих множественную резистентность (МР) (Bendy R.H. et al, 1964).

Среди штаммов *P.aeruginosa*, выделенных в клиниках часто выявляются культуры, характеризующиеся множественной устойчивостью к антибиотикам. У *P. aeruginosa* в настоящее время выявлены 4 системы эффлюкса и установлено, что основной причиной приобретения повышенной устойчивости к структурно не родственными антибиотикам являются мутации, ведущие к избыточной экспрессии белков этих систем эффлюкса (Bornside G.H., Bornside B.B. 1979; Романова Ю.М., 2006).

В дополнение четырем системам эффлюкса большой геном *P. aeruginosa* возможно кодирует ряд дополнительных систем эффлюкса, которые обладают значительной гомологией с уже известными экспортерами.

В настоящее время осуществляется международный контроль изменения антибиотикочувствительности бактерий *P.aeruginosa* (Дмитренко О.А., и др., 2005; Шагинян И.А., Дмитренко О.А, 2007). Бактерии *P.aeruginosa* были всегда резистентны к пенициллинам, ампициллину, амоксициллин-клавулановой кислоте, ампициллин-сульбактаму, тетрациклинам, макролидам, рифампицину, хлорамфениколу, триметаприм-сульфаметаксозолу, цефалоспорином узкого и широкого спектра, оральным цефалоспорином широкого спектра (цефиксиму и цефподоксиму) (Шагинян И.А., Дмитренко О.А, 2007; Armstrong D.G.,1995).

#### **Анализ иммунного ответа как методическая основа оценки применимости низкотемпературной аргоновой плазмы для дезинфекции хронических язв *in vivo*.**

В структуре первичной обращаемости к общему хирургу частота гнойных ран достигает 70%. По нашим данным сохраняется неуклонный рост гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей (В.К. Гостищев). Сохраняется также высокая частота послеоперационных гнойных осложнений, нередко сводящих на нет труд хирургов, анестезиологов и реаниматологов. Нагноение ран может осложняться остеомиелитом, сепсисом, тромбоэмболиями и другими тяжелыми заболеваниями и синдромами. Общая частота хирургической раневой инфекции, приводящей к увеличению сроков госпитализации, общей заболеваемости и смертности колеблется между 10 и 20%.

Немаловажно и финансовое значение проблемы лечения инфицированных ран. Так, анализ случаев лечения хирургической раневой инфекции в отделениях головы и шеи демонстрирует увеличение средних сроков госпитализации с 14 до 24 (!) суток по сравнению с неосложненным течением раневого процесса. В США при инфицировании ран затраты на каждого пациента увеличиваются в среднем на 3937 долларов США.

В проблеме профилактики и лечения инфекции мягких тканей - гнойных ран, трофических язв, пролежней до настоящего времени остается много нерешенных вопросов. Внедрение в практику новых групп антибиотиков, современных физических и химических средств воздействия на раневой процесс (ультразвуковое, УФО и др.) не привело к эффективному и радикальному лечению таких больных. Во многих случаях эти методы, даже в комплексной терапии, оказываются недостаточными и заболевание принимает затяжной характер, часто рецидивирует и нередко приводит к тяжелым осложнениям и последствиям.

В настоящее время во всем мире наблюдается резкое возрастание нозокомиальных инфекций, обусловленных распространением полирезистентных к антибактериальным препаратам штаммов возбудителей, среди которых послеоперационная раневая хирургическая инфекция составляет более 25% . В целом по России ежегодное количество инфекционных раневых осложнений составляет не менее 2 млн.

Все это обуславливает необходимость изучения раневой постоперационной инфекции и гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей с позиций различных специальностей – хирургии, клинической микробиологии, клинической фармакологии, эпидемиологии.

Исследование “Разработка способа применения низкотемпературной аргоновой плазмы для санации инфицированных ран и незаживающих язв различного генеза”, в котором планируется проведение широкого и углубленного изучения влияния низкотемпературной аргоновой плазмы на заживление гнойных ран без сомнения представляется актуальной проблемой.

Таким образом, проблема лечения гнойных ран, в частности, с применением новых немедикаментозных факторов воздействия, обладающих антибактериальным эффектом – одно из приоритетных направлений физического раздела медицины

### **Состояние иммунитета при незаживающих язвах**

При обследовании больных с трофическими язвами на фоне варикозной болезни

нижних конечностей в возрасте от 45 до 50 лет, с площадью трофических язв от 2 до 80 см<sup>2</sup>, и длительностью существования язвы — от 2 месяцев до 12 лет были выявлены выраженные нарушения в системе иммунитета.

Для обобщенной характеристики функциональная активность нейтрофильных (ФАН) гранулоцитов и моноцитов периферической крови обычно используется так называемый НСТ-тест, суть которого заключается в неферментативном и ферментативном восстановлении нитросинего тетразолия (НСТ) до формазана, легко выявляемого как спектрофотометрически при проведении теста в растворе, так и цитофотометрически при проведении реакции на иммобилизованных клетках. Неферментативное образование формазана обусловлено, как правило, протеканием свободно-радикальных процессов: формазан является в этом случае продуктом реакции одноэлектронного переноса восстановительных эквивалентов от любых активных форм кислорода и азота, включая одноэлектронные утечки в системе микросомального и митохондриального переноса электронов на кислород. Поскольку для нейтрофилов и моноцитов периферической крови при формировании иммунного ответа характерно наличие специальной системы ферментативной генерации свободных радикалов, выполняющих роль поражающего фактора в отношении бактерий, вирусов, чужеродных и патологически измененных клеток, постольку НСТ-тест позволяет в полной мере оценить эту (одну из ведущих) защитную функцию клеток крови. Ферментативное образование окрашенного формазана связано с активностью флавин-зависимых и цитохром-зависимых оксидо-редуктаз, в частности различных дегидрогеназ независимо от их локализации в цитозоле или клеточных органеллах.

Для больных с трофическими язвами характерно развитие вторичной иммунной недостаточности (Г.В. Буренко и др., 2007). При исследовании биоцидности нейтрофильных лейкоцитов у пациентов с хронической венозной недостаточностью нижних конечностей, (возраст 35 - 74 года), средней площадью язвенного дефекта - 2240 мм<sup>2</sup> и длительностью язв от 2 мес до 10 мес были выявлены нарушения состояния системы фагоцитоза. Показатели лизосомально-катионного теста (ЛК-теста) исходно в капиллярной крови из нижней конечности и особенно в раневом экссудате — оказались достоверно снижены, что свидетельствуют о повышенной дегрануляции нейтрофильных лейкоцитов с высвобождением лизосомальных ферментов (лактоферрин, эластаза и др.) в капиллярах пораженной нижней конечности при хронической венозной гипертензии. Обнаруженные крайне низкие показатели ЛК-теста в раневом экссудате могут свидетельствовать об

истощении фагоцитарной активности нейтрофилов вследствие высокого уровня реализации процессов неспецифической резистентности при выраженной бактериальной обсемененности трофической язвы (Ю.М.Стойко и др. 2001). Также выражена вторичная иммунная недостаточность у больных с трофическими язвами при сахарном диабете. Так, при исследовании состояния иммунитета у 130 больных сахарным диабетом 2-го типа, осложненным гнойно-некротическими поражениями нижних конечностей, были выявлены подавление многих иммунологических показателей, выраженные гипо- и дисглобулинемия (Газин И. К. 2008). Исследование иммунного статуса у хирургических больных с развитием постоперационных гнойных осложнений выявило у них наличие комбинированных иммунных нарушений с дисбалансом и недостаточностью в системе Т-звена иммунитета, параметров гуморального иммунитета, состояния системы цитокинов (Бунатян К.А, 2007)

Как известно, иммунная система человека одна из наиболее сложно организованных многоуровневых структур, имеющая свой уникальный язык передачи информации внутри и вне системы (цитокины, хемокины, рецепторы к ним и многим другим биологически активным веществам и т.д.). Иммунная система должна быстро, постоянно и эффективно реагировать на многочисленные экзогенные и эндогенные агенты, сигналы и своим ответом обеспечивать постоянство внутренней среды организма, освобождая его от всего чужеродного и аномального. Она функционирует в тесной связи с нервной, эндокринной и вегетативной нервной системами (имеет рецепторы практически ко всем биологически активным медиаторам, гормонам, нейромедиаторам), с эндотелиальными клетками сосудов, дендритными клетками глии и легочной ткани и т.д.). Возрастание прессинга неблагоприятных факторов внешней среды, включая социальные, накопление в популяции точечных мутаций, приводящих к ослаблению тех или иных функций ферментов, клеточных структур (рецепторов) и других факторов, имеющих отношение к функционированию иммунной системы, приводят к значительному возрастанию числа лиц с вторичной патологией иммунитета.

Вторичный иммунодефицит (ВИД) чаще проявляется нарушением противоинфекционной защиты, несколько реже – другими видами иммунопатологии. ВИД лежит в основе возникновения и хронизации многих инфекционно-воспалительных заболеваний. Как уже упоминалось, серьезной проблемой здравоохранения являются хронические язвы конечностей, которые отличаются персистирующим течением и длительно не заживают. Вследствие нарушения венозного кровообращения чаще всего (75-80%) возникают язвы нижних конечностей, также язвы могут образоваться и вследствие

артериальной недостаточности. Непосредственными причинами образования хронических язв могут быть облитерирующие заболевания артерий конечностей, фосфолипидный синдром, аутоиммунные васкулиты, неврологические заболевания, ассоциированные с различными видами иммунопатологии. Хронизация язвенного процесса, распространенность и глубина язв зависит также от характера инфицирования. Как правило, выявляют полимикробную флору, которая определяет торпидность течения болезни. Присоединение грибковой флоры, в том числе актиномикотической группы приводит к выраженному утяжелению течения и ухудшению прогноза. Течение инфекционного процесса в язвах, смена возбудителей, наличие микс-инфекции, полирезистентность флоры к антибиотикам, а также процессы репарации во многом зависят от состояния иммунной системы. Помимо элиминации патогенов иммунная система должна блокировать и токсины микроорганизмов. Таким образом, состояние иммунной системы является важнейшим фактором, определяющим прогноз болезни. При поиске и изучении новых методов терапии хронических язв чрезвычайно важно оценить влияние этих методов на состояние иммунного статуса. Кроме того, иммунологические исследования в динамике терапии могут выявить новые маркеры прогноза заболевания и мониторингирования эффективности лечения язв.

Иммунологическими маркерами состояния местной и общей иммунной защиты у больных с незаживающими язвами различной этиологии могут служить нейтрофилы/моноциты периферической крови, их способность к осуществлению адекватной кислородзависимой и кислороднезависимой бактерицидности, продукции интерферона альфа и ряда других цитокинов.

### **Общая характеристика нейтрофилов.**

Нейтрофилы (НФ) традиционно относятся к фагоцитирующим клеткам, которые благодаря ряду уникальных свойств (высокой подвижности, способности легко передвигаться в тканях, наличию мощных бактерицидных и цитотоксических продуктов) рассматриваются как высокопрофессиональные «убийцы», составляющие своеобразный «отряд быстрого реагирования» в системе противoinфекционной защиты организма [Долгушин И.И., 2001].

Известно, что 93 - 96% всех лейкоцитов составляют нейтрофилы, содержание которых в крови составляет примерно 4150 в 1 мкл. В организме нейтрофилы находятся в костном мозге ( $8.8 \cdot 10^9$  кл/кг), в крови (циркулирующий пул –  $0.3 \cdot 10^9$  кл/кг), маргинальный пул (прикрепленный к эндотелию сосудов) –  $0.4 \cdot 10^9$  кл/кг, скорость обновления клеток в крови

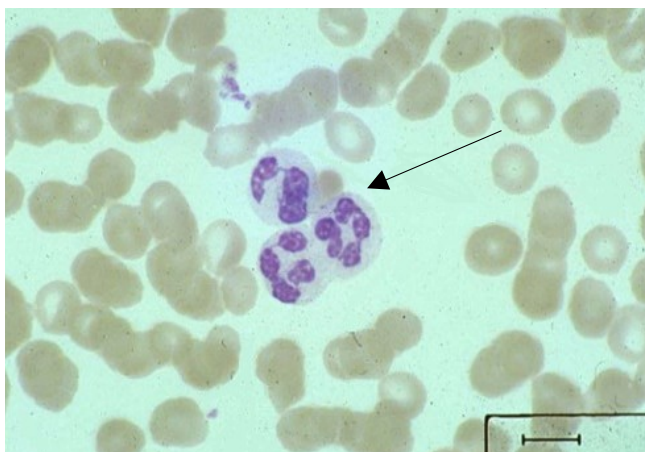
составляет  $1.6 \cdot 10^9$  кл/кг в день или 7 млн/мин. По сравнению с моноцитами и макрофагами, которые могут сохраняться месяцы или даже годы, нейтрофилы - короткоживущие (2-3 суток) клетки [Дамбаева С.В., 2000].

НФ имеет сегментированное ядро. Клетка содержит азурофильные, специфические гранулы и микрогранулы.

Таблица 4.Содержание гранул нейтрофилов.

| Гранулы       | Содержимое                                                                                     |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Азурофильные  | миелопероксидаза, лизоцим, эластазу, катепсин G, B, C, глюкуронидазу                           |
| Специфические | лизоцим, коллагеназу, лактоферин, В <sub>12</sub> -связывающий белок, адгезивные гликопротеины |
| микрогранулы  | миелопероксидаза, эластазу, катепсин, щелочную фосфатазу и др.                                 |

Рисунок 2. Нейтрофилы



Нейтрофилы созревают в костном мозге в течении 6-11 дней, после чего выходят в кровяное русло, где передвигаются током крови и дозревают около 10 часов. Зрелые нейтрофилы выходят в ткань, где движутся от 24 до 48 часов. При инфекции кинетика этих процессов ускоряется [Реро Н., 1987].

Различают 3 состояния существования нейтрофилов:

1. Клетки костномозгового резерва. Такие клетки отличаются меньшей адгезивностью и хемотропностью на действие активатора.
2. Клетки пассивно циркулирующие в кровяном русле.
3. Клетки прикрепленные к слою клеток, выстилающих внутреннюю поверхность кровяных и лимфатических сосудов. Выход нейтрофилов в ткань происходит через 2-4 часа после появления инфекции.

Нейтрофилы, после выхода из костного мозга практически не меняют своего «облика» даже выходя из сосудистого русла. Это связано с тем, что адаптация к микроокружению почти не проявляется в условиях короткого жизненного цикла клетки. НФ - высокоспециализированная клетка, практически завершившая дифференцировку и предназначенная для экстренной мобилизации при острых нарушениях гомеостаза. Одной из основных функций нейтрофилов является фагоцитоз - поглощение и уничтожение чужеродного материала, что обеспечивает необходимый "структурный гомеостаз организма". Нейтрофилы – проявляют следующие функции:

1. Способность к адгезии (прилипание) и изменение формы.
2. Способность к движению
  - а) случайное блуждание;
  - б) хемотаксис (направленное движение отдельных клеток под влиянием односторонне действующего стимула – химического вещества)
  - в) хемокинез (реакция на внешний стимул, выражающиеся в изменении скорости, частоты, смены периодов движения или частоты и амплитуды поворотов во время случайного блуждания.)
3. Способность к распознаванию чужеродных агентов.  
Нейтрофил с помощью рецепторов распознает бактерии.
4. Способность к фагоцитозу.
5. Микробицидная активность.

#### **Продукция кислородных радикалов и секреция ферментов, содержащихся в гранулах.**

Дисфункции нейтрофилов, такие как различные формы **нейтропении**, дефицит адгезии нейтрофилов или **хронический грануломатоз**, приводят к тяжелым формам подверженности больных бактериальным инфекциям, что подчеркивает ключевую роль нейтрофилов в обеспечении **врожденной формы иммунитета**. С другой стороны, гиперактивация нейтрофилов также приводит к патологиям. Такие аномалии, как повреждение при реперфузии [Williams, F.M. 1994], васкулит [Savage, C.O.S., 1994.], **синдром дыхательной недостаточности взрослых** [Hasleton, P.S., 1999.], или **гломерулонефрит** [Lefkowitz, J.B. 1997], свидетельствуют о важном медицинском значении гиперактивации нейтрофилов. В борьбе с бактериями нейтрофилы используют **фагоцитоз**, образование кислородных радикалов и секрецию различных ферментов деградации.

### Механизмы активации нейтрофилов.

Полиморфно-ядерные лейкоциты играют ведущую роль в неспецифической резистентности организма, что делает их мишенью и универсальным индикатором различных нарушений гомеостаза. Активность микробицидной системы обеспечивается содержанием специфических азурофильных гранул нейтрофилов, в частности, фосфатазы, эластазы, катепсина G, миелопероксидазы, катионных белков, лактоферрина, лизоцима, а также за счет оксидазной системы, генерирующей супероксид-анионы

Под активацией нейтрофилов подразумеваются быстро наступающие изменения физиологической и биохимической активности при действии внешнего сигнала. Критерием активированного состояния принято считать появление респираторного взрыва и секреторной дегрануляции [Маянский А. Н. 1989г]. Наиболее характерным ответом нейтрофилов на присоединение агонистов к рецепторам является накопление в нейтрофилах перекиси водорода для того, чтобы убить бактерии нейтрофил нарабатывает активные радикалы кислорода.[Пигаревский В.Е. 1988.; Маянский Д.Н. 2001; Саприн А.Н. 1999;].

В зрелых нейтрофилах существует два основных типа гранул: азурофильные и специфические. При воздействии на нейтрофилы растворимыми агонистами происходит дегрануляция нейтрофилов. Часть гранул, расположенных вблизи плазматической мембраны сливается с мембраной и содержимое гранул высвобождается во внеклеточную среду. С наружной клеточной мембраной сливаются сначала специфические гранулы и уже затем – азурофильные. Такой тип дегрануляции характерен для «несостоявшегося фагоцитоза». При состоявшемся фагоцитозе бактерия захватывается мембраной нейтрофила со всех сторон, попадает в цитоплазму, где происходит её разрушение.

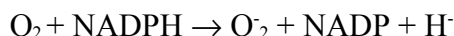
В нейтрофилах обнаружены универсальные механизмы передачи сигналов через G-белки (семейство гомологичных белков, плазматической мембраны, которые переносят информацию с рецепторов на ряд мембранных ферментов), систему вторичных мессенджеров (Инозитолтрисфосфата ( $IP_3$ ) и диацилглицерина (DAG)) и фосфорилирование с участием протеинкиназ. Форболовые эфиры активируют нейтрофилы, вызывают дегрануляцию, респираторный взрыв, увеличение содержания F – актина без увеличения внутриклеточной концентрации  $Ca^{++}$ . Диацилглицерин вызывает активацию специфического фермента клеток протеинкиназа C. (Долгушин И.И.2001.).

### Бактерицидные механизмы нейтрофилов.

Бактерицидность фагоцитов определяется активностью лизосомальных ферментов, катионных белков, а так же образованием активных форм кислорода во время респираторного взрыва. Эти факторы вносят огромный вклад в конечный результат киллинга патогенных микробов [Дамбаева С.В., 2000] . Киллинг бактерий, поглощенных нейтрофилами, осуществляется с помощью кислородозависимых и кислородонезависимых механизмов. В первом случае происходит окисление кислорода НАДФН-оксидазной системой, в результате чего образуется активные формы кислорода, оказывающие сильное микробицидное действие. Другой механизм, приводящий к гибели и разрушению бактериальной клетки, реализуется за счет кислой реакции среды фаголизосомы, гидролитических ферментов и большого числа микробицидных белков и пептидов.

#### **Кислородзависимые механизмы.**

Известно, что контакт фагоцитов с антигеном приводит к запуску механизмов окислительного метаболизма клеток. По мнению исследователей, этот механизм инициируется конформационными изменениями мембранных рецепторов, что в свою очередь активирует поверхностные оксидазы [Дамбаева С.В.2000; Маянский А.Н., 1999]. НФ содержат 4 типа гранул, в которых находятся различные протеины и ферменты. Азурофильные гранулы ПМН содержат большей частью уникальный белок, гем-содержащий фермент миелопероксидазу. Вместе с мембранной НАДФ-Н оксидазой, миелопероксидаза вовлечена в формирование АФК и окисление биологических тканей. В стимулированных ПМН НАДФ-Н оксидаза восстанавливает молекулярный кислород до супероксид анион-радикала.



Это вещество и продукт его дисмутации пероксид водорода являются субстратами для миелопероксидазы [Arnhold J. 2004.]. Основой повреждающего действия АФК составляет их способность нарушать нормальное функционирование жизненно важных структур клетки. Супероксиданион радикал ( $\text{O}_2^-$ ), гидрооксильный радикал ( $\text{OH}^*$ ), и пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) представляют собой реакционноспособные АФК. Следует подчеркнуть, что основные формы АФК исходно являются нормальными компонентами клеточного метаболизма и выполняют определенные биологические функции. Реакционная агрессивность АФК сдерживается мощной антиоксидантной системой, присутствующей в организме человека. Но в патологических условиях этот баланс нарушается в сторону неконтролируемой генерации АФК, что приводит к состоянию окислительного стресса. В

обычном состоянии этот фермент находится в неактивной форме, но при адгезии лейкоцитов к бактериям или другим субстратам, подвергающихся фагоцитозу, происходит его активация. При воздействии различных стимулов, при фагоцитозе в Нф с очень большой скоростью происходят реакции называемые "респираторным взрывом". При этом наблюдается увеличение потребления кислорода не связанное с продукцией энергии. Было показано что  $O_2$  используется для образования  $O_2^-$ . В другом ферментативном пути генерации супероксидного радикала участвует ксантиноксидаза. Этот фермент катализирует реакции окисления гипоксантина в ксантин, а ксантина в мочевую кислоту с образованием  $O_2^-$ .

Высокоспецифичная нейтрализация  $O_2^-$  осуществляется ферментом супероксиддисмутазой (СОД).

В условиях *in vivo* существуют неферментативные пути образования АФК. В частности, именно такими путями возможно образование наиболее активной формы –  $OH^\bullet$ . Он является наиболее реакционноспособным из всех АФК. Первичное действие  $OH^\bullet$  проявляется в месте его генерации. Взаимодействие  $OH^\bullet$  с окружающими молекулами приводит к образованию вторичных радикалов. Образование  $OH^\bullet$  наблюдается в реакции Хабера-Вейса и Фентона. Кроме того, полагают, что  $OH^\bullet$  может генерализоваться нейтрофилами и моноцитами человека по механизмам, зависимым от миелопероксидазы. При дисмутации супероксидных радикалов образуется перекись водорода. В норме фагоциты используют перекись водорода для синтеза гипохлорита, выделяя специальный фермент - миелопероксидазу (МПО). Миелопероксидаза катализирует реакцию:  $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow H_2O + ClO^-$  (гипохлорит). Гипохлорит разрушает стенку бактериальной клетки и тем самым убивает бактерии. МПО также регулирует множество аспектов воспалительного ответа. Так, МПО ответственна за физиологическую обратную связь в рекрутировании ПМН. Она вносит вклад в прекращение притока ПМН в очаги воспаления. ПМН с недостаточным содержанием МПО обычно демонстрируют более сильный и продолжительный респираторный взрыв.

В условиях окислительного стресса и неконтролируемой генерации АФК превалирующими становятся процессы нерегулируемой модификации белков приводящие, в конечном счете, к утрате их биологической активности (ферментативная активность, рецепторная и транспортная функции и т.д.). Окислительная модификация белков генерирует новые антигены и провоцирует иммунный ответ. Продукты такой модификации могут служить причиной вторичного повреждения других биомолекул. Поэтому при

патологических состояниях, сопровождающихся развитием окислительного стресса, процессы окислительной модификации белков должны находиться под непрерывным лабораторным контролем.

Окислительная модификация различных клеточных компонентов играет важную роль в жизнедеятельности человеческого организма. Активные формы кислорода (АФК) образуются и в нормальных условиях, они используются в реакциях синтеза простагландинов и лейкотриенов, причем на это расходуется 1-2 % кислорода потребляемого организмом. Однако в условиях окислительного стресса на образование АФК может расходоваться до 20-30% кислорода, поступающего в клетки, что само по себе усугубляет кислородное голодание тканей.

Исследование уровня наработки АФК не только имеет диагностическое значение, но и дает возможность оценить степень возбужденности клетки и ее функциональный потенциал при воздействии стимулятора.

#### **Кислороднезависимые механизмы.**

К кислороднезависимым бактерицидным механизмам относят дефенсины, семейство BPI- молекул, семейство CAP-37-белков, лактоферин, лизоцим, различные катионные белки (КБ). Установлено, что содержащиеся в гранулах нейтрофильных гранулоцитов КБ выполняют разнообразные функции в воспалительной реакции (медиаторов воспаления, неспецифических опсонинов при фагоцитозе, модуляторов свертывания крови и фибринолиза). КБ обеспечивают мощный антимикробный потенциал нейтрофилов благодаря комплексному воздействию на структуру и обмен веществ микроорганизмов. Также катионные белки формируют водные каналы в мембранах бактерий, что приводит к лизису клетки [ Пасечник И.Н. 2001].

Цитоплазматические КБ имеют большое значение для осуществления клеточных защитных реакций Нф. КБ обладают универсальной бактерицидной активностью, участвуют в фагоцитозе, ферментативных реакциях клетки. КБ участвуют в реализации сосудистого компонента воспалительной реакции. Изучение КБ необходимо проводить в динамике для наблюдения за состоянием клеточного иммунитета в процессе лечения. Снижение КБ характерно для острого воспалительного процесса: наблюдается в разгаре различных инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной этиологии. Изменения содержания КБ коррелируют со степенью тяжести заболевания.

Важнейшим свойством катионных белков, содержащихся как в азурофильных, так и в специфических гранулах нейтрофилов, является их высокая микробицидность. В этом отношении они находятся в синергистическом взаимодействии с системой миелопероксидазы. Катионные белки адсорбируются на отрицательно заряженной мембране бактериальной клетки путем электростатического взаимодействия. В результате этого нарушаются проницаемость и структура оболочки и наступает гибель микроорганизма, что является предпосылкой для последующего эффективного лизиса его лизосомальными протеиназами. Высвободившиеся внеклеточно катионные белки опосредуют повышение проницаемости сосудов (главным образом путем индукции дегрануляции тучных клеток и высвобождения гистамина), адгезию и миграцию лейкоцитов [Долгушин И.И., 2001].

Благодаря исследованиям, выполненным в последние два десятилетия, устоявшийся взгляд на нейтрофилы как на клетки-мусорщики пересматривается. Нф, помимо способности к фагоцитозу, обладают еще одной важной функцией – секреторной. Более того, морфологические, физиологические, биохимические исследования свидетельствуют, что секреторная функция Нф – важнейшее проявление реактивности этих клеток.

Полиморфно-ядерные нейтрофилы - высокоспециализированные клетки для фагоцитоза и разрушения микроорганизмов. Они подвижны, отвечают на хемотаксические сигналы и содержат в своих гранулах микробицидные системы и ферменты. В цитоплазме НФ присутствует более 50 различных биологически активных веществ, причем бактерицидные продукты среди них занимают не основное место. В гранулах содержатся соединения с четко выраженными регуляторными свойствами: кинин- и комплементактивирующий ферменты, ингибиторы комплемента и протеин киназы С, хематтрактант для моноцитов, коллагеназа, желатиназа, гистаминаза, гепариназа, различные рецепторы к фрагментам комплемента, иммуноглобулинов, компонентам внеклеточного матрикса. Нейтрофилы образуют цитокины (ИЛ-1,3,6,8,ФНО), лимфоцит-, фагоцитозстимулирующие факторы, тканевый тромбопластин, активатор плазминогена, низкомолекулярные (в том числе опиоидные) пептиды, метаболиты липидов (различные эйкозаноиды, тромбоцитарный активатор, эозинофильный хемотаксический фактор) и другие соединения. Благодаря этим продуктам нейтрофилы могут обладать разнообразными и разнонаправленными регуляторными эффектами. Большая часть названных веществ образуется в нейтрофилах на стадии их созревания. Секреторная дегрануляция для Нф – это однократный акт, клетка неспособна в полном объеме ресинтезировать содержимое своих гранул. В этом заключается одно из отличий Нф от истинных секреторных клеток эндокринных органов.

Нф имеют развитый аппарат движения, дольчатое ядро, благодаря чему способны быстро передвигаться и легко преодолевать узкие межклеточные пространства. В экстремальных ситуациях Нф в течение нескольких часов могут перемещаться из костно-мозговых депо в кровь и накапливаться в тканях в значительных количествах, где они и реализуют свой секреторный потенциал. Большинство продуктов секретируемых нейтрофилами действуют локально, так как имеет аутокринный, паракринный и юкстокринный механизмы взаимодействия с клетками. Лишь некоторые из них (цитокины, низкомолекулярные пептиды) обладают системным, эндокринным действием.

В НФ содержатся гранулы различного биохимического состава. На сегодняшний день известно 4 основных типа, однако с помощью градиентного центрифугирования их можно разделить на большее количество фракций, ряд которых содержит не смесь, а отдельные вещества, например миелопероксидазу, дефенсины, желатиназу и т.д. При этом механизмы функциональной мобилизации различных секреторных органелл могут быть независимы друг от друга. Богатый арсенал биологически активных продуктов позволяет нейтрофилам влиять на самые различные физиологические процессы в организме.

НФ, несомненно, играют важную роль в защите от многих патогенных и условно-патогенных бактерий и грибов и других патогенов.

Надо отметить, что в научной литературе практически отсутствуют исследования об индивидуальных особенностях реагирования системы нейтрофилов/фагоцитов у больных с незаживающими ранами, о взаимосвязи между продукцией активных форм кислорода, способностью к синтезу интерлейкинов и интерферона (т.е. разными функциями нейтрофилов/фагоцитов). Также нет единого представления о влиянии на функции Нф квантовой терапии.

### **Провоспалительный цитокин интерферон- $\alpha$ (ИФН- $\alpha$ ) , продуцируемый нейтрофилами.**

Интерферон-альфа синтезируется лейкоцитами на ранних этапах инфекции и поэтому относится к первой линии защиты организма. Макрофагами преимущественно продуцируется интерферон- $\alpha 2$ . Высокий уровень экспрессии его генов выявлен в клетках лимфоидных органах и головного мозга. На мембране клеток имеется два типа рецепторов для интерферонов. Большинство из них являются гетеродимерами и состоят из трех фрагментов (доменов) – внеклеточного (лиганда), трансмембранного и внутриклеточного (сигнального) доменов. Характерным свойством их является рецепция только

видоспецифических молекул интерферонов. При связывании молекул интерферонов с внеклеточным распознающим доменом рецептора формируется активационный мембранный сигнал, передающийся посредством трансмембранной части к внутриклеточному (сигнальному) домену. Этот домен функционирует в ассоциации с группой внутриклеточных сигнальных молекул, таких как JAK – STAT( белков трансдукторов сигналов и транскрипции) действующих в каскадной манере и обеспечивающих проведение и усиление сигнала с мембраны в ядро клетки. В основе формирования сигнала лежит активация этим доменом цитозольных тирозиновых киназ семейства JAK, которые затем фосфорилируют STAT белки. Комплекс фосфорилированных STAT белков мигрирует в ядро и селективно усиливает транскрипцию группы генов, контролирующих биосинтез от 50 до 100 полипептидов с разными функциями. Время, необходимое для формирования на мембране и проведения в ядро внутриклеточного сигнала, составляет не более 1-й минуты. Большинство из продуцируемых белков интерферируют с процессами репликации вирусов в клетке. Различные вирусы ингибируются под влиянием интерферонов разными путями: а) на уровне репликации и транскрипции генома; б) стабилизации мРНК; в) трансляции вирусспецифических белков. Непрямыми эффектами биологического действия интерферонов является стимуляция экспрессии соматическими и иммунокомпетентными клетками молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС I и II классов). Толл (toll-like) рецепторы – семейство молекул, состоящее из 11 трансмембранных одноцепочечных белков-рецепторов со сходным строением (Trengeve N.J, et al, 1996). Имеют внеклеточную (Dowd SE, et al., 2008; Elliott D.C., et al, 1996; Hannson C., et al, 1995; Harrson-Balestra C et al, 2003; Kirketerp-Moller K, et al, 2008; . Levine N.S., et al, 1976; Mertz PM, et al, 1987) тандемно-повторяющихся участков с повышенным содержанием лейцина), трансмембранную и внутриклеточную (гомологичную внутриклеточному домену ИЛ-1) (Brook I., Frazier E.H. 1998; Harrson-Balestra C., et al, 2003) части. Фрагменты этих рецепторов напрямую взаимодействует с ПАМП микроорганизмов, образуя активационные комплексы. Проведение активационного сигнала, индуцированного этими рецепторами, происходит с участием нескольких вспомогательных молекул-CD11/CD18, CD14, MD2, ЛСБ и др. (Kirketerp-Møller K et al, 2008). Общим свойством всех толл-рецепторов является их способность взаимодействовать со структурами вирусов – белками, гликопротеидами, липопротеидами, РНК и ДНК, формирование и проведение в ядро активационного сигнала, ведущего к повышению защитных неспецифических механизмов организма, в частности воспалительной реакции. Это, в конечном итоге, обеспечивает гибель и элиминацию

патогена. Указанные рецепторы экспрессированы на моноцитах, макрофагах, нейтрофилах, ДК, НК-клетках и, в меньшей степени, на эозинофилах, Т-и В-лимфоцитах. Имеется взаимосвязь между толл-рецепторами и системой интерферонов. Пять типов толл-рецепторов участвуют в индукции биосинтеза трех основных классов интерферонов. В основе причин тяжелого течения и летального исхода от многих инфекций могут лежать дефекты толл-рецепторов, а также протеинкиназы, ассоциированной с рецептором ИЛ-1 (IRAK) (Trentham N.J., et al, 1996). Множественные и многоуровневые биологические эффекты интерферонов на клетки организма суммируются с формированием так называемого «противовирусного состояния». Это состояние обусловлено синтезом двух ферментов, ингибирующих клеткой репродукцию вирусов. Один из них — 2'5'-олигоаденилатсинтетаза-активирует внутриклеточную рибонуклеазу, разрушающую молекулы РНК вируса, что снижает как их количественное содержание, так и интенсивность синтеза вирусных мРНК. Другой – протеинкиназа - катализирует фосфорилирование фактора элонгации eIF2 $\alpha$ , и таким образом ингибирует процесс образования белков. Хотя в результате этого клетка может погибнуть, но и репродукция вируса будет остановлена. Это состояние клеток, однажды индуцированное, неспецифически защищает их от проникновения широкого круга вирусов. Биологический эффект интерферонов осуществляется в три стадии: 1) индукции, в результате которой происходит дерепрессия генов интерферонов; 2) биосинтеза и секреции молекул интерферонов; 3) взаимодействия молекул интерферонов с рецепторами окружающих клеток. Интерферон-альфа, кроме того, оказывает влияние на функцию Нф/макрофагов, усиливая их антимикробный потенциал (Mattner J. et al, 2000). Также интерферон-альфа обладает выраженным иммунорегуляторным действием (С.А.Кетлинский, А.С Симбирцев Цитокины, С-Пб, 2008), индуцируя экспрессию молекул МНС I класса, модулируя продукцию иммуноглобулинов. Также интерферон-альфа повышает клеточную цитотоксичность Т-лимфоцитов и естественных киллеров., ингибирует Т-клеточную супрессию, защищает активированные Т-лимфоциты от апоптоза и активно влияет на продукцию ряда цитокинов (ИЛ-12, ИЛ-18 ИЛ-15, ИФН- $\gamma$ ). Оценка продукции интерферон-альфа Нф отражает их функциональную активность и секреторную функцию, которая играет большое значение в формировании иммунного ответа.

Для оценки эффективности низкотемпературной аргоновой плазмы и ее влияния как на раневой процесс, так и на показатели иммунитета представляется целесообразным сравнить действие аргоновой плазмы с действием другого вида квантовой терапии – лазерного облучения. В научной литературе, несмотря на большое число исследований разных

аспектов лазеротерапии, остается очень много нерешенных вопросов и отсутствует единое мнение о влиянии лазерного облучения низкой интенсивности на процессы продукции АФК в НФ/фагоцитах, на другие функции клеток, на различные субпопуляции лимфоцитов. Так, рядом авторов обнаружено *стимулирующее* влияние лазерного облучения на синтез ферментов супероксиддисмутазы и индуцибельной NO-синтазы, цитокинов (ИЛ1'бета' и ФНО'альфа'), в основе которого как считают авторы, лежит фотосенсибилизированное образование активных форм кислорода в цитоплазме клеток. Также была сформулирована концепция свободнорадикального механизма активации синтетических процессов клеток под действием лазерного облучения. (Полтанов Е.А., 2004). В других работах отмечается наличие противовоспалительного, противоотечного, улучшающим микроциркуляцию, иммуномодулирующего эффектов квантовой терапии (эффектами, которые не могут быть связаны с продукцией провоспалительных цитокинов и усилением продукции АФК(!). также многие исследователи выявляют антиоксидантное действие лазерного облучения. По видимому, эффект лазерного воздействия зависит от исходного функционального состояния иммунной системы и метаболического фона органов и систем в момент облучения, однако в научной литературе такие данные отсутствуют.

#### **Экспериментальные модели для исследования влияния физических факторов на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток млекопитающих в условиях *in vitro*.**

Исследования процессов заживления ран, проводимые начиная с 50-х годов прошлого века, однозначно свидетельствуют о важной роли механических напряжений, создаваемых фибробластоподобными клетками соединительной ткани, в процессе заживления ран. (Abercrombie et.al., 1956, Billingham et.al. 1956, Watts et al 1958). Было показано, что фибробласты, культивируемые в матриксе коллагенового геля, в отличие от фибробластов, культивируемых на пластике или стекле, имеют тканеподобный фенотип, проявляют миграционную активность и реорганизуют коллагеновый матрикс (Elsdale T, Bard J., 1972) Фибробласты, культивируемые в коллагеновом геле, вызывают его сильное сжатие (контракцию), приводящую к формированию плотного диска коллагена, быстро уменьшающегося в диаметре. Данной системе присущи элементы самоорганизации: коллагеновые волокна переупаковываются, клетки организуются в кластеры, значительно уменьшается объем коллагенового геля. Аналогичные процессы реорганизации матрикса наблюдаются при культивировании фибробластов в фибриновом геле (Niewiarowski and

Goldstein, 1973). Впоследствии Белл предложил использовать процесс реорганизации коллагенового геля фибробластами в качестве *in vitro* модели контракции раны (Bell et al., 1979).

В настоящее время разработано несколько *in vitro* моделей контракции ран, использующих фибробласты, культивируемые в коллагеновом или фибриновом гелях. Модель флолирующего (открепленного) коллагенового геля, уменьшающегося в диаметре, имитирует состояние механически релаксированных тканей, морфология и пролиферативная активность клеток в которых аналогичны дерме. Модель прикрепленного матрикса, уменьшающегося по высоте, имитирует состояние механически напряженной грануляционной ткани. Измерение механических напряжений показало, что силы, генерируемые фибробластами в контрактирующем прикрепленном геле коллагена сравнимы с силами, возникающими при контракции кожных ран и прорезывании зубов. (Kasugai et al 1990, Delvoye et al., 1991, Kolodney and Wysomerski, 1992). Релаксационная модель заключается в откреплении в некоторый момент времени матрикса, сконтрактировавшего в прикрепленном состоянии. Таким образом, значительные механические напряжения, создаваемые при контракции прикрепленных гелей в матриксе, снимаются при откреплении и последующем сжатии гелей, приводящем к релаксации механических напряжений (Mochitate et al. 1991). Модель стресс релаксации часто рассматривают как модель формирования рубца. В отличие от медленной (от часов до дней) контракции флолирующих или прикрепленных гелей стрессовые коллагеновые матрицы контрактируют в течение считанных минут за счет ретракции псевдоподий и коллапса актиновых филаментов (Mochitate et al, 1991, Tomasek et al., 1992). Данный механизм контракции более напоминает сокращение мускулярного типа, а не тракционное ремоделирование матрикса.

В отличие от флолирующих коллагеновых гелей, где фибробласты имеют звездообразную морфологию, в прикрепленных матриксах наблюдается биполярная форма клеток, ориентированных вдоль линий натяжения (Stopak and Harris 1982, Bellows et al, 1982), стресс-фибриллы и межклеточные контакты придают им сходство с миофибробластами (Farsi and Aubin, 1984, Mochitate et al. 1991, Tomasek et al., 1992). Такие же различия наблюдаются и в пролиферативной активности клеток, культивируемых в прикрепленных и флолирующих гелях. После контракции флолирующего коллагенового геля наблюдается значительное снижение синтеза ДНК, выход в G<sub>0</sub>-фазу и последующая регрессия клеток, в то время как клетки в прикрепленных матрицах продолжают синтезировать ДНК и пролиферировать (Sarber et al. 1981, Nishiyama et al, 1989, Nakagawa et

al, 1989, Kono et al. 1990, Mochitate et al. 1991). У фибробластов, культивируемых во флоотирующих гелях, также снижена биосинтетическая активность и повышен уровень коллагеназ по сравнению с прикрепленными гелями (Nusgens et al. 1984, Paue et al. 1987, Fukamizu et al 1009). Изменения пролиферативной и биосинтетической активностей клеток после релаксации прикрепленных гелей происходит чрезвычайно быстро, сигнальные механизмы, контролирующие переход из активного состояния в состояние покоя пока полностью не выяснены, однако предполагается, что стресс-релаксация активирует сАМФ/протеинкиназа А сигнальный путь. Главное, что стоит отметить, до тех пор, пока клетки находятся под механическим напряжением матрикса, они сохраняют свои биосинтетическую и пролиферативную активности. После снятия механического стресса после завершения контракции матрикса (или раны) клетки переходят в неактивное состояние и начинается их регрессия, независимо от наличия стимулирующих ростовых факторов.

Показано, что контракция является следствием миграционной активности фибробластов и их взаимодействия с матриксом (Harris et al., 1981, Grinnell F, Lamke, 1984), этот процесс называется тяговым ремоделированием («tractional remodeling»), чтобы различить его с контракцией по мускулярному типу. Показано, что основным механизмом контракции является реорганизация клетками близлежащих коллагеновых фибрилл при распластывании и миграции и последующая передача напряжений по сети взаимосвязанных коллагеновых волокон (Guidry C, Grinnell F., 1985). Адгезивное взаимодействие между клетками и коллагеновыми волокнами происходит посредством  $\alpha 2 \beta 1$  интегринов (Schirow et al., 1991, Klein et al., 1991), при этом тянущее усилие зависит от состояния актинового цитоскелета (Bell et al., 1979, Bellows et al., 1982, Guidry and Grinnell, 1985) и киназной активности легкой цепи миозина (MLCK) (Ehrlich et.al. 1991). Для контракции коллагенового матрикса необходима сыворотка (Steinberg et al., 1980, Guidry and Grinnell F, 1985), что показывает возможность регуляции этого процесса внеклеточными факторами. Активность сыворотки может быть замещена или усилена ростовыми факторами, например TGF- $\beta$  стимулирует контракцию флоотирующих и прикрепленных гелей (Montesano and Orci, 1988, Finesmith, et al 1990, Fukamizu and Grinnel, 1990) фибробластами и направляет их дифференцировку в миофибробласты (Desmouli et al., 1993). PDGF также стимулирует контракцию матрикса фибробластами по механизму независимому от TGF- $\beta$  (Clark et al., 1989, Tingstrom, 1992). Среди факторов, подавляющих контракцию коллагенового матрикса, можно назвать FGF (Finesmith, et al 1990, Dubertret L, 1991) и  $\gamma$ -интерферон (Gillery et al. 1992). Сигнальные механизмы регуляции процесса контракции коллагенового геля

ростовыми факторами пока не выявлены, однако предполагается участие в этих процессах протеинкиназы C (Guidry C 1992). Изменения в биосинтезе коллагена и коллагеназ у фибробластов, культивируемых во флолирующих гелях зависят от транскрипции и посттранскрипционных механизмов.

Таким образом, фибробласты могут контрактировать коллагеновый матрикс и этот процесс можно рассматривать как *in vitro* модель заживления ран. При проведении исследования следует обращать внимание на выбор модели контракции коллагенового геля. В прикрепленном матриксе развиваются механические напряжения, происходит интенсивная пролиферация клеток и их дифференцировка в миофибробласты. Эта ситуация имитирует состояние раны на начальной стадии заживления раны. Во флолирующем геле в отсутствии механического стресса происходит угнетение пролиферативной и биосинтетической активности и возрастает коллагеназная активность клеток. Данная система, как мы предполагаем, в большей степени подходит для исследования влияния физических и химических факторов на состояние дермы. Изменение пролиферативной и биосинтетической активности клеток в модели стресс-релаксации открывает возможности исследования влияния физико-химических факторов на процессы формирования рубцовой ткани.

### **Плазмы, типы плазмы.**

Плазмой в физике и химии называют полностью или частично ионизированный газ, который может быть как квазинейтральным, так и неквазинейтральным. Плазма иногда называется четвёртым (в отличие от твёрдого, жидкого и газообразного) агрегатным состоянием вещества. Термин «ионизированный газ» означает, что от значительной части атомов и молекул отделён по крайней мере один электрон. В «квазинейтральном» газе несмотря на наличие свободных зарядов (электронов и ионов) суммарный электрический заряд плазмы приблизительно равен нулю. Присутствие свободных электрических зарядов делает плазму проводящей средой, что обуславливает её заметно большее (по сравнению с другими агрегатными состояниями вещества) взаимодействие с магнитным и электрическим полями. Термин плазма используется для систем заряженных частиц, достаточно больших для возникновения коллективных эффектов. Микроскопические малые количества заряженных частиц (напр. пучки ионов в ионных ловушках) не являются плазмой. В отличие от газа электрическая проводимость плазмы чрезвычайно высока и она имеет не один и несколько сортов частиц (электроны, ионы, нейтральные частицы), отличающихся

распределением по скоростям и типам взаимодействия, в частности в плазме они имеют коллективный характер.

Далее мы остановимся на основных характеристиках плазмы, прежде всего, тех, которые нам предстояло определить экспериментально в ходе выполнения данного проекта.

Плазма обычно разделяется на идеальную и неидеальную, низкотемпературную и высокотемпературную, равновесную и неравновесную, при этом довольно часто горячая плазма бывает равновесной, а холодная плазма неравновесной. В неравновесной плазме электронная температура существенно превышает температуру ионов. Такая ситуация встречается в газовых разрядах, когда ионы имеют температуру около сотен, а электроны около десятков тысяч градусов. В равновесной плазме обе температуры равны. Равновесная плазма обычно является горячей (с температурой больше нескольких тысяч градусов). Понятие высокотемпературная плазма употребляется обычно для плазмы с температурой в миллионы градусов кельвинов. Горячая плазма почти всегда полностью ионизована (степень ионизации  $\sim 100\%$ ), и именно она понимается под «четвертым агрегатным состоянием вещества». Под степенью ионизации имеется в виду отношение числа ионизованных частиц к общему числу частиц. Для низкотемпературных плазм (НТП) характерны малые степени ионизации ( $< 1\%$ ). НТП широко употребляются в плазменных технологиях. Создают НТП, как правило, при помощи электрических полей, ускоряющих электроны, которые в свою очередь ионизируют атомы.

Важным параметром плазмы является плотность электронов, то есть число свободных электронов в единице объема. Другая существенная характеристика - потенциал плазмы, определяемый как среднее значение электрического потенциала в данной точке пространства. В случае если в плазму внесено какое-либо тело, его потенциал в общем случае будет меньше потенциала плазмы. Такой потенциал называют плавающим потенциалом.

Касаясь практического применения низкотемпературной плазмы отметим, одну из важных вех - это получение долгоживущего плазменного образования в свободном пространстве энергоемкого объекта. В работах [Протасевич Е.Т., 1989, Протасевич Е.Т., 1989; Протасевич Е.Т. и др., 1985, Протасевич Е.Т., 1990, Зуев В.Е., и др., 1987] экспериментально было показано, что при добавлении в ВЧ-разряд молекул  $H_2O$  удастся синтезировать, холодную неравновесную плазму с аномальными свойствами: низкой температурой нейтральных и заряженных частиц; аномально большим временем распада; уплотнением холодной плазмы газового разряда; появлением границы раздела между

областями переохлажденной плазмы. При использовании ВЧ- и СВЧ разрядов было получено устойчивое воспроизведение плазмоидов в узком диапазоне изменения относительной влажности воздуха. Экспериментально установлено, что время их жизни составляет  $\sim 0,5\text{--}5,0$  с вместо 20 мкс в сухом воздухе, а диаметр  $\sim 2,5\text{--}5,0$  см. В результате исследований выяснилось, что «подбором соответствующих параметров среды (относительная влажность, давление, исходное состояние воды) или ионизирующего излучения (длительность импульса, его энергия, частота повторения и пр.) можно обеспечить режим длительного распада плазмы». Проведенные в лабораторных условиях и в открытом пространстве эксперименты в целом подтвердили ранее высказанные предположение [Протасевич Е.Т., 1989] о том, что для формирования долгоживущего плазменного образования наиболее важны параметры ионизирующего излучения, а не его вид, и наличие переохлажденной плазмы.

В последнее десятилетие началось использование низкотемпературной плазмы, иницированной СВЧ разрядами, существующими только в присутствии инициаторов при аномально малых мощностях. СВЧ разряды могут создавать неравновесную плазму и, главное, ее параметрами можно управлять. Первые физические исследования СВЧ плазмы были выполнены несколько позже, чем началось их практическое применение [Л. Бардош, Ю.А. Лебедев, 1998]. Как описывает Ю.А. Лебедев, «термин “СВЧ-плазма” объединяет плазменные образования, полученные в различных СВЧ устройствах (СВЧ-разряды). В настоящее время разработаны многочисленные СВЧ устройства для получения плазмы». Ее свойства зависят от способа получения. И именно характеристики конкретных газоразрядных устройств определяют структуру электромагнитного поля, энергетическую эффективность, широкополосность, частоту, уровни минимальной и максимальной мощности генерируемой плазмы. Микроволновыми СВЧ-разрядами называют разряды, создаваемые с помощью электромагнитных волн с частотой, превышающей 300 МГц. Чаще всего из разрешенных частот используется частота 2450 МГц.

Не касаясь типов и принципов действия различных СВЧ генераторов плазмы, укажем основные достоинства СВЧ-разрядной плазмы. К ним относятся простота получения плазмы с высоким ( $>1 \text{ Вт/см}^3$ ) и малыми ( $\ll 1 \text{ Вт/см}^3$ ) удельными энергозатратами; широкая область рабочих давлений, начиная от  $10^{-5}$  Тор; возможность создания квазиравновесной и существенно неравновесной плазмы; простота управления внутренней структурой разряда путем изменения электродинамических характеристик устройства ввода СВЧ энергии в плазму; возможность создания плазмы в безэлектродных и электродных системах в малых и больших объемах, включая свободное атмосферное пространство и возможность обработки больших поверхностей сканированием. При этом обеспечивается совместное воздействие плазмы и электромагнитного поля. Разработанные семейства разнообразных эффективных СВЧ генераторов плазмы позволяют выбрать конструкцию для любых применений [Батенин В.М., и др., 1988; Л.С. Полак, Ю.А. Лебедев, 1991; Yu.A. Lebedev, 1994, Litvak, 2000; Yu. A. Lebedev, 2001].

### **Первый опыт использования плазмы в биологии и медицине.**

Одним из первых опытов практического применения низкотемпературной плазмы в биологии, экологии и медицине стало использование плазмы как агента, разрушающего биологические объекты и структуры. Так появились холодно-плазменная хирургия и методы плазменной стерилизации.

Холодно-плазменная хирургия первоначально получила распространение в Англии и была названа коблацией (cold ablation – холодное разрушение). Первый аппарат для коблации был выпущен компанией ArthroCare в 1995 году. Операционный плазменный инструмент создавал тонкую плазменную струю при температуре на уровне обрабатываемого объекта 40-70°C, что позволяло предотвратить ожог и воспаление окружающих тканей, практически осуществлять операцию безболезненно и при минимальном кровотечении. Метод имел и другие преимущества (перед механическим или лазерным способами рассечения тканей), так как позволял одновременно и рассекать, и коагулировать ткани, проводить объемное удаление тонких слоев или перфорировать ткани с коагуляцией раневого канала. Именно поэтому он с успехом используется и при проведении эндоскопических операций. Возможности метода весьма расширены благодаря большому диапазону разнообразных сменных электродов и портативности самого аппарата. Ныне холодно-плазменная хирургия используется в артрологии, спортивной медицине, онкохирургии, ЛОР-хирургии и гинекологии.

Физическая основа метода заключается в том, что разность электрических потенциалов между электродами вызывает ионизацию электропроводящей жидкости (физиологический раствор), образуя слой ионизированного пара - плазму. Оказалось, что энергии ионов в такой плазме достаточно для разрушений органических макромолекул на низкомолекулярные составляющие. Это молекулярное расщепление приводит к рассечению или объемному удалению ткани.

Уникальная технология бесконтактной хирургической коагуляции нашла свое воплощение и в ряде отечественных аппаратов. Холодно плазменная коагуляция без применения нейтрального электрода реализуется интегрированным биполярным блоком в одном компактном аппарате. Уникальная технология бесконтактной коагуляции особенно необходима при остановке диффузных кровотечений. При этом имеет место экстремально малая глубина проникновения плазменного луча при коагуляции от 0,1 мм до 0,5 мм, отсутствуют термические эффекты в подлежащих тканях. После использования метода не наблюдается развития рубцов и происходит полная регенерация ткани.

На отечественном рынке медицинских инструментов представлены модифицированные возможности биполярной резки с коагуляцией (CutPulse) приборами СРС 1000 (электрохирургический аппарат для монополярной резки / коагуляции и холодно плазменной коагуляции), СРС 1500 (для биполярной резки / коагуляции) и СРС 3000 (для монополярной и биполярной резки / коагуляции и холодно плазменной коагуляции).

### Плазменная стерилизация

Создание эффективных и энергетически дешевых методов разрушения болезнетворных микроорганизмов (и токсичных химических соединений) в газах, жидкостях, на поверхностях различных тел является непреходяще актуальной проблемой медицины. Стерилизация объектов представляет собой процесс разрушения или удаления микроорганизмов, включая вегетативные клетки, споры и вирусы. Традиционные методы стерилизации и дезинфекции основаны на использовании сухого и влажного нагрева, фильтрации, применении радиации и химических соединений (биоцидов). Эти методы весьма трудоёмки, длительны и дорогостоящи, а применение биоцидов не всегда обеспечивает экологическую безопасность. Внедрение в медицинскую практику метода, основанного на использовании НТАП, оказалось весьма перспективно, поскольку позволяет стерилизовать самые разнообразные материалы, в том числе полимеры, которые требуют щадящих (нетермических), быстрых, безопасных и дешёвых способов стерилизации. Стерилизующая НТП при атмосферном давлении создаётся непосредственно в обрабатываемых жидкостях и газах или на поверхности стерилизуемых объектов [А. Anpilov, et al., 2001; С. Yamabe, et al., 2000; Yu. Akishev et al., 2000].

