

ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Кафедра физиологии

Допущен к защите
Заведующий кафедрой
Веселкин Н.П.
« ___ » _____ 2018 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему: Морфофизиологическая характеристика заживления
кожных ран животных при воздействии гелиевой плазменной
струи атмосферного давления

Выполнила:
студентка 602 группы
Порохняк Ирина Дмитриевна

Научный руководитель:
д.б.н., проф.
Рыбальченко Оксана Владимировна

Санкт-Петербург
2018 год

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1. Посттравматическая регенерация эпидермиса млекопитающих	6
1.1.1. Строение кожи млекопитающих	6
1.1.2. Раневой процесс у млекопитающих	9
1.2. Низкотемпературная плазма атмосферного давления	12
1.2.1. Определение терминов	12
1.2.2. Источники низкотемпературной плазмы атмосферного давления	14
1.2.3. Применение низкотемпературной плазмы атмосферного давления в медицине.....	16
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	28
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
3.1. Морфометрический анализ	35
3.2. Сравнительный электронно-микроскопический анализ ультратонких срезов.....	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	46
ВЫВОДЫ	48
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	49
ПРИЛОЖЕНИЯ	56
Приложение 1. Опубликованные научные работы по теме ВКР	56

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМП – антимикробный препарат

ВПН - высоковольтный преобразователь напряжения

НПАД – низкотемпературная плазма атмосферного давления

AQP - аквапорины

ASK - регулирующая апоптоз киназа

ATM - ген атаксии-телеангиэктазии

DSB - разрыв двойной цепи

FAK - киназа фокальной адгезии

GSH - глутатион

JNK - c-Jun N-концевая киназа

mRNA - информационная РНК

Nox - НАДФН-оксидаза

Prx - пероксиредоксин

RNS - активные формы азота

ROS - активные формы кислорода

SOD - супероксиддисмутаза

Src - Srcтирозинкиназа

TNFR - рецептор фактора некроза опухоли

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Повышение эффективности лечения раневых инфекций различной этиологии и заживление хронических кожных ран представляют собой актуальные задачи современной медицины, решение которых еще достаточно далеко до завершения. До настоящего времени активно ведутся разработки в различных областях медицины. Наиболее распространенным приемом профилактики бактериальных инфекций является применение антимикробных препаратов (АМП). АМП, как правило, назначают без определения чувствительности микроорганизмов к применяемому антимикробному средству, что приводит к распространению антибиотикорезистентности. В докладе Всемирной организации здравоохранения «Устойчивость к противомикробным препаратам: глобальный доклад по эпиднадзору» подчеркивается, что эта очень важная проблема существует уже сейчас и является серьезной угрозой для человечества [51]. Среди методов лечения и профилактики раневых инфекций используют обработку хлоргексидином, перекисью водорода, антисептиками, содержащими спирты и йод. При лечении ран применяют методы хирургического вмешательства, физические методы воздействия, например, вакуум или лазер, а также барокамеры. Несмотря на существование значительного числа методов профилактики инфекционных осложнений и лечения ран, в настоящее время необходимо создание новых концепций и стратегии борьбы со всевозможными осложнениями инфицированных и хронических ран. Одной из наиболее успешных перспектив является физический метод воздействия на раны низкотемпературной плазмой атмосферного давления (НПАД). В настоящее время в медицине для обработки живых клеток, тканей и микроорганизмов начинают активно применять НПАД с температурой около 30-40°C, так называемую “холодную плазму”. Стремительно развивается новое научное направление “Плазменная медицина”,

сочетающее новые достижения в области физики плазмы и биомедицины. В ряде исследований обнаружено, что НПАД очень эффективно инактивирует различные микроорганизмы, в том числе разрушает патогенные бактерии с множественной лекарственной устойчивостью, включая наиболее проблемные для заживления ран MRSA- стафилококки. Полученные результаты позволили сделать предположение, что холодная плазма может быть альтернативным решением для антисептического лечения хронических инфицированных ран, а также дезинфекции хирургических инструментов и материалов. В литературе описаны первые положительные результаты заживления ран на экспериментальных животных. В последнее время НПАД стали использовать для лечения таких кожных заболеваний, как атопический дерматит, экзема и псориаз. Однако механизмы воздействия НПАД на микроорганизмы и их микробные сообщества в виде бактериальных биоплёнок при заживлении ран все еще остаются не исследованными.

Целью работы являлось определение влияния гелиевой плазменной струи атмосферного давления на морфофизиологические свойства тканей в инфицированных кожных ранах животных.

Задачами исследования являлись:

- Оценка динамики уменьшения площади раневой поверхности под влиянием НПАД с помощью морфометрического анализа.
- Исследование влияния НПАД на ультраструктуру клеток тканей в области раны животного.
- Исследование влияния НПАД на ультраструктуру микроорганизмов в кожной ране.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Посттравматическая регенерация эпидермиса млекопитающих

Кожа – это наружный покров тела, являющийся одним из наиболее крупных органов. Среди функций кожного покрова можно выделить защитную, терморегуляторную, экскреторную, эндокринную, рецепторную и иммунную. Данные функции важны для поддержания нормальной жизнедеятельности организма [2].

1.1.1. Строение кожи млекопитающих

Кожа состоит из трех слоев: эпидермиса, дермы и гиподермы. Эпидермис – это многослойный плоский ороговевающий эпителий толщиной 80 мкм. Толща эпителия разделяется на пять слоев на 90% состоящих из клеток-кератиноцитов различных по своему строению и функциям. Также в данном слое присутствуют меланоциты, клетки Лангерганса и клетки Меркеля. Эпидермис имеет извилистую нижнюю границу и образует первичные и вторичные эпителиальные гребешки. Базальный слой эпидермиса расположен на базальной пластинке, отграничивающей эпидермис от подлежащей дермы. Это один слой клеток, имеющих кубическую или призматическую форму и подразделяющихся на два типа: с ровной и зубчатой поверхностью. Зубчатые клетки являются покоящейся популяцией и выполняют резервную