В России способ борьбы с патогенными бактериями и микроорганизмами с помощью холодной воздушной плазмы более 10 лет тому назад разработан в МИФИ под руководством профессора Э. Школьников. Его коллектив создал экспериментальную установку, состоящую из высоковольтного импульсно-периодического генератора и газоразрядной камеры. В камере низкотемпературная газоразрядная плазма содержала наряду с электронами, ионами, нейтральными атомами и молекулами, активные продукты плазмохимических реакций, и при этом создавала ультрафиолетовое и рентгеновское излучение. В результате воздействия НТП «окисляются микроорганизмы, разрушаются оболочки бактерий и ДНК, в том числе и вирусные. Оставаясь холодной, плазма не разрушает термочувствительные материалы» и является действительно универсальным стерилизатором.

В отличие от традиционно используемых способов стерилизации, газоразрядный метод стерилизации на основе НТП обладает рядом принципиальных преимуществ: даёт возможность стерилизовать термочувствительные материалы; период воздействия на микробы очень мал - составляет нескольких минут. При этом плазменные стерилизационные

установки не являются источником радиационной опасности, не требуют специальных помещений и специально подготовленного персонала, экологически безопасны и отличаются низким энергопотреблением и относительно малой стоимостью.

### Стерилизация биологических объектов

Стерилизующая активность НТП была описана В.П. Холоденко и соавторами в работе «Перспективы применения низкотемпературной плазмы в области биологической и экологической безопасности» 1998 г., в которой была показана «инактивация различных видов микроорганизмов низкотемпературной плазмой при атмосферном давлении» в отношении грамотрицательные бактерии *Serratia marcescens* и *Escherichia coli*, в меньшей мере - грамположительные бактерии *Bacillus subtilis*, и еще более устойчивыми оказались споры *B. subtilis*. Однако не ясно было, можно ли метод, рекомендованный для стерилизации жидких сред и поверхностей, в том числе трудно стерилизуемых химическими средствами, использовать для дезинфекции биологических объектов без их повреждения.

Восемь лет тому назад (10.01.2000) был опубликован российский патент № 2143794, описывающий стерилизацию биологического объекта с помощью холодной плазмы как «Способ для дезинсекции и дезинфекции материалов зернового происхождения и устройство для его осуществления» (автор Г.В. Лысов, ООО "Плазма-Т"). Суть этого способа состоит в том, что энергию СВЧ преобразуют в энергию разряда неравновесной плазмы в замкнутом объеме и материалы зернового происхождения пропускают сквозь этот объем. При этом плотность СВЧ- воздействия определяется величиной  $5-20 \text{ Вт/см}^3$ , а степень заполнения потока зерном составляет 10-15%. Время пребывания зерна в плазме определяется получением им дозы энергетического воздействия 5-10 кДж/кг. Использование преобразования СВЧ-энергии в плазму позволяет сократить энергозатраты в десятки раз в сравнении с использованием прямого СВЧ-нагрева зерна до 60-70°. В качестве источника СВЧ-энергии используется выпускаемый промышленностью источник с импульсной СВЧ-мощностью 10 кВт на частоте 2450 МГц при средней мощности до 5 кВт. Инициирование разряда осуществляется кратковременным вводом штыря 27 в разрядную камеру. Одновременно с включением источника СВЧ-энергии на электроды подается синусоидальное напряжение величиной 1000 В на частоте 10 кГц.

Совершенно ясно, что такая холодно-плазменная обработка совершенно непригодна для стерилизации и тем более для санации (дезинфекции с одновременным ускорением заживления) инфицированных незаживающих ран и язвенных поверхностей у животных и

человека. Однако опыт применения НТП для стерилизации зерновой продукты свидетельствовал как минимум о сохранности дезинфицируемого живого объекта при относительно короткой экспозиции объекта в плазменном поле.

### **Подходы к использованию низкотемпературной воздушной плазмы в качестве лечебного средства.**

Согласно данным ВОЗ из всего числа ран мягких тканей и кожных болезней хронические инфицированные поражения являются наиболее дорогостоящими в лечении: так в США затраты на лечение инфицированных ран и язв за 2005 год составили 9.47 млрд. долларов [Данилина Г.А и др. 2007]. Бактериальная флора огнестрельных, ожоговых, травматических ран, обморожений, острых и хронически незаживающих радиационных и трофических язв представлена разнообразными микроорганизмами, среди которых зачастую преобладают полирезистентные штаммы  $\beta$ -гемолитического стрептококка, бактерий рода *Pseudomonas* и *Staphylococcus aureus*. Колонизация патогенными микроорганизмами ран и язв препятствует их заживлению, может привести к генерализации инфекции, которая сопровождается высокой смертностью, в среднем до 25-35 % (для *S. aureus* – до 60%).

В комплексном лечении инфицированных ран и язв сочетанная местная и системная антимикробная терапия во многих случаях малоэффективна, а при колонизации полирезистентными штаммами *S. aureus* неэффективна вовсе. Использование в таких ситуациях ванкомицина и тейкопланина, вводимых внутривенно антибиотиков новых поколений, сопровождается появлением еще более резистентной микрофлоры и значительными побочными негативными последствиями: подавлением иммунитета и регенераторной способности тканей, развитием аллергических реакций. В развитых странах число встречающихся в клинической практике штаммов *P. aeruginosa*, устойчивых к аминогликозидам и кинолонам, превышает 50%, а доля полирезистентных штаммов *S. aureus* достигает 70%. Тяжесть и длительность заболевания, дороговизна и малая эффективность современной антимикробной терапии, высокая инвалидизация и летальность в случае генерализации инфекции обуславливают необходимость разработки новых подходов для лечения инфицированных ран и хронически незаживающих язв.

Как уже указывалось, среди возбудителей, инфицирующих открытые раневые поверхности преобладают прежде всего полирезистентные штаммы  $\beta$ -гемолитических стрептококков, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, формирующие смешанные микробные сообщества, включающие метициллин-резистентные стафилококки (MRSA)..

Смешанный характер инфекций требует применения антибиотиков широкого спектра. Однако при лечении смешанной инфекции в обширных ранах и язвах использование только антибиотикотерапии в большинстве случаев недостаточно, что обусловлено прогрессирующим распространением антибиотикоустойчивых штаммов. Именно поэтому применение плазменных технологий, использующих физическое воздействие на микрофлору, клетки и ткани раневых поверхностей млекопитающих, может стать важной составной частью комплексной антибактериальной терапии ран и язв, инфицированных различными видами микроорганизмов.

Низкотемпературные плазменные генераторы в настоящее время уже нашли применение в отечественной медицинской практике в качестве деструктирующих ткани плазменных скальпелей, коагуляторов, инструментов для туннелирования тканей, в частности широко известен аппарат «Плазон», разработанный в Московском государственном техническом университете им Н.Э. Баумана. Он создает электрические разряды, превращающие проходящий газ (аргон, гелий, воздух) в газовую плазму, с помощью которой осуществляется деструкция и коагуляция ткани. При клиническом применении плазменного деструктора было обнаружено, что «дистанционное воздушно-плазменное воздействие» на расстоянии 20-30 см от выхода способствует ускорению очищению ран и улучшению их заживления. Газоспектральный анализ показал, что на таком расстоянии в плазменном потоке образуется большое количество оксида азота NO и другие свободные радикалы. При этом воздушная плазма, обогащенная NO, способна оказывать стимулирующее действие на местный иммунный ответ, кровоток и на процесс заживления гнойных ран [К.В.Липатов, А.Б.Шехтер, 2001; С.А. Петрин, А.Б. Шехтер, 2001]. Метод «дистанционного воздушно-плазменного воздействия» при всей его вариабельности вследствие неконтролируемости состава воздушно-плазменного потока, показал высокую эффективность при уничтожении бактериальной обсемененности. Так, в тестах *in vitro* за 15 сек облучения было уничтожено 98% *S. aureus* (№ 209P), *E.coli* (№ 26941), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC № 43062) при исходной плотности посева  $10^7$  микробных тел в 1 мл. Метод воздействия на раневой процесс NO – содержащим газовым потоком, имеющим плазменное происхождение, дал хорошие результаты при лечении ран мягких тканей в эксперименте и в клинике [Петрин С.П., и др., . 2001; С.В.Сидоренко, 1996; Слесаренко А. В., Егоров В.И., 2005; Ступин И.В. и др., 1990]. Использование NO–содержащего газового потока для лечения инфицированных ран привлекает своей простотой, неинвазивностью,

отсутствием необходимости в расходном материале и выполнении стерилизационных мероприятий.

Применение низкотемпературной аргоновой плазмы в настоящее время считается одним из наиболее перспективных подходов, обеспечивающим активацию иммунного ответа и процессов заживления, уменьшение микробного обсеменения инфицированных ран и язв, без инициации новых полирезистентных штаммов [Буянов В.М., Родоман Г.Н. , 1996; Галеев Ф.С. и др., 2000; Грищенко А.А., 1992; Дуванский В.А., и др., 2005; С.В.Сидоренко, 1996; Слесаренко А. В., Егоров В.И., 2005]. Однако конструкции современных отечественных и зарубежных плазменных деструкторов-коагуляторов с температура плазмы на выходе от 3000-4000°C не может быть применена для лечения инфицированных ран, так как разрушает ткани животных и человека. При нарушении фокусирования исходно тонкого пучка плазмы и ручном сканировании по обрабатываемой поверхности, интуитивно-произвольном задании врачом дистанции от генератора до ткани, иными словами, при неконтролируемом воздействии, состав доходящей до ткани плазмы, ее температура, спектр излучения, эффекты воздействия на микрофлору, поврежденные и неповрежденные ткани макроорганизма становятся неопределенными. Фактически безопасность, эффективность, воспроизводимость лечебного воздействия, однородность облучения и размер охватываемой поверхности целиком зависят от искусства и навыка оператора. При этом не исключена вероятность отрицательного влияния теплового облучения, гетерогенных рекомбинаций на границе плазма-биоткань, сил Керровской природы, образования избытка свободнорадикальных форм азота, кислорода, гидроперекисей, поражения ультрафиолетовым и СВЧ облучением, инициация повреждения биоструктур не только микрофлоры, но и тканей макроорганизма.

Для надежного перехода к практическому использованию новой плазменной технологии санации инфицированных ран требуются специальные устройства и способы для их использования.

Предлагаемый в настоящем исследовании подход направлен на разработку технического предложения по способу применения генератора низкотемпературной аргоновой плазмы для санации обширных инфицированных поверхностей ран и язв без опасности отрицательного воздействия на ткани человека и животных. Решение поставленной задачи предполагалось достигнуть за счет использования многоэлектродного СВЧ-генератора плазмы, обеспечивающего широкое поле облучения, порядка 30 мм на фиксированном расстоянии порядка 20 мм и при захвате поверхности до 60 мм при

увеличении расстояния до 60 мм. При этом параметры плазмы (ионный состав, температура не выше 36-40°C), положение облучателя относительно обрабатываемой раны и скорость протока рабочего газа должны были строго задаваться медицинским персоналом. Особое внимание в ходе выполнения исполнения проекта уделено новым способам диагностики и определения параметров низкотемпературной аргоновой плазмы (температура плазмы, спектральные характеристики излучения, ионный состав и т.п.). Наряду с контролируемым широким захватом поверхности, преимуществом применяемого НТП воздействия должна быть безболезненность облучения в течение 10-15 минут, достаточного для уничтожения патогенной микрофлоры, при минимизации сохранении жизнеспособности и стимуляции регенеративной активности клеток и тканей пациента.

### **Разработка общей программы проведения исследований.**

В настоящее время традиционная комплексная терапия обширных инфицированных ран и язв базируется на нескольких подходах, включающих освобождение раневой поверхности от микробного и тканевого детрита (созданы и испытываются новые виды скарификаторов) и применение антибиотиков (разрабатываются новые виды антимикробных воздействия с помощью антибиотиков, в том числе белковой природы обладающих широким спектром действия). После освобождения от микробного обсеменения подключаются трансплантационные технологии пересадки ауто- и ксенотрансплантатов, введение в рану мезенхимальных и других видов прогениторных стволовых клеток. Важным элементом, позволяющим и усилить антимикробную защиты организма и активировать трофику тканей является применение вазодилаторных и иммуномодулирующих средств, способствующих ускоренному течению процесс заживления и регенерации.

Новым шагом в комплексном лечении инфицированных ран стало применение новых подходов, использующих физические методы воздействия на патогенные микроорганизмы и состояние тканей в ранах. **Использование** НТАП, как ясно из вышеизложенного материала, может обеспечить одномоментное уничтожение микрофлоры в очаге облучения. Однако это вовсе не гарантирует дезинфекции. Дело в том, что не известно на какую глубину распространяется стерилизующее воздействие плазменного луча. Кроме того, всегда остается не обработанной значимая часть объекта, в частности окружающие поле облучения ткани, также колонизированные микроорганизмами. Следовательно, после уничтожения под лучом микрофлоры в ране фактически создается идеальный плацдарм - свободная «экологическая ниша» для заселения новой микрофлорой, как минимум из окружающей

чистое поле частично колонизированной ткани. Отсюда становится не ясным, по крайней мере, из опубликованных за рубежом исследований, каким должен быть курс облучения НТП (частота, промежутки, длительность и количество сеансов) для достижения санационного эффекта, а не только гибели микрофлоры под лучом. Приводимые авторами ряда работ данные об эффективности дезинфекции *in vitro* ничего не позволяют сказать по поводу эффективности дезинфекции *in vivo*.

Кроме того, важным компонентом воздействия НТАП являются свободные радикалы. Их качество, количество при использовании воздушной плазмы губительно, а в аргоновой плазме никем не исследовано. Однако опубликованные данные, которые мы проанализируем далее, дают основание полагать, что может быть избран такой диапазон генерации свободных радикалом при действии НТАП, который оказывает не столько разрушающее, сколько «целебное» воздействие.

Регуляторное и повреждающее действие свободных радикалов также как, и различные виды коротковолнового излучения являются издавна известными естественными факторами антимикробной защиты и модуляторами физиологической и регенераторной активности всех биологических тканей. Наиболее широко в литературе обсуждается повреждающее действие активных форм кислорода (АФК) с 1957 г [Тарусов, 1957, Ю.А.Владимиров и А.И.Арчаков, 1972] и активных форм азота (АФА). Регуляторное и повреждающее действие активных радикалов азота (АФА) и кислорода (АФК) определяется интенсивностью, местом и источниками их генерации. В условиях организма клетки-киллеры иммунной системы используют АФК и АФА для уничтожения бактерий, поврежденных клеток и клеток злокачественных опухолей. Основными механизмами при этом являются: усиление процессов ПОЛ в мембранах клеток [Radi, ea 1991] и липопротеинах сыворотки [Bult, ea 1996], повреждение митохондриальной и ядерной ДНК, инициация апоптозной гибели клеток [Khan, ea 1997, Loweth, ea 1997, Suzuki, ea 1996]. NO может модулировать развитие воспалительной реакции [Меньшикова ea 1997, Nath, ea 1997], его избыток стимулирует развитие вторичной альтерации не только поврежденных, но и здоровых клеток вокруг раны, может ингибировать окислительное фосфорилирование в митохондриях и синтез АТФ [Drapier ea 1988, Kurose, ea 1993]. Применение АФК и АФА как универсальных регуляторов процессов жизнедеятельности и эффекторов иммунной системы в терапевтических целях является чрезвычайно перспективным, но подразумевает необходимость контроля дозы и времени его воздействия на клетки и ткани, особенно при использовании внешних генераторов свободных радикалов. Использование новых генераторов низкотемпературной

газовой плазмы позволит решить одновременно несколько задач: уменьшения микробного обсеменения ниже критического уровня (без инициации новых полирезистентных штаммов), активацию иммунного ответа и кровотока а также процессов заживления.

Проведенный нами анализ клинического опыта военно-полевой и гнойной хирургии, [С.В.Грачев, 2001; В.К.Гостищев и др., 2001; В.И.Грушко, 2007] показал перспективность даже неконтролируемого использования газовой плазмы, обогащенной NO и АФК, в дезинфицирующих и лечебных целях для «стимуляции местного иммунного ответа, кровотока и ускорение заживления гнойных ран». Эмпирически найденный подход «дистанционного воздушно-плазменного воздействия» дал основание для разработки специального способа санации инфицированных ран и язв при помощи обогащенной свободными радикалами газовой плазмы. Показано, что плазменный генератор Atlas (ArthroCare, UK), в котором для генерации плазмы используется способ ионизации электропроводящей жидкости при температуре плазмы на выходе генератора 600-700°C, может при отдалении источника плазмы от объекта обеспечить снижение температуры до 40°C и при этом подавлять число прорастающих *in vitro* колоний микроорганизмов в миллион раз [Sladek R.E.J. и Stoffels E., 2005]. Оказалось, что летальная доза при воздействии низкотемпературной аргоновой плазмы для бактерий значительно ниже, чем повреждающая доза для культивируемых клеток животных [Sosnin E.A. et al., 2004]. Однако, кроме оксида азота на выходе данного генератора присутствуют ионы O-, O<sub>2</sub>-, OH-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и другие свободные радикалы, которые в высоких концентрациях оказывают негативное воздействие на клетки и ткани. NO может активировать PARP и ADP-рибозилирование (Moriya R. et al., 2000, Bal-Price A. and Brown G.C., 2000), вызывать разрывы ДНК, это приводит к некрозу, по-видимому, из-за истощения пула NAD и АТФ. Обычно считается, что взаимодействие радикалов NO и O<sub>2</sub>-приводит к появлению еще более ядовитого для клетки пероксинитрита (Маеда Х. и Акаике Т., 1998; Albina J.E. and Reichner J.S., 1998; Estevez A.G. et al., 1999). Однако, есть данные о том, что совместная инкубация клеток с NO и O<sub>2</sub> вызывает перекрестный защитный эффект, тогда как по отдельности оба радикала вызывают апоптоз или некроз (Брюне Б. и др., 1998).

В последние годы установлено, что реакция взаимодействия NO и O<sub>2</sub> происходит в естественных условиях при концентрировании NO и O<sub>2</sub> в гидрофобных участках биоструктур, где образуются молекулы N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, вовлекаемые в свою очередь в образование нитрозотиоловых производных низко- и высокомолекулярных SH-соединений. Обнаружено, что такого рода микрокатализ может быть поддержан сверхнизкими концентрациями

наноразмерной эмульсии перфторорганических соединений [Rafikova et al., 2004] - известным коммерческим препаратом - перфторан, разработанным в ИТЭБ РАН. Ранозаживляющий и противовоспалительный эффекты перфторана показаны во многих клинических работах [Маевский и др. 2001, E. Maevsky et al., 2001]. В связи с этим в последующем при применении низкотемпературной аргоновой плазмы планируется исследовать целесообразность использования перфторана в качестве модулятора уровня свободных радикалов и кровотока при обработке инфицированных ран и незаживающих язв.

Единственный в мире исследовательский образец стационарного генератора низкотемпературной плазмы для лечения обширных инфицированных ран и язв, созданный в 2007 г. Японо-Английской фирмой Adtec Plasma Technology Ltd. ([www.adtec-rf.com](http://www.adtec-rf.com)), находится на стадии испытаний в Институте внеземной физики Макса Планка в Германии. Образец Plasma Technology Ltd. является громоздким (при массе более 250 кг, с размерами 140x200x120см), стационарным дорогостоящим устройством (стоимостью более 250000 Евро), требующим для своей эксплуатации квалифицированного инженера, врача и средний медицинский персонал.

В результате реализации проекта будут разработаны способ и действующий макет устройства для применения низкотемпературной аргоновой плазмы с целью санации и стимуляции заживления обширных инфицированных ран и язв. Одновременно будет разработан способ применения низкотемпературной аргоновой плазмы для санации и стимуляции заживления обширных инфицированных ран и язв. Исследования, проводимые совместно в Объединенном институте высоких температур РАН под руководством академика В.Е. Фортова и в Институте внеземной физики Макса Планка (Мюнхен) под руководством профессора Gregor Morfill и доктора René Pompl, позволили предложить новый подход к созданию способа плазменной генерации для приборов медицинского назначения. Для создания плазменного потока предложено использовать многоэлектродный СВЧ-генератор, в котором в качестве плазмообразующего газа может быть использован высокоочищенный аргон (чистота 99,999%) с контролируемым введением добавок других газов таких, как CO<sub>2</sub>, N или воздух.. По сравнению с существующими в настоящее время способами генерации плазмы, такими как электрическая дуга (Плазон ОКБ «Факел, Россия) или ионизация электропроводящей жидкости (Atlas, ArthroCare, UK), данный способ позволит получать контролируемую по параметрам плазму, с заданным содержанием активных свободных радикалов, что обеспечит уменьшение их повреждающего действия в отношении животных тканей.

В данном исследовании будет применен мультидисциплинарный подход, включающий проведение физико-химических, микробиологических и медико-биологических исследований и конструкторской разработки. *Общая программа проведения исследований включает два основных блока работ:*

1. *Создание действующей модели генератора низкотемпературной аргоновой плазмы, содержащего систему компьютерного управления параметрами плазменной струи, контроля длительности облучения и положения излучателя и относительно раневой поверхности. Обеспечение биомедицинских исполнителей действующим макетом и затем действующей моделью генератора низкотемпературной аргоновой плазмы.* В рамках данного блока работ будут проведены расчет состава плазмы при работе генератора, и использование адаптированных методов диагностики низкотемпературной плазменной струи при атмосферном давлении, зондовых методов определения концентраций электронов и ионов в плазме при атмосферном давлении. Определение ионного состава и спектральных характеристик низкотемпературной аргоновой плазмы при разных режимах работы генератора.

2. *Адаптация в соответствии с медико-техническими требованиями параметров плазменной струи (температуры, скорости потока и ионного состава) и определение режимов использования созданного генератора, обеспечивающих надежную санацию ран, инфицированных сапрофитной и патогенной микрофлорой, при отсутствии или минимизации повреждающего воздействия на клетки покровных мягких тканей.* В рамках данного блока работ будет разработан и апробирован комплекс медико-биологических моделей для оценки воздействия *in vitro* и *in vivo* НТАП в целом и отдельных компонентов плазменного облучения (УФ и ИК излучения, продуктов взаимодействия плазменного луча с окружающим воздухом и биологическим объектом) по бактерицидной активности в отношении различных видов колонизирующих раневую поверхность микроорганизмов, по иммунному ответу периферической крови человека, по функциональной и пролиферативной активности культивируемых клеток тканей животных и человека, по течению заживления ожоговых и резаных ран у животных.

Будет разработано техническое предложение и проведена оценка и адаптация параметров плазменной струи (температура, скорость потока и ионный состав) согласно медико-техническими требованиями Росздрава. Ответственность за разработку технического предложения и обеспечения биомедицинских исполнителей макетом генератора

низкотемпературной аргоновой плазмы, содержащего систему компьютерного управления параметрами плазменной струи, контроля длительности облучения и положения излучателя и относительно раневой поверхности, оценку и адаптация параметров плазменной струи (температура, скорость протока и ионный состав) в соответствии с медико-техническими требованиями взял на себя ОИВТ РАН, также как и за, оптимизацию режимов работы макета, газового состава плазмы, обеспечение бесперебойной, безопасной и квалифицированной эксплуатации генератора при проведении биомедицинских исследований. Экспериментальная оптимизация режимов работы макета генератора низкотемпературной аргоновой плазмы, газового состава, длительности, частоты и количества сеансов облучения для достижения обеззараживания и ускорения заживления инфицированных ран в экспериментах на животных возложены на специалистов ОИВТ РАН, ИТЭБ РАН, ГУ НИИ ЭМ РАМН, ФГУ НИИ ФХМ. В процессе этой работы последовательно проводится серия медико-биологических испытаний, включающая исследование влияния параметров и режимов применения низкотемпературной аргоновой плазмы на жизнеспособность культивируемых *in vitro* патогенных микроорганизмов (грамм-положительные, грамм-отрицательные и полирезистентные бактерии) и на микробные биопленки. (НИИ ЭМ РАМН, ОИВТ РАН), и одновременно - на жизнеспособность, пролиферативную активность культивируемых *in vitro* клеток млекопитающих и кинетику свободнорадикальных реакций в тканевых препаратах (ИТЭБ РАН, ПушГУ), а также изучение влияния режимов применения низкотемпературной аргоновой плазмы на параметры клеточного иммунитета: функциональное состояние фагоцитирующих клеток, включая оценку кислородзависимой и кислороднезависимой бактерицидной активности, а также интерферонообразование в тестах *in vitro*. (ФГУ НИИ ФХМ). При моделировании санации и заживления раневого процесса у животных в случае поражения ран сапрофитной и патогенной резистентной микрофлорой будет изучено влияния курсового применения низкотемпературной аргоновой плазмы на динамику заживления ран, состояние про- и антиоксидантных систем крови и ткани, способность полиморфноядерных лейкоцитов генерировать цитотоксические свободные радикалы. (ИТЭБ РАН, НИИ ЭМ РАМН, ФГУ НИИ ФХМ, ОИВТ РАН, ПушГУ).

На основании анализа, обобщения и оценки полученных результатов исследований, будет оценена полнота решения поставленных задач, в том числе по безопасности и эффективности разработанных способов санации инфицированных ран при использовании низкотемпературной аргоновой плазмы в сравнении с современным научно-техническим

уровнем, разработаны рекомендации по использованию результатов проведенных НИР (ИТЭБ РАН, ОИВТ РАН, НИИ ФХМ, НИИ ЭМ РАМН). Будет разработан способ применения низкотемпературной аргоновой плазмы для обеззараживания и лечения гнойных ран, обеспечивающего (согласно п.4.1 технического задания) при длительности облучения 10-15 минут гибель около 80% патогенных микроорганизмов на поверхности раневого очага и уничтожение 99,99% культивируемых патогенных микроорганизмов при отсутствии поражающего воздействия на клетки и ткани млекопитающих *in vitro*. Будут испытаны дополнительные средства сопровождения плазменной терапии в виде предобработки ран и язв препаратом перфторан (коммерческий фармакопейный препарат, разработанный в ИТЭБ РАН) и последующей обработки раневой поверхности после сеанса облучения дезинфицирующим временным раневым покрытием «Биокол» (коммерческий препарат, разработанный в ИТЭБ РАН).

По результатам проведенных исследований будут разработаны режимы и методических рекомендаций по использованию генератора низкотемпературной аргоновой плазмы (экспозиция, повторность и интервалы между сеансами обработки) для санации обширных инфицированных ран: достижение дезинфицирующего эффекта и активация процессов заживления на животных моделях (ОИВТ РАН, ИТЭБ РАН, НИИ ФХМ, НИИ ЭМ РАМН, ПушГУ). Будут разработаны методические рекомендации для обучения медтехнического персонала способу и навыкам использования генератора низкотемпературной газовой плазмы (ОИВТ РАН, ИТЭБ РАН, ПушГУ). Для закрепления приоритетности прав на созданную интеллектуальную собственность будут проведены патентные исследования по ГОСТ 15.011-96, оценка возможности создания конкурентоспособной продукции и услуг, поданы соответствующие заявки на изобретения.

Для представления в Комитет по новой медицинской технике Росздрава создаваемых способа и генератора согласно принятым нормативам, для последующей их сертификации будут разработаны совместно с будущими клиническими соисполнителями и производителями медико-технических требований на способ применения и генератор низкотемпературной аргоновой плазмы, предназначенные для санации обширных инфицированных ран и язв согласно нормативам Росздрава.

Разработка способа применения низкотемпературной аргоновой плазмы для уничтожения патогенных микроорганизмов в комплексной терапии обширных инфицированных ран и хронически незаживающих язв может стать основой создания новых технологий лечения различных инфекционных поражений: посттравматических и ожоговых ран, трофических

язв. Наряду с этим могут быть разработаны технологии обеззараживания и лечения остеомиелитных поражений, оппортунистических инфекций, стерилизации трансплантатов, компонентов и препаратов донорской крови, операционных ран. Новый способ позволит существенно уменьшить системное и местное использование дорогостоящих и токсичных антибиотиков, а также химических стерилизующих агентов, в том числе при непереносимости, аллергии, наличии антибиотикоустойчивой микрофлоры, сократить сроки лечения инфицированных ран и язв. Будет снижена бактериальная нагрузка в операционных блоках и пунктах переливания крови.

На основе анализа литературного материала и собственного опыта, ранее проведенных экспериментальных исследований нами была сформулирована следующая цель проекта создание способа и устройства, обеспечивающих применение низкотемпературной аргонной плазмы для санации обширных инфицированных ран и язв: уничтожение микроорганизмов на раневой поверхности и ускорение процессов заживления.

Для достижения поставленной цели решаются следующие задачи:

1. Разработка технического предложения и обеспечение биомедицинских исполнителей макетом генератора низкотемпературной аргонной плазмы, содержащим систему компьютерного управления параметрами плазменной струи, контроля длительности облучения и положения излучателя и относительно раневой поверхности. Оценка и адаптация параметров плазменной струи (температура, скорость протока и ионный состав) в соответствии с медико-техническими требованиями.
2. Оптимизация режимов работы созданного макета генератора низкотемпературной аргонной плазмы, газового состава, длительности, частоты и количества сеансов облучения для достижения обеззараживания и ускорения заживления инфицированных ран в экспериментах на животных.
3. Исследование влияния параметров и режимов применения низкотемпературной аргонной плазмы на жизнеспособность культивируемых *in vitro* патогенных микроорганизмов (грамм-положительные, грамм-отрицательные и полирезистентные бактерии) и микробные биопленки.
4. Исследование влияния параметров и режимов применения низкотемпературной аргонной плазмы на жизнеспособность, пролиферативную активность культивируемых *in vitro* клеток млекопитающих и кинетику свободнорадикальных реакций в тканевых препаратах.

5. Исследование влияния режимов применения низкотемпературной аргоновой плазмы на параметры клеточного иммунитета: функциональное состояние фагоцитирующих клеток, включая оценку кислородзависимой и кислороднезависимой бактерицидной активности, а также интерферонообразование в тестах *in vitro*.
6. Изучение влияния курсового применения низкотемпературной аргоновой плазмы на динамику заживления ран, состояние про- и антиоксидантных систем крови и ткани, способность полиморфноядерных лейкоцитов генерировать цитотоксические свободные радикалы при моделировании раневого процесса у животных в случае поражения ран сапрофитной и патогенной резистентной микрофлорой.
7. Разработка способа применения низкотемпературной аргоновой плазмы для обеззараживания и лечения гнойных ран, обеспечивающего при длительности облучения 10-15 минут гибель около 80% патогенных микроорганизмов на поверхности раневого очага и уничтожение 99,99% культивируемых патогенных микроорганизмов при отсутствии поражающего воздействия на клетки и ткани млекопитающих *in vitro*.
8. Разработка режимов и методических рекомендаций по использованию генератора низкотемпературной аргоновой плазмы (экспозиция, повторность и интервалы между сеансами обработки) для санации обширных инфицированных ран: достижение дезинфицирующего эффекта и активация процессов заживления на животных моделях.
9. Разработка медико-технических требований на способ применения генератора низкотемпературной аргоновой плазмы, предназначенный для санации обширных инфицированных ран и язв согласно нормативам Росздрава.

Таким образом, в результате реализации данного проекта будет создан действующий макет генератора низкотемпературной аргоновой плазмы и разработан способ его применения для обеззараживания и лечения гнойных ран. На основании полученных данных будут сформулированы медико-технические требования на способ применения низкотемпературной аргоновой плазмы и соответствующее устройство.

Внедрение данной технологии позволит значительно снизить тяжесть и длительность заболевания, сократить процент инвалидизации и долю летальных исходов при лечении инфицированных ран и хронически незаживающих язв. По сравнению с дорогой и не всегда эффективной антимикробной терапией, применяемой в настоящее время в клиниках, новый

подход к лечению труднозаживающих инфицированных ран будет обладать большей эффективностью и универсальностью.

Работы по проекту, в частности способы решения перечисленных задач, будут осуществлены в рамках существующих норм и стандартов.

### **Заключение по анализу нормативной документации .**

В рамках госконтракта предусматривается создание действующего макета (опытного образца) прибора с условным названием «Генератор низкотемпературной аргоновой плазмы для санации ран», предназначенного для санации (уменьшения микробного колонизации рана и язв антибиотикорезистентными и других штаммами патогенный и условно-патогенных микроорганизмов, а также для ускорения заживления) ран и язв различного генеза.

Область создания новой медицинской техники в Российской Федерации регулируется следующими нормативными актами:

1. ГОСТ Р 15.013-94 «Система разработки и постановки продукции на производство. Медицинские изделия», введен в действие Постановлением Госстандарта России от 21 апреля 1994 г., № 118;
2. Приказ Минздравсоцразвития Российской Федерации от 30 октября 2006 г. № 735 «Об утверждении Административного регламента Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по регистрации изделий медицинского назначения»;
3. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (Росздравнадзор) № 3731-Пр/07 от 9 ноября 2007 г. «О введении в действие номенклатурного классификатора изделий медицинского назначения»;
4. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (Росздравнадзор) № 01И-71/08 от 27 февраля 2008 г. «О перечне организаций, осуществляющих проведение технических испытаний изделий медицинского назначения отечественного и зарубежного производства для целей регистрации»;
5. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (Росздравнадзор) № 01И-66/08 от 27 февраля 2008 г. «О перечне организаций, осуществляющих проведение медицинских испытаний изделий медицинского назначения отечественного и зарубежного производства для целей регистрации»;

6. Перечень экспертных организаций, уполномоченных Росздравнадзором на проведение экспертизы качества, эффективности и безопасности изделия медицинского назначения от 01 января 2008 г.
7. Информационное письмо Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (Росздравнадзор) № 01И-605/08 от 17 сентября 2008 г. «О порядке направления запросов с целью подтверждения целевого назначения изделий медицинского назначения».

Анализ имеющейся нормативной документации показал, что для выполнения условий госконтракта № 02.512.12.2023 и требований государственных регулирующих органов необходимо провести следующие работы:

1. Разработка проекта медико-технических требований (МТТ) к прибору с условным названием «Генератор низкотемпературной аргоновой плазмы для санации ран» (ГНТАП) в соответствии с требованиями ГОСТ Р 15.013-94.
2. В последующем при проведении ОКР и создании образцов прибора необходимы:
  - 2.1. Разработка конструкторской документации прибора ГНТАП.
  - 2.2. Изготовление трех опытных образцов прибора ГНТАП.
  - 2.3. Проведение предварительных технических и медицинских испытаний прибора ГНТАП. по существующим требованиям к изделиям медицинской техники и МТТ
  - 2.4. Написание технических условий и регламентной документации, необходимой для проведения государственной регистрации
  - 2.5. Проведение государственной регистрации:
    - I. В соответствии с приказом Минздравсоцразвития Российской Федерации от 30.10.2006 №735 «Об утверждении Административного регламента Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по регистрации изделий медицинского назначения» подготовить первичный пакет документации для регистрации нового медицинского прибора и представить его в Федеральную службу по надзору в сфере здравоохранения и социального развития для регистрации изделий медицинского назначения.

Представляемый пакет включает в себя следующие документы:

1. опись представляемых документов установленного образца в 2 экз. (образец прилагается);
2. заявление о регистрации изделия медицинского назначения установленного образца в 2 экз. (образец прилагается);

3. документ установленного образца, свидетельствующий об оплате государственной пошлины (образец прилагается);
4. справка установленного образца об изделии медицинского назначения (образец и рекомендации прилагаются);
5. документы, подтверждающие регистрацию организации-изготовителя в качестве юридического лица (в том числе выписку из Единого государственного реестра юридических лиц) (требования к документам прилагаются);
6. доверенность установленного образца или заверенную копию договора в том случае, если заявителем не является изготовитель изделия медицинского назначения (образец прилагается);
7. документы, подтверждающие соответствие условий производства изделия медицинского назначения требованиям законодательства Российской Федерации (могут представляться сертификаты на систему качества или производства (ISO 9001:2000), а также акт квалификационных испытаний) (перечень документов прилагается);
8. проект нормативного документа вместе с документами, подтверждающими соответствие изделия медицинского назначения его требованиям, либо требованиям технических условий, либо стандартов (протоколы всех испытаний) (образец и рекомендации прилагаются);
9. руководство по эксплуатации изделия медицинского назначения (требования к документу прилагаются);
10. проект инструкции по медицинскому применению при регистрации физиотерапевтических аппаратов и реагентов (наборов) для диагностики (in vitro), самостоятельно используемых конечным потребителем (образец прилагается).

**Требования к представляемым документам для регистрации прибора:**

а) Все документы для регистрации изделия медицинского назначения должны быть заверены подписью и печатью уполномоченного лица Заявителя (включая протоколы испытаний).

б) Все документы для регистрации изделия медицинского назначения должны представляться на русском языке, либо иметь заверенный перевод на русский язык.

в) Копии документов должны быть четкими, читаемыми, включая имеющиеся на них печати и подписи.

г) Документы представляются в папке (скоросшивателе), каждый документ должен находиться в отдельном файле и располагаться строго по описи.

д) Оформленные регистрационные удостоверения выдаются уполномоченному представителю Заявителя строго по доверенности.

е) Все документы должны представляться в двух экземплярах - на электронном (в формате Word) и бумажном носителях.

ж) Документы, свидетельствующие о результатах технических испытаний, оценки безопасности и медицинских испытаний эффективности и безопасности изделия медицинского назначения должны содержать в себе следующие сведения:

- определение вида и объекта исследований (по применимости) (технические испытания физических свойств изделия; микробиологические исследования; токсикологические исследования; иммунобиологические исследования; исследования биоэквивалентности; исследования эффективности; исследования стабильности (определение срока годности) и пр.);
- заключение исследователя по результатам проведенных исследований;

з) Документы, свидетельствующие о результатах медицинских испытаний эффективности и безопасности изделия медицинского назначения должны включать в себя:

- протокол исследований;
- обобщенную информацию об эффективности и безопасности изделия; побочных реакциях и осложнениях; поломках изделия медицинского назначения в ходе медицинских испытаний, приведших к ремонту или замене;
- сведения о пациентах, принимавших участие в испытаниях (количество, пол, возраст, диагноз) включая подтверждение наличия письменного согласия пациентов на участие в исследованиях;
- жалобы пациентов;
- количественные сведения для каждого пациента, изложенные в табличной форме;
- результаты статистической обработки полученных в ходе исследования данных.

Рекомендации для составления справки об изделии медицинского назначения (п. 4 Перечня документов)

Справка об изделии медицинского назначения должна содержать в себе следующую информацию:

- описание изделия;

- описание принципа действия изделия, либо ссылку на научно обоснованный механизм его действия;
- сведения обо всех имеющих отношение к принципу действия (или механизму действия) функциональных характеристиках изделия, таких как его дизайн, используемые материалы и физические свойства;
- информацию о сферах применения изделия, включая краткое описание заболеваний или состояний человека, при которых данное изделие может использоваться для диагностики, лечения, профилактики, или улучшения состояния, включая, по возможности, определение частоты встречаемости таких заболеваний или состояний.

#### **Рекомендации для составления нормативного документа (п. 8 Перечня документов)**

Нормативный документ на изделие медицинского назначения – (заполняется заявителем и не имеет официально утвержденной формы изложения) представляет собой документ, свидетельствующий об особых свойствах изделия, наиболее полно и специфически характеризующих его назначение и применение (принцип или механизм действия, функциональное назначение, характеристики эффективности, достоверность параметров, физических или химических свойств используемых материалов и т.д.).

Данный документ призван специфически охарактеризовать изделие медицинского назначения, его новизну или подтвердить эквивалентность или тождественность уже зарегистрированному аналогу.

Основой для его составления являются:

- паспорт изделия,
- техническая документация,
- протоколы технических, медицинских и др. испытаний.

Нормативный документ должен быть подписан ответственным лицом и содержать следующие разделы:

1. Назначение изделия.
2. Особые свойства изделия, специфические характеристики, присущие только этому изделию.
3. Техническая спецификация (описание изделия, какие модификации выпускаются, применяемые материалы, перечень химических веществ, из каких блоков состоит изделие (для мед. техники), требования относительно качества (физико-механические показатели),

чистота относительно микробов, методы исследований, описание транспортной и потребительской маркировки и упаковки, условия хранения и гарантийные сроки.

4. Транспортировка.

5. Упаковка.

6. Хранение и срок годности.

Примечание: к нормативному документу применяются установленные нормы заверения.

II. Представленный пакет документов рассматривается в соответствии с Административным регламентом Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по регистрации изделий медицинского назначения (Приказ Минздравсоцразвития Российской Федерации от 30 октября 2006 г. № 735), проводятся необходимые экспертизы и принимается решение о государственной регистрации изделия медицинского назначения. Документом, подтверждающим факт регистрации изделия медицинского назначения, является регистрационное удостоверение. Регистрационное удостоверение действительно при условии сохранения в неизменности всех изложенных в нем сведений об изделии медицинского назначения и о лице, на имя которого изделие медицинского назначения зарегистрировано. Срок действия регистрационного удостоверения не ограничен.

III. После получения регистрационного удостоверения необходимо проведение сертификации прибора согласно установленным требованиям.

## 2. Материалы и методы

### Штаммы микроорганизмов.

В течение 2007-2008 годов в лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций ГУНИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи РАМН собрана коллекция штаммов *P.aeruginosa* и *S.aureus*, включающая около 1000 изолятов, из которой для исследования были отобраны 21 культура *P.aeruginosa* и 24 культуры *S.aureus*, включая референс-штаммы PA 103 и *S aureus* 6538P. Изоляты были выделены из образцов, полученных из клиники Республиканской детской больницы, Института трансплантологии и искусственных органов РАМН от больных отделения реанимации после хирургических вмешательств, связанных с трансплантацией органов, также от амбулаторных пациентов (таб. 5, 6).

Штаммы выращивали при T° 30° C в течение 18 часов на L - агаре. Идентификацию штаммов проводили с использованием коммерческих биохимических тестов (api 20 NE “bio Merieux”, E/NF “BBL CRYSTAL”).

Таблица 5. Характеристика клинических штаммов *P.aeruginosa*, использованных в работе.

| №  | отделение                                                              | источник                             | Клинические проявления | Лабораторный №         | Дата      |
|----|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|-----------|
| 1. | Отделение Генетики Республиканской детской клинической больницы (РДКБ) | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 90                     | 2006-2007 |
| 2  | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 13Г                    | 2006-2007 |
| 3  | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 34м                    | 8.07.07   |
| 4  | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 16                     | 11.07.06  |
| 5  | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 18 Pa <sub>2</sub> (2) | 11.07.06  |
| 6  | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 80                     | 3.07.07   |
| 7  | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с                | пневмония              | 12                     | 2006-2007 |

|    |                                                       |                                            |             |        |               |
|----|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------|--------|---------------|
|    |                                                       | муковисцидозом                             |             |        |               |
| 8  | Отделение<br>Генетики РДКБ                            | Мокрота от<br>пациента с<br>муковисцидозом | пневмония   | 30     | 2006-<br>2007 |
| 9  | Отделение<br>Генетики РДКБ                            | Мокрота от<br>пациента с<br>муковисцидозом | пневмония   | 19     | 2006-<br>2007 |
| 10 | Отделение<br>Генетики РДКБ                            | Мокрота от<br>пациента с<br>муковисцидозом | пневмония   | 29     | 2006-<br>2007 |
| 11 | Отделение<br>Генетики РДКБ                            | Мокрота от<br>пациента с<br>муковисцидозом | пневмония   | 91     | 2006-<br>2007 |
| 12 | Отделение<br>Генетики РДКБ                            | Мокрота от<br>пациента с<br>муковисцидозом | пневмония   | 53     | 2006-<br>2007 |
| 13 | Отделение<br>Генетики РДКБ                            | Мокрота от<br>пациента с<br>муковисцидозом | пневмония   | 50     | 2006-<br>2007 |
| 14 | Ин-т<br>трансплантологии<br>, отделение<br>реанимации | Кровь от<br>больного                       | септицемия  | 36     | 2006          |
| 15 | Ин-т<br>трансплантологии<br>, кардиохирургия          | Отделяемое из<br>трахеи                    | пневмония   | 1      | 10.200<br>6   |
| 16 | Ин-т<br>трансплантологии<br>, кардиохирургия          | Отделяемое из<br>бронхоскопа               | пневмония   | 5      | 10.200<br>6   |
| 17 | Ин-т<br>трансплантации                                | кровь                                      | септицемия  | 4      | 10.200<br>6   |
| 18 | Ин-т<br>трансплантологии<br>, хирургия                | моча                                       | пиелонефрит | 2      | 10.200<br>6   |
| 19 | Ин-т<br>трансплантологии<br>, хирургия                | кровь                                      | септицемия  | 3      | 10.200<br>6   |
| 20 | Ин-т<br>трансплантологии<br>, хирургия                | Отделяемое из<br>нефростомы                | пиелонефрит | 14     | 10.200<br>6   |
| 21 | Коллекция<br>лаборатории                              | -                                          | -           | РА 103 | -             |

Таблица 6. Характеристика клинических штаммов S.aureus, использованных в работе.

| №   | отделение                                                              | источник                             | Клинические проявления | Лабораторный № | Дата      |
|-----|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|----------------|-----------|
| 1.  | Отделение Генетики Республиканской детской клинической больницы (РДКБ) | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 31             | 2006-2007 |
| 2   | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 30             | 2006-2007 |
| 3   | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 42             | 2006-2007 |
| 4   | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 21             | 2006-2007 |
| 5   | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 53             | 2006-2007 |
| 6   | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 87             | 2006-2007 |
| 7   | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 70             | 2006-2007 |
| 8   | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 46             | 2006-2007 |
| 9   | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 80             | 2006-2007 |
| 10  | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 6м             | 2006-2007 |
| 11  | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 22             | 2006-2007 |
| 12  | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 24             | 2006-2007 |
| 13  | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 50             | 2006-2007 |
| ,14 | Отделение Генетики РДКБ                                                | Мокрота от пациента с муковисцидозом | пневмония              | 52             | 2006-2007 |
| 15  | Амбулаторные                                                           | кал                                  | дисбактериоз           | 78             | 09.200    |

|    |                       |           |              |       |         |
|----|-----------------------|-----------|--------------|-------|---------|
|    | пациенты              |           |              |       | 8       |
| 16 | Амбулаторные пациенты | кал       | дисбактериоз | 81    | 09.2008 |
| 17 | Амбулаторные пациенты | кал       | дисбактериоз | 89    | 09.2008 |
| 18 | Амбулаторные пациенты | кал       | дисбактериоз | 85    | 09.2008 |
| 19 | Амбулаторные пациенты | Из зева   | обследование | 800   | 09.2008 |
| 20 | Амбулаторные пациенты | Из уретры | обследование | 738   | 09.2008 |
| 21 | Амбулаторные пациенты | Из уретры | обследование | 741   | 09.2008 |
| 22 | Амбулаторные пациенты | Из носа   | обследование | 754   | 09.2008 |
| 23 | Из коллекции          | -         | -            | 6538P | -       |

### Характеристика штаммов.

Штаммы охарактеризованы по морфологическим, биохимическим, микробиологическим свойствам.

**Гемолитическая активность.** Гемолитическую активность штаммов проверяли при добавлении 1.5% взвеси эритроцитов кролика и при высеве штрихом на 5% кровяном агаре. О гемолитической активности судили по зонам гемолиза вокруг колоний исследуемых штаммов на кровяном агаре. Клетки высевали уколом в толщу агара и выращивали при 28 °С и 37°С от 2 до 8 суток.

**Чувствительность к антимикробным препаратам.** Чувствительность к антимикробным препаратам определяли дискодиффузионным методом (ДДМ). Для определения чувствительности штаммов к антибиотикам использовали агар Мюллера-Хинтона (HiMedia). Использовали стандартный инокулюм, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту МакФарленда и содержащий примерно  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл. Далее стандартный инокулюм наносили пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 1 -2 мл, равномерно распределяли по поверхности, после чего удаляли избыток инокулюма пипеткой. Чашки помещали в термостат и инкубировали при температуре 35°С в течение 18-24 часов. В работе использовали диски фирм BioMerueux (Франция) и HiMedia (Индия).

**Оценка эффективности образования биопленок.** Образование биопленок (БП) изучали с помощью определения способности бактерий к адгезии на поверхности 96-луночной полистероловой планшете (15). Штаммы выращивали на L агаре

(“Difco”США) при 30° С в течение 48 часов. Далее полученные культуры высевали в L-бульон (“Difco” США) и инкубировали в течение 2 суток при 30° С. Затем готовили разведения ночной культуры 1/100, 1/1000 и инокулировали в лунки 96-луночной панели микропипеткой-дозатором по 150 мкл в 4-х повторностях. В качестве отрицательного контроля вносили по 150 мкл L-бульона. Количество инокулированных планктонных клеток подчитывали на спектрофотометре (СПФ) (длина волны 540) и выражали в условных единицах оптической плотности (ОП). Далее планшет закрывали крышкой и инкубировали при 30°С в течение 48 часов в закрытом влажном контейнере (экзикатор с притертой крышкой). Через 24 и 48 часов инкубации проводили подсчет количества клеток.

Из лунок панели удаляли планктонные клетки (микроорганизмы) и окрашивали пленки. Для этого в лунку аккуратно (не взбалтывая) вносили 150 мкл дистиллированной воды и 20 мкл 1% кристалл-виолета и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. После тщательного трехкратного промывания дистиллированной водой в лунки для перевода краски в спирт добавляли 200 мкл 96 % этанола. Размер БП был определен измерением абсорбции (оптической плотности - ОП) конечного раствора при длине волны 540 нм. Интенсивность окрашивания содержимого лунок соответствовала степени пленкообразования. Количественным выражением степени образования БП служили значения ОП, измеряемые на спектрофотометре.

***Адаптация методов оценки микробного обсеменения раневых поверхностей in vivo в экспериментах на животных. Определение микрофлоры кишечника взрослых крыс линии CD.***

200 мг фекалий взрослой крысы были суспендированы в 2 мл физиологического раствора для получения исходного разведения материала  $10^{-1}$ . Из исходного разведения делают дополнительные разведения в физиологическом растворе  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ . Из приготовленных разведений делают дозированные посеvy на питательные среды для культивирования различных групп микроорганизмов (таблица 8).

Для выявления и подсчета количества бифидобактерий, лактобактерий, кишечной палочки, клостридий, стафилококков, дрожжеподобных грибов рода Candida использовали селективные питательные среды (среда для бифидобактерий, MRS-агар, Эндо, Вильсона-Блера, ЖСА, Сабуро-агар).

Таблица 7. Схема посева разведений на питательные среды.

| Разведение материала         | Посевная доза | Среды                                                                           |
|------------------------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| $10^{-1}$                    | 0,05 мл       | Желточно-солевой агар, Сабууро.                                                 |
| $10^{-3}$                    | 0,05 мл       | Желточно-солевой агар, кровяной агар, Эндо, среда для лактобактерий (MRS-агар), |
|                              | 0,5 мл        | среда для клостридий (4,5 мл).                                                  |
| $10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$  | 0,5 мл        | среда для клостридий (4,5 мл).                                                  |
| $10^{-7}$                    | 0,05 мл       | Кровяной агар, Эндо, MRS-агар.                                                  |
| $10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}$ | 0,5 мл        | Среда для бифидобактерий (4,5мл).                                               |
| $10^{-11}$                   |               |                                                                                 |

Все среды инкубируют при 37°C 24-48 часов; чашки со средой Сабууро оставляют после этого еще на 2 суток при комнатной температуре.

После ночной инкубации производят подсчет колоний каждого вида аэробных организмов (колонии анаэробов подсчитывают через 48 ч.) на плотных питательных средах с учетом степени разведения кала и величины посевной дозы по формуле:

$$M = N \times 10^{n+1},$$

где M – число микробов в 1 г кала; N- число выросших на чашке колоний; n - степень разведения материала.

Количество грамположительных анаэробных стрептококков, бифидобактерий и бактероидов определяют после выращивания бактерий на бифидум среде по наличию характерных клеток в мазках, сделанных из соответствующих разведений и окрашенных по Грамму.

Количество клостридий определяют по изменению цвета среды Вильсен-Блера в пробирке с наибольшим разведением материала.

Проводили также идентификацию бактерий семейства Enterobacteriaceae, относящихся к условно-патогенным бактериям и входящих в состав родов Klebsiella, Proteus, Enterobacter, Serratia, Morganella, Citrobacter, используя идентификационные диагностические тест-системы «Entero-24» фирм “Biomerue” (Франция) и “La Chema (Чехия).

Представителей неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов (Pseudomonas spp., Acinetobacter spp. и другие) идентифицировали с помощью диагностических тест-систем фирм “Biomerue” (Франция) и “La Chema (Чехия) – “API 20 NE” и “NE -FERMtest”.

### *Культуры клеток*

Исследования проводились на линиях клеток из коллекции клеточных культур Института Биофизики Клетки РАН:

Vero - эпителиальные клетки, полученные из клеток почки зеленой африканской мартышки ((Flow Laboratories, Великобритания, Nippon Rinsho 1963, 21,1209);

NCTC clone L929 - фибробласты, полученные из клеток подкожной соединительной ткани мышей C3H/An (Flow Laboratories, Великобритания, J. Nat.Cancer Inst. 1948, 9, 229);

HF- Эмбриональные фибробласты человека (первичная культура)

Среда Игла в модификациях 199 и Дальбекко (DMEM), L-глутамин, растворы трипсина и Версена были приобретены в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН. В работе были использованы эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС), 0,4% раствор трипанового синего производства "Sigma", а также пенициллин и стрептомицин производства ОАО "Биосинтез", г. Москва. Для культивирования клеток использовали пластиковую посуду (планшеты, флаконы и чашки Петри) производства фирм "Nunc" и "Costar". Клетки культивировали в среде DMEM/199 (1:1), содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), 50мкг/мл пенициллина, 50мкг/мл стрептомицина и 1% L-глутамина при 37°C во влажной атмосфере при 5% CO<sub>2</sub>. Посев клеток на поверхность культуральных планшетов проводили с плотностью 20 тыс/см<sup>2</sup>. Наблюдение за морфологией, подсчет клеток и микрофотосъемку проводили на инвертированном микроскопе проходящего света Leica LEITZ DMIL с использованием метода фазового контраста.

Для *выделения эмбриональных фибробластов* человека использовали кожно-мышечную ткань зародышей 6-8 недельной гестации (абортный материал). Ткань промывали в среде DMEM/199 с обычным содержанием антибиотиков (50 мкг/мл), тщательно измельчали глазными ножницами до размеров менее 1 мм<sup>2</sup> и переносили в центрифужную пробирку. Кусочки ткани осаждали центрифугированием при 200g в течение 2 мин, переносили в пенфлакон и проводили диспергирование протеолитическими ферментами (0,25% трипсином) в течение 25-30 минут при температуре 37°C при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки до

получения гомогенной суспензии клеток. Далее для инактивации фермента добавляли 1% сыворотки, переносили материал в центрифужную пробирку и центрифугировали при 200g в течение 2-3 мин. Осторожно отбирали надосадочную жидкость пипеткой, а осадок ресуспендировали в среде ДМЕМ/199, содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS HyClone). Клетки высевали во флаконы (Nunc) с плотностью 50 тыс/см<sup>2</sup> и культивировали в термостате при 37°C. Пассирование клеток (1:2) осуществляли по достижении ими состояния монослоя (через 6-7 суток). Клетки культивировали в среде ДМЕМ/199 (1:1) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 50мкг/мл пенициллина, 50мкг/мл стрептомицина и 1% L-глутамина при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5%CO<sub>2</sub>. В экспериментах была использована культура клеток HF на 11 пассаже.

Для **приготовления суспензии** клетки ополаскивали средой ДМЕМ, не содержащей сыворотки, и добавляли раствор трипсина, смешанный с раствором Версена в пропорции 1:1. После трехминутного выдерживания при 37°C раствор трипсин-версена сливали, клетки суспендировали в среде культивирования. Определение числа клеток в суспензии проводили, используя гемоцитометр Горяева. Подсчет проводили по 5 полям (20-100 клеток в каждом) и определяли среднее значение. Проводили не менее 2 независимых подсчетов, (при расхождении средних значений двух подсчетов более чем на 25% проводили перемешивание суспензии и повторное определение числа клеток). Подсчет живых клеток в культуре проводили путем добавления  $\frac{1}{4}$  объема 0.4% раствора трипанового синего к аликвоте суспензии клеток, полученной после обработки раствором трипсин-версена. Жизнеспособность клеток определяли как отношение числа окрашенных (мертвых) клеток к общему числу клеток в суспензии, выраженное в процентах.

Для **определения жизнеспособности культивируемых клеток** был применен МТТ-тест, основанный на восстановлении бесцветной соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ) митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана, растворимого в диметилсульфоксиде. Клетки высевали в лунки 48-ми луночного планшета в концентрации 20 тыс. кл./см<sup>2</sup> в среде ДМЕМ/199, содержащей 5% FBS. Через сутки в среду вносили по 25 мкл раствора МТТ (5мг/мл в растворе PBS [150 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,2, 150 мМ NaCl], профильтрован через фильтры с диаметром пор 0,2 мкм). После выдерживания в течение 3 часов при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> жидкость удаляли, вносили по 125 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и, встряхивая планшеты при комнатной температуре в

течение 5 мин, растворяли образовавшиеся соли формазана. Развитие окраски регистрировали путем измерения оптической плотности при длине волны 540 нм в лунках 96 луночного планшета (100 мкл. раствора на лунку) с помощью фотометра (модель 680 BIO-RAD, Россия). Число параллельных экспериментов составляло не менее трех. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Origin, за достоверные принимали различия средних величин по t-критерию Стьюдента при  $p < 0,05$ .

**Коллаген типа I** экстрагировали из сухожилий хвоста крыс 0.5М раствором уксусной кислоты. После доведения нейтрализации экстракта до  $pH=7.0$  путем добавления водного раствора аммиака, проводили осаждение коллагеновых фибрилл 96% этанолом (20 объемных %). После центрифугирования при 5000 g,  $5^{\circ}C$  в течение 30 минут осадок коллагена растворяли в 0.1М уксусной кислоте. Концентрацию белка определяли по сухому весу, после высушивания в вакуумном шкафу. В работе был использован стоковый раствор коллагена с концентрацией белка 6 мг/мл. Раствор коллагена смешивали со средой культивирования, доводили pH до нейтрального путем добавления 1М раствора NaOH. Иммобилизация клеток в объеме геля проводилась путем смешивания суспензии клеток с гелеобразующим раствором перед прогревом смеси при  $37^{\circ}C$ . Соотношение компонентов смеси рассчитывалось исходя из конечной концентрации коллагена 1 мг/мл и концентрации клеток 250 тыс./мл.

**Облучение культур клеток**, культивируемых на поверхности планшетов и иммобилизованных в матрикс коллагенового геля проводили со стороны дна культуральной посуды (толщина слоя полистирола 1 мм), обеспечивая освещение УФ-светом в течение заданного времени (1, 3 и 10 минут). В качестве источника ультрафиолетового света служила импульсная ультрафиолетовая установка «Альфа-05» (НПП Мелитта), источником света в которой является ксеноновая лампа ИНП 5/120. Средний бактерицидный поток, излучаемый установкой, составляет 3,5 Вт, средняя плотность потока при облучении клеток составляла  $1 мВт/см^2$ . В качестве источника красного и инфракрасного света были использованы фотонные матрицы Коробова «Барва-Флекс», представляющие собой монохромные излучатели инфракрасного (840-890 нм) и красного (630-660 нм) участков спектра. Облучение культур проводили через 3 часа после посева клеток, плотность посева клеток составляла 20 тыс./ $см^2$ . Схема проведения экспериментов включала использование следующих режимов облучения:

1. УФ-излучение,  $1 мВт/см^2$ , 1,3 и 10 мин,
3. Красный свет,  $\lambda=630-660$  нм,  $40 мВт/см^2$ , 30 мин.
4. ИК-излучение,  $\lambda=840-890$  нм,  $40 мВт/см^2$ , 30 мин

5. УФ-свет 10 мин затем через 1 час красный свет, 30 мин.

6. УФ-свет 10 мин затем через 1 час ИК-излучение 30 мин

В качестве контроля использовались интактные клетки, не подвергавшиеся воздействию излучения.

### Методы оценки функциональной активности нейтрофилов

**Определение восстановления нитросинего тетразолия фагоцитирующими клетками спектрофотометрически (НСТ-тест).** В основе метода лежит способность восстановления поглощенного фагоцитом красителя нитросинего тетразолия в нерастворимый диформаза под влиянием активных форм кислорода. Измерения проводили в цельной крови. В 96-луночные плоскодонные планшеты для иммуноферментного анализа (произв. «Медполимер», СПб) вносили 50 мкл цельной крови 20 мкл 0,2% раствора НСТ (произв. «ДИАЭМ») в дистиллированной воде на лунку и 20 мкл стандартного PBS. Инкубировали 60 мин при 37°C, при постоянном встряхивании 200 об/мин на шейкере АВТ Медикэлс. После клетки троекратно отмывали и фиксировали 96% этиловым спиртом, 100мкл на лунку, в течение 30 мин. остатки спирта удаляли декантированием, планшет высушивали. Растворяли осадок в 250 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) (произв. «SIGMA»). Оптическую плотность измеряли при  $\lambda=450\text{nm}$ . (Модификация метода Р.М.Хаитов, Б.В. Пинегин, Х.И. Истамов «Экологическая Иммунология» М., 1995г). Полученные значения принято оценивать в условных единицах (у.е.):

- до 70 у.е. – сниженные значения продукции АФК;
- от 70 до 110 у.е. – нормальные значения продукции АФК;
- более 110 у.е. – повышенные значения продукции АФК.

Одна условная единица соответствует 0,001 единице оптической плотности.

Коэффициент стимуляции рассчитывали как отношение уровней продукции АФК после облучения НИЛИ к уровню спонтанной продукции без облучения.

Оптическую плотность пробы измеряли прибором «Stat Fax – 2100» (произв. AWARENESS Technology Inc.) Прибор является компактной фотометрической системой, контролируемой микропроцессором, предназначенной для измерения и вычисления результатов проб, которые проводятся в микропланшетных платах. Измерения проводили при длине волны 450 нм, в режиме «от точки к точке».

Контролем, вычитаемым из значения пробы, служит лунка с обозначением A1 в стандартном планшете для ИФА с чистым ДМСО.

**Определение количества неферментативных катионных белков (КБ)** проводили спектрофотометрически. КБ характеризуют кислороднезависимую бактерицидную систему нейтрофилов, способность к внутриклеточному и экстрацеллюлярному киллингу.

**Определения уровня продукции АФК** проводили методом хемилюминесценции (ХЛ). Обычно, оценивается уровень спонтанной и стимулированной хемилюминесценции. Стимулированная ХЛ клеток в присутствии люминола - ценный показатель функционального состояния фагоцитов крови и тканей, их способности производить при необходимости активные формы кислорода, т.е. выполнять свою защитную функцию. Эта способность обычно усиливается при возникновении в организме очагов воспаления, и уменьшается при хронических инфекциях.

Выполненный нами экспериментальный анализ различных лабораторных методов оценки функциональной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови, взятой у больных вторичным иммунным дефицитом, позволил выбрать для последующего изучения влияния НТАП модифицированный НСТ-тест (Р.М.Хаитов, Б.В. Пинегин, Х.И. Истамов «Экологическая Иммунология» М., 1995г.), продукцию катионных белков, и хемилюминесцентный анализ. Эти тесты характеризуют достаточно полно бактерицидную систему клеток крови, просты в исполнении, не требуют значительных затрат времени для получения достоверно значимого результата, экономически выгодны и позволяют исследовать одновременно образцы крови несколько пациентов. Эти методы отражают не только бактерицидную функцию фагоцитов и способность клеток к завершённому фагоцитозу (согласно нормативам ВОЗ), т.е. адгезивную способность нейтрофилов, но и уровень продукции АФК, работу их специфических ферментативных систем. Таким образом, в целом выбранные методы пригодны для оценки функционального состояния клеточного иммунитета на уровне периферической крови.

**Медико-биологические испытания при моделировании раневого процесса у  
животных**

В качестве контрольного вещества использовалась дистиллированная вода, получаемая в лаборатории. Образец тестируемого вещества сдан в архив лаборатории и будет храниться до истечения срока годности. Вел журнал учёта тестируемого вещества. Остатки суспензии вещества сливали в соответствующую промаркированную тару и в конце исследования сданы на уничтожение. В исследовании использованы 48 крыс CD самцов. Производитель животных - НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН, г.Пущино. Животные разведены специально и ранее не участвовали в исследованиях. Прибывшие животные до начала исследования были помещены в отдельную комнату содержания на период адаптации при групповом содержании в клетках. Во время этого периода у животных контролировали проявление признаков отклонения в состоянии здоровья. Перед формированием групп проводили подробный клинический осмотр. Животных распределяли по группам, используя в качестве критерия массу тела. Начальная средняя масса тела была одинаковой в каждой группе, и индивидуальная масса животных не отличалась более чем на 20% от средней массы животных. К началу введения веществ возраст животных составлял 9-11 недель. Массу тела после периода карантина учитывали при формировании экспериментальных групп. В течение всего эксперимента крысы содержались в индивидуальных клетках. Каждому животному был присвоен индивидуальный номер в соответствии с номерами группы, подгруппы и порядковым номером. На этикетке клетки указывали группу, подгруппу, номер животного, название тестируемого вещества, код исследования, Ф.И.О. руководителя. В течение всего эксперимента животные находились в индивидуальных клетках в комнате содержания животных. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, данным в руководстве (Guide for Care and Use of Laboratory Animals. ILAR publication, 1996, National Academy Press). Все процедуры по рутинному уходу за животными выполняли в соответствии с СОП лаборатории. Записи рутинных процедур вели в «Листе рутинных процедур комнаты содержания животных», которые приложены в соответствующую документацию лаборатории. Каждая крыса содержалась в индивидуальной макролоновой клетке ТИП-2, оборудованной стальной решетчатой крышкой с кормовым углублением, стальным разделителем для корма и стальным держателем этикетки. В качестве подстилки использовалась резаная пищевая автоклавированная бумага. В лаборатории периодически осуществляется анализ подстилки на контаминацию. Данные о результатах анализов хранятся в документации лаборатории. Не было контаминации подстилки, способной повлиять на результаты исследования. Стандартный корм для грызунов давался *ad libitum* в кормовое углубление

стальной решетчатой крышки клетки. Отсутствие контаминации корма подтверждается производителем. Животные получали в качестве питья воду *ad libitum* в стандартных питьевых бутылочках со стальными крышками-носиками. В комнате содержания животных поддерживаются следующие условия:

- температура окружающего воздуха 18-26° С;
- автоматическая смена 12-ти часового светового периода (08:00-20:00 – день, 20:00-08:00 – ночь);
- относительная влажность 30-70 %;
- вентилирование со сменой воздуха 7-12 объемов комнаты в час.

Вещество вводили один раз в день ежедневно на протяжении соответствующих сроков наблюдения за течением процесса заживления в динамике: в течение 2, 6, 13 и 20 дней соответственно подгруппам зондом в желудок. Введение осуществляли утром, начиная с 10:00. Объем введения составлял 5 мл/кг. Объем введения для каждого животного рассчитывали в соответствии с его массой. Нужный объем набирали в шприц-зонд. Ежедневно проводили наблюдение за общим состоянием животных для выявления отклонений в состоянии здоровья. Клинический осмотр раневой поверхности каждого животного проводили ежедневно, после введения тестируемого и контрольного вещества в течение всего периода наблюдения и до полного заживления ран. У каждого животного регистрировали сроки заживления раны.

На следующий день после нанесения ран, и в последующем каждый день (сроки наблюдения 3 и 7 сутки) или через каждые два дня (сроки наблюдения 14 и 21 сутки), фотографировали раневую поверхность каждого животного при помощи стереоскопической бинокулярной лупы. Полученные изображения обрабатывали при помощи программы Trace 1.24b, позволяющей рассчитать площадь раневой поверхности.

Цитологический анализ содержимого раны проводится на 3, 7 и 14 сутки после нанесения животным механической и ожоговой раны. Для этого по три животных из каждой подгруппы, соответственно указанным срокам и в соответствии с этапом исследования, подвергали эвтаназии в CO<sub>2</sub> - камере, после чего делался отпечаток с раневой поверхности. После окрашивания цитологического препарата по Романовскому-Гимзе проводили анализ клеточного состава содержимого раны по следующим критериям:

- Число лейкоцитов в поле зрения;
- Процент деструкции лейкоцитов;
- Микрофлора: число микробных тел на 100 клеток;

- Клеточный состав, % (на 100 клеток):

- 1.Нейтрофилы
- 2.Эозинофилы
- 3.Лимфоциты
- 4.Моноциты
- 5.Полибласты
- 6.Макрофаги
- 7.Фибробласты
- 8.Клетки многоядерные
- 9.Клетки плазматические

Все процедуры выполняли согласно СОП: «Техника приготовления цитологического отпечатка с раневой поверхности», «Техника окрашивания цитологического отпечатка по Романовскому-Гимзе».

Гистологический анализ содержимого раны проводился на 3 и 7 сутки после нанесения животным механической и ожоговой раны на первом этапе исследования и на 14 и 21 сутки после нанесения механической и ожоговой раны на втором этапе исследования. Для этого по три животных из каждой подгруппы, соответственно указанным срокам и в соответствии с этапом исследования, подвергали эвтаназии в CO<sub>2</sub>-камере, после взятия материала для цитологического анализа вырезался участок кожи из приранековой области с подлежащим мышечным слоем из области раны, а также тимус и селезенка, последние два органа предварительно взвешивали. Образцы органов фиксировали в 10% формалине, затем после специальной обработки изготавливали срезы, которые окрашивали по стандартным методикам Гематоксилин-Эозином и Пикрофуксином по Ван-Гизону. Все указанные процедуры проводили согласно СОП: «Проводка тканей и органов с использованием автомата для гистологической обработки тканей карусельного типа STP 120»; «Нарезка тканей и органов на секции с использованием ротационного микротомы НМ 340Е в комплекте с системой переноса срезов»; «Заливка тканей и органов в парафин с использованием станции для заливки парафином модульного типа AP 280»; «Окрашивание парафиновых секций тканей и органов гематоксилин-эозином по Майори и пикрофуксином по Ван-Гизону. Заключение гистологических препаратов в светопреломляющую среду и монтирование покровных стекол».

Гистологический анализ участка кожи проводили в двух плоскостях среза образца: продольном и поперечном. При этом регистрировали:

- смену клеточного состава тканей в приранековой области и в области раневого повреждения в динамике патогенеза и репарации раны;
- характер грануляций;
- степень и сроки восстановления микроциркуляторного русла;
- степень и сроки заполнения тканевого повреждения фиброзной тканью;
- митотический индекс на 1000 клеток (10 полей зрения при увеличении 400)

На срезах селезенки регистрировали количество герминативных центров и характер маргинальной зоны, на срезах тимуса – характер коркового и мозгового вещества органа.

Для всех количественных данных вычислялось среднее арифметическое по группе (Mean) и стандартная ошибка среднего (SEM). Для определения межгрупповых различий и оценки достоверности различий между группами были применены адекватные статистические методы сравнения с использованием стандартных компьютерных программ Excel, Statistica for Windows и GraphPad Prism 3.00. Различия между группами считали статистически значимыми при  $P < 0,05$ .

### **3. Результаты и обсуждение**

**3.1. Разработка технического предложения и обеспечение биомедицинских исполнителей действующей моделью генератора низкотемпературной аргоновой плазмы, содержащего систему компьютерного управления параметрами плазменной струи, контроля длительности облучения и положения излучателя и относительно раневой поверхности. Оценка и адаптация параметров плазменной струи (температура, скорость протока и ионный состав) в соответствии с медико-техническими требованиями.**

Разрабатываемый способ использования генератора должен обеспечить эффективное уничтожение различных видов сообществ микроорганизмов (распространенных сапрофитных, условно-патогенных и патогенных микроорганизмов) и их биопленок на поверхности ран и язв, в том числе:

Грамм-положительных бактерий;

- Staph. aureus
- Streptococci, enterococci
- Group A - necrotizing fasciitis
- Group B – diabetes

Грамм-отрицательных бактерий;

- Pseudomonas aeruginosa, Proteus, Klebsiella
- Anaerobes e.g. Bacteroides group
- Yeasts e.g. Candida albicans

Полирезистентных (обладающих множественной устойчивостью к антибиотикам) аэробных форм бактерий;

- *Methicillin resistant Staph. Aureus (MRSA).*

Разрабатываемый способ должен использоваться для обеззараживания и лечения гнойных ран и обеспечивать (согласно п.4.1 технического задания) при длительности облучения 10-15 минут гибель около 80% патогенных микроорганизмов на поверхности раневого очага и уничтожение 99,99% культивируемых патогенных микроорганизмов при отсутствии поражающего воздействия на клетки и ткани млекопитающих in vitro.

#### *Техническая характеристика*

Санация инфицированных ран и язв, включающая уменьшение микробного обсеменения, без инициации новых полирезистентных штаммов, активацию иммунного ответа и процессов заживления, может быть обеспечена с помощью низкотемпературной аргоновой плазмы (при температуре газовой струи 36-40°C). Об этом косвенно свидетельствует клинический опыт военно-полевой и гнойной хирургии, накопленный в результате применения аппарата «Скальпель-коагулятор-стимулятор воздушно-плазменный СКВП/NO-01 «Плазон», генерирующего воздушную плазму, обогащенную NO, и жидко-плазменного скальпеля «Atlas» в США. Выпускаемые плазменные аппараты предназначены для рассечения, удаления, деструкции и испарения мягких и плотных тканей, туннелирования, гемостаза и коагуляции. Температура воздушно-плазменного потока, выходящего из узкого сопла (диаметром 0,7-1,2 мм) аппарата «Плазон», достигает 4000°C. В гнойной хирургии был разработан метод «дистанционного воздушно-плазменного воздействия»: сканирование лучом «плазменного скальпеля» поверхности раны на таком расстоянии (15-30 см), чтобы не вызвать ожог, коагуляцию и деструкцию тканей. При этом частично уменьшается микробное обсеменение и наблюдается «стимуляция местного иммунного ответа, кровотока и ускорению заживления гнойных ран». Этот эмпирически найденный подход и послужил основанием для разработки специального способа санации инфицированных ран и язв.

Однако требования к устройству, генерирующему низкотемпературную аргоновую плазму для обеззараживания и лечения обширных инфицированных ран и незаживающих

язв, существенно отличаются от требований к аппарату плазменного «скальпеля-коагулятора-стимулятора» (Табл.8)

Таблица 8. Сравнение характеристик плазменных генераторов медицинского назначения

| Сравниваемые параметры                                                     | Atlas<br>(ArthroCare, UK)                                                                | Плазон<br>(ОКБ «Факел,<br>Россия»)                                                       | Предлагаемая<br>разработка                  |
|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Способ генерации<br>плазмы                                                 | ионизация<br>электропроводящей<br>жидкости                                               | электрическая<br>дуга постоянного<br>тока                                                | СВЧ-генератор                               |
| Плазмообразующая среда                                                     | слой<br>ионизированного<br>пара                                                          | Воздушная<br>плазма,<br>обогащенная NO                                                   | Аргоновая плазма                            |
| Диаметр выходящего<br>луча плазмы                                          | 1 мм                                                                                     | 0,7-1,2 мм                                                                               | Не менее 30 мм                              |
| Рабочая температура<br>плазмы на выходе<br>генератора                      | 600-700°C                                                                                | 3000-3500°C                                                                              | 36-40°C                                     |
| Диапазон и контроль<br>температуры на уровне<br>ткани                      | От 40 до 700°C,<br>неконтролируемая                                                      | От 20 до 3000°C<br>неконтролируемая                                                      | 30-36°C<br>контролируемая                   |
| Потребляемая мощность                                                      | 125-300 Вт                                                                               | 500 Вт                                                                                   | 95-100 Вт                                   |
| Результат воздействия на<br>ткани раны                                     | рассечение,<br>деструкция,<br>коагуляция,<br>обеззараживание,<br>ускорение<br>заживления | рассечение,<br>деструкция,<br>коагуляция,<br>обеззараживание,<br>ускорение<br>заживления | обеззараживание,<br>ускорение<br>заживления |
| Положение относительно<br>раны и состав плазмы в<br>режиме обеззараживания | 20-30см,<br>состав плазмы<br>варьирует, не<br>контролируется                             | 15-25 см<br>состав плазмы<br>варьирует, не<br>контролируется                             | 4-5 см<br>заданный состав<br>плазмы         |

Как видно из данных, приведенных в таблице, разрабатываемый способ генерации низкотемпературной аргоновой плазмы решает проблемы санации (обеззараживания и ускорения заживления) за счет иного механизма. При этом обеспечивается стандартное широкое поле облучения – порядка 30 мм, низкая температура (36-40°C) газовой плазмы на выходе генератора и поддержание контролируемого состава и температуры плазмы на поверхности раны. Это позволяет применять генератор для санации обширных инфицированных поверхностей ран и язв без опасности дополнительного поражения тканей. Единственный в мире исследовательский образец стационарного генератора низкотемпературной плазмы создан в 2007 г. японско-английской фирмой Adtec Plasma Technology Ltd. ([www.adtec-rf.com](http://www.adtec-rf.com)). Он находится на стадии испытаний в Институте внеземной физики Макса Планка в Германии. Показано, что облучение культивируемых микроорганизмов *in vitro* низкотемпературной аргоновой плазмой снижает число прорастающих колоний микроорганизмов в миллион раз. Обнаружено, что летальная для бактерии доза низкотемпературной аргоновой плазмы не вызывает деструкции изолированных клеток животных. Способ использования низкотемпературной аргоновой плазмы для санации ран и язв не разработан.

СВЧ-генератор создает плазму в атмосфере аргона индуцированную микроволнами. Для обеспечения требуемого результата, как показал анализ, генерируемая плазма должна удовлетворять следующим условиям:

- Электронная температура в плазменной области (в факеле) не должна превышать нескольких единиц эВ;
- Температура ионов в факеле не должна превышать температуру самого факела;
- Главные области спектра излучения факела должны находиться в областях 300-400 нм и 700-800 нм;
- Из примесей токсических соединений плазменный факел на уровне облучаемого объекта может содержать на уровне допустимых ПДК NO<sub>2</sub>, CO, и O<sub>3</sub>
- Плавающий потенциал сетки на расстоянии 20-40 мм не должен быть на уровне нуля (как свидетельство наличия плазмы);
- Мощность УФ излучения на расстоянии 20 мм от обрабатываемого объекта не должна превышать 100 мкВт/см<sup>2</sup>.

Уровень свободных радикалов азота и кислорода на расстоянии 20 мм от апертуры генератора плазмы находится на пределе чувствительности используемой измерительной аппаратуры и в настоящее время не может быть установлен количественно. Область

обрабатываемой поверхности при достижении бактерицидного эффекта при обработке культивируемых на агаре бактерий после 2 минут облучения должна составлять 30-40 мм в диаметре; при 4 минутном облучении – до 50-60 мм в диаметре. Таким образом, параметры низкотемпературной аргоновой плазмы и характеристики действующего генератора НТАП должны обеспечивать уничтожения высокорезистентной патогенной микрофлоры на обширной раневой поверхности, исключать дополнительное поражение тканей раны и обеспечивать активацию процесса заживления инфицированных ран.

Действующий СВЧ-генератор обеспечивает микроволновое излучение на частоте 2,45 ГГц. приняты ограничения по размерам, электропитанию и др. характеристикам действующего генератора (см. Табл. 9). Разряд создается при помощи СВЧ-напряжения частотой 2,45 ГГц, подаваемого на электроды через коаксиальные кабели и согласующий шлейф. При горении разряда между концами электродов и внутренней поверхностью цилиндра образуются 6 небольших плазменных каналов, как показано на рис.3. Диаметр апертуры генератора при полном открытии составляет 35 мм. Поток газа является гомогенным как при открытии факела, так и в период облучения поверхности. Генератор низкотемпературной аргоновой плазмы имеет собственный процессор для управления параметрами плазменной струи и для контроля положения излучателя относительно раневой поверхности и длительности облучения.

Все функциональные части аппарата, включая генератор плазменной струи, расположены на тележке. В целях маневренности генератор прикреплен к рычагу с противовесом. Он может использоваться также в вертикальном положении и под различными углами. Узел генератора быстросъемный, что упрощает и ускоряет замену узла или его компонентов при проведения обработки различных объектов, а также проведение профилактики узла. Внешнее крепление блока генератора позволяет проводить его настройку. Схема генератора струи представлена на рис. 3. Генератор струи состоит из 6 стальных электродов, расположенных внутри алюминиевого цилиндра длиной 135 мм. Центры электродов с зубчатой поверхностью образуют правильный шестиугольник и расположены на расстоянии 6 мм от внутренней поверхности цилиндра. Концы электродов находятся на расстоянии 20 мм от выходного отверстия струи. Обычно генератор располагается так, что его основная ось перпендикулярна земле, т.е. находится в вертикальном положении. В данном исследовании для получения разряда используется только аргон для того чтобы избежать образования ядовитых газов и минимизировать образование АФК и АФА. Аргон подается от основания электродов через тефлоновый распылитель, регулирующий поток газа у электродов.

Создаваемый в результате проекта способ соответствует требованиям техники безопасности и производственной санитарии. Создаваемая в результате выполнения проекта интеллектуальная собственность является патентоспособной.

Табл. 9. Описание генератора низкотемпературной плазмы

|                                |                                                                                                                                                                                                                                      |                          |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Генерация плазмы               | Микроволновый разряд при атмосферном давлении                                                                                                                                                                                        |                          |
| Рабочая область                | Плазменный факел                                                                                                                                                                                                                     |                          |
| Температура газа в плазме      | $\leq 40^{\circ}\text{C}$ на расстоянии 22 мм головы плазменного факела                                                                                                                                                              |                          |
| Рабочее время                  | 20сек- 20 мин                                                                                                                                                                                                                        |                          |
| Плазмообразующий газ           | Аргон, чистота $\geq 99,95\%$<br>$\text{CO}_2$ , чистота $\geq 99,9\%$                                                                                                                                                               |                          |
| Уровень расхода газа/давление  | Контроллер массового расхода для аргона: $0,5-10 \text{ слм} \leq 0,4 \text{ МПа}$<br>Контроллер массового расхода для азота: $1-50 \text{ см}^3/\text{с} \leq 0,8 \text{ МПа}$<br>Конверсионный фактор для $\text{CO}_2$ равен 0.74 |                          |
| Газовые баллоны                | Аг – ёмкость: 10л, вес: 15 кг, материал: сталь.<br>$\text{CO}_2$ – ёмкость: 4,5л                                                                                                                                                     |                          |
| Микроволновой источник питания | максимальный выход 150Вт                                                                                                                                                                                                             |                          |
| Микроволновое пропускание      | Коаксиальный кабель                                                                                                                                                                                                                  |                          |
| Управление                     | Полу-автоматическое                                                                                                                                                                                                                  |                          |
| Входное напряжение             | AC230V 1ф,50/60Hz                                                                                                                                                                                                                    |                          |
| Потребление энергии            | 1кВА                                                                                                                                                                                                                                 |                          |
| Выходные размеры               | Осн. часть                                                                                                                                                                                                                           | W700×D1200×H2000(mm)     |
|                                | Рабочий рычаг                                                                                                                                                                                                                        | L1360(mm)×H750(mm)×R120° |
| Диапазон рабочей температуры   | $10^{\circ}\text{C}-35^{\circ}\text{C}$                                                                                                                                                                                              |                          |
| Диапазон допустимой влажности  | 10%-80%                                                                                                                                                                                                                              |                          |
| Вес                            | 250кг                                                                                                                                                                                                                                |                          |

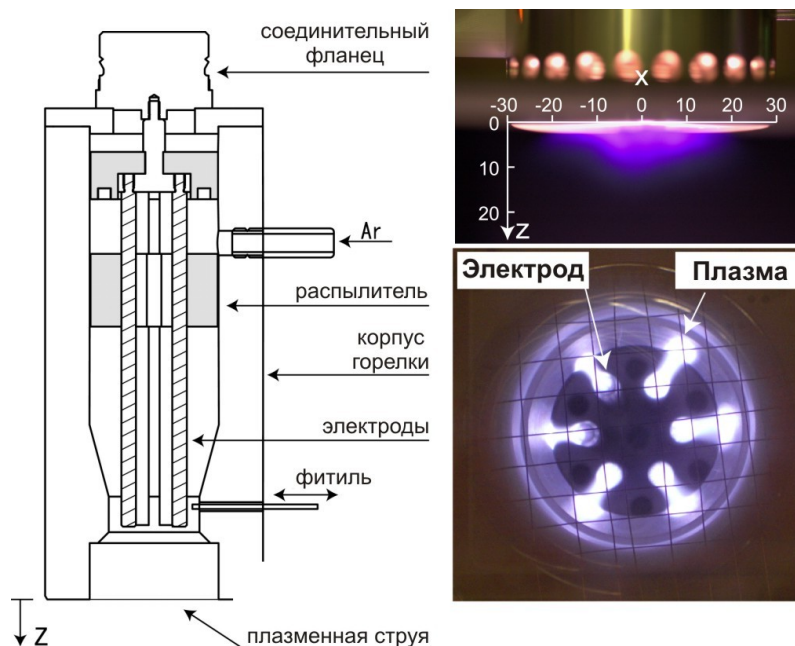


Рис. 3. Схема плазменного генератора и вид плазменной струи сбоку (верхний рисунок) и снизу (нижний рисунок).

В результате работы по проекту будет разработан способ применения низкотемпературной аргоновой плазмы, дополняющий комплексную терапию путем обеззараживания обширных инфицированных ран и хронически незаживающих язв, ускоряющий их заживление.

Будет создан необходимый потенциал для разработки плазменных технологий и аппарата для клинических испытаний при лечении обширных инфицированных ран и трофических язв, остеомиелитных поражений, оппортунистических инфекций, стерилизации трансплантатов, компонентов и препаратов донорской крови.

Новые технологии позволят существенно уменьшить системное и местное использование дорогостоящих и токсичных антибиотиков не менее чем в 1.5 раза и сократить сроки лечения инфицированных ран и язв.

Испытания подтверждают, что конструкция генератора является работоспособной и надежной и удовлетворяет требованиям к аппаратуре, используемым в физиотерапевтических кабинетах клинических учреждений. Для управления расходом газа используются системы контролируемого напуска. Автоблок настройки управляет микроволновым импедансом и подает максимальную электроэнергию плазменному факелу. Это позволяет гарантировать необходимую генерацию плазмы.

Разрабатываемый способ генерации позволит использовать низкотемпературную плазму для санации обширных инфицированных поверхностей ран и язв без опасности

дополнительного поражения тканей.

Дизайн и управление генератором, а также последовательность действий при санации ран разрабатываемым способом, приспособлены к условиям и требованиям клиники и не должны требовать для обслуживания специального технического образования. Сеансы лечения сможет выполнять один медицинский работник, но может потребоваться помощь второго медицинского работника, который будет проводить дополнительный контроль за параметрами обрабатывающего факела.

В процессе первого запуска должна проходить проверка генерации плазмы, проверка температурного режима с помощью соответствующих датчиков.

Работы должны проводиться в специально отведенном месте удобном для выполнения операций. Требования к светотеневой обстановке и ориентации генератора не предъявляется. Желательно расположить оборудование в месте с минимальным уровнем механических и электромагнитных возмущений. Генератор перед работой должен быть заземлен. Перед первым включением необходимо проверять надежность соединения электрических кабелей и затем подключать к сети. Кроме того, особой осторожности требует работа с газом. Вскрывать и ремонтировать блоки оборудования разрешается только специально обученному научно-техническому персоналу.

**3.2. Расчет состава плазмы при работе генератора, адаптация методов диагностики низкотемпературной плазменной струи при атмосферном давлении. Адаптация зондовых методов определения концентраций электронов и ионов в плазме при атмосферном давлении. Определение ионного состава и спектральных характеристик низкотемпературной аргоновой плазмы при разных режимах работы генератора.**

*Диагностика плазменной струи при атмосферном давлении (температура, состав, излучение).*

*Измерение концентрации положительных ионов.* Концентрация положительных ионов измерялась методом электрического зонда, который является одним из основных средств исследования зарядового состава плазмы. При использовании зондов в плазме атмосферного давления, как известно, возникает проблема интерпретации измерений. Обычно при диагностике такой плазмы используются ионные токи насыщения. Концентрация положительных ионов определяется по ионной части зондового тока, т.е.

используется ток, поступающий на зонд при отрицательных, относительно плазмы, потенциалах зонда, когда вкладом электронного тока можно пренебречь. При этом связь концентрации положительных ионов  $n_i$  в невозмущенной зондом плазме с плотностью ионного тока насыщения  $j$  устанавливается согласно расчетной модели, развитой в [Васильева И.А., Косов В.Ф., 1981, Бенилов М.С., и др.1987; Косов В.Ф., и др., 1991], для потоков плазмы с малым числом Маха и большим числом Рейнольдса  $Re$ .

Для условий эксперимента расчетная формула приводится к виду:

$$n_i = \frac{j_i}{1.13e} \left( \frac{r_{pr}}{V_g D_i} \right), \quad (1)$$

где  $r_{pr}$  - радиус зонда,  $V_g$  - скорость невозмущенного потока плазмы,  $D_i$  - коэффициент диффузии положительных ионов.

Формула (1) справедлива в условиях, когда:

$$r_D < \delta_h < l_r, \quad (2)$$

где  $r_D$  - радиус Дебая, оцененный по параметрам в невозмущенной плазме,  $\delta_h = r_{pr} / \sqrt{Re}$  - толщина гидродинамического слоя у зонда цилиндрической формы радиуса  $r_{pr}$ ,  $Re = V_g r_{pr} / \nu$  - число Рейнольдса,  $\nu$  - коэффициент кинематической вязкости,  $l_r = (D_i / \alpha_r n_e)^{1/2}$  - характерная длина рекомбинации,  $\alpha_r$  - коэффициент рекомбинации.

В схему измерения зондового тока с применением автоматизированной системы входят: вводимый кратковременно в поток плазмы зонд, шаговый электродвигатель, цифровой осциллограф С9-8. Для управления модулями использовался персональный компьютер. Рабочая поверхность зонда представляла собой цилиндр диаметром 4 мм, длиной 5 мм. В качестве изолятора применялся фторопласт. На зонд подавался переменный относительно корпуса горелки потенциал (+2...-30В). Среднеквадратичная погрешность определения концентрации ионов составляла 10%.

*Определение концентрации электронов.* Для определения локальной концентрации электронов использовался метод, основанный на измерении протекающего в плазме тока  $I_{pl}$  и продольной напряженности электрического поля  $E$  [3]. Определение  $n_e$  становится возможным при корректном определении плотности тока  $j$ . Для этого используется закон Ома:

$$j = \sigma E \quad (3)$$

где  $\sigma$  - электропроводность плазмы,

и соотношение:

$$I_{pl} = \int_{S_{pl}} j dS, \quad (4)$$

где  $S_{pl}$  - площадь поперечного сечения столба плазмы.

Для осесимметричного потока плазмы:

$$I_{pl} = j_0 \int_0^{R_{pl}} j(r) 2\pi r dr, \quad (5)$$

где  $j_0$  - плотность тока на оси плазменного потока;  $j(r)$  - относительное распределение плотности тока по радиусу  $r$  плазменного потока;  $R_{pl}$  - радиус столба плазмы (для нашего случая радиус внешнего факела пламени горелки).

Как следует из (5), эффективная площадь поперечного сечения плазмы равна:

$$S_{eff} = \int_0^{R_{pl}} j(r) 2\pi r dr \quad (6)$$

Если имеется возможность корректного определения  $S_{eff}$ , то находим:

$$I_{pl} = j_0 S_{eff} = \sigma_0 E S_{eff} \quad (7)$$

Далее по измеренным значениям  $I_{pl}$  и  $E$  находится электропроводность плазмы в ядре потока:

$$\sigma_0 = \frac{I_{pl}}{E S_{eff}} \quad (8)$$

а, зная подвижность электронов  $\mu_e$ , определяем концентрацию электронов  $n_e$ :

$$n_e = \frac{I_{pl}}{e \mu_e E S_{eff}} \quad (9)$$

Для проведения указанных измерений  $n_e$  в поток плазмы за выходным отверстием горелки вводился электрод, на который относительно корпуса горелки подавалось постоянное напряжение от батареи постоянного тока и формировалась цепь протекания зондирующего тока  $I_{pl}$ : батарея - столб плазмы - корпус горелки.

#### **Измерения плавающего потенциала плазмы с помощью сеточного зонда.**

Помимо упомянутых выше разработанных зондовых методик, была сделана попытка сконструировать специальный, так называемый сеточный зонд для измерения плавающего потенциала и получения продольных профилей поля плазмы вдоль струи

горелки. Сеточный зонд представлял собой молибденовую сетку с малыми ячейками с шагом 20 нитей на дюйм и диаметром 30 мм, которая располагалась за выходным отверстием горелки, удерживалась молибденовым держателем и охватывала плазменную струю полностью. В экспериментах измерялся потенциал сетки (включая ее держатель) по отношению к потенциалу пространства и сеточный ток, в итоге получалась характеристика подобная вольт-амперной характеристике ленгмюровского зонда. Напряжение на сетке измерялось с помощью цифрового вольтметра В7-34, имеющего входное сопротивление более  $2 \cdot 10^{10}$  Ом, что позволяло проводить измерение напряженности электрического поля практически в бестоковом режиме. В результате, было получено, что потенциал электрода с увеличением расстояния до отверстия горелки существенно уменьшается. Измерения показали, что в промежутке 7-13 мм за выходным отверстием горелки потенциал электрода и температура газа изменяются одинаковым образом. На расстоянии 20 мм от выходного отверстия был измерен ненулевой плавающий потенциал сетки, что свидетельствует о наличии заряженных частиц плазмы на этом расстоянии.

Прежде всего, были проведены экспериментальные исследования осевого профиля температуры газа и измерения плавающего потенциала решетки (зонда). В проведенных экспериментах комнатная температура равнялась  $25^{\circ}\text{C}$  ( $298\text{ K}$ ). На рис. 4 изображены  $z$ -профили ( $z$  – расстояние до выходного отверстия горелки) температуры, измеренной по оси горелки. Было обнаружено, что, если в непосредственной близости от горелки температура газа сравнительно высока ( $\approx 368\text{ K}$ ), то в промежутке от начала плазменной струи  $z = 3\text{ мм}$  до расстояния  $z = 13\text{ мм}$  температура газа резко падает. При дальнейшем увеличении  $z$  газ в плазме охлаждается незначительно. На расстоянии  $z = 20\text{ мм}$ , когда температура газа становится меньше  $313\text{ K}$ , тепловой эффект не оказывает никакого влияния на процесс стерилизации.

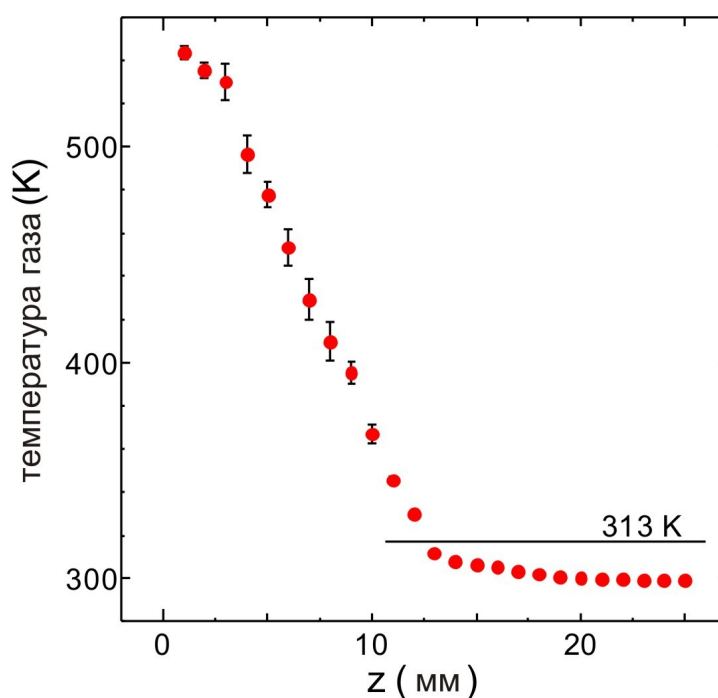


Рис. 4. Распределение температуры газа в плазменной струе за выходным отверстием горелки ( $z$  – расстояние до отверстия).

Для дальнейших исследований распределения плазмы ниже горелки, были проведены измерения плавающего потенциал сетчатого электрода (рис. 5). Импеданс между зондом и землей в ходе экспериментов составлял 20 МОм. В результате, было получено, что потенциал электрода с увеличением  $z$  существенно уменьшается.

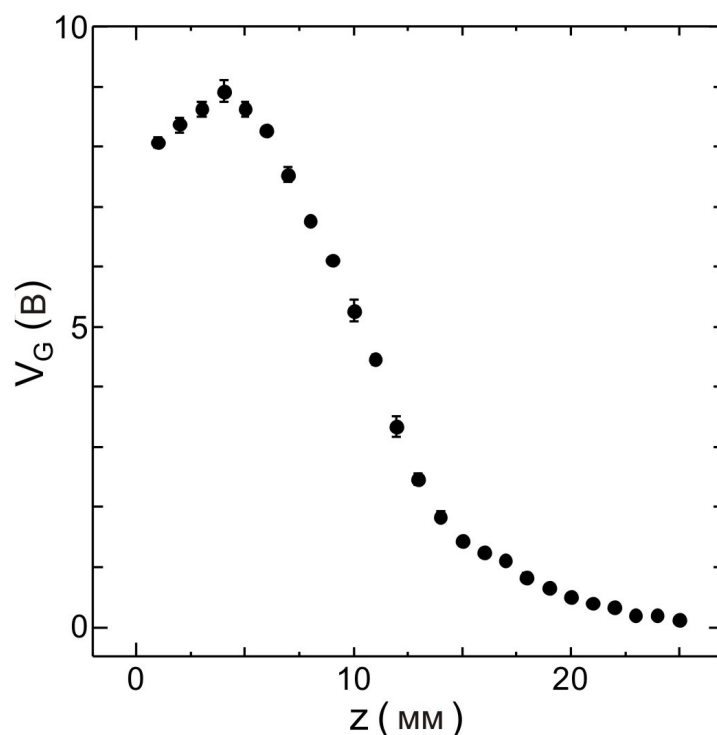


Рис. 5. Изменение потенциала сетчатого электрода (зонда) в плазменной струе за

выходным отверстием горелки ( $z$  – расстояние до отверстия).

Кроме того, как видно из рис. 5, кривая изменения потенциала обнаруживает сильное сходство с профилем распределения температура газа в плазменной струе. На расстоянии  $z = 20$  мм плавающий потенциал сетки не был равен нулю, что свидетельствует о наличии заряженных частиц плазмы на этом расстоянии.

### **Исследование состава плазмы. Измерение концентрации двуокиси азота методом абсорбционной спектроскопии.**

В качестве плазмообразующего газа в горелке используется чистый  $Ar$  (99,998 %) для того, чтобы избежать образования ядовитых примесей. Однако, газ  $NO$ , полученный плазмохимическим способом, можно рассматривать как положительный полифункциональный фактор в лечении инфицированных ран. Поэтому наибольший интерес представляет исследование примеси  $NO_2$ , присутствие которой в плазменной струе означает, что поток плазмы горелки активно реагирует с окружающим воздухом и в процессе горения образуются химически активный газ  $NO$ . Для измерения профиля концентрации  $NO_2$  по оси плазменной струи использовался метод прямой абсорбционной спектроскопии. Оптико-спектральные измерения концентрации молекул основаны на поглощении ими света. Если принять, что отношение концентрации молекул на поглощающих уровнях  $n_i$  к полной концентрации молекул  $N$  неизменно в различных измерениях (в первую очередь это условие постоянства температуры), то, при использовании приведенных на рисунке сечений, величина  $N$  определяется законом Бугера

$$\Delta I = I_0 - I = I_0 \alpha L ; \alpha = N \sigma ; \delta I = \Delta I / I_0 = N \sigma L, \quad (10)$$

где  $I_0$ ,  $I$  – интенсивности падающего и прошедшего излучений,  $L$  – длина пути света в веществе,  $\sigma$  – сечение фотопоглощения,  $\delta I$  – безразмерное относительное изменение интенсивности за счет поглощения,  $\alpha$  – коэффициент поглощения,  $\alpha L$  – показатель поглощения. При прямых измерениях абсорбции находятся величины  $\Delta I$  или  $\delta I$  и из них определяется абсолютная концентрация молекул.

Для реализации метода абсорбционного спектрального анализа используется перестраиваемый диодный лазер видимого диапазона, а именно, с длинами волн в синезеленой области максимального электронного поглощения  $NO_2$ . В составе измерительной системы используется модификация диодного лазерного спектрометра. Излучение диодного лазера мощностью 35 мВт на длине волны 415 нм заводилось в плазменную струю с помощью оптической системы линз. Проходящее излучение регистрировалось с

помощью фотоприемника излучения - фотодиода. Оптическая система спектрометра была смонтирована на стальной поверхности стола, специальных методов повышения механической и тепловой стабильности не предпринималось. Область частот излучения лазера устанавливалась с помощью спектрометра, более точные значения частот определялись по виду спектра поглощения (при повышенных концентрациях  $\text{NO}_2$ ) путем сопоставления с данными [I.Courtillot, 2006]. Коэффициент поглощения  $\alpha$  и концентрация  $N$  определялись по формулам (10). Были проведены измерения профиля концентрации  $\text{NO}_2$  по оси плазменной струи, которые показали, что распределение концентрации имеет максимум (6,2 мд или  $6,2 \cdot 10^{-4} \%$ ) на расстоянии 9 мм от отверстия горелки.

При исследовании состава газа в плазменной струе было обнаружено наличие дополнительной примеси  $\text{NO}_2$ . Присутствие газа  $\text{NO}_2$  в плазменной струе означает, что в ней в процессе горения образуются как химически активные атомы азота, так и химически активные атомы кислорода, т.е. поток плазмы горелки активно реагирует с окружающим воздухом. Однако количественная регистрация активных форм азота и кислорода оказалась неосуществимой, поскольку их уровень находился на пределе чувствительности использованной аппаратуры. Были проведены измерения профиля концентрации  $\text{NO}_2$  (см. рис.6) по оси плазменной струи, которые показали, что распределение концентрации имеет максимум (6.2 мд или  $6.2 \cdot 10^{-4} \%$ ) на расстоянии  $z = 9$  мм.

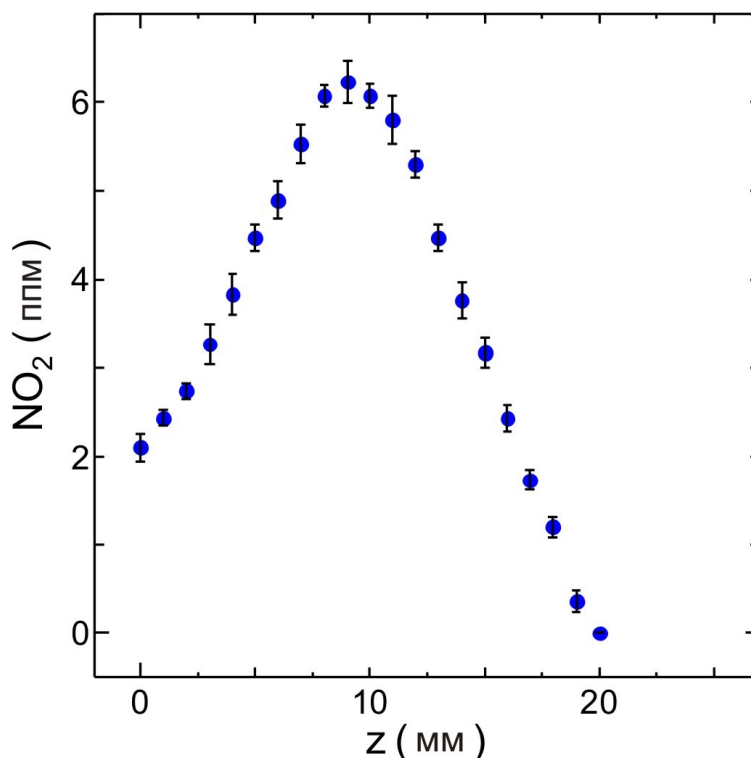


Рис.6. Профиль концентрации газа  $\text{NO}_2$  (см. рис.3) по оси плазменной струи (в относительных единицах).

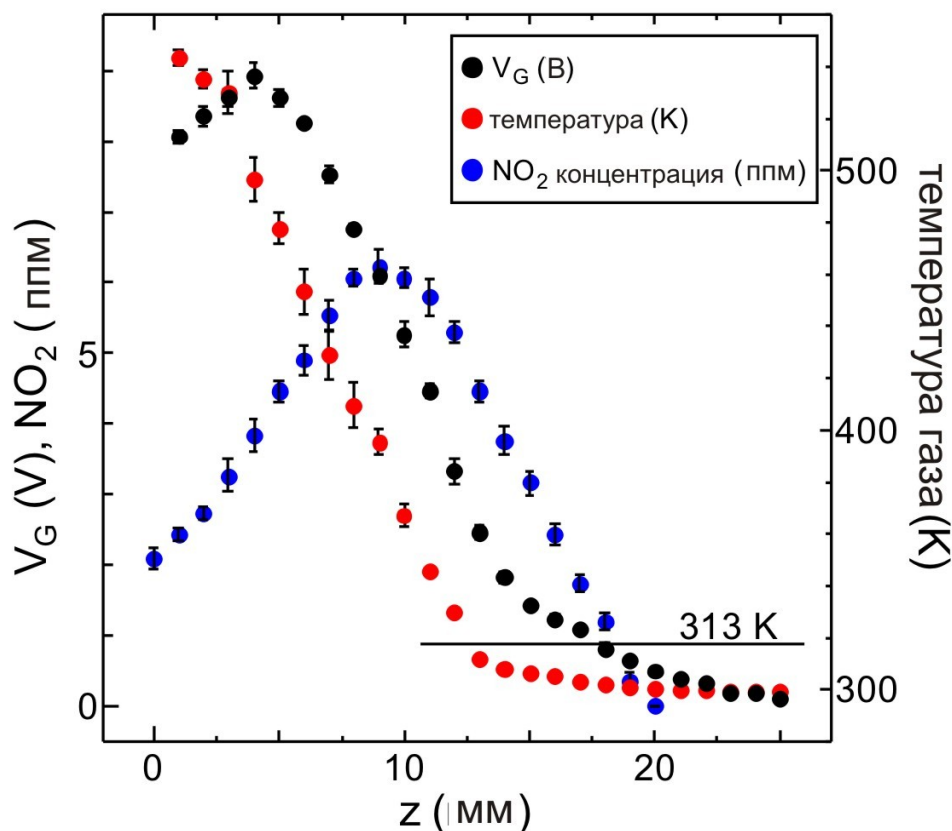


Рис. 7. Сводная диаграмма характеристик плазменной струи

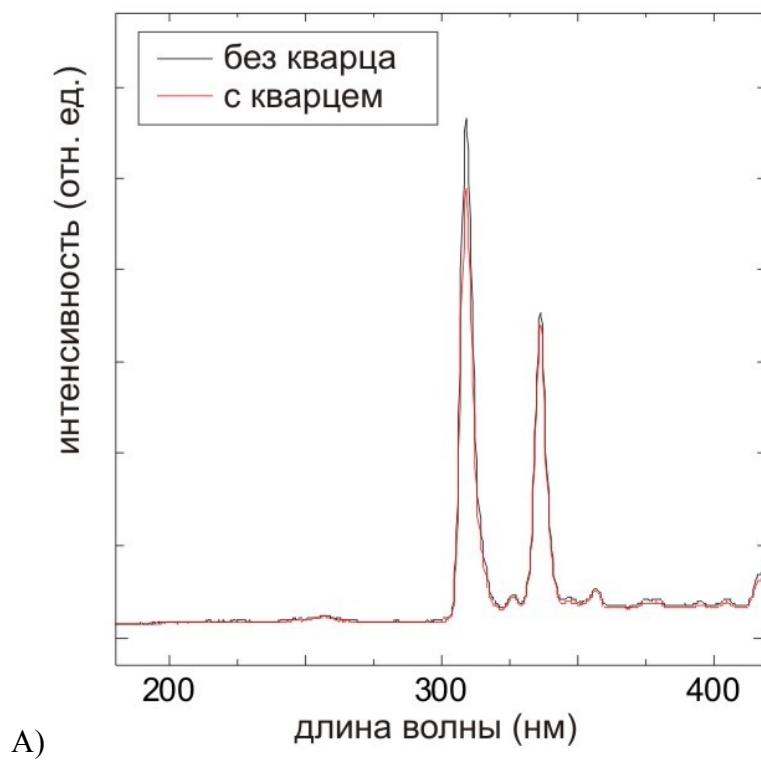
Полученные выше зависимости для сравнения приведены на одном графике (рис. 7). Хорошо видно, что в промежутке 7-13 мм потенциал сеточного электрода и температура газа в плазменной струе изменяются одинаковым образом. Внутри горелки хорошо заметны области, где образуется ярко светящаяся плазма – между электродами и цилиндром, тем не менее, поток плазмы, выходящий из горелки, практически невидим, поскольку его излучение находится в основном в УФ-диапазоне и частично в ИК-диапазоне.

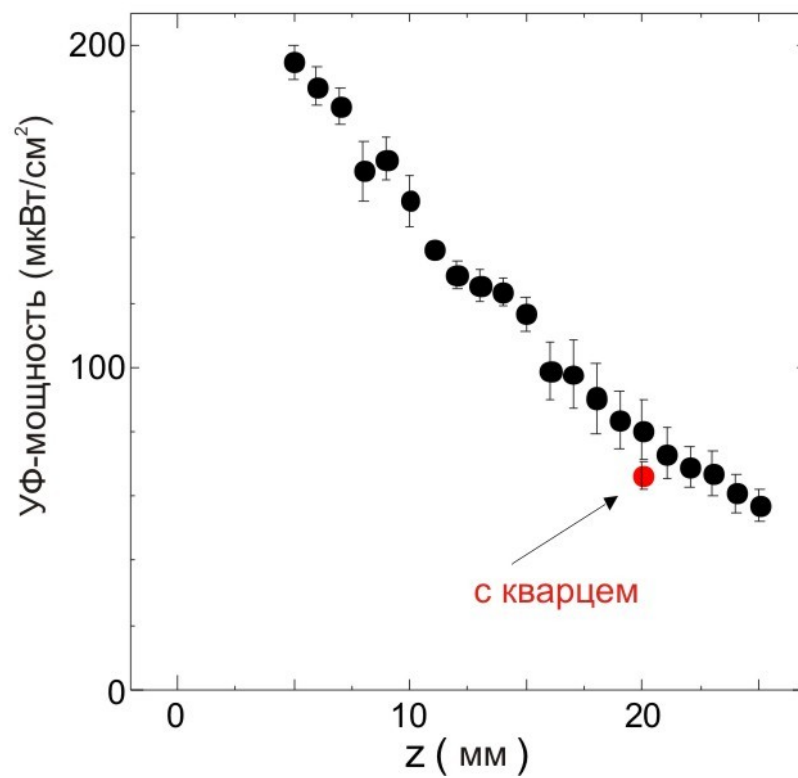
#### УФ-спектрометрия аргоновой плазменной струи. Спектральные характеристики.

Важной причиной, побуждающей проводить спектроскопические исследования плазмы в области коротких длин волн, является тот факт, что наиболее сильные линии струи горелки лежат в области ультрафиолета (УФ). Внутри горелки хорошо заметны области, где образуется ярко светящаяся плазма – между электродами и цилиндром. Тем не менее, поток плазмы, выходящий из горелки, практически невидим, поскольку его

излучение находится в основном в УФ-диапазоне. К лечебным факторам плазменного потока следует отнести наличие излучения именно УФ-спектра.

Плазменное УФ-излучение исследовалось УФ-спектрофотометром и УФ-ПЗС-детектором на основе фотодиодов с высокой чувствительностью и линейностью в широком динамическом диапазоне. Измерения спектра излучения плазмы проводились в диапазоне 160-360 нм (рис. 8). В результате, в излучении плазменной струи было обнаружено два резких пика в длинноволновом УФ-диапазоне – 309 и 316 нм. В коротковолновом диапазоне пиков обнаружено не было. Измеренная мощность УФ излучения на расстоянии 2 см от обрабатываемого объекта составила 80 мкВт/см<sup>2</sup>. Располагая перед объектом прозрачную пластину из кварца, мощность воздействующего УФ излучения можно было уменьшить на 20 % (см. рис. 8).





Б)

Рис. 8. Спектр излучения а) и мощность б) УФ излучения плазменной струи (z – расстояние до выходного отверстия).

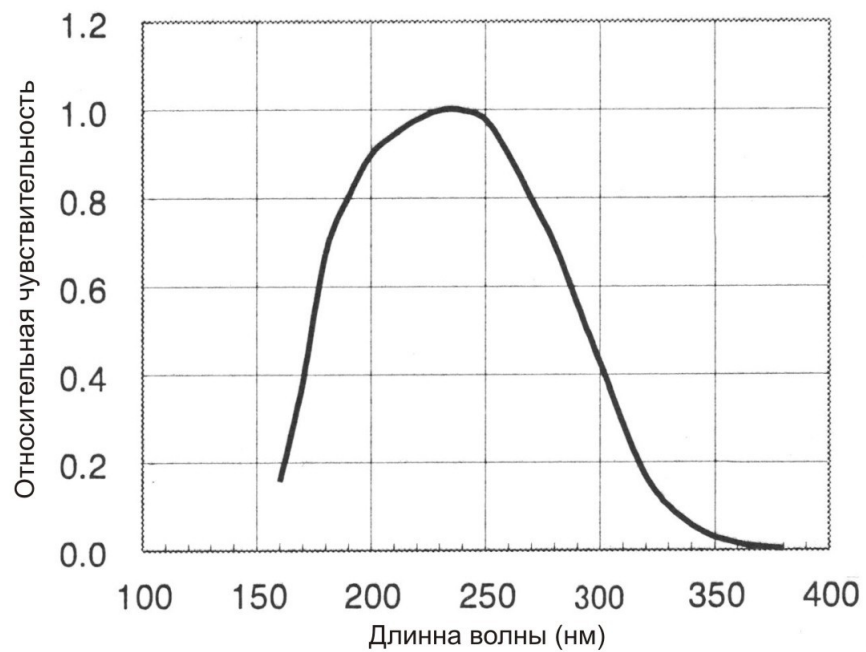


Рис.9. Коэффициент относительной чувствительности УФ измерителя мощности.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что параметры СВЧ-горелки и генерируемого плазменного потока в полной мере соответствуют сформулированным техническим требованиям.

### 3.3. Экспериментальный отбор антибиотикорезистентных патогенных штаммов микроорганизмов, полученных из коллекции патогенных штаммов (грамм-положительные, грамм-отрицательные, полирезистентные бактерии), для последующей оценки влияния аргоновой плазмы на жизнеспособность микроорганизмов в культуре и биопленках.

Изучали свойства штаммов *P.aeruginosa* и *S.aureus*, а именно, наличие гемолиза, пигмента и способности к образованию биоплёнки. В результате проведенных исследований было обнаружено, что 56% (13) из 23 изученных штаммов *P.aeruginosa* обладали выраженными гемолитическими свойствами (№№ 34м, 80,12,30,19,29,91,53,50,4,2,3,14). Большинство штаммов 87% (20) продуцировали пигмент пиовердин. При изучении штаммов *S.aureus* было показано, что выраженной гемолитической активностью обладали 4 штамма -№№ 78,89,85,738. Наличие каротиноидного (золотистого) пигмента обнаружено у 6 штаммов *S.aureus* -№№ 42,21,70,78,738,6538Р. (Табл. 10,11, рис. 10-12)

Таблица 10. Способность штаммов *P.aeruginosa* к образованию биоплёнок и характеристика их свойств.

| Штаммы                 | Наличие<br>гемолитической<br>активности | Наличие<br>пигмента | Способность<br>образования<br>биопленок |
|------------------------|-----------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------|
| 90                     | +                                       | +                   | ++++                                    |
| 13Г                    | +                                       | -                   | ++                                      |
| 34м                    | +++                                     | +                   | +++                                     |
| 16                     | ++                                      | +                   | +++                                     |
| 18 Ра <sub>2</sub> (2) | ++                                      | +                   | ++                                      |
| 80                     | +++                                     | +                   | ++                                      |
| 12                     | +++                                     | +                   | ++++                                    |
| 30                     | +++                                     | +/-                 | +++                                     |
| 19                     | +++                                     | +                   | ++                                      |
| 29                     | +++                                     | +                   | ++                                      |
| 91                     | +++                                     | +                   | +++                                     |
| 53                     | +++                                     | +                   | ++                                      |
| 50                     | +++                                     | +                   | ++                                      |

|        |     |     |      |
|--------|-----|-----|------|
| 36     | +   | +   | ++   |
| 1      | +   | +   | +++  |
| 5      | +   | +   | ++   |
| 4      | +++ | +/- | ++   |
| 2      | +++ | +   | +++  |
| 3      | +++ | +   | ++   |
| 14     | +++ | +   | ++++ |
| РА 103 | +   | +   | ++++ |

Гемолиз и наличие пигмента «+» - слабо выраженный, «++» - умеренно выраженный, «+++» -выраженный; «-» - отсутствие свойств.

Способность к образованию биопленок –«+» - слабо выраженная( ОП<0,2), «++» - умеренно выраженная( ОП 0,2-0,6) «+++» -выраженная( ОП>0,6).

Таблица 11. Способность штаммов S.aureus к образованию биоплёнок и характеристика их свойств.

| Штаммы | Наличие<br>гемолитической<br>активности | Наличие<br>пигмента | Способность<br>образования<br>биопленок |
|--------|-----------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------|
| 31     | ++                                      | -                   | ++                                      |
| 30     | +                                       | -                   | ++                                      |
| 42     | +                                       | +                   | ++                                      |
| 21     | +                                       | +/-                 | ++                                      |
| 53     | +                                       | -                   | +++                                     |
| 87     | ++                                      | -                   | ++                                      |
| 70     | ++                                      | +                   | ++                                      |
| 46     | +                                       | -                   | ++                                      |
| 80     | +                                       | -                   | +++                                     |
| 6м     | +                                       | -                   | +++                                     |
| 22     | +                                       | -                   | ++                                      |
| 24     | +                                       | -                   | ++                                      |
| 50     | +                                       | -                   | ++                                      |
| 52     | ++                                      | -                   | ++                                      |
| 78     | +++                                     | +                   | ++                                      |
| 81     | +                                       | -                   | +++                                     |
| 89     | +++                                     | -                   | ++                                      |
| 85     | +++                                     | -                   | ++                                      |
| 800    | +                                       | -                   | ++                                      |
| 738    | +++                                     | +                   | ++                                      |
| 741    | ++                                      | -                   | ++                                      |

|       |   |   |      |
|-------|---|---|------|
| 754   | + | - | ++   |
| 6538P | - | + | ++++ |

Гемолиз и наличие пигмента «+» - слабо выраженный, «++» - умеренно выраженный, «+++» -выраженный; «-» отсутствие свойств.

Способность к образованию биопленок –«+» - слабо выраженная (ОП<0,2), «++» - умеренно выраженная (ОП 0,2-0,6) «+++» -выраженная (ОП>0,6).

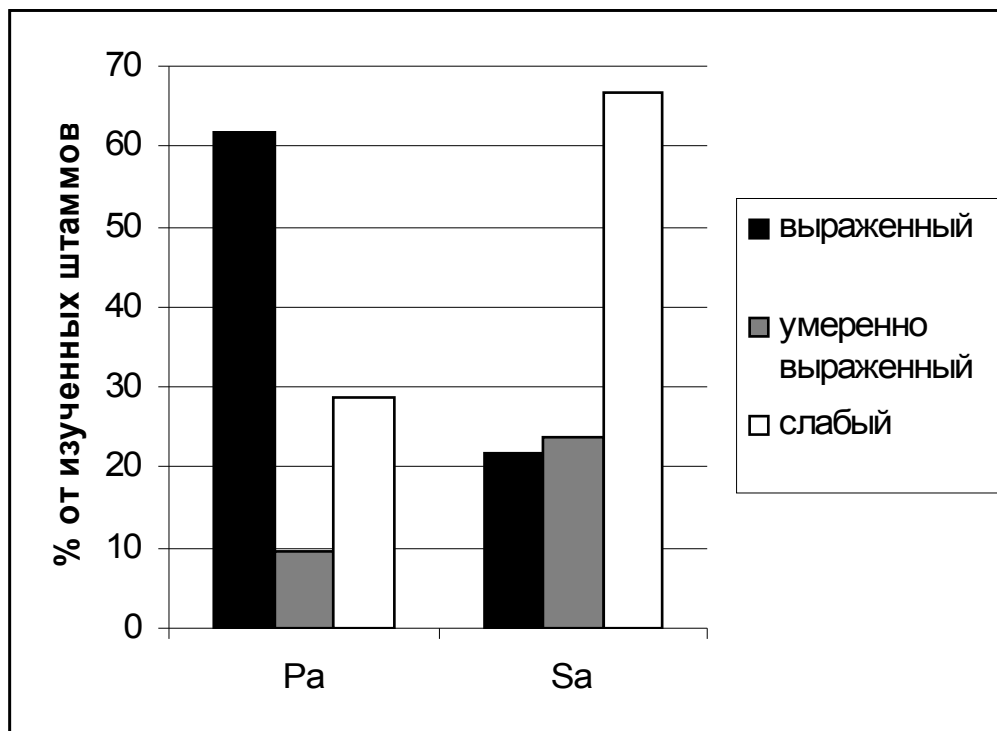


Рис.10. Способность к гемолизу среди изученных штаммов. Pa – *P. aeruginosa*, Sa – *S. aureus*.

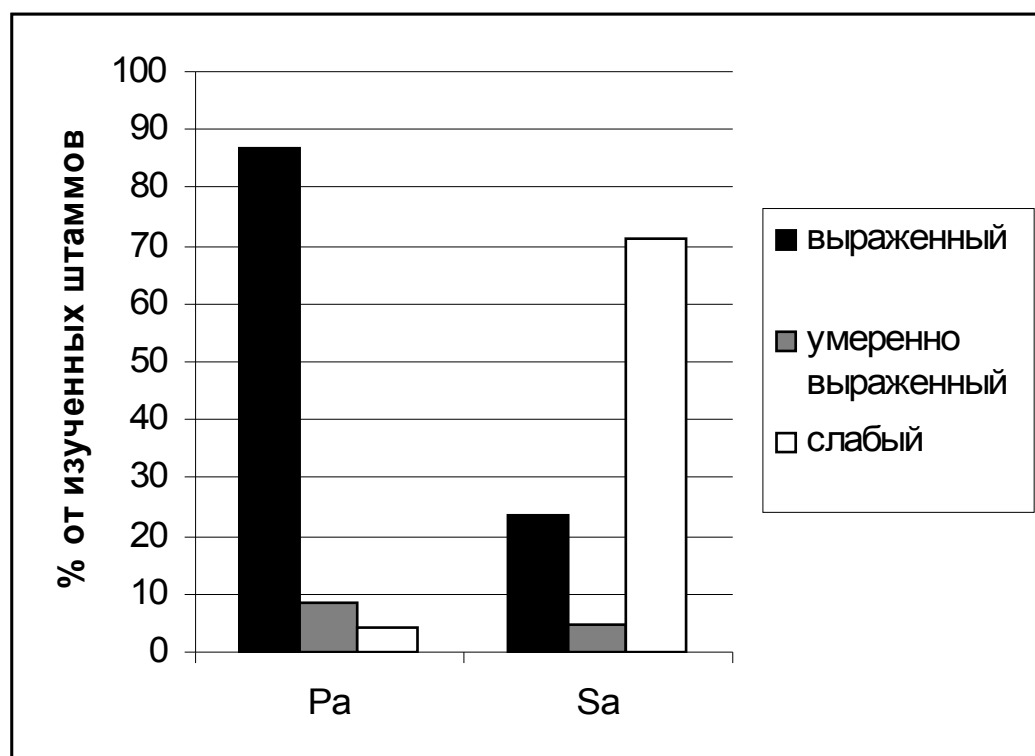


Рис.11. Продукция пигмента среди изученных штаммов. Pa – *P. aeruginosa*, пигмент пиовердин Sa – *S. aureus*, каротиноидный пигмент .

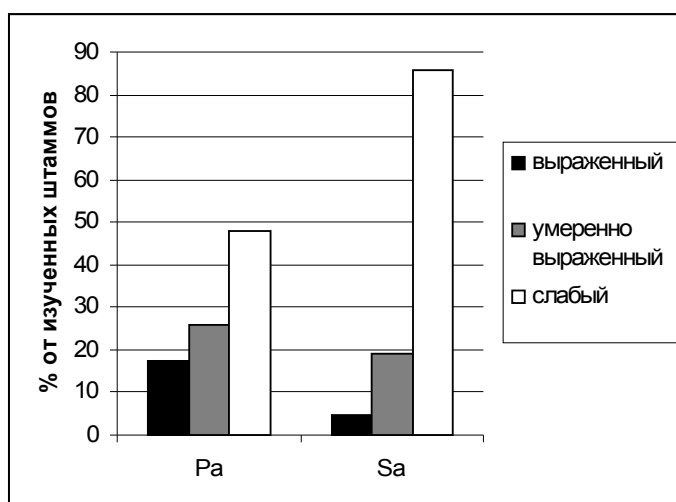
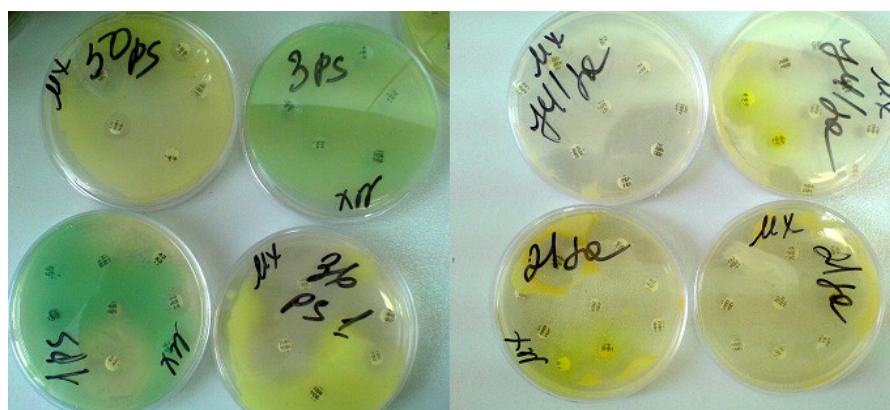


Рис.12. Способность к образованию биопленок среди изученных штаммов. Pa – *P. aeruginosa*, Sa – *S. aureus*.

При изучении антибиотикочувствительности 21 штамма *P.aeruginosa* было выявлено, что около 70%(14) изолятов (№№1,2,3,4,5,12,19,29,30,34м,50,53,80,90) обладали множественной устойчивостью к антибиотикам (более чем к 5 антибиотикам). Среди них были штаммы, полученные как от больных муковисцидозом, так и от пациентов после хирургических вмешательств, находящихся на лечении в Институте Трансплантологии

органов и тканей.

Определение антибиотикочувствительности у 23 штаммов *S.aureus* показало, что все исследованные штаммы можно отнести метициллинчувствительным, однако 61% штаммов были резистентными к ампициллину, 26% (6) изолятов резистентны к азитромицину и 17,4 % штаммов были резистентными к эритромицину. Среди исследованных изолятов 2 штамма (№800 и №85) обладали множественной устойчивостью к антибиотикам (к 4-м и более) (таблица 12, рис.13).



А

В

Рис.13. Определение антибиотикочувствительности дискодиффузионным методом:

А - штаммы *P.aeruginosa*; В - штаммы *S.aureus*.

Таблица 12. Антибиотикочувствительность штаммов *P.aeruginosa*.

| Штаммы | азлоциллин | имипинем | цефотаксим | цефтазидим | цефепим | цефтриаксон | гентамицин | азитромицин | офлоксацин | ципрофлокс | левомецетин | таваник | тобрамицин |
|--------|------------|----------|------------|------------|---------|-------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|---------|------------|
| 90     | R          | S        | R          | R          | R       | R           | R          | R           | S          | S          | R           | I       | S          |
| 13Г    | S          | S        | I          | S          | S       | I           | S          | I           | S          | S          | R           | S       | S          |
| 16     | S          | S        | R          | S          | S       | S           | R          | S           | S          | S          | R           | S       | R          |
| 80     | S          | S        | R          | R          | R       | R           | R          | S           | I          | S          | R           | I       | R          |
| 12     | S          | S        | R          | R          | S       | S           | R          | R           | S          | S          | R           | S       | R          |
| 30     | S          | R        | R          | S          | S       | S           | R          | R           | S          | S          | R           | S       | R          |
| 19     | S          | S        | I          | S          | S       | S           | R          | I           | S          | S          | R           | S       | R          |
| 29     | S          | S        | R          | S          | S       | I           | R          | S           | S          | S          | R           | S       | R          |
| 91     | S          | S        | R          | S          | S       | I           | S          | R           | S          | S          | R           | S       | S          |
| 53     | R          | S        | R          | R          | R       | R           | S          | I           | R          | S          | R           | S       | S          |
| 50     | R          | R        | R          | R          | R       | R           | R          | R           | R          | S          | R           | R       | R          |
| 36     | S          | S        | I          | S          | S       | S           | R          | R           | S          | S          | R           | S       | R          |
| 1      | R          | R        | R          | R          | R       | R           | R          | R           | R          | R          | R           | R       | R          |
| 5      | R          | R        | R          | R          | R       | R           | R          | I           | R          | I          | R           | R       | R          |
| 4      | R          | R        | R          | R          | R       | R           | R          | R           | R          | I          | R           | R       | R          |

**WWW.MEDLINE.RU ТОМ10, БИОФИЗИКА, ОКТЯБРЬ 2009**

|                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <b>2</b>                     | S | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R |
| <b>3</b>                     | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | R | R |
| <b>14</b>                    | S | S | R | S | I | S | S | R | S | S | R | S | S |
| <b>PA 103</b>                | S | R | I | S | S | S | S | R | S | S | I | S | S |
| <b>34м</b>                   | R | S | R | S | R | I | R | R | S | S | R | S | S |
| <b>18 Pa<sub>2</sub> (2)</b> | S | S | R | S | S | R | R | S | S | S | S | S | R |

S - чувствительные, R- резистентные, I- умеренно чувствительные.

Таблица 13. Антибиотикочувствительность штаммов S.aureus.

| штаммы | ампициллин | аугментин | оксациллин | цефалексин | цефотаксим | доксисицилин | гентамицин | эритромицин | азитромицин | офлоксацин | норфлоксацин | ципрофлоксацин | линкомицин | левамецетин | рифампицин | таваник | фурагин | фурадонин |
|--------|------------|-----------|------------|------------|------------|--------------|------------|-------------|-------------|------------|--------------|----------------|------------|-------------|------------|---------|---------|-----------|
| 31     | S          | S         | S          | S          | S          | I            | S          | S           | S           | S          | I            | R              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 30     | S          | S         | S          | S          | S          | S            | S          | S           | S           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 42     | S          | S         | S          | S          | S          | S            | S          | S           | S           | S          | R            | S              | I          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 21     | S          | S         | S          | S          | S          | S            | S          | S           | S           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 53     | R          | S         | S          | S          | S          | S            | S          | S           | R           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 87     | S          | S         | S          | S          | S          | I            | S          | R           | R           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 70     | R          | I         | S          | S          | S          | S            | S          | S           | S           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 46     | R          | S         | S          | S          | S          | S            | S          | S           | S           | S          | S            | S              | S          | I           | S          | S       | S       | S         |
| 80     | R          | S         | S          | S          | S          | S            | S          | S           | S           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 6м     | R          | S         | S          | S          | S          | S            | S          | S           | S           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 22     | S          | S         | S          | S          | S          | S            | R          | S           | R           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 24     | R          | S         | S          | S          | S          | S            | S          | S           | S           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 50     | R          | S         | S          | S          | S          | S            | I          | S           | S           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | R       | S         |
| 52     | S          | S         | S          | S          | S          | S            | I          | R           | R           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 78     | R          | S         | S          | S          | S          | S            | S          | S           | S           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 81     | R          | S         | S          | S          | S          | S            | S          | S           | S           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 89     | R          | S         | S          | S          | S          | S            | S          | S           | S           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 85     | R          | S         | S          | S          | S          | S            | R          | R           | R           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 800    | R          | S         | S          | S          | S          | R            | S          | R           | R           | S          | S            | R              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 738    | R          | S         | S          | S          | S          | S            | S          | S           | S           | S          | S            | S              | S          | R           | S          | S       | S       | S         |
| 741    | S          | S         | S          | S          | S          | S            | S          | S           | S           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 754    | R          | S         | S          | S          | S          | S            | S          | S           | S           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |
| 6538P  | S          | S         | S          | S          | S          | S            | S          | S           | S           | S          | S            | S              | S          | S           | S          | S       | S       | S         |

S - чувствительные, R- резистентные, I- умеренно чувствительные.

Была оценена способность отобранных штаммов *P.aeruginosa* и *S.aureus* к образованию биоплёнок (рис.14). В результате проведенных исследований показано, что 3 штамма (№№ PA103,14,12) *P.aeruginosa* обладали выраженной способностью к образованию биопленок и 6 штаммов (№№1,2,16,30,34,36) умеренной способностью к образованию биоплёнок (таблица 3, рис.3, таблица 7). Среди штаммов *S.aureus* 1 референс-штамм № 6538Р обладал выраженной способностью к образованию биоплёнок и 4 изолята (№№ 6,53,80,81) умеренной способностью к образованию биоплёнок (таблица 13, рис.15, таблица 14).

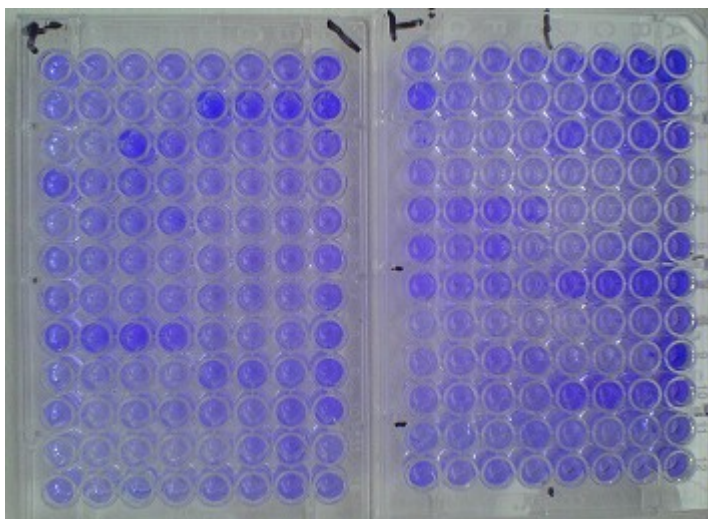


Рис. 14. Интенсивность окрашивания содержимого лунок полистироловых планшет при оценке эффективности образования биопленок.

[illegible]

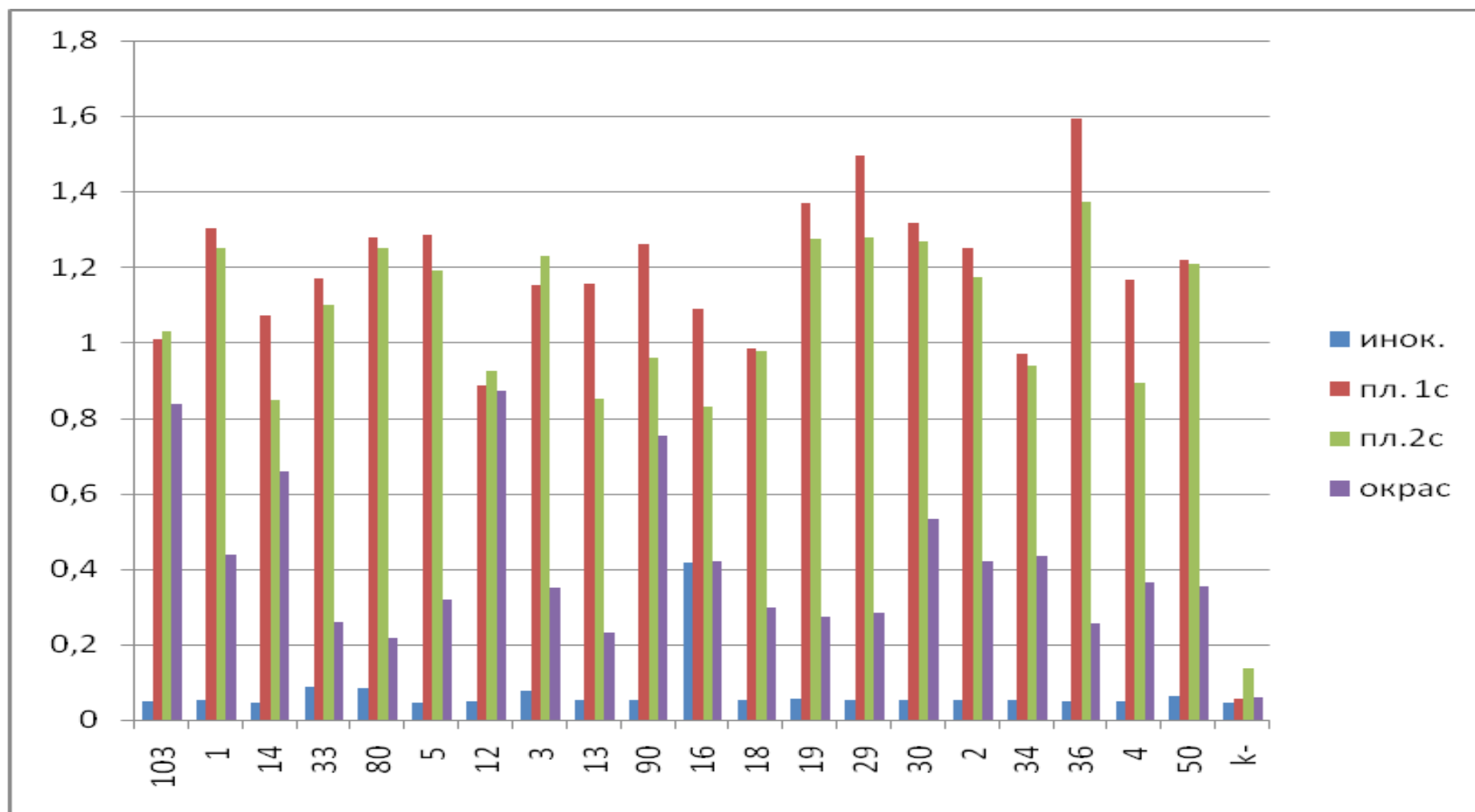


Рис.15. Способность к образованию биопленок бактериями *P. aeruginosa*.

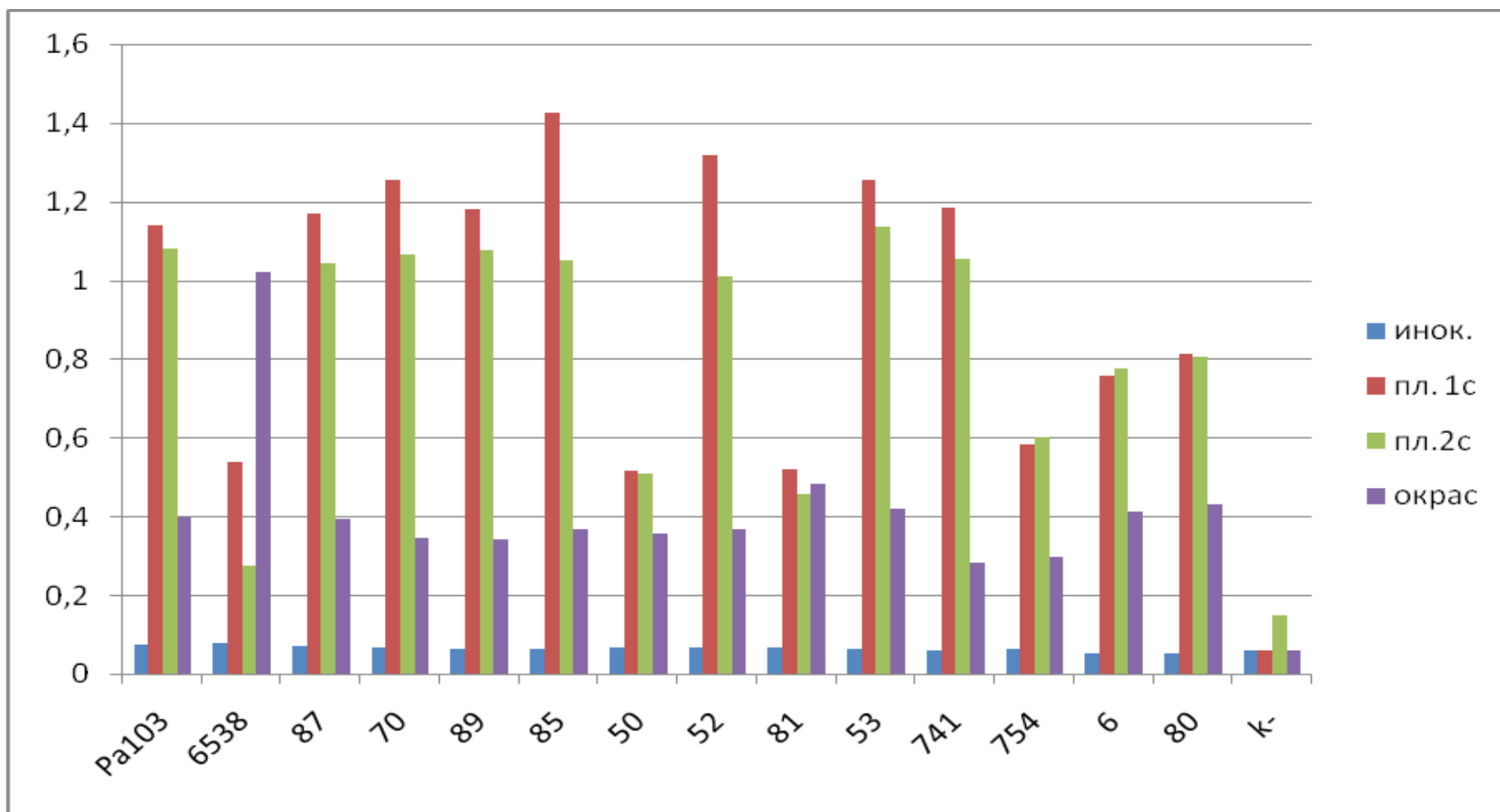


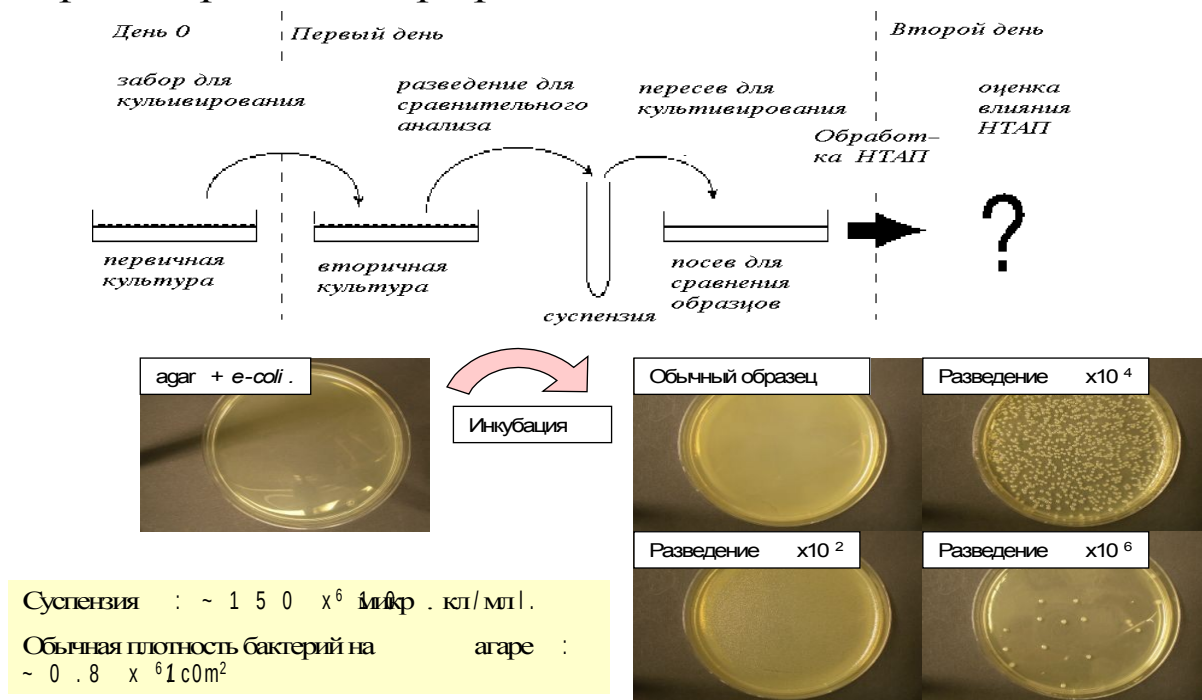
Рис.16. Способность к образованию биопленок бактериями *S. aureus*.

Учитывая полученные данные, для дальнейших экспериментов на животных целесообразно использовать штаммы *P.aeruginosa* и *S.aureus*, обладающие выраженными и/или умеренно выраженными гемолитическими свойствами, способностью к образованию биопленок и обладающие множественной устойчивостью к антибиотикам. К таким штаммам можно отнести следующие штаммы *P.aeruginosa* №№ 12, 14, PA 103 и штаммы *S.aureus* №№ 78,85,6538P.

### 3.4. Исследование влияния параметров и режимов применения низкотемпературной аргоновой плазмы на жизнеспособность культивируемых *in vitro* патогенных микроорганизмов (грамм-положительные, грамм-отрицательные и полирезистентные бактерии).

Измерение влияния длительности облучения НТАП на культивируемые штаммы выделенных из раневой поверхности микроорганизмов проводилось в сравнении с их обычным разведением согласно представленному протоколу:

#### Протокол работы с микроорганизмами



Как показано на схеме протокола, получали высоко концентрированную суспензию с относительно стандартным содержанием микроорганизмов и стандартизованной плотностью засева агара для получения сопоставимых результатов независимо от вида используемого штаммов бактерий. Величина бактерицидного эффекта НТАП изучалась при экспозиции 2 или 3 минуты. На рис. 175 приведены результаты бактерицидного

воздействия НТАП при двухминутной экспозиции культивируемых микроорганизмов под лучом.

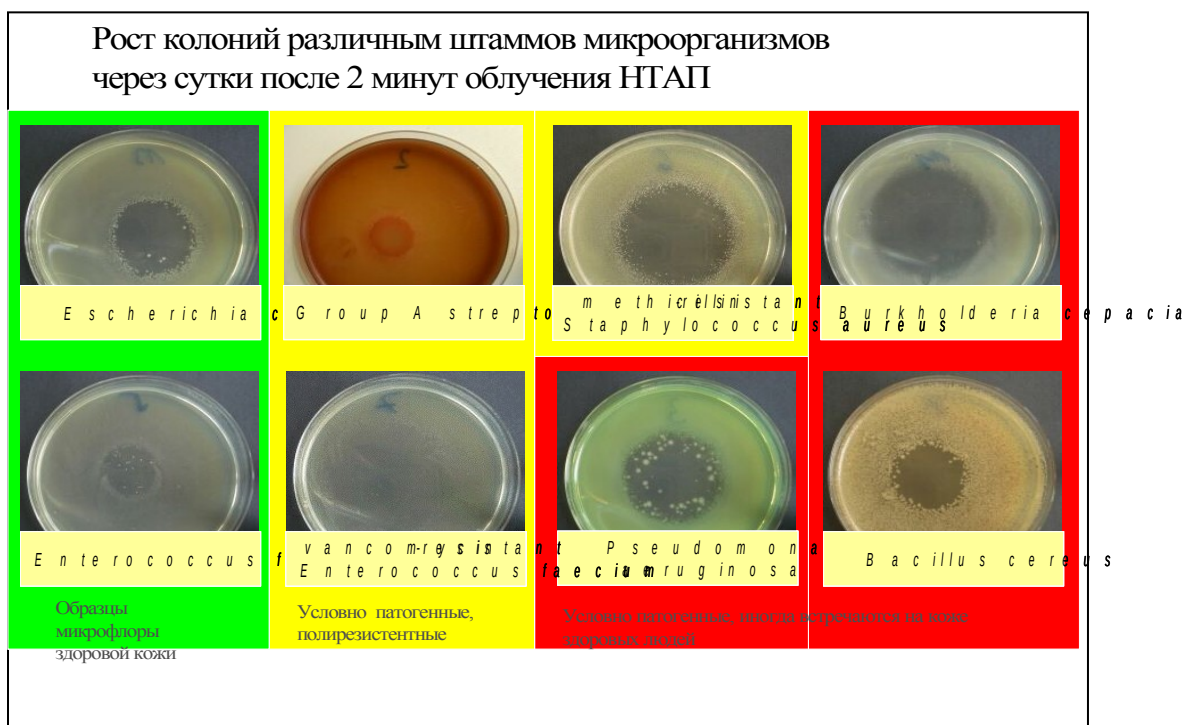


Рис. 17 Дезинфицирующее действие низкотемпературной аргоновой плазмы in vitro.

Увеличение экспозиции облучения до 4-х минут позволило увеличить площадь «поражения» до 55-60 мм в диаметре. Однако количество колоний, выросших через сутки после четырехминутного облучения, на подвергнутой обработке поверхности было практически таким же, как после двухминутного облучения. Следовательно, для достижения бактерицидного эффекта in vitro достаточно двухминутного воздействия НТАП, что в 5-7 раз меньше длительности планируемого сеанса плазменной обработки инфицированных ран.

**3.5. Разработка программы и проведение медико-биологических испытаний с использованием культур клеток покровных мягких тканей (первичные и перевиваемые культуры клеток) и исследование функционального состояния фагоцитирующих клеток млекопитающих (кислородзависимая и кислороднезависимая бактерицидная активность, интерферонообразование) in vitro.**

В настоящее время разработаны многочисленные СВЧ устройства для получения плазмы, свойства которой зависят от способа получения. Именно характеристики конкретных

газоразрядных устройств определяют структуру электромагнитного поля, энергетическую эффективность, широкополосность, частоту, уровни минимальной и максимальной мощности генерируемой плазмы.

В излучении плазменной струи, получаемой с помощью разработанной в ходе выполнения проекта СВЧ-горелки, было обнаружено два пика в длинноволновом УФ-диапазоне – 309 и 316 нм., измеренная мощность УФ излучения на расстоянии 2 см от обрабатываемого объекта составила 80 мкВт/см<sup>2</sup>. Излучение данных длин волн при обработке инфицированной поверхности раны оказывает бактерицидное воздействие, однако фотоповреждение клеточных структур может привести к нарушению функциональной активности и гибели клеток покровных мягких тканей.

Наряду с этим в спектре НТАП присутствуют полосы в диапазонах волн красного и инфракрасного света, которые согласно литературным данным оказывают стимулирующее воздействие на процессы регенерации ткани. Так установлено, что искусственное излучение красного (620-680нм) и ближнего инфракрасного (ИК) света оказывает лечебно-профилактическое действие на сетчатку глаза (при этом эффективность лечения глаукомы и катаракты составляет в среднем около 80%) и на весь организм (Панков О.П., Офтальмология, В кн. «Низкоинтенсивная лазерная терапия», М.,2000г). В научной литературе, несмотря на большое число исследований разных аспектов квантовой терапии, остается много нерешенных вопросов и отсутствует единое мнение о влиянии облучения низкой интенсивности на функциональное состояние клеток покровных мягких тканей и клеток иммунной системы человека. Лечебный эффект фототерапии определяется механизмом физиологического действия красного и ближнего инфракрасного света - он снижает воспалительные реакции, улучшает тканевую регенерацию, местную сопротивляемость и противоинфекционную защиту.

При испытаниях плазменного генератора «Плазмон» («плазменного скальпеля»), разработанного в МГТУ имени Баумана, было обнаружено, что при воздействии на расстоянии 20—30 см от выхода плазмотрона раны быстро очищаются и заживают. Газоспектральный анализ показал, что именно на этом расстоянии в плазменном потоке образуется большое количество оксида азота— NO, которому и приписывается важная роль в стимуляции заживления ран. Механизм этой стимуляции до конца не выявлен, скорее всего, речь идет о комбинированном бактериостатическом и иммуномодулирующем воздействии. Большинство этих эффектов оксида азота связано с активацией растворимой гуанилатциклазы и образованием циклического GMP (Брюне Б. и др., 1998; Северина И.С., 1998). NO также чрезвычайно важен для системы

неспецифического иммунитета. На мышинных макрофагах, а затем и на различных других макрофагах, было показано, что NO необходим для обеспечения их цитотоксического действия на опухолевые клетки и клетки, пораженные вирусом (Albina J.E. and Reichner J.S., 1998). Механизм действия оксида азота в этом случае не связан с активацией гуанилатциклазы и обусловлен, в основном, эффектами самого NO и образующихся нитроксильных радикалов. В этой связи следует указать на свободнорадикальную природу молекулы оксида азота (наличие неспаренного электрона у атома азота), что делает его весьма реакционно-способным соединением. Среднее время жизни NO *in vivo* составляет 5-30 секунд (Недоспасов А.А., 1998), он достаточно быстро взаимодействует со своими мишенями (в основном, тиолами и переходными металлами) или окисляется до неактивных нитрата и нитрита, например, цитохром С оксидазой (Torres J. et al., 2000), или образует так называемые активные формы азота. Показано, что в первую очередь NO (макрофагальный или экзогенный) ингибирует дыхательную цепь и окислительное фосфорилирование в митохондриях клеток-мишеней. Это происходит, так как NO обратимо связывается с цитохром оксидазой дыхательной цепи митохондрии. С другой стороны, подавление электронного транспорта в митохондрии приводит к генерации супероксида, и образованию пероксинитрита ONOO-, который подавляет ферменты дыхательной цепи необратимо, нитрозилируя их и отнимая железо (Moriya R. et al., 2000). Подавление митохондриального дыхания приводит к падению энергопродукции, что может инициировать апоптотический процесс (Borutaite V. et al., 2000). С другой стороны известно, что при отсутствии глюкозы или блокировании гликолиза NO-индуцированное подавление дыхания приведет скорее к некрозу, чем к апоптозу (Bal-Price A. and Brown G.C., 2000). Таким образом, действие NO носит прямой или косвенный характер. К настоящему времени в научной литературе можно найти почти равное количество свидетельств, как цитотоксического действия, так и защитных эффектов этого соединения в зависимости от уровня NO. Все это осложняет переход от теоретических разработок к практическому использованию технологий, связанных с генерацией NO, поскольку при таком разнообразии эффектов *in vitro* трудно предсказать их воздействие на уровне многоклеточного организма.

Таким образом, в случае каждого конкретного генератора плазмы необходимо провести определение и оптимизацию газового и спектрального состава плазмы и разработать режимы обработки НТАП, при которых создается максимальный бактерицидный эффект при щадящем, а желательно и стимулирующем воздействии на клетки покровных мягких тканей. Одной из наиболее важных задач первого этапа

проекта было проведение медико-биологических испытаний и разработка клеточных *in vitro* моделей оценки функционального состояния первичных и перевиваемых культур клеток покровных мягких тканей (жизнеспособность, митохондриальная и пролиферативная активности) и фагоцитирующих клеток млекопитающих (кислородзависимая и кислороднезависимая бактерицидная активность, интерферонообразование) при воздействии факторов, определяющих биологическую активность НТАП.

Для оценки влияния НТАП в ходе проекта был разработан и адаптирован ряд оригинальных биомедицинских моделей:

1) Система оценки состояния раневого процесса и показателей иммунитета по анализу крови *in vitro*. На 39 образцах крови больных с вторичной иммунной недостаточностью и 32 образцах крови практически здоровых лиц впервые выделено 5 типов ответов на моделирующее «контрольное» низкоинтенсивное лазерное облучение (632 нм), в зависимости от дозы и исходного уровня продукции активных форм кислорода.

2) Впервые *in vitro* модель репарации ран, основанная на контракции коллагенового геля иммобилизованными в его объеме фибробластами, применена для исследования физических воздействий (УФ и ИК излучений) на функциональную активность культур клеток покровных мягких тканей.

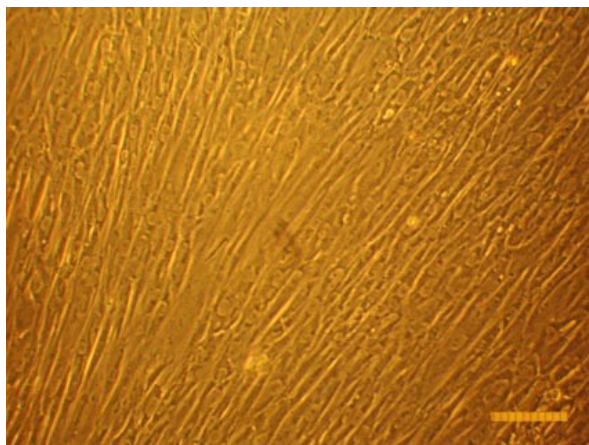
3) Модель определения влияния физическо-химических воздействий на жизнеспособность и функциональную активность культур клеток покровных мягких тканей (эпителия и фибробластов), основанная на исследовании уровня активности митохондриальных и цитозольных дегидрогеназ, показавшая высокую чувствительность при определении воздействия УФ и ИК излучений.

Детальное описание разработанных *in vitro* моделей и результатов, полученных в ходе медико-биологических испытаний с использованием культур клеток покровных мягких тканей и фагоцитирующих клеток млекопитающих, приведено в пунктах 2.3.5.1. и 2.3.5.2. настоящего отчета.

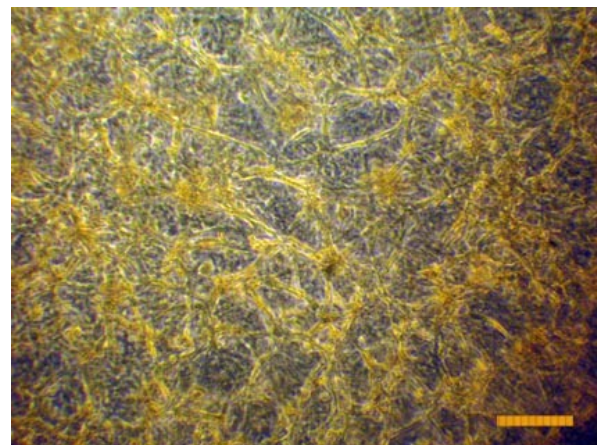
### **3.5.1. Исследование влияния параметров и режимов применения низкотемпературной аргоновой плазмы на жизнеспособность, пролиферативную активность культивируемых *in vitro* клеток млекопитающих.**

В качестве экспериментальной модели для исследования влияния физических факторов на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток использовали две системы культивирования клеток: на поверхности культурального пластика и в матриксе

флотирующего коллагенового геля. Данные системы культивирования различаются, прежде всего, морфологическими характеристиками (рис.18), биосинтетической и пролиферативной активностями клеток.



А



Б

Рис.18. Морфология эмбриональных фибробластов человека, культивируемых на поверхности пластика (А) и в матриксе коллагенового геля (Б)

Для исследования влияния физических факторов (УФ-излучения) на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток использовали культуры клеток покровных мягких тканей, культивируемых на поверхности пластика. (Рис.19)

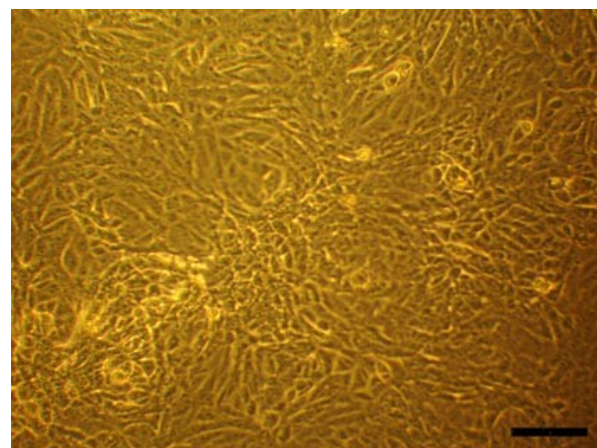
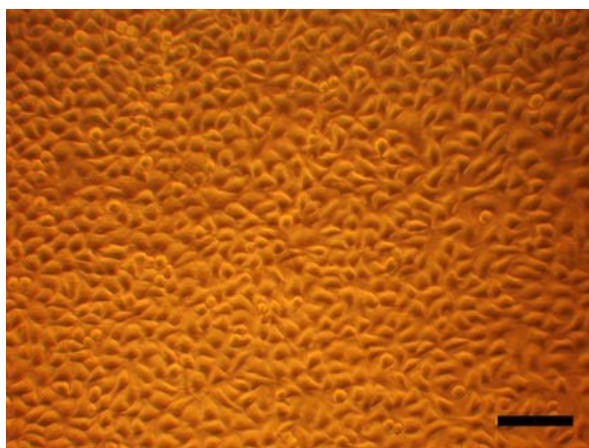


Рис 19. Внешний вид клеток NCTC L929 (А) и Vero (Б) через двое суток после посева на поверхность культурального пластика. Линейка 100 мкм.

Исследование пролиферативной активности эпителиальных клеток линии Vero и фибробластов линии NCTC clone L929 при различных режимах воздействия ультрафиолетовым светом показало значительное снижение пролиферативной активности при облучении клеток в течение 1 минуты и полное блокирование пролиферации и регрессию клеток обоих типов при облучении в течение 10 минут. (Рис.20, 21)

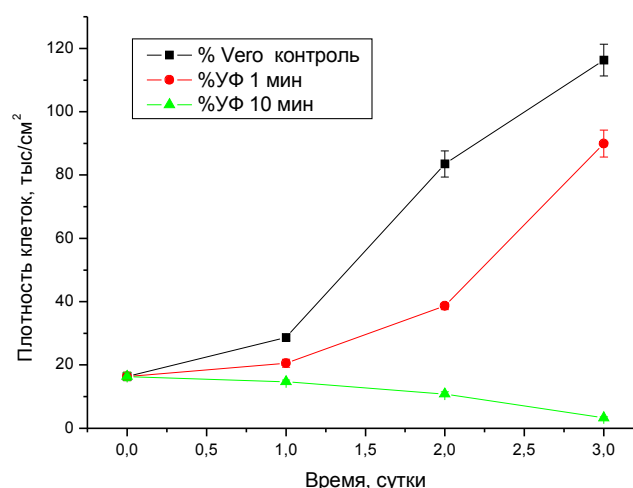


Рис.20. Пролиферативная активность эпителиальных клеток линии Vero при воздействии ультрафиолетовым светом.

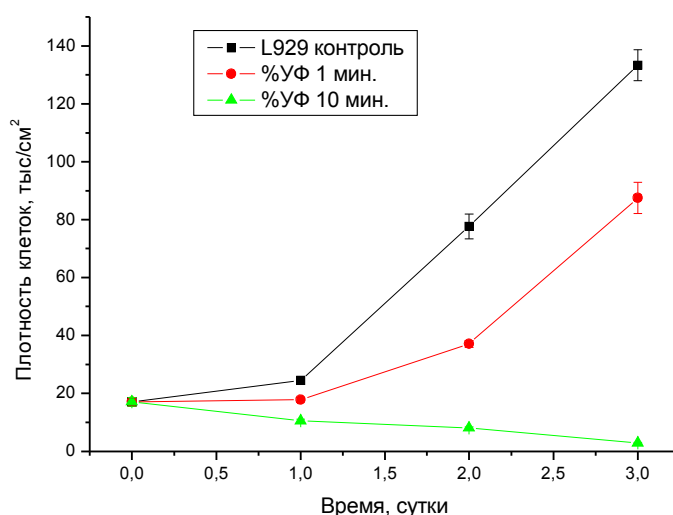


Рис. 21. Пролиферативная активность фибробластов линии NCTC L929 при воздействии ультрафиолетовым светом.

Для определения жизнеспособности культивируемых клеток был применен МТТ-тест, основанный на восстановлении бесцветной соли тетразолия митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана, растворимого в диметилсульфоксиде. Спектрофотометрические данные по количеству формазана в клеточных культурах при различных режимах облучения ультрафиолетовым светом свидетельствуют о значительном снижении дегидрогеназной активности при облучении клеток. (Рис.22, 23)

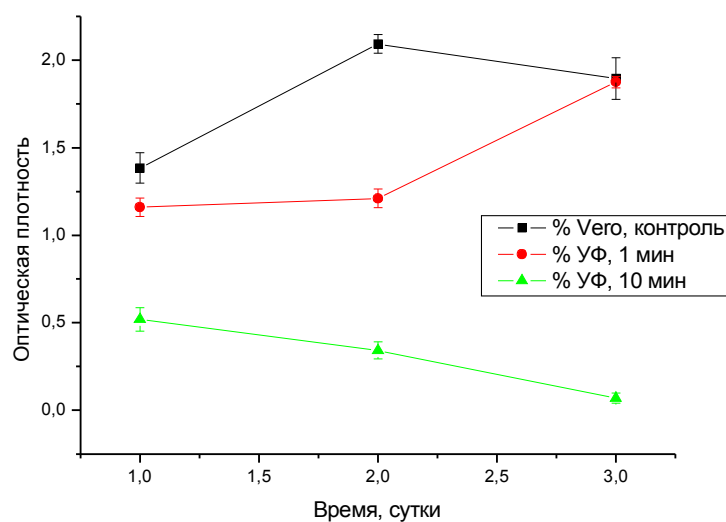


Рис.22. Зависимость оптической плотности в МТТ – тесте от времени облучения эпителиальных клеток линии Vero ультрафиолетовым светом.

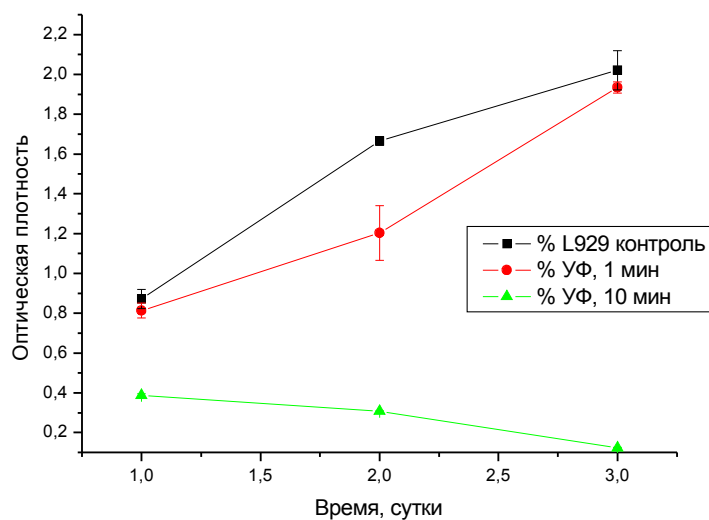


Рис.23. Зависимость оптической плотности в МТТ – тесте от времени облучения эпителиальных клеток линии Vero ультрафиолетовым светом.

Сравнение данных прямого подсчета количества клеток и активности митохондриальных и цитоплазматических дегидрогеназ живых метаболически активных клеток показало, что МТТ-тест может быть использован для исследования влияния режимов воздействия ультрафиолетового света на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток линий Vero и NCTC clone L929, культивируемых на поверхности пластика. Исследование показало значительное снижение числа жизнеспособных клеток и полное отсутствие пролиферативной активности при облучении клеток УФ-светом в течение 10 минут, однако минутное освещение не приводит к значительному изменению клеточной активности, а лишь задерживает начало пролиферации клеток. При

практически одинаковом сигнале МТТ-теста на третьи сутки культивирования количество клеток в лунках, подвергшихся минутному облучению ультрафиолетом все еще значительно меньше, чем в контроле для клеток обоих типов. Это можно объяснить снижением активности клеточных дегидрогеназ при достижении клетками состояния монослоя (выходе в  $G_0$  фазу клеточного цикла).

Для *разработки in-vitro модели исследования эффективности воздействия НТАП на жизнеспособность и пролиферативную активность культур клеток покровных мягких тканей* были проведены эксперименты по исследованию активности дегидрогеназ (МТТ-тест) в эпителиальных клетках линий Vero и фибробластах линии L929 при различных режимах облучения светом ультрафиолетового, красного и инфракрасного диапазонов, присутствующих в спектре НТАП. Было проведено исследование жизнеспособности клеток, подвергнутых воздействию критических доз ультрафиолетового излучения (10 мин при бактерицидной мощности  $1\text{ мВт/см}^2$ ) и терапевтических доз ( $40\text{ мкВт/см}^2$ , 30 мин) излучений красного и инфракрасного диапазонов. (Рис.24).

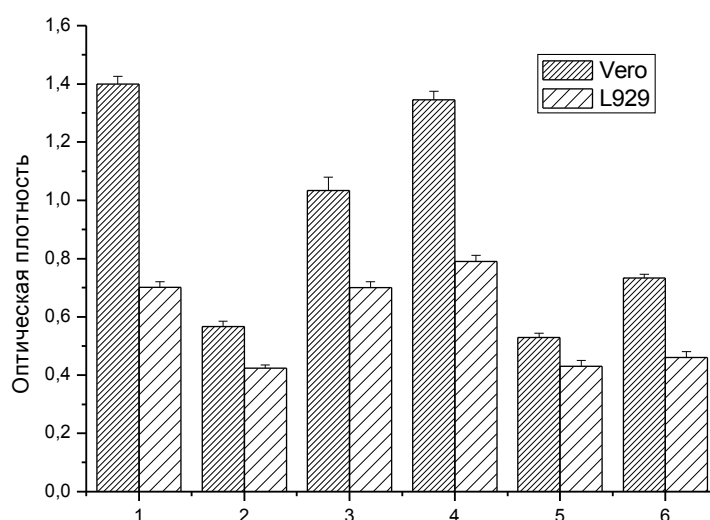


Рис.24. Зависимость оптической плотности в МТТ – тесте от времени облучения клеток линий Vero и NCTC L929 светом при различных режимах облучения:

1. Контроль, клетки без облучения;
2. УФ-свет 10 мин;
3. Красный свет,  $\lambda=630-660\text{ нм}$  30 мин;
4. ИК-излучение,  $\lambda=840-890\text{ нм}$ ;
5. УФ-свет 10 мин затем через 1 час красный свет, 30 мин;
6. УФ-свет 10 мин затем через 1 час ИК-излучение 30 мин

При этом, следует отметить разную чувствительность эпителиальных и фибробластоподобных клеток к фотоповреждению и к действию излучений в инфракрасном и красном диапазонах. Так, через сутки после облучения

ультрафиолетовым светом жизнеспособность фибробластов и эпителия снижается соответственно на 40 и 59,5% по сравнению с контролем. Красный свет не оказывает воздействия на фибробласты, однако угнетает жизненную активность эпителиальных клеток, такая же тенденция сохраняется при облучении красным светом клеток, травмированных УФ-излучением. Инфракрасное излучение стимулирует фибробласты и незначительно угнетает эпителий и оказывает ярко выраженное стимулирующее действие на оба типа клеток, переживших облучение УФ-светом в критической дозе ( Таблица 15).

Таблица 15. влияния параметров и режимов воздействия света ультрафиолетового, инфракрасного и красного диапазонов на жизнеспособность и пролиферативную активность эпителиальных клеток линии Vero и фибробластов NCTC clone L929

| Режим облучения                                                      | Активность по данным МТТ-теста, фибробласты линии NCTC L929 | Активность по данным МТТ-теста, эпителиальные клетки линии Vero |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Контроль, клетки без облучения                                       | 100%                                                        | 100%                                                            |
| УФ-свет, 1мВт/см <sup>2</sup> , 10 мин                               | 60%                                                         | 40,5%                                                           |
| Красный свет, $\lambda=630-660$ нм, 40 мкВт/см <sup>2</sup> , 30 мин | 100%                                                        | 73,9%                                                           |
| ИК-излучение, $\lambda=840-890$ нм, 40 мкВт/см <sup>2</sup> , 30 мин | 112,6%                                                      | 96,1%                                                           |
| УФ-свет 10 мин затем через 1 час красный свет, 30 мин.               | 61,4%                                                       | 37,8%                                                           |
| УФ-свет 10 мин затем через 1 час ИК-излучение 30 мин                 | 65,6%                                                       | 52,4%                                                           |

Таким образом, проведенное исследование влияния параметров и режимов воздействия света ультрафиолетового, инфракрасного и красного диапазонов на жизнеспособность и пролиферативную активность эпителиальных клеток линии Vero и фибробластов NCTC clone L929 показало применимость МТТ-теста для исследования воздействия физических факторов на клетки.

***Разработка in vitro модели воздействия физических факторов на динамику заживления ран.*** Признанной моделью для исследования воздействия физико-

химических факторов на заживление кожных ран является модель флотирующего (открепленного) коллагенового геля, которая была использована в данной работе для определения влияния различных режимов воздействия ультрафиолетового света на функциональную активность фибробластов линии NCTC clone L929 и эмбриональных фибробластов человека, иммобилизованных в матриксе коллагенового геля типа I. Изменение диаметра контрактирующего диска является одним из показателей жизнеспособности и функциональной активности фибробластов (Рис.25) и служит для оценки скорости заживления ран.

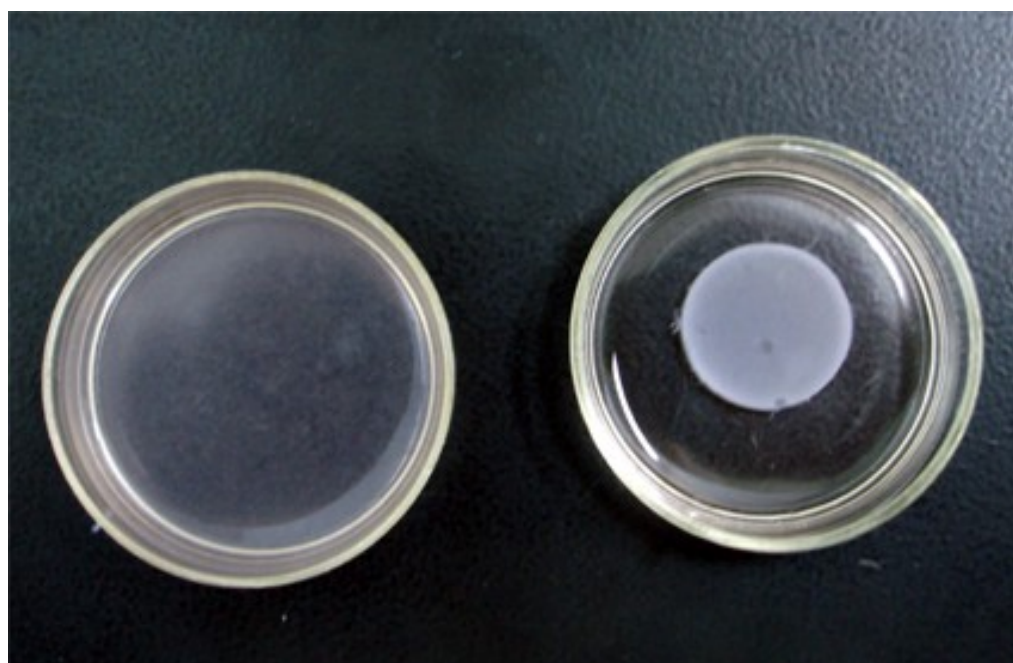


Рис.25. Контракция коллагенового геля с иммобилизованными в объеме эмбриональными фибробластами человека (справа) и отсутствие контракции коллагенового геля без клеток (слева).

Исследование динамики контракции коллагеновых гелей трансформированными фибробластами линии L929 и первичной культурой фибробластов, выделенных из кожно-мышечной ткани эмбрионов человека, и показало сравнимые результаты воздействия УФ-света на первичную и линейную культуры клеток. (Рис.26 , 27)

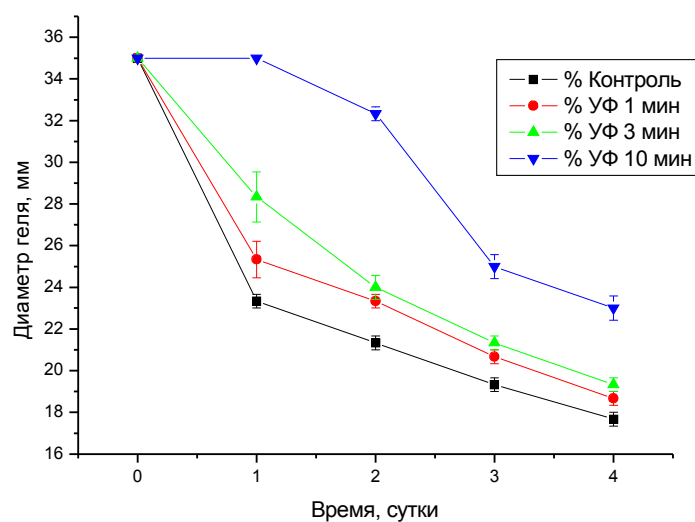


Рис.26. Динамика контракции коллагеновых гелей с иммобилизованными эмбриональными фибробластами человека при различных режимах облучения ультрафиолетовым светом.

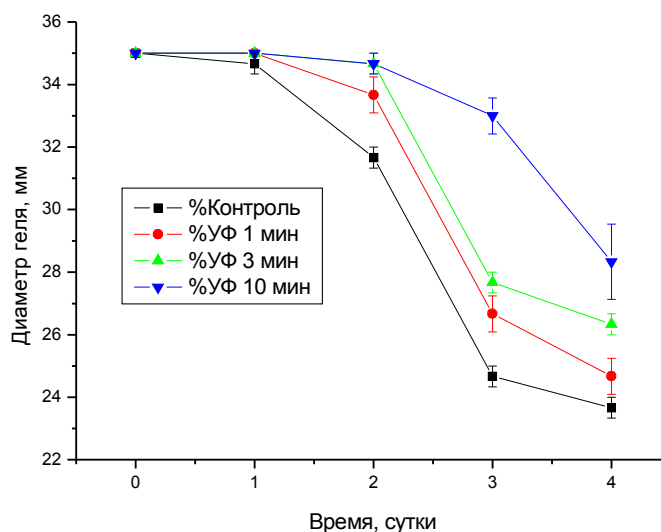


Рис.27. Динамика контракции коллагеновых гелей с иммобилизованными фибробластами линии L929 при различных режимах облучения ультрафиолетовым светом.

Проведенное исследование показало, что воздействие ультрафиолетового света замедляет процесс контракции коллагенового геля, однако даже при облучении УФ-светом в течение 10 минут не происходит существенного нарушения жизнеспособности и функциональной активности фибробластов, культивируемых в трехмерном коллагеновом матриксе. В отличие от клеток, культивируемых на пластике, клетки, иммобилизованные в коллагеновом геле являются более устойчивы к воздействию ультрафиолетового света. Таким образом, использованные при исследовании влияния физико-химических факторов (УФ-излучения) модели культивирования клеток на поверхности культурального пластика и в трехмерном матриксе коллагена являются взаимодополняющими и позволяют исследовать влияние параметров и режимов физико-химического воздействия на жизнеспособность, пролиферативную активность культивируемых *in vitro* клеток млекопитающих. Данные модели могут быть использованы при разработке программы и проведении медико-биологических испытаний с использованием культур клеток покровных мягких тканей.

### **3.5.2. Исследование влияния режимов применения низкотемпературной аргоновой плазмы на параметры клеточного иммунитета: функциональное состояние фагоцитирующих клеток, включая оценку кислородзависимой бактерицидной активности, а также интерферонообразование в тестах *in vitro*.**

С целью отработки методических подходов для изучения влияния низкотемпературной аргоновой плазмы на функциональную активность нейтрофилов в тестах *in vitro* на данном этапе работы проведено исследование индивидуальной чувствительности к различным дозам лазерного излучения по результатам НСТ-теста. Исследовано влияние различных доз лазерного излучения на ФАН в тесте *in vitro* на 39 образцов крови больных вторичной иммунной недостаточностью и хроническими незаживающими язвами конечностей и 32 практически здоровых лиц (контрольная группа).

Кроме того, на данном этапе исследования было изучено исходное состояние кислороднезависимой бактерицидности (уровень катионных белков) и способность к продукции интерферонов альфа и гамма в 20 образцах крови больных вторичной иммунной недостаточностью и хроническими незаживающими язвами конечностей.

Таблица 16. Характеристика больных с ВИН и обследованных лиц контрольной группы.

|  | Обследованная группа | Контрольная группа |
|--|----------------------|--------------------|
|--|----------------------|--------------------|

|             |                 |              |
|-------------|-----------------|--------------|
|             | (39 чел)        | (32 чел)     |
| Возраст     | От 36 до 62 лет | 32 до 52 лет |
| Мужчины     | 17 чел          | 14 чел       |
| Женщины     | 22 чел          | 18 чел       |
| Синдром ВИН | есть            | Нет          |

***Исследование уровня продукции АФК нейтрофилами при воздействии красного лазерного излучения  $\lambda=632$  нм***

Было исследовано 39 проб крови, взятых у больных с вторичным иммунодефицитом, проходивших обследование в лаборатории клинической иммунологии НИИ Физико-химической медицины. Все пробы подвергались воздействию НИЛИ по описанной выше схеме. Затем, подсчитывался коэффициент лазерной стимуляции (Клс) по формуле:

Клс = значение НСТ-теста после ЛО/ значение НСТ-теста без ЛО

Полученные результаты приведены в таблице 14.

Таблица 17. Значения спонтанного НСТ-теста и Клс при облучении проб крови *in vitro* различными дозами красного лазера у обследованных пациентов (n=39)

| Инд№\<br>Доза,<br>Дж/см <sup>2</sup> | Спонт.<br>НСТ | 0,0  | 0,4  | 0,8  | 2    | 4    | 6    | 8    | 12   |
|--------------------------------------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1                                    | 97,60         | 1,00 | 0,89 | 0,97 | 1,10 | 1,34 | 1,49 | 1,16 | 1,29 |
| 2                                    | 89,17         | 1,00 | 1,10 | 1,22 | 1,23 | 1,18 | 1,30 | 1,19 | 0,94 |
| 3                                    | 142,33        | 1,00 | 0,85 | 0,68 | 0,83 | 0,79 | 0,72 | 1,01 | 0,80 |
| 4                                    | 155,00        | 1,00 | 1,08 | 1,41 | 1,29 | 1,37 | 1,60 | 1,31 | 1,59 |
| 5                                    | 155,00        | 1,00 | 0,85 | 0,93 | 0,90 | 1,03 | 1,01 | 0,75 | 1,17 |
| 6                                    | 184,67        | 1,00 | 1,12 | 0,99 | 0,87 | 0,78 | 0,96 | 0,87 | 0,96 |
| 7                                    | 184,67        | 1,00 | 0,94 | 1,11 | 1,14 | 1,27 | 1,10 | 0,97 | 0,97 |
| 8                                    | 145,67        | 1,00 | 1,25 | 1,06 | 1,90 | 1,88 | 1,73 | 1,57 | 1,55 |
| 9                                    | 145,67        | 1,00 | 1,15 | 0,87 | 1,24 | 1,38 | 1,16 | 1,50 | 1,08 |
| 10                                   | 114,33        | 1,00 | 1,03 | 1,06 | 1,24 | 0,97 | 0,98 | 1,02 | 1,01 |
| 11                                   | 86,33         | 1,00 | 1,29 | 1,42 | 0,96 | 1,14 | 1,19 | 1,18 | 1,15 |
| 12                                   | 102,33        | 1,00 | 0,86 | 1,35 | 1,25 | 1,07 | 1,11 | 1,07 | 1,03 |
| 13                                   | 112,00        | 1,00 | 0,82 | 0,95 | 0,91 | 0,78 | 0,95 | 0,76 | 0,86 |
| 14                                   | 83,67         | 1,00 | 1,67 | 1,91 | 1,72 | 1,63 | 1,67 | 2,10 | 1,95 |
| 15                                   | 155,00        | 1,00 | 0,93 | 1,37 | 1,03 | 1,22 | 1,11 | 1,10 | 1,06 |
| 16                                   | 174,33        | 1,00 | 1,11 | 1,08 | 1,43 | 1,42 | 1,13 | 1,78 | 1,48 |
| 17                                   | 181,67        | 1,00 | 0,71 | 0,78 | 0,65 | 0,78 | 0,75 | 0,84 | 0,72 |

|    |        |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 18 | 90,33  | 1,00 | 0,90 | 0,91 | 0,85 | 0,89 | 1,19 | 1,09 | 1,09 |
| 19 | 100,33 | 1,00 | 1,50 | 1,01 | 0,88 | 0,78 | 0,98 | 0,66 | 0,81 |
| 20 | 155,00 | 1,00 | 1,48 | 1,08 | 1,58 | 1,56 | 1,42 | 1,30 | 1,00 |
| 21 | 141,67 | 1,00 | 1,15 | 1,50 | 1,36 | 1,50 | 1,21 | 1,25 | 1,12 |
| 22 | 191,00 | 1,00 | 0,88 | 0,88 | 0,75 | 0,81 | 0,80 | 0,83 | 1,10 |
| 23 | 106,33 | 1,00 | 1,13 | 1,24 | 1,21 | 1,09 | 1,30 | 1,12 | 1,37 |
| 24 | 120,00 | 1,00 | 1,07 | 1,12 | 0,96 | 1,24 | 1,21 | 1,33 | 1,14 |
| 25 | 170,00 | 1,00 | 1,23 | 1,23 | 1,33 | 1,42 | 1,42 | 1,43 | 1,14 |
| 26 | 119,33 | 1,00 | 1,04 | 1,03 | 1,24 | 1,02 | 1,04 | 1,19 | 1,17 |
| 27 | 157,33 | 1,00 | 1,11 | 1,12 | 1,14 | 1,64 | 1,15 | 1,25 | 1,26 |
| 28 | 193,33 | 1,00 | 1,07 | 1,35 | 1,09 | 1,04 | 0,82 | 0,95 | 1,08 |
| 29 | 168,33 | 1,00 | 0,95 | 1,19 | 1,09 | 0,96 | 0,90 | 0,98 | 1,00 |
| 30 | 156,33 | 1,00 | 0,72 | 0,69 | 0,67 | 0,66 | 0,63 | 0,83 | 0,79 |
| 31 | 188,67 | 1,00 | 0,87 | 0,91 | 0,84 | 0,81 | 0,77 | 0,90 | 1,01 |
| 32 | 84,00  | 1,00 | 1,12 | 1,34 | 1,18 | 1,29 | 1,38 | 1,18 | 1,55 |
| 33 | 99,67  | 1,00 | 1,04 | 1,01 | 0,97 | 1,01 | 1,06 | 1,12 | 1,21 |
| 34 | 85,92  | 1,00 | 0,98 | 1,29 | 0,95 | 1,09 | 1,06 | 1,00 | 1,18 |
| 35 | 98,92  | 1,00 | 1,73 | 1,71 | 1,48 | 1,63 | 1,49 | 1,51 | 1,77 |
| 36 | 109,00 | 1,00 | 0,93 | 0,88 | 0,88 | 0,99 | 1,06 | 0,96 | 1,19 |
| 37 | 116,92 | 1,00 | 0,93 | 0,89 | 1,02 | 1,10 | 0,95 | 1,04 | 1,05 |
| 38 | 92,69  | 1,00 | 0,95 | 0,72 | 0,76 | 0,95 | 0,90 | 0,86 | 0,93 |
| 39 | 120,23 | 1,00 | 1,03 | 0,90 | 0,82 | 0,94 | 0,87 | 1,09 | 1,18 |
| M  | 132,69 | 1,00 | 1,06 | 1,11 | 1,10 | 1,14 | 1,12 | 1,13 | 1,15 |
| ±m | 5,73   | 0,00 | 0,04 | 0,04 | 0,05 | 0,05 | 0,04 | 0,05 | 0,04 |

Как видно из представленных данных, Клс в целом по выборке сильно различаются, принимая значения от 0,63 до 2,1, что при расчете средних значений дало достоверно не отличающиеся средние значения Клс для разных доз облучения, с большими доверительными интервалами. Согласно литературным данным, принято считать значения Клс больше 1 как стимулирующее действие, меньше 1 как угнетающее действие, равные 1 – отсутствие эффекта.

***Исследование зависимости продукции АФК у обследованных пациентов от исходного состояния нейтрофилов.***

В зависимости от исходного уровня продукции АФК было сформировано две подгруппы обследованных –больные с нормальными значениями спонтанного НСТ-теста (подгруппа 1) и больные с повышенными значениями. (таблица 18).

Таблица 18 Средние значения спонтанного НСТ-теста у больных с ВИН и в контрольной группе

| Подгруппы | Количество<br>исследованных | Спонт.<br>НСТ(усл.ед.) |
|-----------|-----------------------------|------------------------|
|-----------|-----------------------------|------------------------|

|                                                          |                |                |
|----------------------------------------------------------|----------------|----------------|
| Контрольная группа                                       | 32 чел         | 88,22±5,23     |
| Б-е с уровнем спонт. НСТ 70-110 усл.ед – подгруппа 1     | 14 чел (35,9%) | 94,74 ± 2,25   |
| Б-е с уровнем спонт. НСТ более 110 усл.ед. – подгруппа 2 | 25 чел (64,1%) | 153,94 ± 5,21* |

\*  $p \leq 0,05$ , достоверность отличий от показателя контрольной группы

Нормальные показатели спонтанного НСТ-теста выявлены у 14 (35,9%) больных с ВИД, в среднем составили  $94,74 \pm 2,25$  усл.ед, что соответствует нормальному уровню продукции АФК нейтрофилами.

У 25 чел. (64,1%) больных с ВИД, показатели спонтанного НСТ-теста были выше нормы и составили в среднем  $153,94 \pm 5,21$  усл.ед., что достоверно ( $p \leq 0,05$ ) отличается от группы контроля -  $88,22 \pm 5,23$  усл.ед.

Средние значения Клс в зависимости от дозы облучения для первой подгруппы находятся в пределах от  $1.1 \pm 0,07$  до  $1.25 \pm 0,09$  (таблица 19), что говорит о преимущественной стимуляции продукции АФК у лиц со спонтанным НСТ-тестом от 70 до 110 усл.ед.

Таблица 19. Значения Клс и спонтанного НСТ-теста в зависимости от дозы облучения у обследованных пациентов подгруппы 1

| Инд№\<br>Доза,<br>Дж/см | Спонт.<br>НСТ | 0,0  | 0,4  | 0,8  | 2    | 4    | 6    | 8    | 12   |
|-------------------------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1                       | 97,60         | 1,00 | 0,89 | 0,97 | 1,10 | 1,34 | 1,49 | 1,16 | 1,29 |
| 2                       | 89,17         | 1,00 | 1,10 | 1,22 | 1,23 | 1,18 | 1,30 | 1,19 | 0,94 |
| 12                      | 86,33         | 1,00 | 1,29 | 1,42 | 0,96 | 1,14 | 1,19 | 1,18 | 1,15 |
| 13                      | 102,33        | 1,00 | 0,86 | 1,35 | 1,25 | 1,07 | 1,11 | 1,07 | 1,03 |
| 15                      | 83,67         | 1,00 | 1,67 | 1,91 | 1,72 | 1,63 | 1,67 | 2,10 | 1,95 |
| 19                      | 90,33         | 1,00 | 0,90 | 0,91 | 0,85 | 0,89 | 1,19 | 1,09 | 1,09 |
| 20                      | 100,33        | 1,00 | 1,50 | 1,01 | 0,88 | 0,78 | 0,98 | 0,66 | 0,81 |
| 24                      | 106,33        | 1,00 | 1,13 | 1,24 | 1,21 | 1,09 | 1,30 | 1,12 | 1,37 |
| 33                      | 84,00         | 1,00 | 1,12 | 1,34 | 1,18 | 1,29 | 1,38 | 1,18 | 1,55 |
| 34                      | 99,67         | 1,00 | 1,04 | 1,01 | 0,97 | 1,01 | 1,06 | 1,12 | 1,21 |
| 35                      | 85,92         | 1,00 | 0,98 | 1,29 | 0,95 | 1,09 | 1,06 | 1,00 | 1,18 |
| 36                      | 98,92         | 1,00 | 1,73 | 1,71 | 1,48 | 1,63 | 1,49 | 1,51 | 1,77 |
| 37                      | 109,00        | 1,00 | 0,93 | 0,88 | 0,88 | 0,99 | 1,06 | 0,96 | 1,19 |

|    |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 39 | 92,69 | 1,00 | 0,95 | 0,72 | 0,76 | 0,95 | 0,90 | 0,86 | 0,93 |
|    |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
| М  | 94,74 | 1,00 | 1,15 | 1,21 | 1,10 | 1,15 | 1,23 | 1,16 | 1,25 |
| ±m | 2,25  |      | 0,08 | 0,09 | 0,07 | 0,07 | 0,06 | 0,09 | 0,09 |

Средние значения коэффициентов лазерной стимуляции в зависимости от дозы облучения для второй подгруппы не превышают 1,13 (таблица 20).

Таблица 20. Значения Клс и спонтанного НСТ-теста у обследованных пациентов подгруппы 2.

| <i>Инд№\<br/>Доза,<br/>Дж/см2</i> | <i>Спонт. НСТ</i> | <i>0,0</i> | <i>0,4</i> | <i>0,8</i> | <i>2</i> | <i>4</i> | <i>6</i> | <i>8</i> | <i>12</i> |
|-----------------------------------|-------------------|------------|------------|------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| 3                                 | 142,33            | 1,00       | 0,85       | 0,68       | 0,83     | 0,79     | 0,72     | 1,01     | 0,80      |
| 4                                 | 155,00            | 1,00       | 1,08       | 1,41       | 1,29     | 1,37     | 1,60     | 1,31     | 1,59      |
| 5                                 | 156,00            | 1,00       | 0,85       | 0,93       | 0,90     | 1,03     | 1,01     | 0,75     | 1,17      |
| 6                                 | 184,67            | 1,00       | 1,12       | 0,99       | 0,87     | 0,78     | 0,96     | 0,87     | 0,96      |
| 7                                 | 185,67            | 1,00       | 0,94       | 1,11       | 1,14     | 1,27     | 1,10     | 0,97     | 0,97      |
| 8                                 | 145,67            | 1,00       | 1,25       | 1,06       | 1,90     | 1,88     | 1,73     | 1,57     | 1,55      |
| 9                                 | 146,67            | 1,00       | 1,15       | 0,87       | 1,24     | 1,38     | 1,16     | 1,50     | 1,08      |
| 10                                | 114,33            | 1,00       | 1,03       | 1,06       | 1,24     | 0,97     | 0,98     | 1,02     | 1,01      |
| 13                                | 112,00            | 1,00       | 0,82       | 0,95       | 0,91     | 0,78     | 0,95     | 0,76     | 0,86      |
| 15                                | 155,00            | 1,00       | 0,93       | 1,37       | 1,03     | 1,22     | 1,11     | 1,10     | 1,06      |
| 16                                | 174,33            | 1,00       | 1,11       | 1,08       | 1,43     | 1,42     | 1,13     | 1,78     | 1,48      |
| 17                                | 181,67            | 1,00       | 0,71       | 0,78       | 0,65     | 0,78     | 0,75     | 0,84     | 0,72      |
| 20                                | 155,00            | 1,00       | 1,48       | 1,08       | 1,58     | 1,56     | 1,42     | 1,30     | 1,00      |
| 21                                | 141,67            | 1,00       | 1,15       | 1,50       | 1,36     | 1,50     | 1,21     | 1,25     | 1,12      |
| 22                                | 191,00            | 1,00       | 0,88       | 0,88       | 0,75     | 0,81     | 0,80     | 0,83     | 1,10      |
| 24                                | 120,00            | 1,00       | 1,07       | 1,12       | 0,96     | 1,24     | 1,21     | 1,33     | 1,14      |
| 25                                | 170,00            | 1,00       | 1,23       | 1,23       | 1,33     | 1,42     | 1,42     | 1,43     | 1,14      |
| 26                                | 119,33            | 1,00       | 1,04       | 1,03       | 1,24     | 1,02     | 1,04     | 1,19     | 1,17      |
| 27                                | 157,33            | 1,00       | 1,11       | 1,12       | 1,14     | 1,64     | 1,15     | 1,25     | 1,26      |
| 28                                | 193,33            | 1,00       | 1,07       | 1,35       | 1,09     | 1,04     | 0,82     | 0,95     | 1,08      |
| 29                                | 168,33            | 1,00       | 0,95       | 1,19       | 1,09     | 0,96     | 0,90     | 0,98     | 1,00      |
| 30                                | 156,33            | 1,00       | 0,72       | 0,69       | 0,67     | 0,66     | 0,63     | 0,83     | 0,79      |
| 31                                | 188,67            | 1,00       | 0,87       | 0,91       | 0,84     | 0,81     | 0,77     | 0,90     | 1,01      |
| 37                                | 116,92            | 1,00       | 0,93       | 0,89       | 1,02     | 1,10     | 0,95     | 1,04     | 1,05      |
| 39                                | 120,23            | 1,00       | 1,03       | 0,90       | 0,82     | 0,94     | 0,87     | 1,09     | 1,18      |
| М                                 | 153,94            | 1,00       | 1,01       | 1,05       | 1,09     | 1,13     | 1,06     | 1,11     | 1,09      |
| ±m                                | 5,21              | 0,00       | 0,03       | 0,04       | 0,06     | 0,06     | 0,05     | 0,05     | 0,04      |

что, хотя и говорит, о преимущественной стимуляции продукции АФК у лиц со спонтанным НСТ-тестом более 110 усл.ед., но разнородность полученных данных по 2-ой подгруппе и отличие от исхода на малую величину не позволяет считать полученные Клс достоверным повышением активности нейтрофилов у обследованных пациентов под действием

В лазерной терапии выделяются малые, средние и высокие дозы облучения. Исходя из этого, выбранные дозы облучения были разделены:

- малые дозы – 0,4 и 0,8 Дж/см<sup>2</sup>
- средние дозы 2, 4, 6 Дж/см<sup>2</sup>
- высокие дозы 8 и 12 Дж/см<sup>2</sup>.

При сравнении полученных результатов от двух подгрупп обследованных пациентов, выявляется различный уровень стимуляции продукции АФК разными дозами ЛИ.

Под воздействием малых доз лазерного излучения:

- доза 0,4 Дж/см<sup>2</sup> – средние значения Клс для подгрупп 1 и 2 составили  $1,15 \pm 0,08$  и  $1,01 \pm 0,03$  соответственно;
- доза 0,8 Дж/см<sup>2</sup> – средние значения Клс для подгрупп 1 и 2 составили  $1,21 \pm 0,09$  и  $1,05 \pm 0,04$  соответственно.

При воздействии средней дозы 6 Дж/см<sup>2</sup> среднее значение Клс для подгрупп 1 и 2 составило  $1,23 \pm 0,06$  и  $1,06 \pm 0,05$  соответственно. Как видно из сравнения средних значений Клс у двух подгрупп при облучении 12 Дж/см<sup>2</sup>, для подгруппы 1 в данной точке среднее значение Клс достигло максимального значения  $1,25 \pm 0,09$  и, возможно увеличение дозы приведет к дальнейшему возрастанию Клс. Напротив, в подгруппе 2 среднее значение Клс для данной дозы облучения составило  $1,09 \pm 0,04$  и, скорее всего, дальнейшее облучение приведет к снижению эффекта. (Таблица 21)

Таблица 21. Зависимость средних значений Клс от доз ЛИ в исследуемых подгруппах.

| Подгруппа\<br>Доза, Дж/см <sup>2</sup> | Спонт.<br>НСТ     | 0,0  | 0,4             | 0,8             | 2               | 4               | 6               | 8               | 12              |
|----------------------------------------|-------------------|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Подгруппа 1                            | $94,74 \pm 2,25$  | 1,00 | $1,15 \pm 0,08$ | $1,21 \pm 0,09$ | $1,10 \pm 0,07$ | $1,15 \pm 0,07$ | $1,23 \pm 0,06$ | $1,16 \pm 0,09$ | $1,25 \pm 0,09$ |
| Подгруппа 2                            | $153,94 \pm 5,21$ | 1,00 | $1,01 \pm 0,03$ | $1,05 \pm 0,04$ | $1,09 \pm 0,06$ | $1,13 \pm 0,06$ | $1,06 \pm 0,05$ | $1,11 \pm 0,05$ | $1,09 \pm 0,04$ |

Как видно из представленных данных, средние значения Клс в подгруппах 1 и 2 при облучении в дозах 2 Дж/см<sup>2</sup>, 4 Дж/см<sup>2</sup> и 8 Дж/см<sup>2</sup> примерно равны, причем, максимальные значения Клс в подгруппе 2 соответствуют минимальным значениям Клс, отмеченным в подгруппе 1. На диаграмме (рис.28) отображены Клс в зависимости от дозы лазерного облучения с длиной волны 632 нм для первой и второй подгруппы.

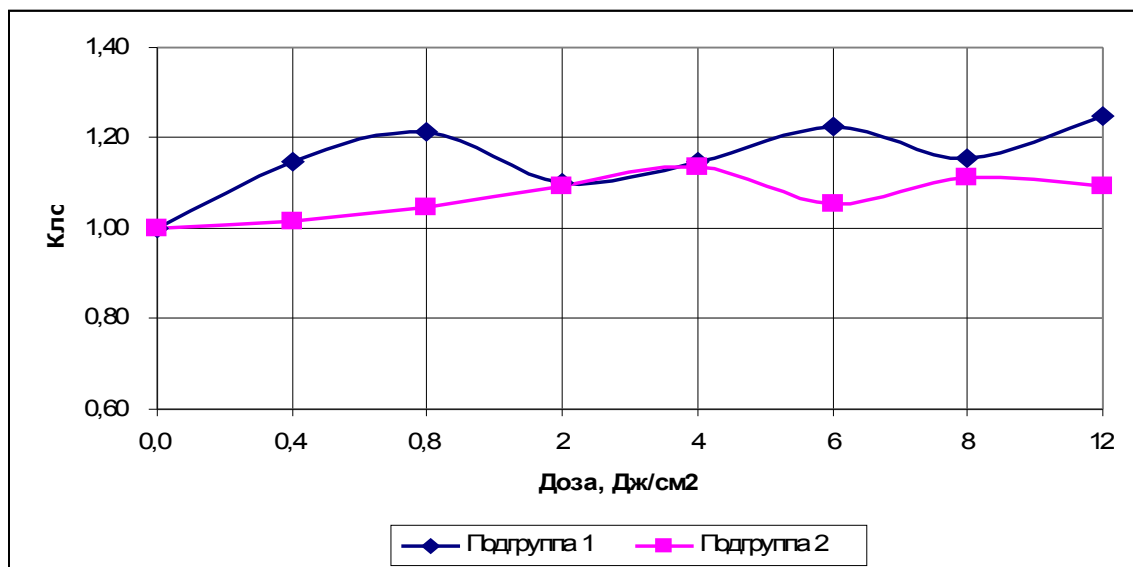


Рисунок 28. Зависимость средних значений Клс при разных дозах лазерного облучения для двух подгрупп.

Таким образом, для пациентов с нормальным уровнем продукции АФК более характерна стимуляция ФАН под действием ЛО, чем для лиц с исходно повышенными значениями НСТ-теста. При воздействии дозами 0,4 Дж/см², 0,8 Дж/см² и 6 Дж/см² наблюдается достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение продукции АФК в подгруппе с нормальным уровнем НСТ-теста, в отличие от второй подгруппы. Выраженность эффектов лазерного облучения в зависимости от исходного уровня ФАН не вызывает сомнений, и соответственно целесообразной является оценка исходного уровня продукции АФК до проведения сеансов лазерной терапии.

***Исследование уровня продукции АФК нейтрофилами при воздействии лазерного излучения  $\lambda=890$  нм и сравнение с воздействием излучения с  $\lambda = 632$  нм***

Среди 39 обследованных пациентов случайным образом было выбрано 5 человек, пробы крови которых были облучены инфракрасным лазером. Среди выбранных пациентов было 2 мужчин и 3 женщины, среднее значение исходного НСТ-теста которых составило  $104,95 \pm 6,73$  усл.ед. – соответствует нормальному уровню продукции АФК. Облучение проводилось в триплетах по описанной ранее схеме с помощью головки для неинвазивного лазерного облучения ИК длины волны ЛО1-2000. Эффект воздействия инфракрасного лазерного излучения также оценивался по изменению уровня продукции активных форм  $O_2$  в тесте восстановления нитросинего тетразолия. Полученные данные представлены в таблице 22.

Таблица 22. Значения Клс и спонтанного НСТ-теста при облучении различными дозами инфракрасного лазера у обследованных пациентов

| Инд.№ | Спонт. НСТ\<br>Доза,<br>мДж/см <sup>2</sup> | 0    | 0,062 | 0,124 | 0,310 | 0,620 | 0,930 | 1,24 | 1,860 |
|-------|---------------------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| 34    | 85,92                                       | 1,00 | 0,96  | 1,16  | 1,04  | 1,04  | 1,00  | 1,34 | 1,28  |
| 36    | 109,00                                      | 1,00 | 0,83  | 0,8   | 0,83  | 0,89  | 0,84  | 0,96 | 1,06  |
| 37    | 116,92                                      | 1,00 | 0,92  | 1,01  | 1,07  | 0,98  | 1,03  | 1,03 | 1,10  |
| 38    | 92,69                                       | 1,00 | 0,93  | 0,81  | 1,05  | 0,98  | 1,05  | 1,01 | 0,96  |
| 39    | 120,23                                      | 1,00 | 0,94  | 1,01  | 0,99  | 0,95  | 0,68  | 1,15 | 1,04  |
| М     | 104,95                                      | 1,00 | 0,92  | 0,96  | 1,00  | 0,97  | 0,92  | 1,10 | 1,09  |
| ±m    | 6,73                                        |      | 0,02  | 0,07  | 0,04  | 0,02  | 0,07  | 0,07 | 0,05  |

Как видно из представленных данных, Клс принимает значения от 0,68 до 1,34, что говорит о наличии разнообразных ответов на лазерное облучение ИК-диапазона. Отмечается стойкое снижение продукции АФК при облучении сверхмалой дозой 0,062 мДж/см<sup>2</sup>. Тем не менее, в среднем по группе не отмечается достоверного изменения ФАН в ответ на лазерное облучение в данных дозах.

#### **Сравнение уровней продукции АФК нейтрофилами в ответ на воздействие красного и инфракрасного лазера**

Разные пробы цельной крови, взятые у 5 обследованных пациентов, были облучены лазерным излучением с длинами волн 632 нм и 890 нм. Изменение функциональной активности нейтрофилов оценивалось в НСТ-тесте. Полученные данные представлены в таблице 23.

Таблица 23. Значения Клс при облучении красным лазером и спонтанного НСТ-теста у обследованных пациентов

| Инд№\<br>Доза,<br>Дж/см <sup>2</sup> | Спонт<br>НСТ | 0,0  | 0,4  | 0,8  | 2    | 4    | 6    | 8    | 12   |
|--------------------------------------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 34                                   | 85,92        | 1,00 | 0,98 | 1,29 | 0,95 | 1,09 | 1,06 | 1,00 | 1,18 |
| 36                                   | 109,00       | 1,00 | 0,93 | 0,88 | 0,88 | 0,99 | 1,06 | 0,96 | 1,19 |
| 37                                   | 116,92       | 1,00 | 0,93 | 0,89 | 1,02 | 1,10 | 0,95 | 1,04 | 1,05 |
| 38                                   | 92,69        | 1,00 | 0,95 | 0,72 | 0,76 | 0,95 | 0,90 | 0,86 | 0,93 |
| 39                                   | 120,23       | 1,00 | 1,03 | 0,90 | 0,82 | 0,94 | 0,87 | 1,09 | 1,18 |
| М                                    | 104,95       | 1,00 | 0,96 | 0,94 | 0,89 | 1,01 | 0,97 | 0,99 | 1,11 |
| ±m                                   | 6,73         |      | 0,02 | 0,09 | 0,05 | 0,03 | 0,04 | 0,04 | 0,05 |

Как видно из представленных данных, Клс принимает значения от 0,72 до 1,18, что говорит о наличии разнообразных ответов на лазерное облучение  $\lambda = 632$  нм в данной группе. Отмечается стойкое снижение продукции АФК при облучении дозой 2 Дж/см<sup>2</sup>. Тем не менее, в среднем по группе также не отмечается достоверного изменения ФАН в ответ на лазерное облучение в данных дозах.

Анализ данных об уровне продукции АФК в двух представленных группах показывает схожие однонаправленные изменения под действием лазерного облучения с длинами волн 632 нм и 890 нм.

#### **Оценка индивидуальных ответов на воздействие разных доз лазерного излучения с длиной волны 632 нм**

Полученные результаты обследования проб 39 пациентов с вторичным иммунодефицитом позволили оценить индивидуальный ответ (изменение продукции АФК нейтрофилами) на лазерное излучение. Проанализировав полученный эффект по каждому пациенту, были выделены несколько типовых форм ответа: повышение практически на всеисследованные дозы ЛИ, понижение Клс практически на все исследованные дозм ЛИ, а так же типы ответа с выраженным эффектом в узком спектре доз.

При стимуляции продукции АФК в ответ на все изучаемые дозы лазерного излучения *первая типовая форма ответа* наблюдалась у 19 (48,7%) пациентов (9 м/10 ж). У обследованных лиц этой группы отмечается возрастание Клс в ответ на ЛО практически во всех дозах независимо от исходного значения НСТ-теста. Полученные результаты представлены в таблице 24.

Таблица 24. Стимулирующее влияние ЛИ с  $\lambda = 632$  нм

| Инд№\<br>Доза,<br>Дж/см <sup>2</sup> | Спонт.<br>НСТ | 0,0  | 0,4  | 0,8  | 2    | 4    | 6    | 8    | 12   |
|--------------------------------------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 4                                    | 155,00        | 1,00 | 1,08 | 1,41 | 1,29 | 1,37 | 1,60 | 1,31 | 1,59 |
| 14                                   | 83,67         | 1,00 | 1,67 | 1,91 | 1,72 | 1,63 | 1,67 | 2,10 | 1,95 |
| 16                                   | 174,33        | 1,00 | 1,11 | 1,08 | 1,43 | 1,42 | 1,13 | 1,78 | 1,48 |
| 20                                   | 155,00        | 1,00 | 1,48 | 1,08 | 1,58 | 1,56 | 1,42 | 1,30 | 1,00 |
| 21                                   | 141,67        | 1,00 | 1,15 | 1,50 | 1,36 | 1,50 | 1,21 | 1,25 | 1,12 |
| 23                                   | 106,33        | 1,00 | 1,13 | 1,24 | 1,21 | 1,09 | 1,30 | 1,12 | 1,37 |
| 25                                   | 170,00        | 1,00 | 1,23 | 1,23 | 1,33 | 1,42 | 1,42 | 1,43 | 1,14 |
| 26                                   | 119,33        | 1,00 | 1,04 | 1,03 | 1,24 | 1,02 | 1,04 | 1,19 | 1,17 |
| 27                                   | 157,33        | 1,00 | 1,11 | 1,12 | 1,14 | 1,64 | 1,15 | 1,25 | 1,26 |
| 32                                   | 84,00         | 1,00 | 1,12 | 1,34 | 1,18 | 1,29 | 1,38 | 1,18 | 1,55 |
| 35                                   | 98,92         | 1,00 | 1,73 | 1,71 | 1,48 | 1,63 | 1,49 | 1,51 | 1,77 |
| 36                                   | 145,67        | 1,00 | 1,15 | 0,87 | 1,24 | 1,38 | 1,16 | 1,50 | 1,08 |
| 37                                   | 155,00        | 1,00 | 0,93 | 1,37 | 1,03 | 1,22 | 1,11 | 1,10 | 1,06 |
| 38                                   | 120,00        | 1,00 | 1,07 | 1,12 | 0,96 | 1,24 | 1,21 | 1,33 | 1,14 |
| 2                                    | 89,17         | 1,00 | 1,10 | 1,22 | 1,23 | 1,18 | 1,30 | 1,19 | 0,94 |
| 3                                    | 86,33         | 1,00 | 1,29 | 1,42 | 0,96 | 1,14 | 1,19 | 1,18 | 1,15 |
| 8                                    | 145,67        | 1,00 | 1,25 | 1,06 | 1,90 | 1,88 | 1,73 | 1,57 | 1,55 |
| 12                                   | 102,33        | 1,00 | 0,86 | 1,35 | 1,25 | 1,07 | 1,11 | 1,07 | 1,03 |
| 7                                    | 184,67        | 1,00 | 0,94 | 1,11 | 1,14 | 1,27 | 1,10 | 0,97 | 0,97 |
| М                                    | 130,23        | 1,00 | 1,18 | 1,27 | 1,30 | 1,37 | 1,30 | 1,33 | 1,28 |
| ±m                                   | 7,67          | 0,00 | 0,05 | 0,06 | 0,06 | 0,05 | 0,05 | 0,06 | 0,07 |

Таким образом, исходной уровень продукции АФК нейтрофилами по НСТ-тесту составил в среднем  $130,23 \pm 7,67$  усл.ед., принимая значения от 84,0 до 184,67 усл.ед. Значения Клс в зависимости от дозы облучения составили от  $1,18 \pm 0,05$  – для дозы 0,4 Дж/см<sup>2</sup>, до  $1,37 \pm 0,05$  – для дозы 4 Дж/см<sup>2</sup>.

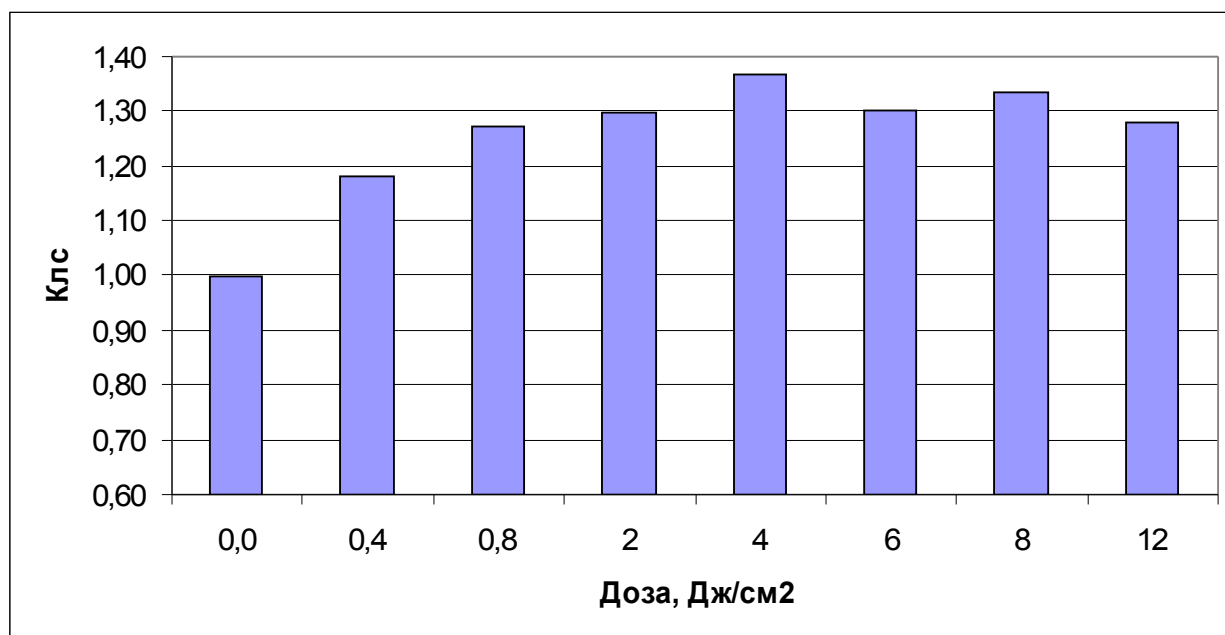


Рисунок 29. Зависимость средних значений Клс от дозы ЛИ для 1-го типа ответа.

**Вторая типовая форма ответа (снижение продукции АФК в ответ на все изучаемые дозы лазерного излучения)** наблюдалась у 7 (17,9%) пациентов (2м/7ж).

У обследованных лиц этой группы отмечается снижение Клс в ответ на ЛО практически во всех дозах. Для пациентов данной группы характерно исходно повышенные значения НСТ-теста. Полученные результаты представлены в таблице 25.

Таблица 25. Подавляющее влияние на продукцию АФК ЛИ с  $\lambda = 632$  нм

| Инд№\<br>Доза,<br>Дж/см² | Спонт<br>НСТ | 0,0  | 0,4  | 0,8  | 2    | 4    | 6    | 8    | 12   |
|--------------------------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 3                        | 142,33       | 1,00 | 0,85 | 0,68 | 0,83 | 0,79 | 0,72 | 1,01 | 0,80 |
| 13                       | 112,00       | 1,00 | 0,82 | 0,95 | 0,91 | 0,78 | 0,95 | 0,76 | 0,86 |
| 17                       | 181,67       | 1,00 | 0,71 | 0,78 | 0,65 | 0,78 | 0,75 | 0,84 | 0,72 |
| 22                       | 191,00       | 1,00 | 0,88 | 0,88 | 0,75 | 0,81 | 0,80 | 0,83 | 1,10 |
| 30                       | 156,33       | 1,00 | 0,72 | 0,69 | 0,67 | 0,66 | 0,63 | 0,83 | 0,79 |
| 31                       | 188,67       | 1,00 | 0,87 | 0,91 | 0,84 | 0,81 | 0,77 | 0,90 | 1,01 |
| 38                       | 92,69        | 1,00 | 0,95 | 0,72 | 0,76 | 0,95 | 0,90 | 0,86 | 0,93 |
| 5                        | 155,00       | 1,00 | 0,85 | 0,93 | 0,90 | 1,03 | 1,01 | 0,75 | 1,17 |
| М                        | 152,46       | 1,00 | 0,83 | 0,82 | 0,79 | 0,83 | 0,82 | 0,85 | 0,92 |
| ±m                       | 7,67         |      | 0,05 | 0,06 | 0,06 | 0,05 | 0,05 | 0,06 | 0,07 |

Таким образом, исходной уровень продукции АФК нейтрофилами по НСТ-тесту составил в среднем  $152,46 \pm 7,67$  усл.ед., что достоверно отличается от контроля ( $p < 0,05$ ) равного  $88,22 \pm 5,23$ , принимая значения от 92,69 до 191,0 усл.ед. Значения Клс в

зависимости от дозы облучения составили от  $0,79 \pm 0,06$  – для дозы 2 Дж/см<sup>2</sup>, до  $0,92 \pm 0,07$  – для дозы 12 Дж/см<sup>2</sup>.

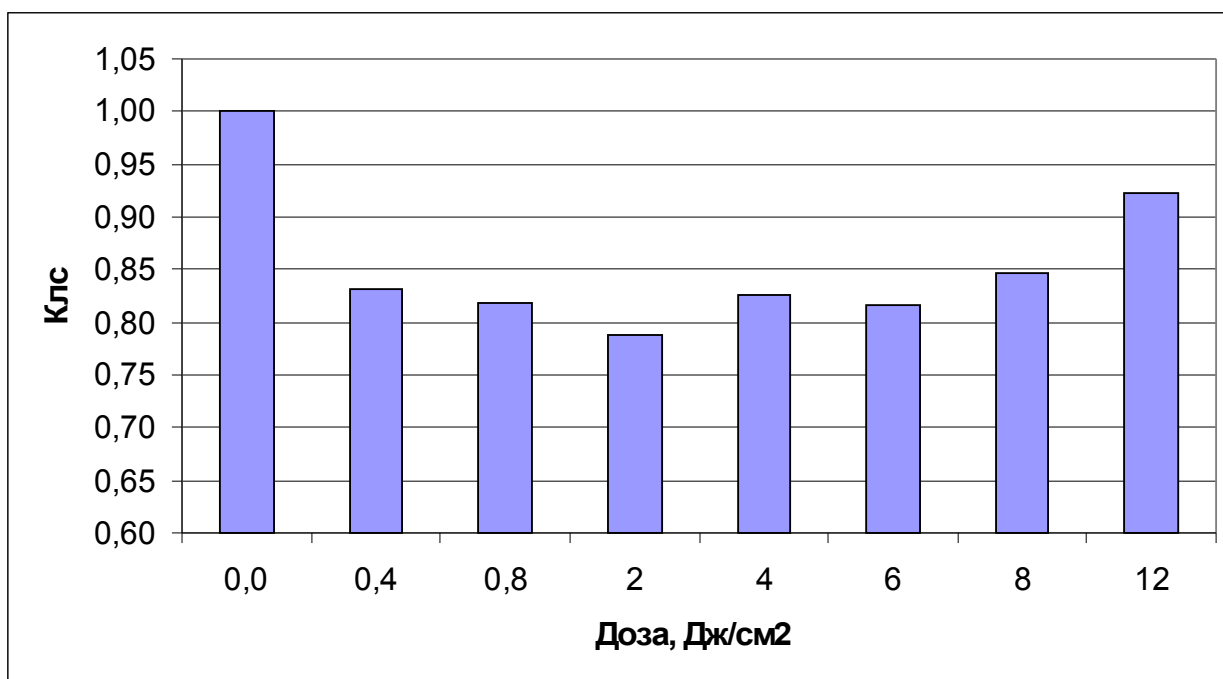


Рисунок 30. Зависимость средних значений Клс от дозы ЛИ для 2-го типа ответа.

**Третий тип ответа со снижением и повышением продукции АФК** в ответ на соответствующие дозы лазерного излучения наблюдался у 5 (12,8%) пациентов (2 м/3 ж). У обследованных лиц этой группы отмечается повышение Клс в ответ на ЛО малыми дозами, а при увеличении дозы облучения стимуляция сменяется угнетением продукции активных форм кислорода. При дозе лазерного облучения 12 Дж/см<sup>2</sup> выраженность эффекта снижается и Клс становится мало отличным от 1, т.е. исходного значения ФАН. Для пациентов данной группы не отмечается зависимость от исходных значений НСТ-теста. Полученные результаты представлены в таблице 26.

Таблица 26. Зависимость средних значений Клс от дозы ЛИ для 3-го типа ответа

| Инд№\<br>Доза,<br>Дж/см <sup>2</sup> | Спонт<br>НСТ | 0,0  | 0,4  | 0,8  | 2    | 4    | 6    | 8    | 12   |
|--------------------------------------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 6                                    | 184,67       | 1,00 | 1,12 | 0,99 | 0,87 | 0,78 | 0,96 | 0,87 | 0,96 |
| 34                                   | 85,92        | 1,00 | 0,98 | 1,29 | 0,95 | 1,09 | 1,06 | 1,00 | 1,18 |
| 29                                   | 168,33       | 1,00 | 0,95 | 1,19 | 1,09 | 0,96 | 0,90 | 0,98 | 1,00 |
| 28                                   | 193,33       | 1,00 | 1,07 | 1,35 | 1,09 | 1,04 | 0,82 | 0,95 | 1,08 |
| 19                                   | 100,33       | 1,00 | 1,50 | 1,01 | 0,88 | 0,78 | 0,98 | 0,66 | 0,81 |
| М                                    | 146,52       | 1,00 | 1,12 | 1,17 | 0,98 | 0,93 | 0,94 | 0,89 | 1,01 |
| ±m                                   | 22,28        |      | 0,10 | 0,07 | 0,05 | 0,06 | 0,04 | 0,06 | 0,06 |

Таким образом, исходной уровень продукции АФК нейтрофилами по НСТ-тесту составил в среднем  $146,52 \pm 22,28$  усл.ед., принимая значения от 85,92 до 193,33 усл.ед. Значения Клс в зависимости от дозы облучения составили:

- от  $1,17 \pm 0,07$  – для дозы 0,8 Дж/см<sup>2</sup> – максимальное стимулирующее влияние
- до  $0,89 \pm 0,06$  – для дозы 8 Дж/см<sup>2</sup> – максимально понижающее действие.
- 

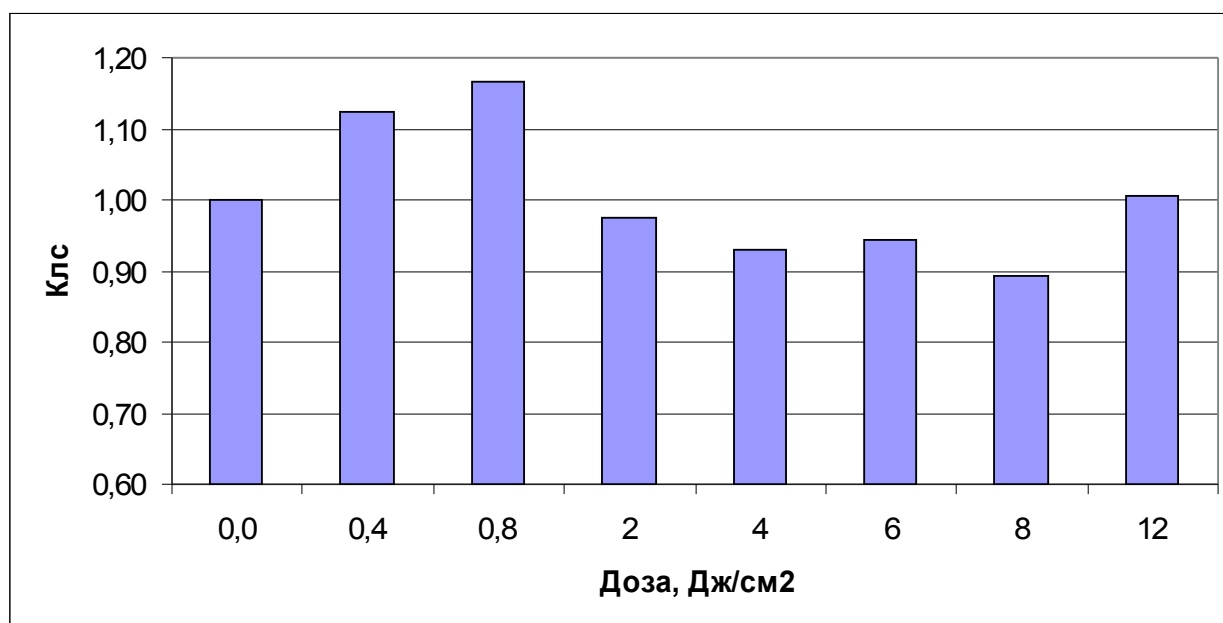


Рисунок 31. Зависимость средних значений Клс от дозы ЛИ для 3-го типа ответа.

**Четвертый тип ответа** наблюдался у 3 (7,7%) пациентов (2 м/1 ж). У обследованных лиц этой группы отмечается понижение Клс в ответ на ЛО малыми дозами и дозой 2 Дж/см<sup>2</sup>, а при увеличении дозы облучения угнетение сменяется стимуляцией продукции активных форм кислорода. Для пациентов данной группы характерно исходно нормальные значения НСТ-теста. Полученные результаты представлены в таблице 27.

Таблица 27. Зависимость средних значений Клс от дозы ЛИ для 4-го типа ответа

| Индекс\<br>Доза,<br>Дж/см <sup>2</sup> | Спонт.<br>НСТ | 0,0  | 0,4  | 0,8  | 2    | 4    | 6    | 8    | 12   |
|----------------------------------------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1                                      | 97,60         | 1,00 | 0,89 | 0,97 | 1,10 | 1,34 | 1,49 | 1,16 | 1,29 |
| 18                                     | 90,33         | 1,00 | 0,90 | 0,91 | 0,85 | 0,89 | 1,19 | 1,09 | 1,09 |
| 36                                     | 109,00        | 1,00 | 0,93 | 0,88 | 0,88 | 0,99 | 1,06 | 0,96 | 1,19 |
| М                                      | 98,98         | 1,00 | 0,91 | 0,92 | 0,94 | 1,07 | 1,25 | 1,07 | 1,19 |
| ±m                                     | 9,41          | 0,00 | 0,02 | 0,05 | 0,14 | 0,24 | 0,22 | 0,10 | 0,10 |

Таким образом, исходный уровень продукции АФК нейтрофилами по НСТ-тесту составил в среднем  $98,98 \pm 9,41$  усл.ед., принимая значения от 90,33 до 109,00 усл.ед. Значения Клс в зависимости от дозы облучения составили:

- от  $0,91 \pm 0,02$  – для дозы 0,4 Дж/см<sup>2</sup> – максимальное стимулирующее влияние
- до  $1,25 \pm 0,22$  – для дозы 8 Дж/см<sup>2</sup> – максимально понижающее действие.

На диаграмме (рис.32) изображено изменение уровня продукции АФК под воздействием разных доз лазерного излучения. Отмечается устойчивое снижение ФАН на первых трех дозах облучения, которое сменяется стойким повышением на дозах от 4 Дж/см<sup>2</sup> до 12 Дж/см<sup>2</sup>.

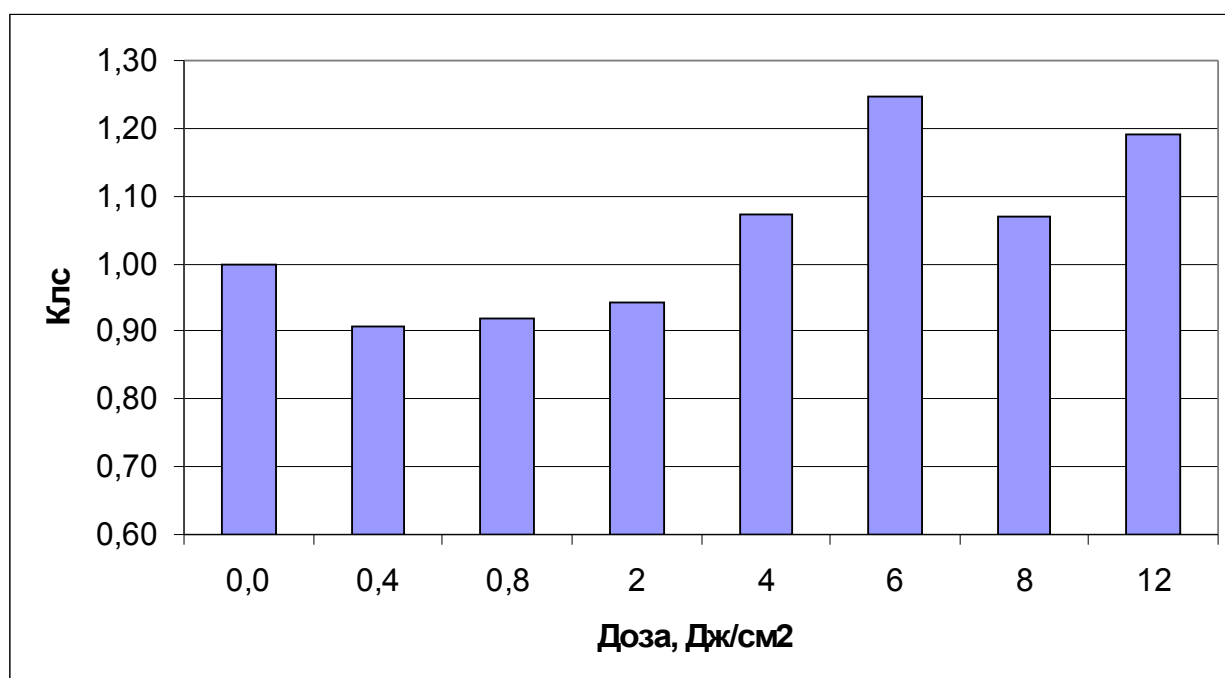


Рисунок 32. Зависимость средних значений Клс от дозы ЛИ для 4-го типа ответа

**Пятый тип ответа** наблюдался у 4 (10,2%) пациентов (1 м/3 ж). У обследованных лиц этой группы отмечается мало выраженный эффект в ответ на ЛО малыми дозами и средними дозами (от 0,4 Дж/см<sup>2</sup> до 6 Дж/см<sup>2</sup>), и только высокие дозы облучения оказывают стимулирующий эффект на продукцию активных форм кислорода. Для

пациентов данной группы характерно исходно нормальные значения НСТ-теста. Полученные результаты представлены в таблице 28.

Таблица 28. Зависимость средних значений Клс от дозы ЛИ для 5-го типа ответа

| Инд№\<br>Доза,<br>Дж/см <sup>2</sup> | Спонт<br>. НСТ | 0,0  | 0,4  | 0,8  | 2    | 4    | 6    | 8    | 12   |
|--------------------------------------|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 33                                   | 99,67          | 1,00 | 1,04 | 1,01 | 0,97 | 1,01 | 1,06 | 1,12 | 1,21 |
| 39                                   | 120,23         | 1,00 | 1,03 | 0,90 | 0,82 | 0,94 | 0,87 | 1,09 | 1,18 |
| 10                                   | 114,33         | 1,00 | 1,03 | 1,06 | 1,14 | 0,97 | 0,98 | 1,02 | 1,01 |
| 37                                   | 116,92         | 1,00 | 0,93 | 0,89 | 1,02 | 1,10 | 0,95 | 1,04 | 1,05 |
| М                                    | 112,79         | 1,00 | 1,01 | 0,97 | 0,99 | 1,01 | 0,97 | 1,07 | 1,11 |
| ±m                                   | 9,07           | 0,00 | 0,05 | 0,08 | 0,13 | 0,07 | 0,08 | 0,05 | 0,10 |

Таким образом, исходный уровень продукции АФК нейтрофилами по НСТ-тесту составил в среднем  $112,79 \pm 9,07$  усл.ед., принимая значения от 99,67 до 120,23 усл.ед. Значения Клс в зависимости от дозы облучения составили:

- около 1 – для доз 0,4 Дж/см<sup>2</sup> – 6 Дж/см<sup>2</sup> – отсутствие эффекта
- до  $1,1 \pm 0,1$  – для дозы 12 Дж/см<sup>2</sup> – максимально стимулирующее действие.

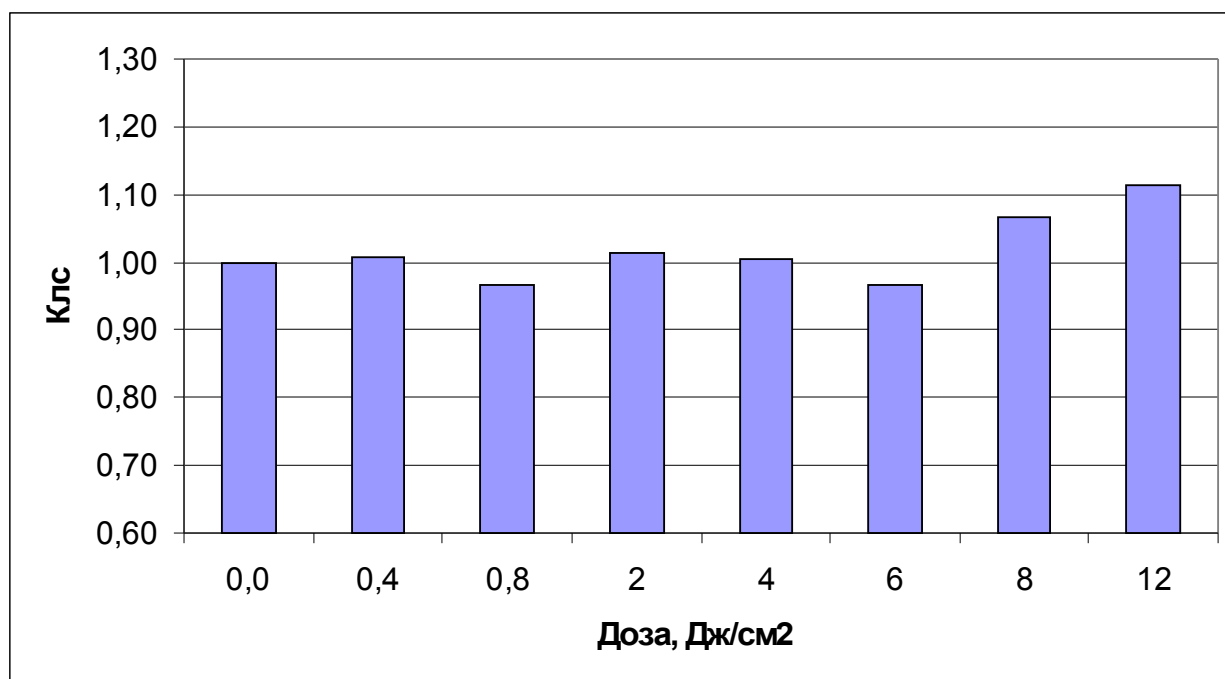


Рисунок 33. Зависимость средних значений Клс от дозы ЛИ для 5-го типа ответа

**Исследование состояния кислороднезависимой бактерицидности по уровню катионных белков**

У 20 больных с наличием вторичной иммунной недостаточности было проведено определение уровня катионных белков спектрофотометрическим методом. Результаты представлены в таблице 29

Таблица 29. Уровнькатионных белков.

| №         | Лейкоциты | Нейтрофилы | Катионные белки, спонтанные, усл.ед | Катионные белки, индуцированные, усл.ед | Индекс стимуляции, ИС |
|-----------|-----------|------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|
| \контроль |           |            | 84,35+-5,36                         | 98,62+-6,01                             | 1,17+0,08-            |
| 1.        | 5,9       | 61,5       | 33                                  | 52                                      | 1,58                  |
| 2.        | 7,1       | 66,0       | 93                                  | 40                                      | 0,43                  |
| 3.        | 5,0       | 74,0       | 88                                  | 48                                      | 0,55                  |
| 4.        | 6,7       | 74,0       | 72                                  | 63                                      | 0,88                  |
| 5.        | 5,8       | 54,0       | 85                                  | 73                                      | 0,86                  |
| 6.        | 5,2       | 79         | 76                                  | 117                                     | 1,54                  |
| 7.        | 7,5       | 56         | 83                                  | 67                                      | 0,81                  |
| 8.        | 8,5       | 43         | 99                                  | 83                                      | 0,84                  |
| 9.        | 7,0       | 60         | 78                                  | 61                                      | 0,78                  |
| 10.       | 6,2       | 73         | 95                                  | 68                                      | 0,72                  |
| 11.       | 18,2      | 74         | 115                                 | 57                                      | 0,50                  |
| 12.       | 6,2       | 59         | 111                                 | 42                                      | 0,38                  |
| 13.       | 4,0       | 57         | 119                                 | 49                                      | 0,41                  |
| 14.       | 6,5       | 57         | 110                                 | 78                                      | 0,71                  |
| 15.       | 9,7       | 58         | 56                                  | 39                                      | 0,70                  |
| 16.       | 6,1       | 63         | 69                                  | 46                                      | 0,67                  |
| 17.       | 4,6       | 58         | 76                                  | 36                                      | 0,47                  |
| 18.       | 4,9       | 59         | 67                                  | 38                                      | 0,57                  |
| 19.       | 10,5      | 73         | 78                                  | 39                                      | 0,50                  |
| 20.       | 5,6       | 37         | 49                                  | 56                                      | 1,14                  |
| M+-+m     | 7,6       | 62,0       | 82,6                                | 57,6                                    |                       |

Как видно из табл. 29, среднее значение уровня спонтанных катионных белков составило 82,6+- 6,1 усл ед, что практически не отличалось от нормальных значений (84,35+-5,36), тогда как при стимуляции *S aureus* в подавляющем большинстве случаев уровень индуцированных катионных белков был достоверно снижен и составлял в среднем 57,6+-4,8 (в норме -98,62+-6,01). Полученные данные свидетельствуют о снижении резервов кислороднезависимой бактерицидности.

В обследованных образцах крови больных величина НСТ-теста была повышена в среднем на  $27,45 \pm 0,97\%$ , однако дополнительная стимуляция липополисахаридом *E.coli* приводила к резкому угнетению данной активности, что свидетельствует об истощении клеток - значительной декомпенсации функции нейтрофилов/моноцитов и их

несостоятельности сформировать адекватный функциональный ответ на микробные антигены ( $5,77 \pm 0,67$ ) и ( $14,57 \pm 0,87$ ) % соответственно. Изучение функциональной активности моноцитов в НСТ-тесте показало значительное снижение показателей как в спонтанном, так и в индуцированном НСТ-тесте по отношению к значениям здоровых лиц. Также были обнаружены недостаточность иммунологической реактивности у данной категории больных со значительным снижением функциональной активности Т-лимфоцитов в реакции бласт-трансформации по отношению к показателям здоровых лиц при повышении величины основного иммунорегуляторного коэффициента, что свидетельствует о снижении количества и функциональной активности Т-лимфоцитов-супрессоров и повышении показателей Т-лимфоцитов-хелперов. При этом цельная аутологичная сыворотка ингибировала активность Т-лимфоцитов.

Таким образом, в ходе выполнения данного этапа проекта был разработан комплекс биомедицинских моделей, необходимых для изучения безопасности и эффективности воздействия НТАП на раневой процесс *in vitro* и *in vivo*, соответственно с использованием культур клеток покровных мягких тканей (фибробласты и эпителиальные клетки) и изолированной периферической крови людей, страдающих вторичным иммунодефицитом, и здоровых пациентов. При экспериментальной апробации разрабатываемого комплекса в качестве тестирующих воздействий использовали влияние физических и химических факторов, воспроизводящих действие отдельных компонентов многопараметрического воздействия НТАП и химических агентов, появляющихся в крови при хроническом воспалительно-инфекционном синдроме. Выполненный нами анализ функционального состояния фагоцитирующих клеток периферической крови человека по НСТ-тесту, кислородзависимой и кислороднезависимой бактерицидной активности и по уровню интерферонообразования показал не столько нарушение стационарного уровня указанных показателей, сколько уменьшение резервных возможностей иммунной системы при предъявлении дополнительной нагрузки.

### **3.6. Проведение медико-биологических испытаний при моделировании раневого процесса у животных (модельные ожоги и механические раны) с инфицированием сапрофитными или патогенными микроорганизмами. Адаптация методов оценки микробного обсеменения раневых поверхностей *in vivo* в экспериментах на животных**

В исследовании было использовано 48 крыс CD самцов. Исследование ранозаживляющего эффекта тестируемого вещества XXX в динамике патогенеза и

репарации ран проводилось поэтапно. На первом этапе было проведено исследование ранозаживляющего эффекта на 3 и 7 сутки после нанесения животным механической и ожоговой раны, на втором этапе - на 14 и 21 сутки. Все исследование выполнено на 4 группах животных, каждая группа включала 4 подгруппы согласно срокам цитологического и гистологического исследования течения раневого процесса в динамике патогенеза и репарации. (Таблица 30).

На первом этапе исследования животным из подгрупп №: 1a-1b, 2a-2b, 3a-3b, 4a-4b в один день по специальным методикам в области спины моделировалась механическая кожно-мышечная (животные из подгрупп № 1a-1b и № 2a-2b) или ожоговая (животные из подгрупп № 3a-3b и № 4a-4b) рана. После чего каждое животное помещалось в отдельную клетку, в которой находилось в течение всего периода наблюдения согласно срокам. Процедура нанесения раны осуществлялась в наркотизированном состоянии животных (кетамин с ксилазином, 80 мг/кг + 10 мг/кг, внутривенно). Перед нанесением раны в соответствующей области удалялась шерсть на участке площадью примерно 4-5 см<sup>2</sup>. Механическая кожно-мышечная рана наносилась в асептических условиях при помощи костных кусачек, которые позволяли вырезать лоскут кожи округлой формы площадью 1,5-2 см<sup>2</sup>. Ожоговая рана, площадью 1,5-2 см<sup>2</sup>, наносилась также в асептических условиях путем локального воздействия на кожу паром кипящей воды в течение 10 секунд.

На следующий день после нанесения ран, начинали вводить тестируемое вещество ХХХ или воду - растворитель тестируемого вещества соответственно группам, зондом в желудок один раз в сутки.

Таблица 30. Группы и дозы.

| Под<br>груп<br>па<br>№. | Чис<br>ло<br>жив<br>отн<br>ых | Номера<br>животн<br>ых | Характ<br>ер раны | Вводи<br>мое<br>вещест<br>во | Доза<br>(мг/к<br>г) | Объе<br>м<br>введе<br>ния<br>(мл/кг<br>) | Концен<br>т-<br>рация<br>раство<br>ра<br>(мг/мл) | Кол-<br>во<br>введе<br>ний<br>XXX | День<br>эвтаназ<br>ии<br>после<br>введен<br>ия<br>XXX |
|-------------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------|------------------------------|---------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 1a                      | 3                             | 1a/01-<br>1a/03        | Механ.            | К                            | 0                   | 5                                        | 0                                                | 2                                 | 3                                                     |
| 1b                      | 3                             | 1b/04-<br>1b/06        | Механ.            | К                            | 0                   | 5                                        | 0                                                | 6                                 | 7                                                     |
| 1c                      | 3                             | 1c/07-<br>1c/09        | Механ.            | К                            | 0                   | 5                                        | 0                                                | 13                                | 14                                                    |
| 1d                      | 3                             | 1d/10-<br>1d/12        | Механ.            | К                            | 0                   | 5                                        | 0                                                | 20                                | 21                                                    |
| 2a                      | 3                             | 2a/01-<br>2a/03        | Механ.            | Т                            | 1000                | 5                                        | 200                                              | 2                                 | 3                                                     |
| 2b                      | 3                             | 2b/04-<br>2b/06        | Механ.            | Т                            | 1000                | 5                                        | 200                                              | 6                                 | 7                                                     |
| 2c                      | 3                             | 2c/07-<br>2c/09        | Механ.            | Т                            | 1000                | 5                                        | 200                                              | 13                                | 14                                                    |
| 2d                      | 3                             | 2d/10-<br>2d/12        | Механ.            | Т                            | 1000                | 5                                        | 200                                              | 20                                | 21                                                    |
| 3a                      | 3                             | 3a/01-<br>3a/03        | Ожогов            | К                            | 0                   | 5                                        | 0                                                | 2                                 | 3                                                     |
| 3b                      | 3                             | 3b/04-<br>3b/06        | Ожогов            | К                            | 0                   | 5                                        | 0                                                | 6                                 | 7                                                     |
| 3c                      | 3                             | 3c/07-<br>3c/09        | Ожогов            | К                            | 0                   | 5                                        | 0                                                | 13                                | 14                                                    |
| 3d                      | 3                             | 3d/10-<br>3d/12        | Ожогов            | К                            | 0                   | 5                                        | 0                                                | 20                                | 21                                                    |
| 4a                      | 3                             | 4a/01-<br>4a/03        | Ожогов            | Т                            | 1000                | 5                                        | 200                                              | 2                                 | 3                                                     |
| 4b                      | 3                             | 4b/04-<br>4b/06        | Ожогов            | Т                            | 1000                | 5                                        | 200                                              | 6                                 | 7                                                     |
| 4c                      | 3                             | 4c/07-<br>4c/09        | Ожогов            | Т                            | 1000                | 5                                        | 200                                              | 13                                | 14                                                    |
| 4d                      | 3                             | 4d/10-<br>4d/12        | Ожогов            | Т                            | 1000                | 5                                        | 200                                              | 20                                | 21                                                    |

В процессе исследования ежедневно велось визуальное наблюдение за клиническим проявлением течения раневого процесса, у каждого животного измерялась площадь раны. В течение исследования у животных также регистрировались интегральные показатели здоровья: внешнее состояние, потребление корма и воды, прирост массы тела.

На 3 и 7 сутки после нанесения раны, по три животных из подгрупп №: 1a, 2a, 3a, 4a и №: 1b, 2b, 3b, 4b соответственно указанным срокам, подвергались эвтаназии. После чего

с раневой поверхности делался отпечаток для проведения цитологического анализа и вырезался участок кожи прираневаемой области с подлежащим мышечным слоем из области раны для гистологического исследования, а также тимус и селезенка, которые предварительно взвешивались. Указанные сроки проведения цитологического и гистологического анализа выбраны на основании закономерной смены стадий в процессе патогенеза и репарации раневого процесса, характеризующиеся определенными морфологическими признаками.

На втором этапе исследования животным из подгрупп №: 1с-1d, 2с-2d, 3с-3d, 4с-4d также в один день по специальным методикам в области спины моделировалась механическая кожно-мышечная (животные из подгрупп № 1с-1d и № 2с-2d) или ожоговая (животные из подгрупп № 3с-3d и № 4с-4d) рана. После чего каждое животное помещалось в отдельную клетку, в которой находилось в течение всего периода наблюдения согласно срокам. Все процедуры выполнялись в соответствии с процедурами первого этапа исследования.

На 14 и 21 сутки после нанесения раны, по три животных из подгрупп №: 1с, 2с, 3с, 4с и №: 1d, 2d, 3d, 4d соответственно указанным срокам, подвергались эвтаназии. После чего делался отпечаток с раневой поверхности для цитологического анализа, для гистологического исследования вырезался участок кожи из прираневаемой области с подлежащим мышечным слоем из области раны, а также тимус и селезенка, которые предварительно взвешивали.

Таким образом, действие препарата оценивали по критериям оценки состояния раны с использованием следующих методов исследования: планиметрического, визуального наблюдения, цитологического, гистологического, а также по состоянию гистологической структуры иммунокомпетентных органов – тимуса и селезенки.

В настоящее время проблемы патогенеза, регенерации и репарации ран остаются актуальными в хирургической практике, поэтому информация о новых препаратах, способствующих скорейшему заживлению ран любой этиологии, является значимой. В этой связи, настоящее исследование проводилось с целью исследования стимулирующего действия ХХХ на процессы регенерации и репарации на моделях неинфицированных механической и ожоговой кожно-мышечной ран у крыс. Действие препарата оценивали по его возможной способности оказывать стимулирующее воздействие на пролиферативные процессы в области тканевого повреждения и на органы иммунной системы – тимус и селезенку животных с моделированной раной, способствуя стимуляции пролиферации лимфоцитов и таким образом иммунитета в целом. Биологическая активность препарата,

оказывать стимулирующее действие на регенераторные процессы в тканях, проверялась в динамике патогенеза и репарации на моделях неинфицированных механической и ожоговой кожно-мышечной ран у крыс в сравнении с соответствующими контрольными животными, не получавшими препарат XXX.

Осуществление данного исследования в соответствии с регламентирующими положениями было невозможно без использования животных. Информация, полученная в результате данного исследования, не дублировала результаты других проводимых ранее исследований.

Настоящее исследование проводили на крысах CD самцах. В соответствии с данными научных публикаций (Bull Exp Biol Med. 2002 Nov, 134(5):512-5. Paramonov VA, Chebotarev VY. Modeling of thermal skin injury for the development of local treatment drugs; J Trauma. 2003 Jun, 54(6):1205-10, discussion 1211. Nissen NN, Gamelli RL, Polverini PJ, DiPietro LA. Differential angiogenic and proliferative activity of surgical and burn wound fluids.) мелкие грызуны: крысы и мыши являются стандартной тест-системой и наиболее общепринятой животной моделью для проведения подобного рода исследований.

Общее количество животных, используемое в данном исследовании – 48 крыс CD самцов. Количество животных в каждой группе должно быть достаточным для получения достоверной информации изучаемого ранозаживляющего эффекта. Количество животных в каждой группе на определенный срок исследования ранозаживляющего эффекта составило по три самца. Такое количество животных в пределах группы достаточно для выявления ранозаживляющей активности тестируемого вещества.

Исследование выполняли согласно утвержденному письменному протоколу, и в соответствии с принципами, отраженными в следующих публикациях и руководствах (Девятков и др. 2002, Paramonov and Chebotarev 2002, Nissen et al 2003).

Конкретные процедуры протокола с использованием животных до их начала рассмотрены и утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными ФИБХ РАН. В Комиссию был подан протокол-заявка на животных с описанием всех манипуляций с животными. Во время исследования все манипуляции с животными проводили согласно их описанию в протоколе исследования и в протоколе-заявке на животных.

В течение всего периода наблюдения за животными, начиная с момента нанесения ожоговой и механической кожно-мышечной раны и до полного восстановления дефекта кожи, состояние животных отмечали как удовлетворительное. У животных всех групп со стороны двигательной активности не было отмечено каких-либо отклонений от

нормального поведения. Наблюдения за потреблением корма и воды по количеству выпитой воды из бутылочек и съеденного корма, также не выявило никаких особенностей. Животные потребляли корм и воду в адекватных количествах. Внешний вид животных в течение всего эксперимента отмечали как вполне удовлетворительный, шерстный покров был гладкий и блестящий. С первых суток после нанесения раны и в течение всего периода наблюдения до полного восстановления дефекта кожи, отмечали незначительное уменьшение массы тела животных, данные представлены в таблице 31.

Таблица 31. Масса тела (г) животных в день моделирования раны и в день эвтаназии

| Подгруппы     | В день<br>моделирования n=3 | В день<br>эвтаназии<br>n=3 |
|---------------|-----------------------------|----------------------------|
| 1a (контроль) | 341 ± 13,0                  | 328 ± 12,6                 |
| 1b (контроль) | 346 ± 12,9                  | 309 ± 4,9                  |
| 1c (контроль) | 290 ± 16,2                  | 278 ± 11,2                 |
| 1d (контроль) | 273 ± 13,9                  | 259 ± 11,0                 |
| 2a            | 337 ± 5,2                   | 314 ± 9,3                  |
| 2b            | 338 ± 4,9                   | 321 ± 2,6                  |
| 2c            | 269 ± 7,9                   | 251 ± 7,1                  |
| 2d            | 308 ± 22,0                  | 273 ± 16,9                 |
| 3a (контроль) | 345 ± 13,9                  | 322 ± 17,8                 |
| 3b (контроль) | 340 ± 16,6                  | 319 ± 12,3                 |
| 3c (контроль) | 255 ± 10,3                  | 246 ± 8,8                  |
| 3d (контроль) | 278 ± 16,5                  | 266 ± 14,4                 |
| 4a            | 359 ± 10,3                  | 322 ± 17,0                 |
| 4b            | 369 ± 13,7                  | 339 ± 7,8                  |
| 4c            | 271 ± 10,8                  | 252 ± 7,7                  |
| 4d            | 264 ± 17,04                 | 242 ± 11,6                 |

У всех животных с моделированными механическими кожно-мышечными ранами, на следующий день после нанесения раны отмечали в легкой степени воспалительную реакцию в приранековой области, сопровождающуюся легким отеком тканей. На вторые сутки на дне раны отмечали присутствие серозно-геморрагического экссудата. К концу четвертых суток на дне раны отмечали участки грануляционной ткани, которые постепенно заполняли область дефекта кожи. К 7-8 суткам начинался процесс стягивания краев раны, к этому сроку грануляционная ткань регрессировала и замещалась на рубцовую ткань. Процесс завершался полной эпителизацией к 13-14 суткам за счет наплыва эпителия с краев раны из приранековой области. Таким образом, различий в

течение процесса заживления ран и в сроках полной эпителизации между животными контрольной группы и группы, получавшей тестируемое вещество XXX, не отмечалось.

У животных с моделированными ожоговыми ранами как контрольной, так и экспериментальной группой в течение первых двух суток после нанесения раны кожа в области ожога выглядела восковидкой. К третьим суткам кожа в обожженном участке изъязвлялась на всю толщину, включая гиподерму. К концу четвертых суток на поверхности раны формировался толстый темный струп. Процесс восстановления дефекта обожженного участка кожи осуществлялся за счет эпителизации с краев раны и рубцевания. К 12 суткам у животных, как контрольной группы, так и у животных, получавших тестируемое вещество XXX, наступало полное восстановление дефекта кожи. Таким образом, различий в течение процесса заживления ожоговых ран и в сроках полной эпителизации между животными контрольной группы и группы, получавшей тестируемое вещество XXX, не отмечалось. В таблице 32 представлены средние значения сроков заживления ран по подгруппам. На рисунке 34 представлена гистограмма, представляющая сроки заживления ран у животных всех групп.

Таблица 32. Средние значения сроков заживления раны

| № подгруппы   | Сутки             |
|---------------|-------------------|
| 1с (контроль) | 14 $\pm$ 00 (n=3) |
| 1d (контроль) | 14 $\pm$ 00 (n=3) |
| 2с            | 14 $\pm$ 00 (n=3) |
| 2d            | 14 $\pm$ 00 (n=3) |
| 3с (контроль) | 12 $\pm$ 00 (n=3) |
| 3d (контроль) | 12 $\pm$ 00 (n=3) |
| 4с            | 12 $\pm$ 00 (n=3) |
| 4d            | 12 $\pm$ 00 (n=3) |

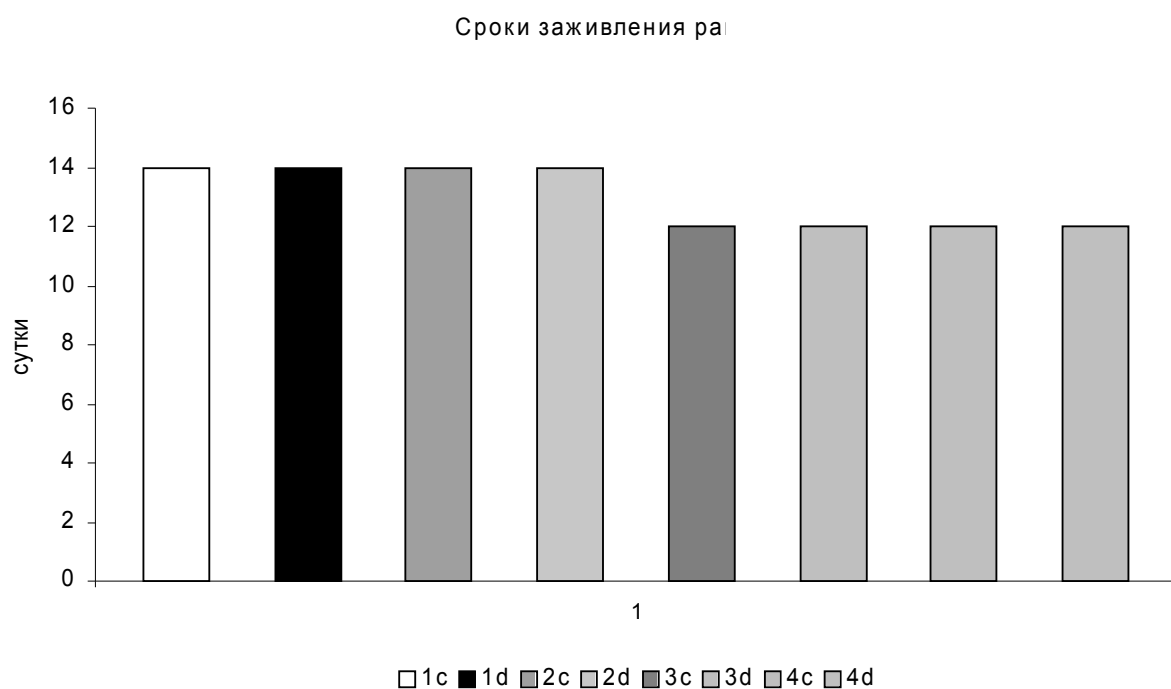


Рис.34 Сроки заживления раны в контрольных и экспериментальных группах

В таблице 33 и таблице 34 представлены фотометрические данные по подгруппам, представляющие собой средние значения площади раны при  $n = 3$  в каждой подгруппе, рассчитанные по длине контура раны.

Таблица 33. Средние значения площади раны (в  $\text{мкм}^2$ ), во всех случаях  $n=3$

**WWW.MEDLINE.RU ТОМ10, БИОФИЗИКА, ОКТЯБРЬ 2009**

**WWW.MEDLINE.RU ТОМ10, БИОФИЗИКА, ОКТЯБРЬ 2009**

**WWW.MEDLINE.RU ТОМ10, БИОФИЗИКА, ОКТЯБРЬ 2009**

**WWW.MEDLINE.RU ТОМ10, БИОФИЗИКА, ОКТЯБРЬ 2009**

**WWW.MEDLINE.RU ТОМ10, БИОФИЗИКА, ОКТЯБРЬ 2009**

Таблица 34. Средние значения площади раны (в  $\text{мкм}^2$ ).

| Сутки | Подгруппа 1с<br>(контроль) | Подгруппа 1d<br>(контроль) | Подгруппа 2с | Подгруппа 2d | Подгруппа 3с<br>(контроль) | Подгруппа 3d<br>(контроль) | Подгруппа 4с | Подгруппа 4d |
|-------|----------------------------|----------------------------|--------------|--------------|----------------------------|----------------------------|--------------|--------------|
| 1     | 92.91±7.61                 | 92.22±7.60                 | 96.17±15.01  | 93.88±7.32   | 84.13±4.19                 | 85.21±2.19                 | 81.57±9.8    | 97.24±12.29  |
| 4     | 46.45±2.32                 | 41.60±15.39                | 57.45±8.85   | 41.81±1.7    | 89.82±24.21                | 88.83±31.48                | 85.41±5.62   | 99.66±9.27   |
| 8     | 23.29±4.62                 | 21.09±6.89                 | 26.11±6.01   | 26.31±11.14  | 44.68±13.28                | 55.08±20.72                | 34.99±1.72   | 51.22±5.46   |
| 12    | 13.73±5.29                 | 11.83±3.99                 | 14.74±2.56   | 17.36±3.71   | 8.17±2.96                  | 10.51±1.21                 | 10.96±7.21   | 4.39±0.82    |
| 14    | 6.42±0.73                  | 7.34±0.11                  | 8.74±2.56    | 6.36±3.71    |                            |                            |              |              |

В процессе проведенного цитологического анализа отпечатков с поверхности раны не было выявлено различий в качественном и количественном составе клеточных элементов между животными контрольных групп и групп, получавших тестируемое вещество XXX. Таким образом, исходя из данных цитологического анализа, можно предположить, что все стадии, присущие патогенезу процесса ранозаживления (воспаление, эпителизация и дифференцировка) осуществлялись примерно в одни и те же сроки, как в контроле, так и у животных, получавших тестируемое вещество XXX.

Данные клеточного состава отпечатка с раневой поверхности представлены в таблице 35.

Таблица 35. Клеточный состав отпечатка с поверхности раны

| Подгруппы        | Процент деструкции лейкоцитов | Нейтрофилы    | Базофилы | Лимфоциты | Моноциты | Макрофаги | Фибробласты | Плазматические | Микробные тельца |
|------------------|-------------------------------|---------------|----------|-----------|----------|-----------|-------------|----------------|------------------|
|                  |                               | на 100 клеток |          |           |          |           |             |                |                  |
| 1a01             | 69                            | 85            | 0        | 10        | 0        | 4         | 0           | 0              | 16000            |
| 1a02             | 55                            | 47            | 0        | 15        | 2        | 6         | 0           | 0              | 22000            |
| 1a03             | 54                            | 98            | 0        | 1         | 0        | 1         | 0           | 0              | 10000            |
| <b>среднее</b>   | <b>59</b>                     | <b>77</b>     | <b>0</b> | <b>9</b>  | <b>1</b> | <b>4</b>  | <b>0</b>    | <b>0</b>       | <b>16000</b>     |
| <b>ст. откл.</b> | <b>5</b>                      | <b>15</b>     | <b>0</b> | <b>4</b>  | <b>1</b> | <b>1</b>  | <b>0</b>    | <b>0</b>       | <b>3464</b>      |
| 1b04             | 71                            | 76            | 3        | 5         | 3        | 13        | 1           | 0              | 16000            |

WWW.MEDLINE.RU ТОМ10, БИОФИЗИКА, ОКТЯБРЬ 2009

|                  |           |           |           |           |          |           |          |          |              |
|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|--------------|
| 1b05             | 83        | 43        | 0         | 19        | 1        | 26        | 3        | 4        | 0            |
| 1b06             | 70        | 91        | 0         | 1         | 1        | 6         | 0        | 0        | 16000        |
| <b>среднее</b>   | <b>75</b> | <b>70</b> | <b>1</b>  | <b>8</b>  | <b>2</b> | <b>15</b> | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>10667</b> |
| <b>ст. откл.</b> | <b>4</b>  | <b>14</b> | <b>1</b>  | <b>5</b>  | <b>1</b> | <b>6</b>  | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>5333</b>  |
| 2a01             | 68        | 67        | 0         | 26        | 0        | 7         | 0        | 0        | 10000        |
| 2a02             | 61        | 90        | 0         | 2         | 4        | 4         | 0        | 0        | 1000         |
| 2a03             | 13        | 75        | 0         | 17        | 4        | 4         | 0        | 0        | 0            |
| <b>среднее</b>   | <b>47</b> | <b>77</b> | <b>0</b>  | <b>15</b> | <b>3</b> | <b>5</b>  | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>3667</b>  |
| <b>ст. откл.</b> | <b>17</b> | <b>7</b>  | <b>0</b>  | <b>7</b>  | <b>1</b> | <b>1</b>  | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>3180</b>  |
| 2b04             | 78        | 53        | 12        | 23        | 4        | 6         |          | 2        | 22000        |
| 2b05             | 58        | 77        | 12        | 9         | 0        | 0         | 0        | 0        | 1500         |
| 2b06             | 58        | 89        | 5         | 1         | 2        | 1         | 0        | 1        | 6000         |
| <b>среднее</b>   | <b>65</b> | <b>73</b> | <b>10</b> | <b>11</b> | <b>2</b> | <b>2</b>  | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>9833</b>  |
| <b>ст. откл.</b> | <b>7</b>  | <b>11</b> | <b>2</b>  | <b>6</b>  | <b>1</b> | <b>2</b>  | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>6220</b>  |
| 3a01             | 0         | 86        | 0         | 5         | 2        | 7         | 0        | 0        | 24000        |
| 3a02             | 33        | 67        | 0         | 21        | 6        | 6         | 0        | 0        | 10000        |
| 3a03             | 33        | 60        | 0         | 26        | 7        | 7         | 0        | 0        | 0            |
| <b>среднее</b>   | <b>22</b> | <b>71</b> | <b>0</b>  | <b>17</b> | <b>5</b> | <b>7</b>  | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>11333</b> |
| <b>ст. откл.</b> | <b>11</b> | <b>8</b>  | <b>0</b>  | <b>6</b>  | <b>2</b> | <b>0</b>  | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>6960</b>  |
| 3b04             | 0         |           | 0         | 0         | 0        | 0         | 0        | 0        | 0            |
| 3b05             | 55        | 73        | 0         | 22        | 1        | 4         | 0        | 0        | 2000         |
| 3b06             | 55        | 40        | 0         | 35        | 11       | 12        | 0        | 0        | 2000         |
| <b>среднее</b>   | <b>36</b> | <b>57</b> | <b>0</b>  | <b>19</b> | <b>4</b> | <b>5</b>  | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1333</b>  |
| <b>ст. откл.</b> | <b>18</b> | <b>17</b> | <b>0</b>  | <b>10</b> | <b>4</b> | <b>4</b>  | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>667</b>   |
| 4a01             | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0         | 0        | 0        | 0            |
| 4a02             | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0         | 0        | 0        | 0            |
| 4a03             | 0         | 35        | 0         | 62        | 3        | 0         | 0        | 0        | 17000        |
| <b>среднее</b>   | <b>0</b>  | <b>12</b> | <b>0</b>  | <b>21</b> | <b>1</b> | <b>0</b>  | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>5667</b>  |
| <b>ст. откл.</b> | <b>0</b>  | <b>12</b> | <b>0</b>  | <b>21</b> | <b>1</b> | <b>0</b>  | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>5667</b>  |
| 4b04             | 39        | 86        | 0         | 4         | 4        | 4         | 0        | 1        | 10000        |

**WWW.MEDLINE.RU ТОМ10, БИОФИЗИКА, ОКТЯБРЬ 2009**

|                  |                                     |           |          |          |          |           |          |          |              |
|------------------|-------------------------------------|-----------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|--------------|
| 4b05             | 42                                  | 80        | 0        | 9        | 3        | 8         | 0        | 0        | 250000       |
| 4b06             | 56                                  | 69        | 0        | 8        | 4        | 18        | 0        | 1        | 20000        |
| <b>среднее</b>   | <b>46</b>                           | <b>78</b> | <b>0</b> | <b>7</b> | <b>4</b> | <b>10</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>93333</b> |
| <b>ст. откл.</b> | <b>5</b>                            | <b>5</b>  | <b>0</b> | <b>2</b> | <b>0</b> | <b>4</b>  | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>78387</b> |
| Подгруппы        | Процент<br>деструкции<br>лейкоцитов | 85        | 0        | 10       | 0        | 4         | 0        | 0        | 16000        |

Гистологический анализ срезов раны с прилегающей прираневой зоной не выявил различий в течение регенераторных процессов в динамике заживления на 3, 7, 14, и 21 сутки после моделирования ран между контрольными группами и группами животных, получавших тестируемое вещество ХХХ. Динамика развития событий, связанных со сменой фаз в процессе заживления раны была в общих чертах одинакова для механической и ожоговой раны. Незначительное различие заключалось в том, что в случае ожоговой раны динамика смены регенераторных фаз наступала на два дня раньше, что явилось следствием более ранней эпителизации дефекта кожи обожженной поверхности.

В течение первых 3 суток область тканевого дефекта заполнена фибрином, между нитями которого присутствуют очаги кровоизлияний, многочисленные нейтрофилы. Со стороны нижний слоев дна раны, из сохранившейся гиподермы, и из прираневой области отмечалась усиленная миграция фибробластов по направлению к дефекту. Гиподерма и ткани прираневой области отечны, со стороны гиподермы отмечены обширные очаги нейтрофильной инфильтрации. Капиллярная сеть гиподермы расширена, отмечены признаки интенсивной васкуляризации. В этот срок отмечена усиленная пролиферация эпителия прираневой области. Со стороны эпидермиса отмечена пролиферация базального слоя и формирование эпителиальных тяжей, спускающихся с краев раны по направлению к ее дну. Значения митотического индекса представлены в таблице 36.

Таблица 36 Митотический индекс в промилях на 1000 клеток

| Подгруппа (n=3) | Митотический индекс |
|-----------------|---------------------|
| 1a (контроль)   | $2,3 \pm 0,88$      |
| 1b (контроль)   | $2,7 \pm 0,67$      |
| 1c (контроль)   | $0,8 \pm 0,17$      |
| 1d (контроль)   | $0,5 \pm 0,00$      |
| 2a              | $1,3 \pm 0,33$      |
| 2b              | $2,0 \pm 0,58$      |
| 2c              | $0,7 \pm 0,17$      |
| 2d              | $0,5 \pm 0,00$      |
| 3a (контроль)   | $0,8 \pm 0,2$       |
| 3b (контроль)   | $2,7 \pm 0,67$      |
| 3c (контроль)   | $0,8 \pm 0,17$      |
| 3d (контроль)   | $0,5 \pm 0,00$      |
| 4a              | $0,8 \pm 0,2$       |
| 4b              | $2,3 \pm 0,33$      |
| 4c              | $0,8 \pm 0,17$      |

|    |                |
|----|----------------|
| 4d | $0,5 \pm 0,00$ |
|----|----------------|

На 7 сутки отмечено усиление пролиферативной активности со стороны базального слоя эпидермиса прираневой области, за счет чего площадь тканевого дефекта значительно сократилась. Значения митотического индекса представлены в таблице 6, где видно, что на этот срок наблюдения они максимальны. Отмечена дифференцировка вновь образованного эпителия. На этот срок наблюдения отмечен усиленный ангиогенез и активная дифференцировка вновь образованных кровеносных сосудов. В гиподерме отмечено присутствие большого количества макрофагов и тучных клеток, присутствие которых свидетельствует в пользу активности регенераторных процессов.

К 14 суткам эпителизация полностью не завершена, но площадь раны значительно сократилась. Отмечено значительно меньше фигур митозов по сравнению с ранними сроками наблюдения (см. таблицу 33). Слой вновь образованного эпидермиса тоньше относительно эпидермиса прираневой области и представлен тремя слоями клеток, дифференцировка не завершена. Дефект кожи заполнен сформировавшейся фиброзной тканью, представленной многочисленными коллагеновыми волокнами.

На 21 сутки отмечена полная эпителизация и дифференцировка вновь образованного эпидермиса о чем свидетельствует присутствие гранул кератогиалина в зернистом слое эпидермиса.

В приложении представлены микрофотографии, соответствующие всем срокам наблюдения регенераторных процессов.

#### Динамика заживления ожоговой раны

На 3 сутки после моделирования раны отмечено значительное утолщение эпидермиса за счет набухания эпителиальных клеток, однако его целостность сохранена. В тканях дермы и гиподермы отмечены признаки выраженного интерстициального отека, капиллярная и сосудистая сеть кровеносной системы гиподермы резко расширена.

На 7 сутки отмечены признаки некротического распада со стороны эпидермиса и дермы обожженного участка кожи. Гиподерма и ткани прираневой области отечны. Со стороны гиподермы, и из прираневой области наблюдалась усиленная миграция фибробластов по направлению к дефекту кожи. Область дефекта частично заполнена вновь сформированной фиброзной тканью. Капиллярная сеть гиподермы расширена, отмечены признаки васкуляризации. В этот срок отмечена усиленная

пролиферация эпителия прираневого области. Со стороны эпидермиса отмечена пролиферация базального слоя и формирование эпителиальных тяжей, спускающихся с краев раны по направлению к ее дну. Значения митотического индекса представлены в таблице 33. Процесс пролиферации сопровождается дифференцировкой вновь образованного эпителия.

К 14 суткам отмечена полная эпителизация и дифференцировка вновь образованного эпидермиса о чем свидетельствует присутствие гранул кератогиалина в зернистом слое эпидермиса. Область дефекта заполнена сформировавшейся фиброзной тканью.

В приложении представлены микрофотографии, на которых представлена морфологическая картина, соответствующая всем срокам наблюдения регенераторных процессов.

#### Гистологический анализ тимуса и селезенки

Гистологический анализ срезов селезенки не выявил различий со стороны морфологических структур тканей между контролем и экспериментальными группами животных. Во всех случаях не было выявлено увеличение Т-зоны в пределах белой пульпы и признаков бласт-трансформации Т-лимфоцитов, что могло бы свидетельствовать в пользу опосредованного иммунного ответа, в связи со стимуляцией регенераторных процессов.

Структура тканей тимуса животных, получавших тестируемое вещество XXX соответствовала контролю. Признаки разряжения корковой зоны тимуса, что могло свидетельствовать об усиленной миграции Т-лимфоцитов в кровоток, не отмечались.

Данные относительно средней массы тимуса и селезенки по подгруппам представлены в таблице 37. В приложении представлены микрофотографии срезов тимуса и селезенки животных из контрольной группы, и из групп, получавших тестируемое вещество XXX.

Таблица 37. Масса тимуса и селезенки (г)

| Подгруппы     | Вес тимуса (n=3) | Вес селезенки (n=3) |
|---------------|------------------|---------------------|
| 1a (контроль) | 0,438 ± 0,044    | 0,790 ± 0,095       |
| 1b (контроль) | 0,489 ± 0,065    | 0,683 ± 0,075       |
| 1c (контроль) | 0,347 ± 0,075    | 0,677 ± 0,152       |
| 1d (контроль) | 0,249 ± 0,062    | 0,633 ± 0,055       |
| 2a            | 0,329 ± 0,087    | 0,825 ± 0,096       |
| 2b            | 0,379 ± 0,050    | 0,713 ± 0,032       |
| 2c            | 0,324 ± 0,021    | 0,493 ± 0,026       |
| 2d            | 0,220 ± 0,015    | 0,663 ± 0,023       |
| 3a (контроль) | 0,409 ± 0,040    | 0,670 ± 0,046       |
| 3b (контроль) | 0,370 ± 0,009    | 0,683 ± 0,086       |
| 3c (контроль) | 0,378 ± 0,017    | 0,543 ± 0,071       |
| 3d (контроль) | 0,367 ± 0,033    | 0,663 ± 0,033       |
| 4a            | 0,343 ± 0,044    | 0,777 ± 0,092       |
| 4b            | 0,426 ± 0,075    | 0,827 ± 0,069       |
| 4c            | 0,290 ± 0,003    | 0,527 ± 0,015       |
| 4d            | 0,242 ± 0,030    | 0,573 ± 0,0186      |

Воспроизведенные модели резаной и ожоговой ран соответствуют требованиям последующего эксперимента для изучения воздействия физических факторов, в том числе НТАП, и параллельно вводимых веществ. Представленные данные свидетельствуют о том, что созданная раневая поверхность оставалась неизменной у молодых крыс (возраст 2-3 месяца) и заживала в среднем на 12 сутки. У старых крыс раневая поверхность сначала увеличивалась к 6-8 суткам, уменьшалась в 1,5-2 раза к 12 суткам и практически заживала на 20-24 сутки.

***Оценка микробного обсеменения раневых поверхностей in vivo в экспериментах на животных***

При свободном содержании животных неизбежно происходит спонтанное обсеменение раневой поверхности микрофлорой, содержащейся в фекальных массах. Проведенный по отпечаткам с ран микробиологический контроль подтвердил наличие в механических (резаных) и ожоговых ранах сапрофитной, условно-патогенной и патогенной микрофлоры. В связи с этим, для последующего выбора стерилизующих режимов НТАП нами было проведено исследование на микробном концентрате, полученном путем разведения фекальных масс

экспериментальных животных. В растворе фекальных масс была обнаружена следующая микрофлора(таблица 38):

Таблица 38. Микрофлора, обнаруженная в растворе фекальных масс.

| Облигатная     | Количество      |
|----------------|-----------------|
| Бифидобактерии | $10^7$          |
| Бактероиды     | $10^{10}$       |
| Анаэробные     | $10^{10}$       |
| Клостридии     | $<10^3$         |
| Лактобактерии  | $6 \times 10^9$ |
| Кишечная       | $10^7$          |
| Фекальные      | $10^7$          |

Последующее искусственное обсеменение механических ран раствором фекальных масс (искусственное обсеменение ожоговых ран оказалось трудновыполнимым вследствие образования спаянного с раневой поверхностью струпа) приводило к увеличению времени заживления данных ран в среднем на  $40 \pm 7\%$  у молодых крыс линии CD.

Все виды высеянной микрофлоры оказались высокочувствительными к воздействию низкотемпературной плазмы. При этом грамм-отрицательные микроорганизмы были более чувствительными к обработке НТАП: для их уничтожения на 99% с помощью разработанной плазменной горелки при культивировании на агаре достаточно было двухминутной экспозиции. Для грамм-положительных микроорганизмов такой же эффект достигался при 4-х минутном облучении. Указанные сроки существенно меньше, чем время неповреждающего воздействия на изолированную кожу человека и на раневую поверхность *in vivo* (в среднем неповреждающая экспозиция облучения с помощью НТАП достигает 15 минут).

Таким образом, высеянная фекальная микрофлора, спонтанно обсеменяющая раны у экспериментальных животных, имеет высокую чувствительность в отношении НТАП, генерируемой разработанной СВЧ-горелкой.

### 3.7. Работы, выполненные за счет внебюджетных средств.

В календарном плане по первому этапу “Установление технических характеристик и выбор режимов работы генератора низкотемпературной аргоновой

плазмы. Разработка программ и методик микробиологических и биомедицинских испытаний, экспериментальных моделей для оценки санирующего и ранозаживляющего воздействия низкотемпературной аргоновой плазмы” государственного контракта с Федеральным агентством по науке и инновациям от 28 июля 2008 г. № 02.512.12.2023. не была предусмотрено при проведении микробиологических и биомедицинских испытаний возникшее в ходе исследований осложнение - контаминация чистых рабочих помещений и боксов сапрофитной, условно-патогенной и патогенной микрофлорой. Необходимость защиты чистых помещений и боксов наряду с проведением исследований по экспериментального вычленению действия каждого из множества различных физико-химических факторов, инициируемых воздействием низкотемпературной плазмы на организм животных, потребовало принять исполнителями решение об оборудовании специального помещения, в котором можно обеспечить автономную работу с потенциально опасными микроорганизмами *in vitro* и *in vivo* и получать принятым в микробиологии способом продукты распада микроорганизмов для последующего изучения их влияния на культивируемые клетки животных и на заживление ран у животных.

Объем затрат на приобретение нового ламинарного бокса, экструзионного гомогенизатора (для дезинтеграции микроорганизмов под действием высокого давления) и более мелкого оборудования и расходных материалов для указанных видов исследований покрыт за счет внебюджетных средств через ИТЭБ РАН, на предусмотренную условиями госконтракта сумму внебюджетного вклада сумму 1900000 (Один миллион девятьсот тысяч) рублей. Благодаря удалось в требуемые сроки провести реконструкцию отдельной 40-метровой комнаты, запустить в эксплуатацию полученное оборудование и выполнить запланированный объем исследований, в том числе обеспечить необходимое качество и безопасность работ, проводимых с использованием сапрофитной, условно-патогенной и патогенной микрофлоры.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Выполнен анализ опубликованной научно-технической литературы и нормативно-технической документации и требований Росздравнадзора, относящихся к разрабатываемой теме. По результатам проведенного информационного анализа разработана общая программа проведения исследований.

Проведены расчет состава плазмы при работе генератора и адаптация методов диагностики низкотемпературной плазменной струи, в том числе адаптация зондовых методов определения концентраций электронов и ионов в плазме при атмосферном давлении.

Проведены определение ионного состава и исследование спектральных характеристик низкотемпературной аргоновой плазмы при разных режимах работы генератора. На основании проведенных исследований сформулированы и рассчитаны исходные медико-биологические требования к устройству СВЧ-разряда для генерации низкотемпературной аргоновой плазмы.

Разработано техническое предложение и осуществлено обеспечение биомедицинских исполнителей действующим макетом генератора низкотемпературной аргоновой плазмы (НТАП), содержащим систему компьютерного управления параметрами плазменной струи, контроля длительности облучения и положения излучателя относительно раневой поверхности, который был предоставлен для обеспечения медико-биологических исследований по проекту.

Были проведены оценка и адаптация параметров плазменной струи (температура, скорость протока и ионный состав) в соответствии с медико-техническими требованиями: параметры плазмы гомогенной по площади при диаметре плазменной струи 30 мм. на расстояниях 20 мм от выходного отверстия генератора находятся в безопасном для тканей животных и человека диапазоне, при ненулевой величине плавающего потенциала сетки температура выходящей струи газа ниже 40°C; при использовании чистого аргона (99,9%) в газовом потоке обнаружены микропримеси NO<sub>2</sub>; мощность УФ облучения (309 нм и 316 нм) составляет 80 мкВт/см<sup>2</sup>, излучение в красной и инфракрасных (ИК) областях менее 40 мкВт /см<sup>2</sup>.

Проведены экспериментальный отбор антибиотикорезистентных патогенных штаммов микроорганизмов из коллекции патогенных штаммов (грамм-положительные, грамм-отрицательные и полирезистентные бактерии) и оценка влияния аргоновой плазмы на жизнеспособность микроорганизмов в культуре и биопленках. Проведен скрининг вирулентности отобранных 44 штаммов *P. aeruginosa* и *S. Aureus*, включающих более 1000 клинических изолятов, выделенных из клинических образцов. Обнаружена высокая патогенность изолятов: 70% штаммов *P.aeruginosa* резистентны более чем к 5 антибиотикам; 61% штаммов *S.*

*aureus* резистентны к отдельным антибиотикам и 2 штамма обладали множественной устойчивостью.

Исследовано влияние параметров и режимов применения низкотемпературной аргоновой плазмы на жизнеспособность культивируемых *in vitro* патогенных микроорганизмов (грамм-положительных, грамм-отрицательных и полирезистентных бактерий). Показано, что более 99% колоний культивируемых *in vitro* штаммов микроорганизмов, выделенных из клинического материала и из инфицированных модельных ран лабораторных животных, гибнут через 2 мин облучения под воздействием НТАП, генерируемой СВЧ-горелкой. Увеличение экспозиции облучения до 4 мин приводит к увеличению площади микробицидного действия НТАП примерно вдвое.

Разработана программа и проведены в условиях *in vitro* медико-биологические испытания с использованием культур клеток покровных мягких тканей и фагоцитирующих клеток млекопитающих: определены жизнеспособность, функциональное состояние, кислородзависимая и кислороднезависимая бактерицидная активность и интерферонообразование клеток при воздействии на них факторов, определяющих биологическое воздействие НТАП.

Проведено исследование влияния режимов применения низкотемпературной аргоновой плазмы (по факторам, определяющим биологическую активность НТАП) на параметры клеточного иммунитета: функциональное состояние фагоцитирующих клеток, включая оценку кислородзависимой бактерицидной активности, а также интерферонообразование в тестах *in vitro*. Выполнено исследование *in vitro* показателей ответной реакции иммунной защиты 71 образца периферической крови людей: 39 образцов взяты у больных с вторичной иммунной недостаточностью и 32 - у практически здоровых лиц. Впервые выделено 5 типов ответов на «контрольное» низкоинтенсивное лазерное облучение, в зависимости от дозы и исходного уровня продукции активных форм кислорода нейтрофилами и моноцитами. Показано, что вторичный иммунодефицит на фоне инфекционно-воспалительного синдрома у больных с незаживающими ранами и язвами характеризуется недостаточностью свободно-радикальной ответной реакции периферической крови и снижением кислороднезависимой бактерицидности (продукции катионных белков и альфа-интерферона) при тестирующей функциональной нагрузке.

Исследовано влияние параметров и режимов применения таких компонентов низкотемпературной аргоновой плазмы, как УФ- и ИК- излучение, на

жизнеспособность, пролиферативную активность культивируемых *in vitro* клеток млекопитающих. Показана применимость *in vitro* модели репарации ран, основанной на контракции коллагенового геля иммобилизованными в его объеме фибробластами, и культивируемых клеток эпителия почек и фибробластов подкожной соединительной ткани животных и человека для исследования влияния таких компонентов НТАП, как УФ- и ИК- излучение на жизнеспособность (окраске трипановым синим), пролиферативную и функциональную активность клеток (оцениваемую по митохондриально-тетразолиевому тесту), на скорость и степень реорганизации фибробластами коллагенового матрикса.

Проведены медико-биологические испытания при моделировании раневого процесса у животных (патофизиологические модели медленно заживающих механических и ожоговых ран у крыс) с инфицированием сапрофитными и условно патогенными микроорганизмами. Осуществлена адаптация методов оценки микробного обсеменения раневых поверхностей *in vivo* в экспериментах на животных. Показано, что у старых животных, в отличие от молодых, наблюдается вторичная альтерация, сопровождающаяся увеличением площади ран и значительной задержкой заживления ран. Дополнительное искусственное инфицирование резаных ран у животных золотистым стафилококком и гемолитическими энтерококками задерживает заживление в среднем на 40%.

Таким образом, все задачи, поставленные на первом этапе проекта, выполнены полностью.

#### **Список литературы.**

- 1 Л. Бардош, Ю.А. Лебедев, Электродный шаровой СВЧ разряд. Феноменология и результаты зондовых измерений. // Журнал технической физики, 1998, т. 68, №12, с. 29-32.
- 2 Батенин В.М., Климовский И.И., Лысов Г.В., Троицкий В.Н. СВЧ генераторы плазмы: Физика, техника, применение. М.: Энергоатомиздат, 1988;
- 3 Бенилов М.С., Косов В.Ф., Рогов Б.В., Синельщиков В.А. Токи насыщения на электрические зонды в потоках химически реагирующей плазмы с разными сортами ионов // Тепл. выс. темп.- 1987.- Т.25.-№3.-С.573-581.
- 4 Брюне Б., Сандау К., фон Кнетен А. (1998) Биохимия, 63, 966-975.

- 5 Бунатян К.А Вторичная иммунная недостаточность у хирургических больных: рациональная диагностика и коррекция. Автореферат на соиск. научной степени доктора мед.наук, Москва, 2007
- 6 Г.В. Буренко, Т.Н. Галыга, О.И. Осадчая, А.М. Боярская Особенности иммунологической реактивности у больных с варикозными трофическими язвами. Хирургия Украины №2, 2007 с 107.
- 7 Буянов В.М., Родоман Г.Н. Проблемы профилактики нагноений после-операционных ран.// Хирургия. – 1996. – № 9. – С. 132-135.
- 8 Васильева И.А., Косов В.Ф. // Тепл. выс. темп.-1981.-Т.19.-№5.-С. 1022.
- 9 Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. 1972, М., Наука, 172 с.
- 10 Газин И. К. Патология иммунитета у больных сахарным диабетом, осложненным гнойно-некротическими поражениями нижних конечностей, и коррекция при традиционном лечении и озонотерапии . Иммунология №1 2008
- 11 Галеев Ф.С., Габдулхаков Р.М., Хасанова С.Г. Микробный пейзаж в различных подразделениях многопрофильного городского стационара // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.,2000., Т.2. – Прилож. №1. – С. 14.
- 12 В.К. Гостищев «Общая хирургия, 2005, Москва, Гэотар Медиа, 608с.
- 13 Гостищев В.К., Липатов К.В., Шехтер А.Б. и др. Использование NO-содержащего газового потока в лечении гнойных ран. В Кн. NO-терапия: теоретические аспекты, клинический опыт и проблемы применения экзогенного оксида азота в медицине. Под. ред. С.В.Грачева, А.Б. Шехтера, Н.П.Козлова, М. 2001. с. 79-82.
- 14 Грищенко А.А. Разработка и обоснование характеристик плазмотрона косвенного действия для обработки биоткани: Автореф. дис. канд. техн. наук. М., 1992. 16 с.
- 15 Грушко В.И.. Применение плазменного потока в комплексном лечении гнойных ран. автореф канд. дисс. М. 2007. 27 с.
- 16 С. В. Дамбаева, Д. В. Мазуров, Н. М. Голубева, Б. В. Пинегин. Влияние некоторых иммуномодуляторов на функциональную активность фагоцитарных клеток периферической крови доноров/ Иммунология. 2000 . N 6. - С. 15-20.

- 17 Данилина Г.А., Чернуха М.Ю., Алексеева Г.В., Батов А.Б., Шагинян И.А. Формирование биопленок клиническими штаммами бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* в зависимости от их фенотипических и генотипических характеристик. ЖМЭИ, 2007, № 1, с3-9
- 18 В.А. Девятков и др. Проблемы амбулаторной гнойной хирургии и пути их решения. Челябинск, Пятигорск. 2002 г. УДК 617-002.
- 19 Дмитренко О.А., Прохоров А.Я., Матвеев С.М., Гинцбург А.Л., Шагинян И.А. Молекулярно-генетическое типирование метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных в стационарах различных регионов России и Беларуси. Ж.микробиол., 2005, №4, с.46-52
- 20 Долгушин И. И., Бухарин О. В. Нейтрофилы и гомеостаз / УрО РАН. – Екатеринбург, 2001. – 279с.
- 21 Дуванский В.А., Елисеенко В.И., Дзагидзе Н.С. Воздушно-плазменные потоки в лечении больных с гнойно-некротическими формами диабетической стопы, Georgian Medical News, 2003, №3 (96), март, с.10-12
- 22 Зуев В.Е., Копытин Ю.Д., Протасевич Е.Т. Образование долгоживущих плазмодов при охлаждении ВЧ-разряда потоком водно-капельного аэрозоля//ДАН СССР, 1987, т.296, №2, с.337-340.5]
- 23 С.А.Кетлинский, А.С Симбирцев. Цитокины, С-Пб, Фолиант, 2008, 552 с.
- 24 Косов В.Ф., Молотков В.И., Нефедов А.П. Измерения концентрации заряженных частиц в потоке плазмы продуктов сгорания методом электрического зонда. // Тепл. выс. тем. -1991. -Т. 29. -С. 633.
- 25 Липатов К.В., Шехтер А.Б., Емельянов А.Ю. Использование оксида азота в сетном лечении флегмонозно-некротической рожи. В Кн. NO-терапия: теоретические аспекты, клинический опыт и проблемы применения экзогенного оксида азота в медицине. Под. ред. С.В.Грачева, А.Б. Шехтера, Н.П.Козлова, М. 2001. с. 82-85.
- 26 Липатов К.В., Сопромадзе М.А., Шехтер А.Б., Емельянов А.Ю., Грачев С.В. Использование газового потока, содержащего оксид азота (NO-терапия) в комплексном лечении гнойных ран // Хирургия. – 2002. – №2. – с.41-43.
- 27 Маеда Х., Акаике Т. (1998) Биохимия, 63, 1007-1019.
- 28 Маянский А.Н. Патогенетические аспекты нейтрофилзависимых реакций // Патологическая физиология. - 1989. - № 6. - С. 66 - 72.

- 29 Маянский Д.Н., Маянская С.Д. Роль нейтрофилов в ишемическом и реперфузионном повреждении миокарда // Терапевт. арх. – 2001. – № 12. – С. 84-88.
- 30 Маевский Е.И., Аксенова О.Г., Богданова Л.А., Мороз В.В., Сенина Р.Я., Пушкин С.Ю., Иваницкий Г.Р. Анализ побочных и клинических эффектов в ходе 1 и 2 фазы клинических исследований перфторана// Вестник службы крови России,- , 2001, (№4), С.:23-29
- 31 Меньщикова Е.В., Зенков Н.К. 1997. Окислительный стресс при воспалении // Успехи соврем, биологии. Т. 117. Р. 155-171.
- 32 Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. // Успехи соврем, биологии. 1997. Т. 117. Вып. 2. С. 155.
- 33 Пасечник, И. Н. Механизмы повреждающего действия активированных форм кислорода на биологические структуры у больных в критических состояниях / И. Н. Пасечник // [Вестник интенсивной терапии : Научно-практический журнал](#). - 2001. - N 4 . - С. 3-9
- 34 Петрин С.П., Шехтер А.Б., Раджабов А.А. и др. Влияние NO-терапии на заживление гнойных ран. В Кн. NO-терапия: теоретические аспекты, клинический опыт и проблемы применения экзогенного оксида азота в медицине. Под. ред. С.В.Грачева, А.Б. Шехтера, Н.П.Козлова, М. 2001. с. 85-88.
- 35 Пигаревский В.Е. Лизосомально-катионный тест. Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов: Сб. науч. тр. Под ред. В.Е.Пигаревского. Л., 1988; с. 87–101.
- 36 Саприн А. Н., Калинина Е. В. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов // Усп. биол. хим. -1999. -Т. 39. -С. 289-326.
- 37 Полтанов Евгений Алексеевич Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на синтетические процессы клеток. Автореферат на соискание уч.степени кандидата биол.наук, 2004
- 38 Протасевич Е.Т. Капичка В., Браблец А. Резонансное охлаждение плазмы ВЧ-разряда парами воды//ЖТФ, 1985, т.55, №4, с.743-745;
- 39 Протасевич Е.Т. Холодная неравновесная плазма газового разряда//ТВТ, 1989, т.27, №6, с.1206-1218

- 40 Протасевич Е.Т. Высоко частотный разряд во влажном воздухе при давлениях 1-20 мм рт. ст.//«Физика космической и лабораторной плазмы», Под ред. А.Г. Пономаренко. СОАН, Новосибирск: Наука, 1989. с.170—174;
- 41 Протасевич Е.Т. ВЧ-разряд при пониженном давлении в условиях переменной влажности воздуха//Годишник на висшите учебни заведения. «Техническа физика» (Болгария), 1990, т.26, №2, с.169-180.;
- 42 Романова Ю.М., Смирнова Т.А., Андреев А.Л., Ильина Т.С., Диденко Л.В., Гинцбург А.Л. 2006. Формирование биопленок как пример социального поведения бактерий. Микробиология. 75: 556-561
- 43 С.В.Сидоренко, Антибиотикорезистентность в клинической практике. Труды II - Российского национального конгресса "Человек и лекарство", М., 1996. 78-94.
- 44 Слесаренко А. В. Егоров В.И. Использование аппарата « Плазон» при лечении воспалительных заболеваний наружного и среднего уха Тезисы V Юбилейной Всеармейской международной конференции "СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ТЕРАПИИ ХИРУРГИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ", 2005
- 45 Ю.М.Стойко, Е.В.Шайдаков, Н.А.Ермаков Комплексное лечение хронической венозной недостаточности нижних конечностей в стадии трофических расстройств Consilium medicum, Журнал доказательной медицины для практикующих врачей 2001, Том 3, N 7,.
- 46 Тарусов Б.Н., «Первичные процессы лучевого поражения». М.: Медгиз, 1957
- 47 Р.М.Хаитов, Б.В. Пинегин, Х.И. Истамов «Экологическая Иммунология» М., 1995г
- 48 Химия плазмы. Под ред. Л.С. Полака и Ю.А. Лебедева. Новосибирск, Наука, Сибирское отд., 1991;
- 49 Чернуха М.Ю., Ковтун В.П, Николаева Т.Н., Гинцбург А.Л., Шагинян И.А. Разработка модели персистирующей инфекции, вызванной *Pseudomonas aeruginosa* и бактериями комплекса *Burkholderia cepacia*. Ж.микробиол., 2004, № 2, 14-20
- 50 Чернуха М.Ю., Шагинян И.А. Николаева Т.Н., Гинцбург А.Л. Влияние бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* и *Pseudomonas aeruginosa* на клеточные иммунные реакции экспериментальных животных Ж.микробиол., 2005, № 3, с. 53-57

- 51 Шагинян И.А. Бусуек Г.П., Александрова Г.А. Эпидемиология и профилактика госпитальных инфекций в акушерских и детских стационарах. Ж. микробиол., 2003, № 6, с. 30-36
- 52 Шагинян И.А., Дмитренко О.А. Молекулярная эпидемиология внутрибольничных инфекций, вызываемых метициллинустойчивыми стафилококками. Ж. микробиол. эпидемиол. иммунол, 2003, №3, с. 99-109
- 53 Шагинян И.А., Дмитренко О.А. Молекулярная эпидемиология внутрибольничных инфекций, вызываемых метициллинустойчивыми стафилококками. Ж. микробиол. эпидемиол. иммунол, 2003, №3, с. 99-109
- 54 Abercrombie, M., M. H. Flint, and D. W. James. 1956. Wound contraction in relation to collagen formation in scorbutic guinea pigs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 4:167-175.
- 55 Yu. Akishev, S. Kroepke, J. Behnisch, A. Hollander, A. Napartovich, N. Trushkin, Proc. Int. Symp. High Pressure Low-Temp. Plasma Chemistry (HAKONE-VII), Greifswald, Germany, 2000, Vol. 2, 481-485
- 56 Albina J.E., Reichner J.S. (1998) Cancer and Metastasis Reviews, 17, 39-53.
- 57 Anpilov, E. Barkhudarov, Yu. Bark et al, J. Phys. D: Appl. Phys., 34(2001), 993-999;
- 58 Shadyro O., Yurkova I., Kisel M., Brede O. and Arnhold J. Radiation-induced fragmentation of cardiolipin in a model a membrane // Int. J. Radial. Biol. 2004. Vol. 80. P. 239–245.
- 59 Anpilov, E. Barkhudarov, Yu. Bark et al, J. Phys. D: Appl. Phys., 34(2001), 993-999
- 60 Armstrong D.G., Liswood P.J., Todd W.F. 1995. Prevalence of mixed infections in the diabetic pedal wounds. A retrospective review of 112 infections. *J. Am. Pediatr. Med. As.* 85: 533-537
- 61 Bal-Price A., Brown G.C. (2000) *J. Neurochem.*, 75, 1455-1464.
- 62 Bell E, Ivarsson B, Merrill C 1979 Production oftissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *PNAS USA* 76,1274-1278.
- 63 Bellows CG, Melcher AH, Aubin JE 1982 Assotiation between tension and orientation of periodontal ligament fibroblasts and exogenous collagen fibers in collagen gels in vitro. *J Cell Sci* 58, 125-138
- 64 Billingham, R. E., and P. S. Russell. 1956. Studies on wound healing, with

special reference to the phenomenon of contracture in experimental wounds in rabbits' skin. *Ann. Surg.* 144:961-981.

- 65 Bendy R.H., Nuccio P.A., Wolfe E., Collins B., Tamburro C., Glas W., Martin C.M. 1964. Relationship of quantitative wound bacterial counts to healing of decubiti. Effect of topical gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4: 147-155
- 66 Bornside G.H., Bornside B.B. 1979. Comparison between moist swab and tissue biopsy methods for quantification of bacteria in experimental incisional wounds. *J. Trauma* 19: 103-105
- 67 Bottone E.J., Perez A.A. II. *Pseudomonas aeruginosa* folliculitis acquired through use of contaminated loofah sponge: an unrecognized potential public health problem// *J.clin.microbial.*- 1993.-Vol. 31.-P. 480-483.
- 68 Bowler P.G., Duerden B.I., Armstrong D.G. 2001. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 244-269
- 69 Brook I., Frazier E.H. 1990. Aerobic and Anaerobic bacteriology of wounds and cutaneous abscesses. *Arch. Surg.* 125:1445-1451
- 70 Brook I., Frazier E.H. 1998. Aerobic and anaerobic microbiology of chronic venous ulcers. *Int. J. Dermatol.* 37:426-428
- 71 Brook I., Randolph J.G. 1981. Aerobic and Anaerobic bacterial flora of burns in children. *J. Trauma.* 21:313-318
- 72 Bult, H. (1996) *Mol Med. Today.*, 2, 510-518
- 73 Church D., Elsayed S., Reid O., Winston B., Lindsay R. 2006. *Clin. Microbiol. Rev.* Burn wound infection. 19: 403-434
- 74 J Clark, R. A. F., J. M. Folkvord, C. E. Hart, M. J. Murray, and J. M. McPherson. 1989. Platelet isoforms of platelet-derived growth factor stimulate fibroblasts to contract collagen matrices. *J. Clin. Invest.* 84:1036-1040.
- 75 Clark RAF (1988). Overview and general considerations of wound repair. In: Clark R.A.F, Henson PM, eds. *Molecular and cellular biology of wound repair.* New York: Plenum Press: 3-33
- 76 Clutterbuck AL, Cochrane CA, Dolman J, Percival SL. 2007. Evaluating antibiotics for use in medicine using a poloxamer biofilm model. *Ann. Clin. Microbiol.* 15:6:2
- 77 I. Courtillot, J. Morville, V. Motto-Ros, D. Romanini, Sub-ppb NO<sub>2</sub> detection by optical feedback cavity-enhanced absorption spectroscopy with a blue diode laser, *Appl. Phys. B* 85, 407-412 (2006)

- 78 Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A, Welsh E, Eaglstein WH, Mertz PM.2008. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. 16:23-29
- 79 Delvoye P., R. Wiliquet, J.-L. Leveque, B. V. Nusgens, and C. M, Lapiere. 1991. Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in the three-dimensional collagen gel. *J. Invest. Dermatol* 97: 898-902.
- 80 Desmouli, A., A. Geinoz, F. Gabbiani, and G. Gabbiani. 1993. Transforming growth factor beta-1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts and in tuififernt nnd grnwng riilmrndfihrnhlrnti *J CellBiol*. 122:103-111.
- 81 Dowd SE, Sun Y, Secor PR, Rhoads DD, Wolcott BM, James GA, Wolcott RD. 2008. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol*. 8:43-58
- 82 Dubertret, L., F. Brunner-Ferber, J. Misiti, K. A. Thomas, and M.-L. Dubertret. 1991. Activities of human acidic fibroblast growth factor in an in vitro dermal equivalent model. *J. Invest. Dermatol*. 97:793-798.
- 83 Ehrlich, H. P., W. B. Rockwell, T. L. Comwell, and J. B. M. Rajaratnam. 1991. Demonstration of a direct role for myosin light chain kinase in fibroblast-populated collagen lattice contraction. *J. Cell Physiol*. 146:1-7.
- 84 Ehrlich HP, Wyler DW 1983 Fibroblast contraction of collagen lattices in vitro: Inhibition by chronic inflammatory cell mediators. *J Cell Physiol* 116,345-351.
- 85 Elliott D.C., Kufera J.A., Myers A.M. 1996. Necrotising soft tissue infections. Risk fatros for mortality and strategies for management. *Ann.Surg*. 224:672-683
- 86 Elsdale, T., and J. Bard. 1972. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J. Cell Biol*. 54:626-637.
- 87 Estevez A.G., Spear N., PelluffoH., Kamaid A., Barberro L., Beckman J.S. (1999) *Methods in Enzimology*, 301, 393-402
- 88 Farsi, J. M. A., and J. E. Aubin. 1984. Microfilamenl rearrangements during fibroblast-induced contraction of three-dimensional hydrated collagen gels. *Cell Motil*. 4:29-40.
- 89 Finesmith, T. H., K. N. Broadley, and J. M. Davidson. 1990. Fibroblasts from wounds of different stages of repair vary in their ability to contract a collagen gel in response to growth factors. *J. Cell Physiol*. 144:99-107.

- 90 J Fukamizu, H., and F. Grinnell. 1990. Spatial organization of extracellular matrix and fibroblast activity: Effects of serum, transforming growth factor b, and fibronectin. *Exp. Cell Res.* 190:276-282.
- 91 Gales A.C., Jones R.N., Turnidge R. et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-1999// *Clin. Infect. Dis.* - 2001.- Vol .32 (Suppl.2).-P.S146-S155.
- 92 Gillery, P., H. Serpier, M. Polette, G. Bellon, C. Clavel, Y. Wegrowski, P. Birembaut, B. Kalis, R. Cariou, and F.-X. Maquart. 1992. Gamma-interferon inhibits extracellular matrix synthesis and remodeling in collagen lattice cultures of normal and scleroderma skin fibroblasts. *Exp. J. Cell Biol.* 57:244-253.
- 93 Grinnell F, Lamke-Seymour C 1984 Reorganization of hydrated collagen lattices by human skin fibroblasts. *J Cell Sci* 66:51-63.
- 94 Grkovic S., Brown M.H., Skurray R.A. Regulation of bacterial drug export systems// *Microbiol Mol .Biol. Rev.* - 2002.- Vol .66.-P.671-701.
- 95 Grundman H., Schneider C., Hartung D. et al. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*// *J. Clin. Microbiol.* - 1995.- Vol .33.-P.528-534.
- 96 Guide for Care and Use of Laboratory Animals. ILAR publication, 1996, National Academy Press
- 97 Guidry, C. 1992. Extracellular matrix contraction by fibroblasts: peptide promoters and second messengers. *Cancer Metastasis Rev.* 11:45-54.
- 98 Guidry C, Grinnell F Studies on the mechanism of hydrated collagen gel reorganization by human skin fibroblasts. *J Cell Sci*, 1985, 79, 67-81.
- 99 Harris AK, Stopak D, Wild P 1981 Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature* 290,249-251.
- 100 Harris AK, Stopak D, Warner P 1984 Generation of spatially periodic patterns by a mechanical instability: a mechanical alternative to the Turing Model. *J Embryol Exp Morph* 80, 1-20
- 101 Hasleton PS. Benign lung tumors and their malignant counterparts. In: Hasleton PS, Ed. *Spencer's Pathology of the Lung*. 5<sup>th</sup> ed. New York. The McGraw-Hill Companies; 1996, pp. 966-71.
- 102 Hannson C., Hoborn J., Moller A., Swanbeck. 1995. The microbial flora in venous leg ulcers without clinical signs of infection. *Acta Dermatol. Venereol.* 75:24-30

- 103 Harrison-Balestra C., Cazzaniga A.L., Davis S.C., Mertz P.M. 2003. A wound-isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows a biofilm in vitro within 10 hours and is visualized by light microscopy. *Dermatol. Surg.* 29:631-635
- 104 International *Pseudomonas aeruginosa* Typing Study Group. A multicenter comparison of methods for typing strains of *Pseudomonas aeruginosa* predominantly from patients with cystic fibrosis// *J.Infect.Dis.*- 1994.-Vol. 169.- P.134-142.
- 105 Kasugai, S., S. Suzuki, S. Shibata, S. Yasui, H. Amano, and H. Ogura. 1990. Measurements of the isometric contractile forces generated by dog periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Arch. Oral Biol.* 35:597-601.
- 106 Kersters K., Ludwig W., Vancanneyt M. et al. Recent changes in the classification of the pseudomonads: an overview// *Syst. Appl. Microbiol.*- 1996.- Vol .19.-P.465-477.
- 107 Khan, S., Kayahara, M., Joashi, U., Mazarakis, N.D., Sarraf, C., Edwards, A.D., Hughes, M.N., and Mehmet, H. (1997) / *Cell Sci.*, 110, 2315-2322.
- 108 [Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, Fazli M, Madsen KG, Pedersen J, Moser C, Tolker-Nielsen T, Høiby N, Givskov M, Bjarnsholt T. 2008.Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. \*J Clin Microbiol.\* 46:2717-2722.](#)
- 109 Kiska D.L., Gilligan P.H. *Pseudomonas*// In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C., Tenover P.C., editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington: ASM Press.- 2003.-P. 719-728.
- 110 Klein, C. E., D. Dressel, T. Steinmayer, C. Mauch, B. Eckes, T. Krieg, R. B. Bankert, and L. Weber. 1991. Integrin  $\alpha 2\beta 1$  is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils. *J. Cell Biol.* 115: 1427-1436.
- 111 Kolodney, M. S., and R. B. Wysolmerski. 1992. Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: a quantitative study. *J. Cell Biol.* 117:73-82.
- 112 Kono, T., T. Tanii, M. Furakawa, N. Mizuno, J.-I. Katajima, M. Ishii, T. Hamada, and K. Yoshizato. 1990. Cell cycle analysis of human dermal fibroblasts cultured on or in hydrated type I collagen lattices. *Arch. Dermatol. Res.* 282:258-262.

- 113 Lambre D.W., Stewart W. Evaluation of pseudosel agar as an aid in the identification of *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*// Appl. Microbiol.- 1972.- Vol.23.-P.377-381.
- 114 Levine N.S., Lindberg R.B., Mason A.D., Pruitt B.A. 1976. The quantative swab culture and smear: a quick simple method for determining the number of viable bacteria in open wounds. J. Trauma. 16: 89-94
- 115 Livermore D.M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?// Clin. Infect. Dis. -2002.- Vol. 34.-P.634-640.
- 116 Lefkowitz, J. B. "Cyclooxygenase-2 specificity and its clinical implications." Am J Med 106(5B):43S-50S, 1999.
- 117 E. Maevsky, G. Ivanitsky, L. Bogdanova, O. Axenova, N. Karmen, E. Zhiburt, R.Senina, S.
- 118 Pushkin, I. Maslennikov, A. Orlov and I. Marinicheva Clinical Results of Perftoran Application: Present and Future.// Artificial Blood Substitutes and Biotechnology, 2005, vol. 33, No. 1, pp.37-47
- 119 J Mattner , A Wandersee-Steinhäuser, As Pahl, M Röllinghoff, G R. Majeau, P S. Hochman and C Bogdan Protection against Progressive Leishmaniasis by IFN- $\beta$  The Journal of Immunology, 2004, 172: 7574-7582.
- 120 Mertz PM, Patti JM, Marcin JJ, Marshall DA. 1987. Model for studying bacterial adherence to skin wounds. J. Clin. Microbiol. 25: 1601-1604
- 121** Microwave Plasma and its Applications. Ed. by Yu.A. Lebedev. Proc. Int. Workshop on Microwave Plasma and its Applications, 5-8 September 1994, Zvenigorod (Russia),
- 122** Microwave Discharges: Fundamentals and Applications. Ed. by Yu. A. Lebedev. The United Phys. Soc. of the Russian Federation, Publ. Comp."Yanus", 2001.
- 123 Microwave Discharges: Fundamentals and Applications. Ed. by Yu. A. Lebedev. The United Phys. Soc. of the Russian Federation, Publ. Comp."Yanus", 2001.
- 124 Mochitate, K., P. Pawelek, and F. Grinnell. 1991. Stress relaxation of contracted collagen gels: Disruption of actin filament bundles, release of cell surface fibronectin, and down regulation of DNA and protein synthesis. *Exp. Cell Res.* 193:198-207.
- 125 Momesano, R., and L. Orci. 1988. Transforming growth factor  $\beta$  stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: Implications for wound healing. *Proc.*

*Natl. Acad. Sci. USA.* 85:4894-4897.

- 126 Moriya R., Uehara T., Nomura Y. (2000) FEBS Letters, 484, 253-260.
- 127 Mousa H.A. 1997. Aerobic, anaerobic and fungal burn wound infections. *J. Hosp. Infect.* 37:317-323
- 128 Nakagawa, S., P. Pawelek, and F. Grinnell. 1989a. Extracellular matrix organization modulates fibroblast growth and growth factor responsiveness. *Exp. Cell Res.* 182:572-582.
- 129 Neyfakh A.A. Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple// *Mol Microbiol.*- 2002.- Vol.44.-P.1123-1130.
- 130 Niewiarowski, S., and S. Goldstein. 1973. Interaction of cultured human fibroblasts with fibrin: modification by drugs and aging in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* 82:605-610.
- 131 Nishiyama, T., M. Tsunenaga, Y. Nakayama, E. Adachi, and T. Hayashi. 1989. Growth rate of human fibroblasts is repressed by the culture within reconstituted collagen matrix but not by the culture on the matrix. *Matrix.* 9:193-199.
- 132 Nissen NN, Gamelli RL, Polverini PJ, DiPietro LA. Differential angiogenic and proliferative activity of surgical and burn wound fluids. *J Trauma.* 2003 Jun, 54(6):1205-10, discussion 1211.
- 133 Nusgens, B., C. Merrill, C. Lapiere, and E. Bell. 1984. Collagen biosynthesis by cells in a tissue equivalent matrix in vitro. *Collagen Relat. Res.* 4:351-363.
- 134 Paramonov VA, Chebotarev VY. Modeling of thermal skin injury for the development of local treatment drugs; *Bull Exp Biol Med.* 2002 Nov, 134(5):512-5.
- 135 Paye, M., B. V. Nusgens, and C. M. Lapiere. 1987. Modulation of cellular biosynthetic activity in the retracting collagen lattice. *Eur. J. Cell Biol.* 45:44-50.
- 136 Proc. IV Int. Workshop on Microwave Discharges: Fundamentals and Applications, September 18-22, 2000, Zvenigorod (Russia)
- 137 Pathare N.A., Bal.A., Talvalkar G.V., Antani D.U. 1998. Diabetic foot infections: a study of microorganisms associated with the different Wagner grades. *Indian J. Pathol Microbiol.* 41: 237-441

- 138 Pearson J.P., Van Delden C., Iglewski B.H. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals// J Bacteriol.-1999.- Vol.181.-P.1203-1210.
- 139 Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*// In G.L. Mandell, J.E. Bennett and R. Dolin (ed.). Principles and Practice of Infectious Diseases. 5<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone. Inc. New York. N.Y.-2000.-P.1980-2003.
- 140 Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., and Freeman, B.A. (1991) J. Biol. Chem., 266, 4244-4250.
- 141 Rafikova E.R., Kurganov B.I., Arutyunyan A.M., Kust S.V., Drachev V.A., Dobrov E.N. A mechanism of macroscopic (amorphous) aggregation of the tobacco mosaic virus coat protein. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2003, v. 35, 1452-1460
- 142 Repo, H; Savilahti, E; Leirisalo-Repo, M. Aberrant phagocyte function in Shwachman syndrome. *Clin Exp Immunol*. 1987 Jul;69(1):204–212.
- 143 Robson M.C., Heggors J.P. 1970. Delayed wound closures based on bacterial counts. J. Surg. Oncol. 2:379-383
- 144 Sapico F.L., Ginunas V.J., Thornhill-Joyes M., Canwati H.N., Capen D.A., Kleoin N.E., Khawam S., Montgomerie J.Z. 1986. Quantative microbiology of pressure sores in different stage sof healing. *Diagn. Microbiolo. Infect. Dis.* 5:31-38
- 145 Savage COS: The biology of glomerulus: Endothelial cells. *Kidney Int* 45:314–319, 1994
- 146 Williams, FM; Murray, RC; Underhill, TM; Flintoff, WF. Isolation of a hamster cDNA clone coding for a function involved in methotrexate uptake. *J Biol Chem*. 1994 Feb 25;269(8):5810–5816.
- 147 Sarber, R., B. Hull, C. Merrill, T. Soranno, and E. Bell. 1981. Regulation of proliferation of fibroblasts of low and high population doubling levels grown in collagen lattices. *Mech. Ageing Dev.* 17:107-117.
- 148 Schiro, J. A., B. M. C. Chan, W. T. Roswit, P. D. Kassner, A. P. Pentland, M. E. Hemler, A. Z. Eisen, and T. S. Kupp«r. 1991. Integrin o201 (VLA-2) mediates reorganization and contraction of collagen matrices by human cells. *Cell.* 67:403-410.
- 149 Shadyro O., Yurkova I., Kisel M., Brede O. and Arnhold J. Radiation-induced

- fragmentation of cardiolipin in a model a membrane // Int. J. Radial. Biol. 2004. Vol. 80. P. 239–245
- 150 Sladek REJ and Stoffels E (2005) J Phys D Appl Phys 38:1716-1721
- 151 Sosnin EA et al. (2004) IEEE Transact Plasma Sci 32(4):1544-1550
- 152 Steinberg BM, Smith K, Colozzo M, Pollack (1980) Establishment and transformation diminish the ability of fibroblasts to contract a native collagen gel. J. Cell Biol 87, 304-308
- 153 Stopak D, Harris AK 1982 Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. Dev Biol 90, 383-398.
- 154 Strong Microwaves in Plasmas. Ed. By A.G. Litvak. Institute of Applied Physics RAS, 2000.Proc. of the Int. Workshop. August 2-9,1999, Vol.1, p.271-290;
- 155 Suzuki, H., Wildhirt, S.M., Dudek, R.R., Narayan, K.S., Bailey, A.H., and Bing, R.J. (1996) Tissue & Cell, 28, 89-97.
- 156 Thomson P.D., Smith D.J. 1994. What is infection? Am. J. Surg. 167: 7S-11S
- 157 Trengove N.J., Stacey M.C., McGeachie D.F., Mata S. 1996. Qualitative microbiology and leg ulcer healing. J. Wound Care. 5: 277-280
- 158** The Moscow Physical Society, 1995; Strong Microwaves in Plasmas. Ed. By A.G. Litvak. Institute of Applied Physics RAS, 2000.Proc. of the Int. Workshop. August 2-9,1999, Vol.1, p.271-290;
- 159 Tingstrom, A., C.-H. Heldin, and K. Rubin. 1992. Regulation of fibroblast-mediated collagen gel contraction by platelet-derived growth factor, interleukin-la and transforming growth factor- $\beta$ . J Cell Sci. 102:315-322.
- 160 Tomasek, J. J., C. J. Haaksma, R. J. Eddy, and M. B. Vaughan. 1992. Fibroblast contraction occurs on release of tension in attached collagen lattices: dependency on an organized actin cytoskeleton and serum. Anal. Rec. 232:359-368.
- 161 Trengove, N. J., Stacey, M. C., McGeachie, D. F. et al. (1996). Qualitative bacteriology and leg ulcer healing. Journal of Wound Care 5, 277–80.
- 162 van der Plas MJ, Jukema GN, Wai SW, Dogterom-Ballering HC, Lagendijk EL, van Gulpen C, van Dissel JT, Bloemberg GV, Nibbering PH.2008. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. J. Antimicrobiol. Chemother. 61:117-122

- 163 Wheat L., Allen S.D., Henry M., Kernek C.B., Siders J.A., Kubler T., Fineberg N., Norton J. 1986. Diabetic foot infections: bacteriologic analysis. Arch. Intern. Med. 146: 1935-1940.
- 164 C. Yamabe, T. Miichi, S. Ihara, N. Hayashi, and S. Satoh, Proc. XIII Int. Conf. Gas Discharges and their Applications, Glasgow, September, 2000, Vol. 2, 684-687.

**Приложения к статье**

**Установление технических характеристик и выбор режимов работы генератора низкотемпературной аргонной плазмы (НТАП). Разработка программ микробиологических и биомедицинских испытаний, экспериментальных моделей для оценки saniрующего и ранозаживляющего воздействия НТАП. (по материалам научного отчета)**

**Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино,  
eim11@mail.ru**

***Приложение В***

**Программа и методика биомедицинских и микробиологических испытаний**

Разработка программы и проведение исследования функционального состояния фагоцитирующих клеток здоровых доноров и больных вторичной иммунной недостаточностью и хроническими незаживающими язвами конечностей (кислородзависимая и кислороднезависимая бактерицидная активность)

Номер исследования: 1-АП 9-12/2008

Заказчик: Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН  
ул. Институтская, д. 3  
г. Пущино, Московская обл.,  
142290, Россия

Представитель  
Заказчика: Маевский Евгений Ильич, д.м.н., профессор  
Зам директора по научной работе  
Phone: +7(4967)732648  
E-mail:

Исследовательско  
е учреждение: Лаборатория клинической иммунологии  
ФГУ "НИИ физико-химической медицины Росздрава"  
Малая Пироговская ул. 1А Москва, 119992

Руководитель  
исследования: Дидковский Николай Антонович, д.м.н., профессор,  
заведующий лабораторией  
Phone/Fax: +7(499)782-33-39  
E-mail: didkovski@rambler.ru

**Ответственный персонал**

|                                          |                |
|------------------------------------------|----------------|
| Медсестра, ответственная за забор крови: | Платонова Н.С. |
| Врач-лаборант, аспирант, ответственный   | Вавилина Ю.В.  |

за подготовку проб и проведение исследований (тестов, анализов)

## **Цель**

Целью данного исследования являлось изучение (индивидуальной чувствительности нейтрофилов/фагоцитов периферической крови больных вторичной иммунной недостаточностью и хроническими незаживающими язвами конечностей и практически здоровых лиц (контрольная группа) к различным дозам квантового воздействия – низкоинтенсивного лазерного излучения по результатам теста восстановления нитросинего тетразолия для отработки методических подходов к исследованию влияния низкотемпературной аргоновой плазмы на функциональную активность нейтрофилов тестах *in vitro*.

Исследовано влияние различных доз лазерного излучения на функциональную активность нейтрофилов (ФАН) в тесте *in vitro* на 39 образцов крови

### ***Дизайн исследования***

I. Отбор больных вторичной иммунной недостаточностью и хроническими незаживающими язвами конечностей и практически здоровых лиц (контрольная группа) по критериям включения и исключения

#### ***Критерии включения:***

- 1) Наличие клинически и лабораторно подтвержденной вторичной иммунной недостаточностью и хроническими незаживающими язвами конечностей различной этиологии
- 2) Длительность заболевания не менее 1 лет;
- 3) Возраст больных от 18 до 65 лет
- 4) Для женщин необходимым условием включения в исследование являлась полноценная контрацепция, а также отсутствие беременности и лактации.

#### ***Критерии исключения:***

- 1) Наличие острых вирусных и других состояний, изменяющих параметры иммунного статуса;
- 2) Необходимость в приеме препаратов иммунодепрессантов, радиотерапии
- 3) Наличие проф.вредностей - контакт с веществами, излучениями, подавляющими иммунную систему
- 4) Тяжелые сопутствующие заболевания, сопровождающиеся декомпенсацией работы внутренних органов (дыхательная, сердечная недостаточность III ст., наличие

хронических заболеваний печени и почек в стадии декомпенсации 2-3 ст., декомпенсированный сахарный диабет с инсулинорезистентностью, онкологические заболевания, ВИЧ-инфицирование, хронические вирусные гепатиты и другие болезни, которые могут быть причиной вторичной иммунной недостаточности

5) Наличие психических заболеваний

Отбор больных, группы практически здоровых лиц будет проходить на базе лаборатории клинической иммунологии НИИ ФХМ Росздрава (ГКБ№7).

II. Изучение чувствительности (изменения функциональной активности нейтрофилов/фагоцитов) к различным дозам низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) по результатам теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-теста) нейтрофилов/фагоцитов периферической крови больных вторичной иммунной недостаточностью и хроническими незаживающими язвами конечностей и практически здоровых лиц (контрольная группа)

Планируется исследование влияния различных доз лазерного излучения на функциональную активность нейтрофилов/фагоцитов (ФАН) в тесте *in vitro* на 39 образцов крови больных вторичной иммунной недостаточностью (ВИН) и хроническими незаживающими язвами конечностей и 32 практически здоровых лиц (контрольная группа).

Кроме того, на данном этапе исследования будет изучено исходное состояние кислороднезависимой бактерицидности (уровень катионных белков) и способность к продукции интерферонов альфа и гамма в 20 образцах крови больных вторичной иммунной недостаточностью и хроническими незаживающими язвами конечностей

Таблица 1. Характеристика больных с ВИН и хроническими незаживающими язвами конечностей и обследованных лиц контрольной группы.

|             | Обследованная группа<br>(39 чел) | Контрольная группа -<br>практически здоровые лица<br>(32 чел) |
|-------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Возраст     | От 36 до 62 лет                  | 32 до 52 лет                                                  |
| Мужчины     | 17 чел                           | 14 чел                                                        |
| Женщины     | 22 чел                           | 18 чел                                                        |
| Синдром ВИН | есть                             | Нет                                                           |

***Исследование уровня продукции АФК нейтрофилами при воздействии красного лазерного излучения  $\lambda=632$  нм***

Будет исследовано 39 проб крови, взятых у больных с вторичным иммунодефицитом,

проходивших обследование в лаборатории клинической иммунологии НИИ Физико-химической медицины. Все пробы будут подвергнуты воздействию НИЛИ по описанной ниже схеме. Затем, будет подсчитываться коэффициент лазерной стимуляции (Клс) по формуле:

$$\text{Клс} = \frac{\text{значение НСТ-теста после ЛО}}{\text{значение НСТ-теста без ЛО}}$$

#### *Регулирующие стандарты*

Исследовательская организация будет следовать требованиям данного утвержденного протокола исследования и стандартам лабораторных исследований.

**Необходимость исследования: обоснование**

Течение инфекционного процесса в язвах, смена возбудителей, наличие микс-инфекции, полирезистентность флоры к антибиотикам, а также процессы репарации во многом зависят от состояния иммунной системы. Помимо элиминации патогенов иммунная система должна блокировать и токсины микроорганизмов. Таким образом, состояние иммунной системы является важнейшим фактором, определяющим прогноз болезни. При поиске и изучении новых методов терапии хронических язв – а именно квантовой терапии (облучение язв аргоновой плазмой и как контроль – облучение низкоинтенсивным лазером) чрезвычайно важно оценить влияние этих методов на параметры иммунитета. Иммунологическими маркерами состояния местной и общей иммунной защиты у больных с незаживающими язвами различной этиологии могут служить нейтрофилы/моноциты периферической крови, их способность к осуществлению адекватной кислородзависимой и кислороднезависимой бактерицидности, продукции интерферона альфа и ряда других цитокинов. Для оценки эффективности низкотемпературной аргоновой плазмы и ее влияния как на раневой процесс, так и на показатели иммунитета представляется целесообразным сравнить действие аргоновой плазмы с действием другого вида квантовой терапии – лазерного облучения. В научной литературе, несмотря на большое число исследований разных аспектов лазеротерапии, остается очень много нерешенных вопросов и отсутствует единое мнение о влиянии лазерного облучения низкой интенсивности на процессы продукции АФК в НФ/фагоцитах, на другие функции клеток, на различные субпопуляции лимфоцитов. Практически отсутствуют работы по изучению эффекта лазерного воздействия в зависимости от исходного функционального состояния иммунокомпетентных клеток и изучению индивидуальных особенностей реагирования клеток в момент облучения. Данные планируемого исследования лягут в основу разработки методологии терапии низкотемпературной аргоновой плазмой незаживающих язв различной этиологии.

**Количество запланированных исследований**

Количество запланированных исследований достаточно для получения статистически достоверных выводов.

**Методология**

Кровь для исследований *in vitro* будет браться у лиц, вошедших в исследования в одно и то же время утром натошак из локтевой вены в вакутейнеры с гепарином.

До начала проведения исследований до и после облучения образцов крови НИЛИ кровь

В

в течение 2-х часов будет прединкубироваться при комнатной температуре для достижения необходимого уровня базовой активации клеток.

Источником лазерного излучения будет являться аппарат лазерной терапии «Мустанг 2000+» (произв. НЛПЦ «ТЕХНИКА», Москва), с излучающими головками:

1. Непрерывного режима излучения КЛ-ВЛОК (632 нм) с мощностью излучения на конце одноразового внутривенного световода 3 мВт;
2. Импульсного режима излучения ЛО1-2000 (890 нм) с мощностью 6 Вт.

АЛТ «Мустанг 2000+» оборудован системой для индикации мощности излучения и подсчета дозы для соответствующего режима излучения.

Низкоинтенсивным лазерным излучением будет облучаться гепаринизированная цельная кровь пациентов, взятая в объеме 50 мкл. Пробы крови будут добавлять в лунки 96-луночного планшета для ИФА по следующей схеме (схема 2.1)

**Схема 2.1** Схематическое изображение 96-луночного планшета. К – контроль, чистый ДМСО; П1 – проба крови пациента №1. Три пробы в одном ряду составляют триплет, т.е. например А4, А5, А6. В столбце №7 указано время облучения.

|   | 1 | 2 | 3 | 4  | 5  | 6  | 7     | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|----|----|----|-------|---|---|----|----|----|
| А | К | К |   | П1 | П1 | П1 | - 0 с |   |   |    |    |    |
| В |   |   |   | П1 | П1 | П1 | - 1 с |   |   |    |    |    |
| С |   |   |   | П1 | П1 | П1 | - 2 с |   |   |    |    |    |
| Д |   |   |   | П1 | П1 | П1 | - 5 с |   |   |    |    |    |
| Е |   |   |   | П1 | П1 | П1 | -10 с |   |   |    |    |    |
| Ф |   |   |   | П1 | П1 | П1 | -15 с |   |   |    |    |    |
| Г |   |   |   | П1 | П1 | П1 | -20 с |   |   |    |    |    |
| Н |   |   |   | П1 | П1 | П1 | -30 с |   |   |    |    |    |

Пробы будут располагаться и облучаться триплетами по рядам, обозначаемым на планшете латинскими заглавными буквами. Длительность облучения будет варьировать от 1 до 30 секунд, что соответствует следующим дозам:

1. для облучения длиной волны 632 нм (таблица 2.2)
2. для облучения длинной волны 890 нм (таблица 2.3)

**Таблица 2.2.** Соответствие времени облучения и доз для красного лазера.

| Время, с | 1 | 2 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 |
|----------|---|---|---|----|----|----|----|
|----------|---|---|---|----|----|----|----|

|                          |     |     |     |     |     |     |      |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Доза, Дж/см <sup>2</sup> | 0.4 | 0.8 | 2.0 | 4.0 | 6.0 | 8.0 | 12.0 |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|

**Таблица 2.3.** Соответствие времени облучения и доз для инфракрасного лазера.

|                           |      |      |      |      |      |      |      |
|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Время, с                  | 1    | 2    | 5    | 10   | 15   | 20   | 30   |
| Доза, мДж/см <sup>2</sup> | 0.06 | 0.12 | 0.31 | 0.62 | 0.93 | 1.24 | 1.86 |

В дальнейшем, облученная кровь будет исследоваться согласно описанной выше методике. Из трех полученных значений триплета будет рассчитываться среднее, которое в дальнейшем используется для расчета коэффициента лазерной стимуляции (Клс): Клс = значение после облучения/значение без облучения.

### **Метод оценки функциональной активности нейтрофилов**

*Определение восстановления нитросинего тетразолия фагоцитирующими клетками спектрофотометрически (НСТ-тест).* В основе метода лежит способность восстановления поглощенного фагоцитом красителя нитросинего тетразолия в нерастворимый диформазан под влиянием активных форм кислорода. Измерения будут проводить в цельной крови. В 96-луночные плоскодонные планшеты для иммуноферментного анализа (произв. «Медполимер», СПб) будут вносить 50 мкл цельной крови 20 мкл 0,2% раствора НСТ (произв. «ДИАЭМ») в дистиллированной воде на лунку и 20 мкл стандартного PBS. Инкубация: 60 мин при 37°C, при постоянном встряхивании 200 об/мин на шейкере АВТ Медикэлс. После инкубации будет удалена надосадочная жидкость (клетки будут отмывать и фиксировать.и 96% этиловым спиртом, 100мкл на луку, в течение 30 мин. остатки спирта будут удалять декантированием,) планшет будут высушивать. Осадок будет растворяться в 250 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) (произв. «SIGMA»). Оптическую плотность будут измерять при  $\lambda=450\text{нм}$ . (Модификация метода Р.М.Хаитов. 1995г.).

Полученные значения будут оценивать в условных единицах (у.е.):

1. до 70 у.е. – сниженные значения продукции АФК;
2. от 70 до 110 у.е. – нормальные значения продукции АФК;
3. более 110 у.е. – повышенные значения продукции АФК.

Одна условная единица соответствует 0,001 единице оптической плотности.

Коэффициент стимуляции будут рассчитывать как отношение уровней продукции АФК после облучения НИЛИ к уровню спонтанной продукции без облучения.

Оптическую плотность пробы будут измерять прибором «Stat Fax – 2100» (произв. AWARENESS Technology Inc.) Прибор является компактной фотометрической системой,

контролируемой микропроцессором, предназначенной для измерения и вычисления результатов проб, которые проводятся в микропланшетных платах. Измерения проводили при длине волны 450 нм, в режиме «от точки к точке».

#### ***Анализ данных***

Для всех данных будет применена описательная статистика: подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего, которые вместе со значением N будут представлены в итоговых таблицах. Для определения достоверности межгрупповых различий будут применены адекватные статистические методы сравнения в зависимости от типа распределения количественных данных. . Статистический анализ будет проводиться программой Statistica ver. 7.0. Различия определяются при 5% уровне достоверности.

#### ***Изменения протокола***

Изменения утвержденного протокола будут приниматься совместно руководителем исследования и представителем Заказчика, документироваться в форме изменения протокола, обосновываться, подписываться и датироваться. Лист изменений будет приложен ко всем верным копиям протокола.

#### ***Отклонения***

Все отклонения будут документироваться руководителем исследования, и анализироваться их влияние на ход исследования. Отклонения, потенциально влияющие на ход и результаты исследования, будут перечислены в итоговом отчете.

#### ***Отчет***

Итоговый отчет будет включать все пункты протокола исследования и все данные, полученные в ходе исследования. В заключении, одна бумажная копия и одна электронная копия отчета будет предоставлена Заказчику. Протокол исследования, изменения и отклонения от протокола будут прилагаться к итоговому отчету.

#### ***Архивирование данных***

После подписания итогового отчета вся документация и образцы, перечисленные ниже, будут переданы в архив лаборатории на 1 год:

- Протокол, изменения и отклонения
- Журналы регистрации результатов исследования
- Письма и другая письменная информация, касающаяся исследования
- Черновой и итоговый отчеты

После указанного срока хранения архивные материалы будут переданы Заказчику или после его уведомления переданы на уничтожение.

*Приложение Г*

**Программа и методика биомедицинских испытаний**

***Сравнительная оценка регенераторных процессов модели резаной и термической ожоговой раны, моделированной в стерильных условиях и с последующим внесением микрофлоры на область раны у крыс CD***  
(пилотное)

|                   |                                                                                                                                     |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Номер             | 143/08                                                                                                                              |
| исследования:     |                                                                                                                                     |
| Заказчик:         | Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН<br>ул. Институтская, д. 3<br>г. Пущино, Московская обл.,<br>142290, Россия |
| Представитель     | Маевский Евгений Ильич, д.м.н., профессор                                                                                           |
| Заказчика:        | Зам директора по научной работе<br>Phone: +7(4967)732648<br>E-mail: eim1@rambler.ru                                                 |
| Исследовательское | Лаборатория биологических испытаний                                                                                                 |
| учреждение:       | Филиал института биоорганической химии РАН,<br>проспект Науки, 6<br>г. Пущино, Московская обл.,<br>142290, Россия                   |
| Руководитель      | Новикова Надежда Ивановна с.н.с., к.б.н.                                                                                            |
| исследования:     | Phone: +7(4967)733753<br>Fax: +7(4967)330527<br>E-mail: novikova@fibkh.serpukhov.su                                                 |

### Ответственный персонал

Лаборанты по уходу за

животными:

Ветеринария:

Моделирование ран:

Фотометрия:

Сбор биологических проб

Гистологическая техника

Гистология:

Мураткина О.А., Буторина Е.Е., Бородина Г.И.

Семушина С.Г., Калабина Е.А.

Дьяченко И.А.

Дьяченко И.А.

Калабина Е.А.

Осипова Г.А., Остапюк О.А., Калабина Е.А.

Новикова Н.И., к.б.н., Садовникова Е. С.

### Цель

Цель данного исследования сравнить сроки репарации и динамику регенераторных процессов моделей резаной и термической ожоговой раны, моделированных в стерильных условиях и с последующим внесением микрофлоры.

### ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве тест-системы будут использованы крысы CD в возрасте 7 месяцев, весом 700-800 г в количестве 60 особей.

В один день всем животным моделируется резаная и термическая ожоговая рана. Непосредственно перед моделированием раны определяется вес тела каждого животного. Все дальнейшие процедуры выполняются в наркотизированном состоянии животных. Для анестезии используются препараты Zoletil 100 и 2% Ксилазин в дозе 20 мг/кг Золетила и 10 мг/кг Ксилазина im. Непосредственно перед моделированием ран удаляется шерстный покров в области моделирования.

Моделирование резаной раны будет осуществляться путем вырезания лоскута кожи диаметром 12-14мм из межлопаточной области.

Моделирование термической ожоговой раны будет осуществляться путем наложения на кожу в межлопаточной области металлического аппликатора, нагретого до температуры 120° на 6 секунд.

Исследование будет проведено на четырех группах животных (см. Таблицу 1). Раны животных 1 и 2 группы моделируются в стерильных условиях и ничем не обрабатываются в течение всего эксперимента. Животным 3 и 4 группы сразу после моделирования ран на ее поверхность будет внесена микрофлора из экскрементов животных в виде суспензии экскрементов в физрастворе по 200 микролитров. В дальнейшем нанесение микрофлоры будет осуществляться в течение первых 5 дней после моделирования раны, один раз в сутки.

Каждое животное с моделированной раной в течение всего эксперимента будет

содержаться в индивидуальной клетке.

Для изучения регенераторных процессов будет использоваться метод клинического наблюдения за течением репарации раны, фотометрический метод и гистологический анализ. Метод клинического наблюдения позволит регистрировать состояние и сроки заживления раны в динамике. Фотометрический метод будет являться тому подтверждением в виде фотографий ран, а также, позволит вычислить площадь раны по длине контура раны. Гистологический анализ позволит увидеть динамику заживления на срезах образца раны толщиной 5 микрон.

В течение всего эксперимента, со следующего дня после моделирования раны, будет проводиться два раза в неделю осмотр животных в клетках. При этом будет проводиться регистрация состояния раны каждого животного.

Фотометрия будет проводиться в день моделирования раны, в дальнейшем площадь раны будет измеряться в динамике на 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 сутки после моделирования.

Гистологический анализ будет проведен на 3, 7, 14, 21 и 30 сутки после моделирования раны. Выбранные временные сроки являются общепринятыми для изучения регенераторных процессов и отражают динамику течения заживления с учетом этапов воспаления, пролиферации и формирования новообразованной ткани.

Для гистологического анализа будут взяты 5 секций из разных уровней образца раны. Секции будут окрашены гематоксилин-эозином и пикрофуксином по методу Ван-Гизона, что позволит оценить общее состояние процессов воспаления и пролиферации. На 7 и 14 сутки гистологического анализа будет подсчитываться митотический индекс, позволяющий количественно оценить процесс пролиферации. В случае пролонгированной репарации ран у животных из 3 и 4 группы, митотический индекс будет подсчитываться и на 21 сутки.

Таблица 1. Группы, модели раны, сроки гистологического анализа

| Группа | Модель раны | Количество животных/<br>гистоанализ |           |            |            |            | Номера<br>животных/гистоанализ |           |            |            |            |
|--------|-------------|-------------------------------------|-----------|------------|------------|------------|--------------------------------|-----------|------------|------------|------------|
|        |             | 3<br>сут.                           | 7<br>сут. | 14<br>сут. | 21<br>сут. | 30<br>сут. | 3<br>сут.                      | 7<br>сут. | 14<br>сут. | 21<br>сут. | 30<br>сут. |
| 1      | Резаная     | 3                                   | 3         | 3          | 3          | 3          | 1-3                            | 4-6       | 7-9        | 10-        | 13-        |

|   |                           |   |   |   |   |   |           |           |           |           |           |
|---|---------------------------|---|---|---|---|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|   | стерильная                |   |   |   |   |   |           |           |           | 12        | 15        |
| 2 | Ожоговая<br>стерильная    | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 16-<br>18 | 19-<br>21 | 22-<br>24 | 25-<br>27 | 28-<br>30 |
| 3 | Резаная с<br>микрофлорой  | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 31-<br>33 | 34-<br>36 | 37-<br>39 | 40-<br>42 | 43-<br>45 |
| 4 | Ожоговая с<br>микрофлорой | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 46-<br>48 | 49-<br>51 | 52-<br>54 | 55-<br>57 | 58-<br>60 |

### Регулирующие стандарты

Исследовательская организация будет следовать требованиям данного утвержденного протокола исследования и стандартным операционным процедурам (СОП) лаборатории.

### Этические принципы

Все процедуры с животными в исследовании будут рассмотрены и утверждены институтской комиссией по уходу и использованию животных (IACUC) на предмет соответствия этическим принципам обращения с животными.

## ОБОСНОВАНИЕ

### Необходимость исследования

По данным литературы и опыту работы известно, что у молодых мелких грызунов в возрасте 8-12 недель регенераторные процессы ран, моделированных в стерильных условиях, протекают быстрее. И в этой связи получить статистически значимый возможный регенераторный эффект тестируемого препарата или любого фактора, порой, затруднительно. Чтобы решить эту задачу, необходимо подобрать адекватную модель раны с пролонгированными сроками репарации. Такой моделью может явиться модель любой раны с внесенной на ее поверхность микрофлоры. В качестве тест-системы рационально использовать зрелых животных, т.к. известно, что у взрослых организмов регенерация замедляется. В данном исследовании в качестве тест-системы будут использоваться крысы CD в возрасте 7 месяцев.

### Выбор вида животных

В качестве тест-системы для изучения репарации ран используются в основном мелкие грызуны.

**Количество животных**

Количество животных, используемое в исследовании, достаточно для полной регистрации изучаемых эффектов.

**Животные**

|                               |                                                  |
|-------------------------------|--------------------------------------------------|
| Вид:                          | <i>Rattus sp.</i>                                |
| Линия/Сток:                   | CD                                               |
| Источник:                     | НПП «Питомник лабораторных животных<br>ФИБХ РАН» |
| Возраст к началу<br>введения: | 7 месяцев *                                      |
| Вес животных:                 | 700-800 г **                                     |
| Количество самцов:            | 60                                               |

\* - точный возраст животных будет указан в рабочих листах и итоговом отчете

\*\* - точный вес животных будет указан в рабочих листах и итоговом отчете

**Содержание животных**

Условия содержания животных соответствуют стандартам, указанным в руководстве *The Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (ILAR publication, 1996, National Academy Press, 1996).

**Клетки**

Каждое животное будет содержаться индивидуально в поликарбонатных клетках на подстиле; клетки покрыты стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением.

**Подстил**

В качестве подстила будет использоваться нехлорированная резаная автоклавированная бумага. Проводится рутинная проверка подстила на микробиологическое загрязнение. Результаты анализов хранятся в документации лаборатории.

**Корм**

Стандартный гранулированный корм «Чара» (Ассортимент Агро, Россия) будет даваться *ad libitum* в кормовое углубление стальной решетчатой крышки клетки. В лаборатории проводится периодический анализ на микробиологическую контаминацию образцов корма.

Результаты анализа, а также данные о составе и качестве корма от производителя хранятся в документации лаборатории.

### ***Вода***

Специально подготовленная фильтрованная водопроводная вода будет даваться *ad libitum* в стандартных автоклавированных питьевых бутылочках со стальными крышками-носиками. В лаборатории проводится периодический анализ питьевой воды на микробиологическую контаминацию. Результаты анализа хранятся в документации лаборатории.

### ***Условия окружающее среды***

Животные будут содержаться в контролируемых условиях окружающей среды (18-26°C и 30-70% относительная влажность). Температура и влажность постоянно контролируются в каждой экспериментальной комнате и вручную документируются один раз в день. В комнатах содержания животных поддерживается 12 часовой цикл освещения и, по крайней мере, 10-ти кратная смена объема воздуха комнаты в час.

### ***Акклиматизация***

Животные будут адаптированы/акклиматизированы в лаборатории в течение как минимум 5 дней до моделирования ран. Непосредственно перед формированием групп будет проведен клинический осмотр.

### ***Распределение по группам***

В экспериментальные группы будут отобраны животные без признаков отклонений внешнего вида, случайным образом, так, чтобы индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения более чем на 14%.

### ***Идентификация животных***

Каждому животному будет присвоен индивидуальный номер, фиксируемый на карточке клетки.

## **МЕТОДОЛОГИЯ**

## **Прижизненные наблюдения и процедуры**

### ***Моделирование резаной раны***

Непосредственно перед моделированием раны удаляется шерстный покров в межлопаточной области путем выстригания с использованием специального прибора Oster Golden A5 (USA). Модель резаной раны осуществляется в межлопаточной области. Рана моделируется путем вырезания лоскута кожи диаметром 12-14 мм специальными костными кусачками, позволяющими моделировать у всех животных стандартные размеры раны по площади и глубине повреждения тканей, с занимаемой площадью 1,2% относительно площади поверхности тела крысы. Преимущества такого метода моделирования раны состоят в следующем: края раны ровные, у всех животных раны одинаковые по размеру, округлой формы, рана умеренной глубины, т. к. вырезается только слой кожи с частичным захватом прилегающей гиподермы, в процессе моделирования раны кровотечение отсутствует. В случае незначительного капиллярного кровотечения предполагается воспользоваться стерильным марлевым тампоном, прижав его к области повреждения. Процедура осуществляется в наркотизированном состоянии животных с применением Золетила и Ксилазина.

### **Моделирование термической ожоговой раны**

Непосредственно перед моделированием раны удаляется шерстный покров в межлопаточной области путем выстригания с использованием специального прибора Oster Golden A5 (USA). Модель термической ожоговой раны осуществляется в межлопаточной области. Моделирование термической ожоговой раны будет осуществляться путем наложения на кожу металлического аппликатора диаметром 15 мм, нагретого до температуры 120° на 6 секунд. Смоделированный таким образом ожог можно охарактеризовать по интенсивности деструктивных изменений, как ожог III<sub>A</sub> степени, с занимаемой площадью 1,2% относительно площади поверхности тела крысы. Метод позволяет моделировать у всех животных стандартные размеры раны по площади и глубине повреждения тканей. Процедура осуществляется в наркотизированном состоянии животных с применением Золетила и Ксилазина.

### **Приготовление суспензии микрофлоры**

Для получения суспензии микрофлоры 1 г экскрементов крыс размешивается в 5 мл физраствора (200 мг в 1 мл), суспензия взбалтывается непосредственно перед нанесением на рану. Количество суспензии приготавливается в нужном объеме.

До начала эксперимента будет проведен микробиологический анализ трех одинаковых проб суспензии экскрементов, приготовленных из расчета 200 мг экскрементов в 1 мл физраствора, а также микробиологический анализ сухой навески экскрементов. Микробиологический анализ позволит определить состав микрофлоры в суспензии и в сухой навеске.

### **Нанесение микрофлоры на поверхность раны**

Животным 3 и 4 группы сразу после моделирования раны на ее поверхность будет внесена микрофлора в виде суспензии в объеме по 200 микролитров на рану. В дальнейшем нанесение микрофлоры будет осуществляться в течение первых 5 дней после моделирования раны, один раз в сутки.

### **Клиническое наблюдение за состоянием раны**

Два раза в неделю, со следующего дня после моделирования раны будет проводиться осмотр животных в клетках содержания с целью выявления состояния раны и признаков отклонения в состоянии здоровья.

### ***Масса тела***

Масса тела будет регистрироваться непосредственно перед моделированием ран и в день эвтаназии.

### ***Фотометрия***

Фотометрия будет проводиться в день моделирования раны. В дальнейшем измерение площади раны будет осуществляться в динамике на 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 сутки после моделирования методом фотографирования при помощи стереоскопической бинокулярной лупы OLYMPUS SZ40 с фотокамерой SONY CCD-IRIS Color video camera. на малом увеличении (10 x 0,67). Для обработки видеоизображения будет использоваться программа ASUS Live. После чего будет рассчитана площадь раны при помощи программы Trase 1.24b, позволяющей рассчитать площадь раневой поверхности по длине контура раны.

## **Терминальные процедуры и патоморфология**

### ***Эвтаназия***

Животные будут подвергнуты эвтаназии помещением в CO<sub>2</sub>-камеру.

### **Сбор биологических проб**

На 3, 7, 14, 21 и 30 сутки после моделирования раны будет вырезана область раны с прилегающими тканями или участок новообразованной кожи. Образцы будут зафиксированы в 10% нейтральном формалине.

### **Гистология**

Для гистологического анализа будут взяты 5 секций из разных уровней образца раны. Секции будут окрашены гематоксилин-эозином (3 секции) и пикрофуксином по методу Ван-Гизона (2 секции), что позволит оценить общее состояние процессов воспаления и пролиферации. На 7 и 14 сутки гистологического анализа будет подсчитываться митотический индекс, позволивший количественно оценить процесс пролиферации. В случае пролонгированной репарации ран у животных из 3 и 4 группы, митотический индекс будет подсчитываться и на 21 сутки.

### **Анализ данных**

Для всех данных будет применена описательная статистика: подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего, которые вместе со значением N будут представлены в итоговых таблицах. Для определения достоверности межгрупповых различий будут применены адекватные статистические методы сравнения в зависимости от типа распределения количественных данных. Анализ будет выполнен для каждого пола отдельно. Статистический анализ будет проводиться программой Statistica ver. 7.0. Различия определяются при 5% уровне достоверности.

### **Изменения протокола**

Изменения утвержденного протокола будут приниматься совместно руководителем исследования и представителем Заказчика, документироваться в форме изменения протокола, обосновываться, подписываться и датироваться. Лист изменений будет приложен ко всем верным копиям протокола.

### **Отклонения**

Все отклонения будут документироваться руководителем исследования, и анализироваться их влияние на ход исследования. Отклонения, потенциально влияющие на ход и результаты исследования, будут перечислены в итоговом отчете.

### **Отчет**

Итоговый отчет будет включать все пункты протокола исследования и все данные, полученные в ходе исследования. В заключении, одна бумажная копия и одна электронная копия отчета будет предоставлена Заказчику. Протокол исследования, изменения и отклонения от протокола будут прилагаться к итоговому отчету.

### **Архивирование данных**

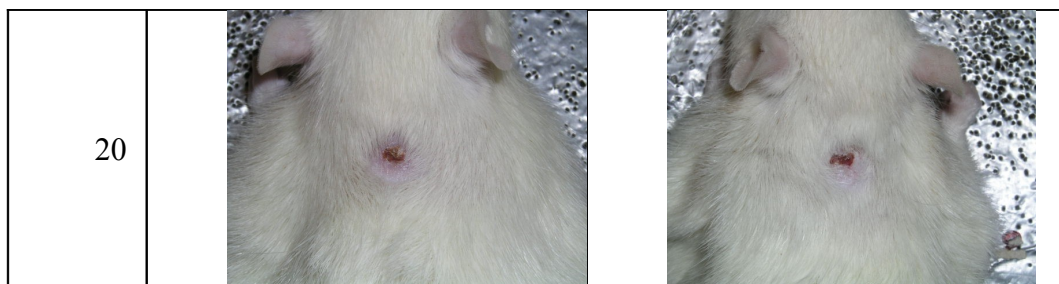
После подписания итогового отчета вся документация и образцы, перечисленные ниже, будут переданы в архив лаборатории на 1 год.

- Протокол, изменения и отклонения
- Листы регистрации результатов исследования
- Обработка тканей и срезов
- Стекла с гистологическими препаратами и парафиновые блоки
- Остатки образцов в формалине
- Письма и другая письменная информация, касающаяся исследования
- Черновой и итоговый отчеты

После указанного срока хранения архивные материалы будут переданы Заказчику или после его уведомления переданы на уничтожение.

Динамика заживления ожоговой раны по срокам наблюдения

| Дн<br>и | Физ. раствор |                                                                                     |                                                                                      |
|---------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 1       |              |    |    |
| 4       |              |    |    |
| 6       |              |   |   |
| 8       |              |  |  |
| 12      |              |  |  |



*Приложение Е.*

**1. Гистологическое исследование динамики заживления механической раны по срокам наблюдения**

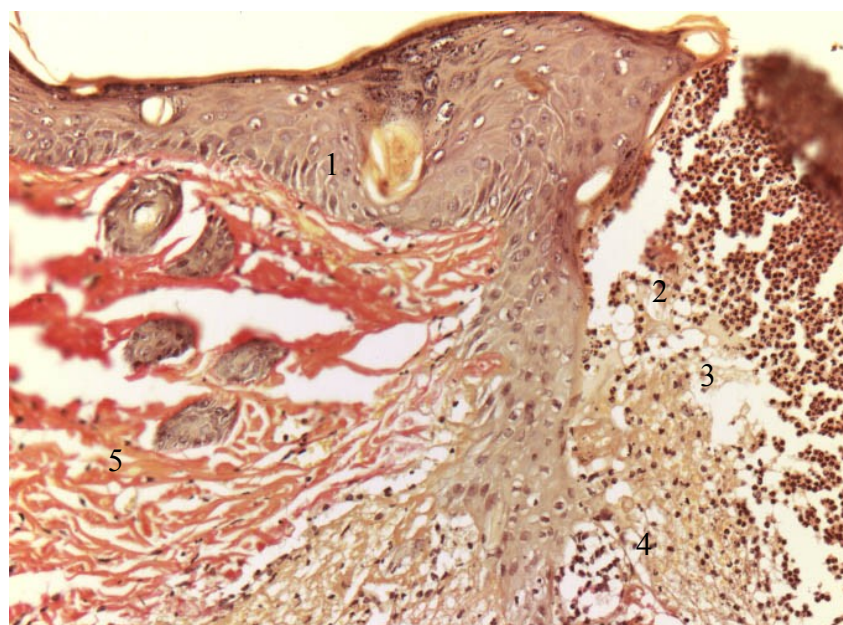


Рис.1 3 сутки после моделирования раны

Окраска Пикрофуксином по Ван-Гизону, увеличение x200

1. прираневая область, 2. область дефекта, 3. нейтрофилы, 4. фибрин, 5. отек дермы



2

3

Рис.2 7 сутки после моделирования раны

Окраска Гематоксилин-Эозином, увеличение x100

1. эпителий прираневой области, 2. вновь образованный эпителий, 3. фибробласты

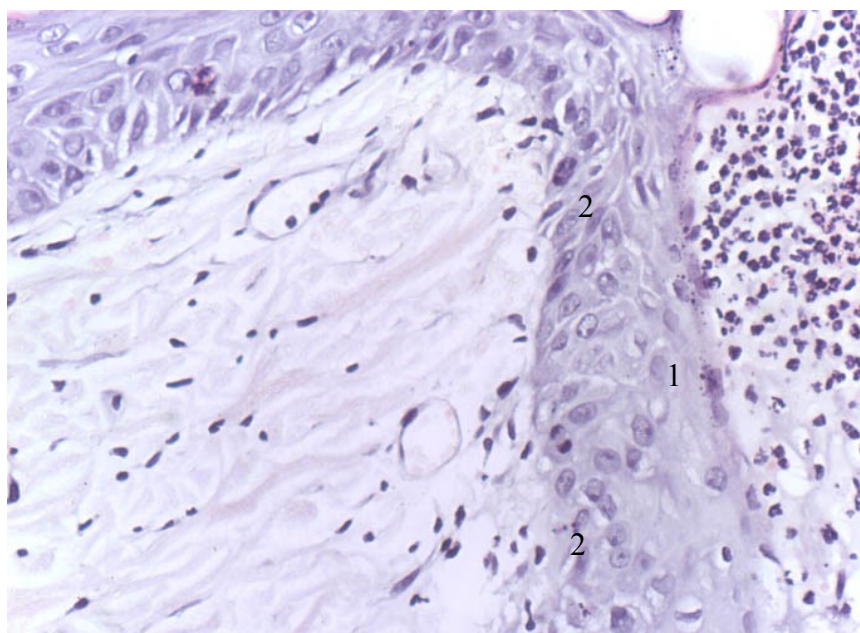


Рис.3 7 сутки после моделирования раны

Окраска Гематоксилин-Эозином, увеличение x400

1. вновь образованный эпителиальный тяж спускается по дну раны,  
2. фигуры митозов

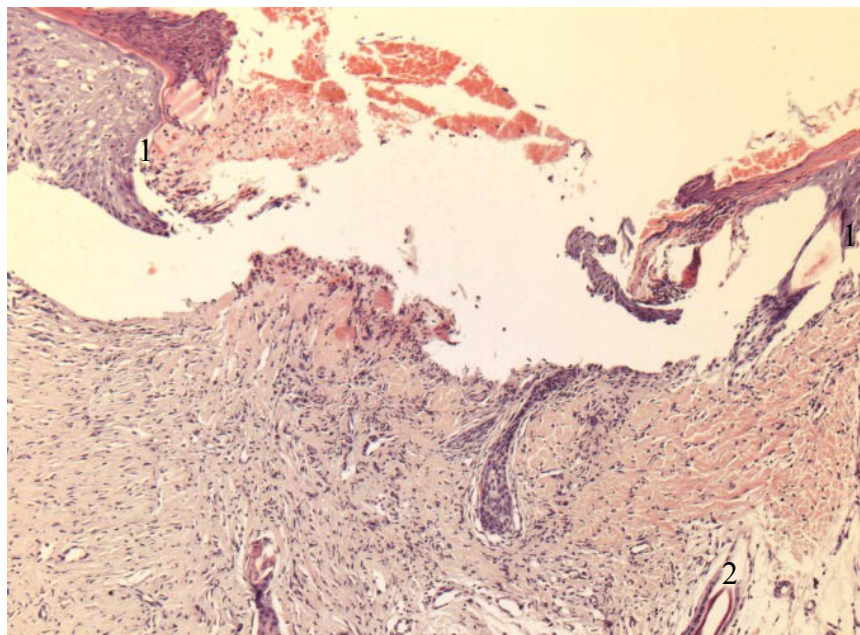


Рис.4 14-сутки после моделирования раны  
 Окраска Гематоксилин-Эозином, увеличение x100  
 1. тяжи вновь образованного эпидермиса,  
 2. дефект кожи заполнен вновь образованной фиброзной тканью

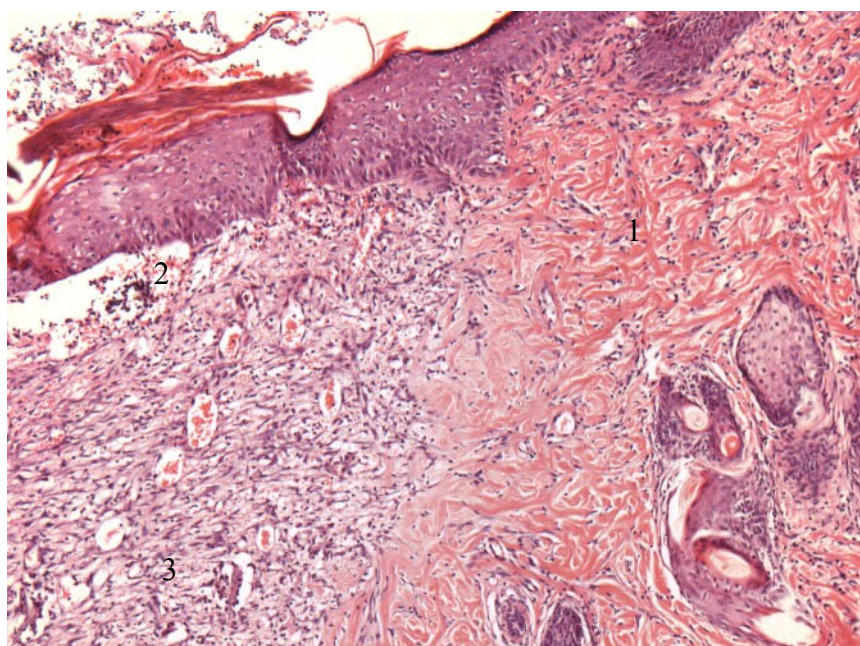


Рис.5 14 сутки после моделирования раны

Окраска Гематоксилин-Эозином, увеличение x100

1. прираневая область, 2. вновь образованный эпидермис,
3. вновь образованная фиброзная ткань, в которой присутствует большое количество фибробластов

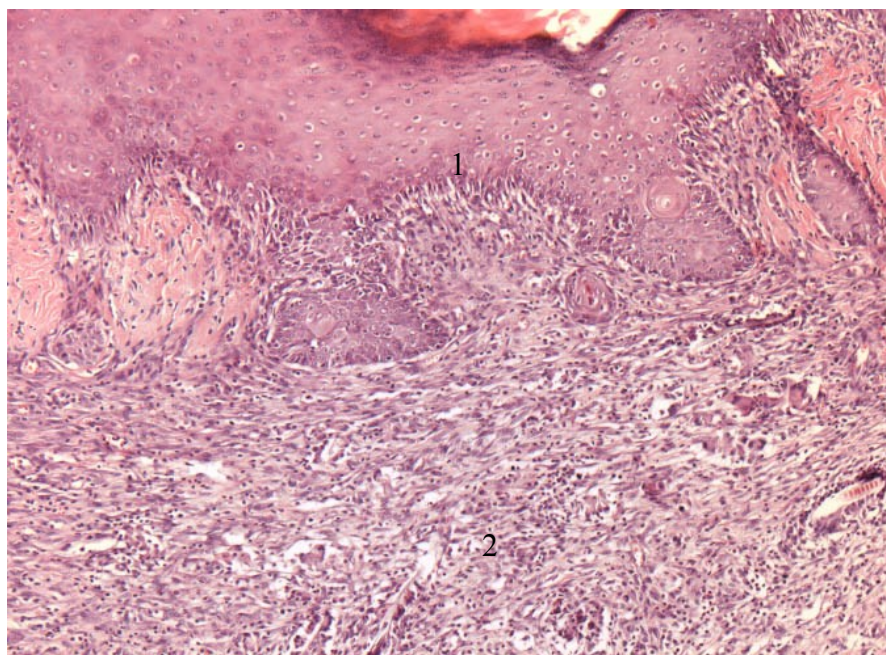


Рис.6 21 сутки после моделирования раны

Окраска Гематоксилин-Эозином, увеличение x100

1. вновь образованный эпидермис полностью дифференцирован,
2. вновь образованная фиброзная ткань, в которой присутствует большое количество фибробластов

**Гистологическое исследование динамики заживления ожоговой раны по  
срокам наблюдения**

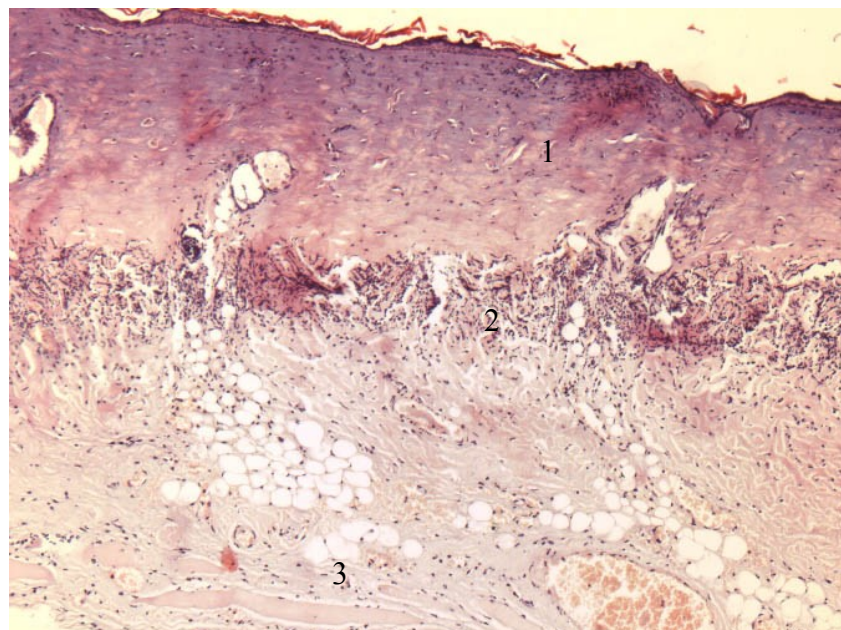


Рис.1 3 сутки после моделирования раны

Окраска Гематоксин-Эозином, увеличение x100

1. разбухший эпителий обожженной поверхности, 2. зона некроза дермы,
3. расширенная капиллярно-сосудистая сеть гиподермы

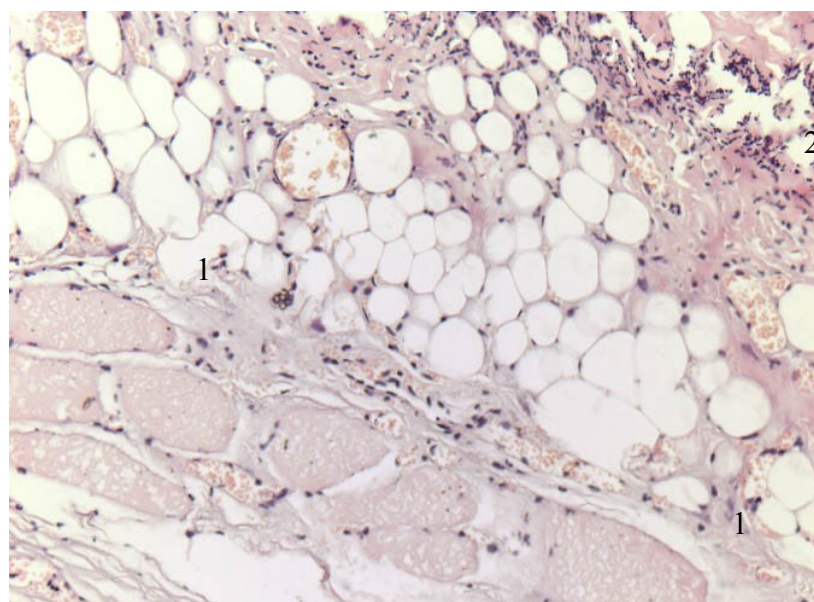


Рис.2 3 сутки после моделирования раны

Окраска Гематоксилин-Эозином, увеличение x200

1. расширенная капиллярно-сосудистая сеть гиподермы, 2. очаг некроза

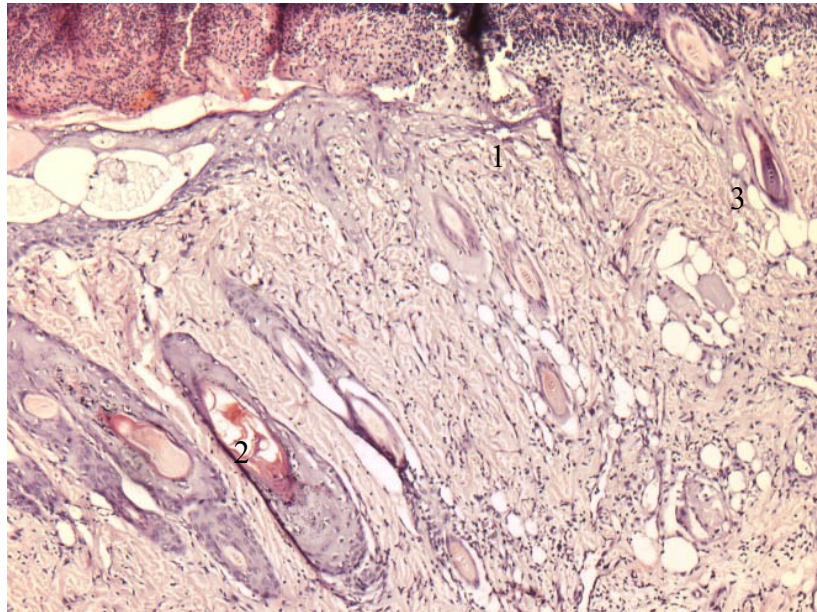


Рис.3 7 сутки после моделирования раны

Окраска Гематоксилин-Эозином, увеличение x100

1. тяж вновь образованного эпидермиса, 2. волосяные фолликулы прираневой области, 3. вновь образованная фиброзная ткань, заполняющая дефект кожи, в которой присутствует большое количество фибробластов, мигрирующих из прираневой области

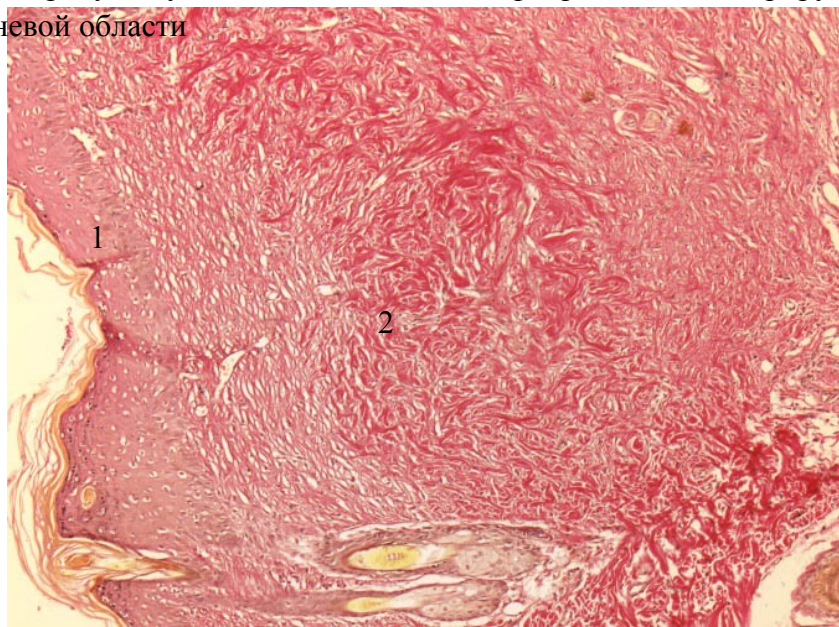


Рис.4 14 сутки после моделирования раны

Окраска Пикрофуксином по Ван-Гизону, увеличение x100

1. вновь образованный эпидермис, подвергшийся полной дифференцировке,
2. вновь сформированная фиброзная ткань
3. волосяные фолликулы прираневой области

**Гистология тканей селезенки при моделировании механической раны**

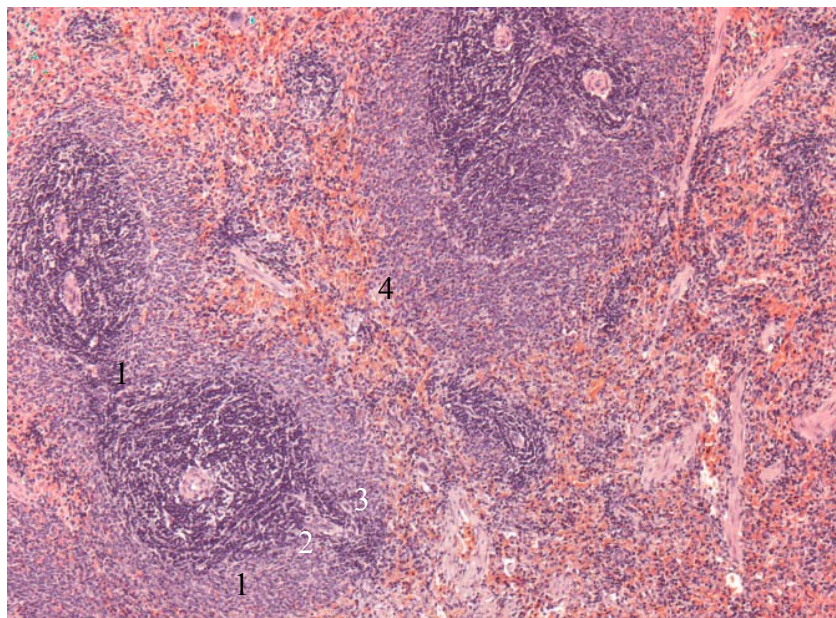


Рис.1 Селезенка контрольного животного с механической раной,  
7 сутки после моделирования раны

Окраска Гематоксилин-Эозином, увеличение x100

1. фолликулярная артерия, 2. Т-зона, 3. маргинальная зона, 4. красная пульпа

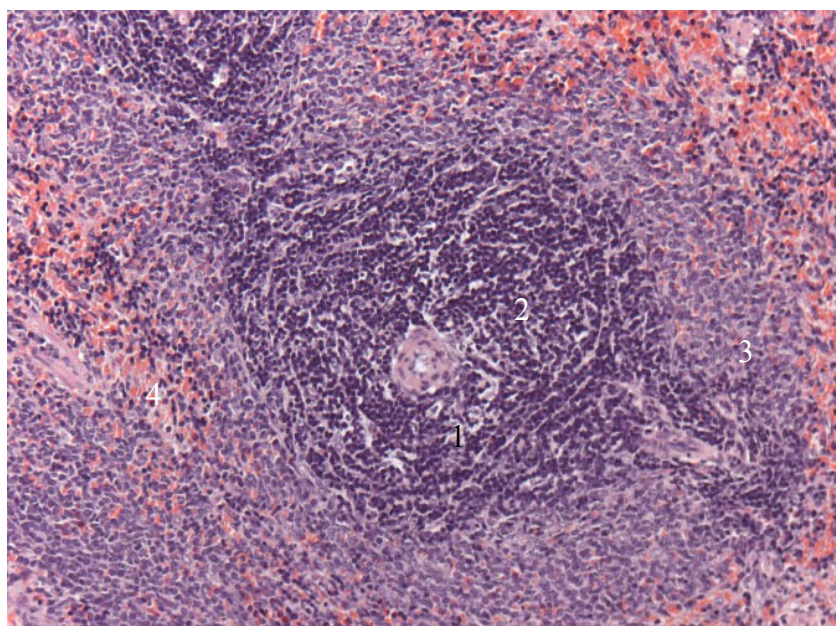
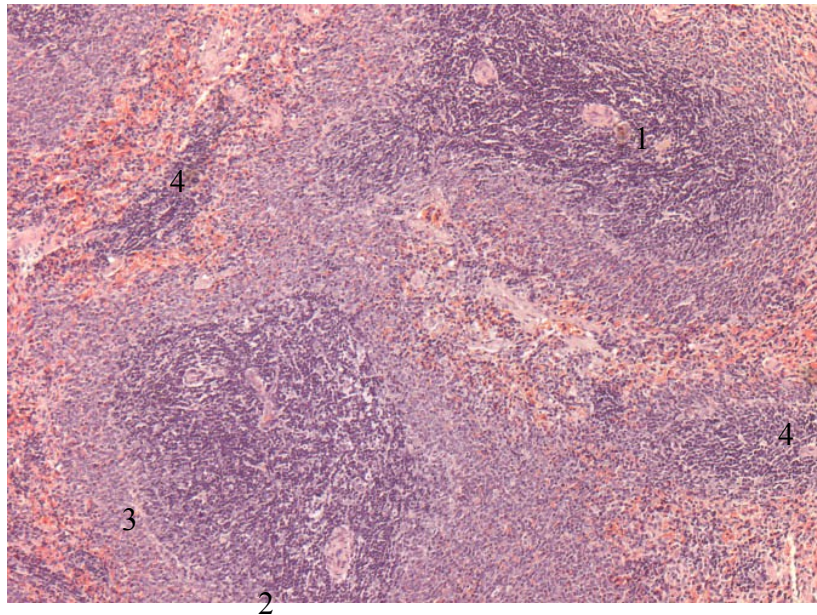


Рис.2 Селезенка контрольного животного с механической раной  
7 сутки после моделирования раны

Окраска Гематоксилин-Эозином, увеличение x200

1. фолликулярная артерия, 2. Т-зона, 3. маргинальная зона, 4. красная пульпа



1

Рис.3 Селезенка экспериментального животного с механической раной  
7 сутки после моделирования раны

Окраска Гематоксилин-Эозином, увеличение x200

1. фолликулярная артерия, 2. Т-зона, 3. маргинальная зона, 4. красная пульпа

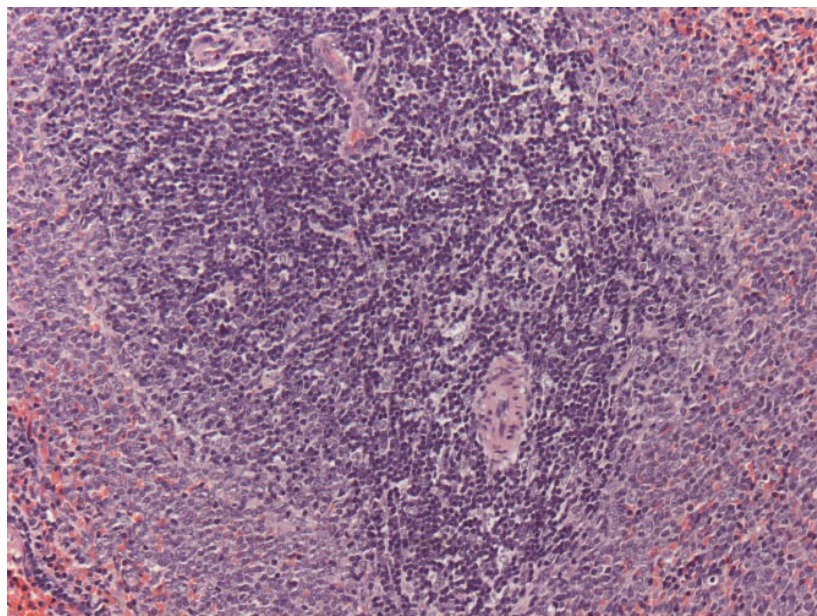


Рис.4 Селезенка экспериментального животного с механической раной  
7 сутки после моделирования раны

Окраска Гематоксилин-Эозином, увеличение x200

1. фолликулярная артерия, 2. Т-зона, 3. маргинальная зона, 4. красная пульпа

**Гистология тканей тимуса при моделировании механической раны**

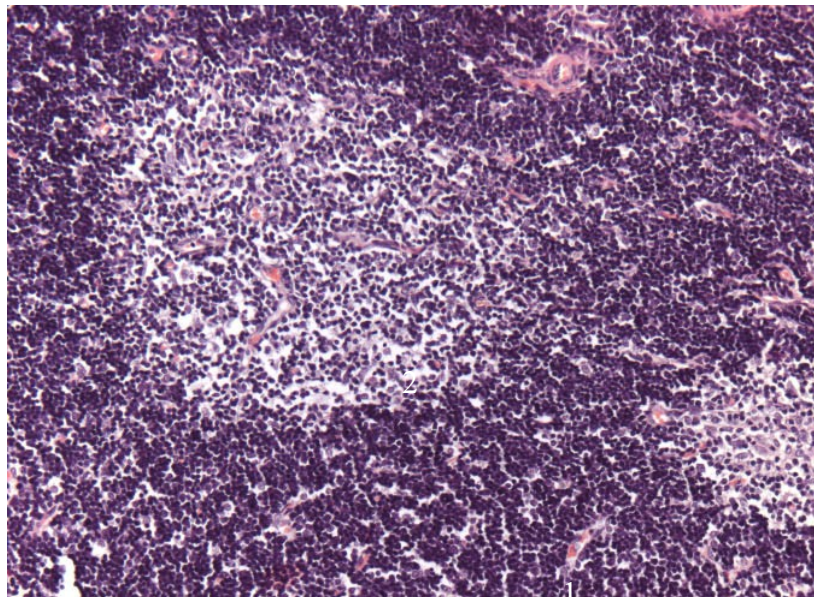


Рис. 1 Тимус контрольного животного с механической раной  
7 сутки после моделирования раны  
Окраска Гематоксилин-Эозином, увеличение x200  
1. корковая зона, 2. мозговая зона

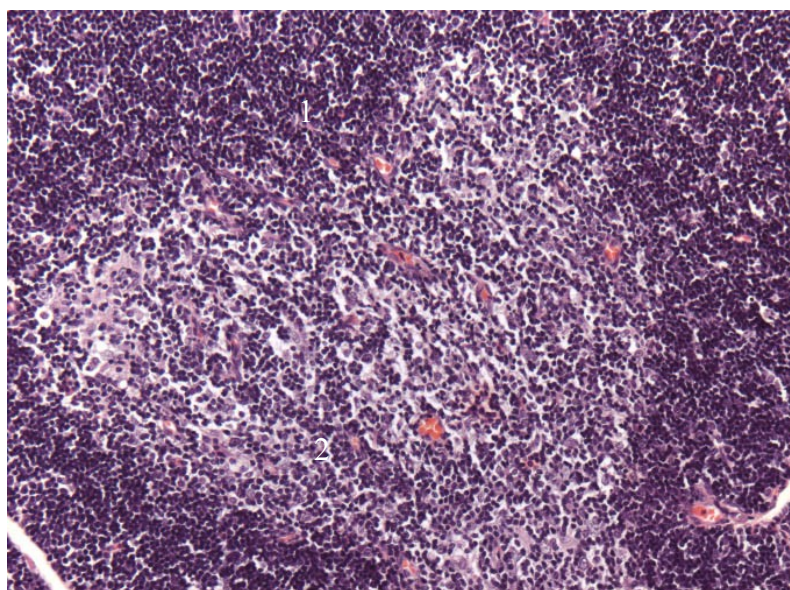


Рис.2 Тимус экспериментального животного с механической раной  
7 сутки после моделирования раны  
Окраска Гематоксилин-Эозином, увеличение x200  
1. корковая зона, 2. мозговая зона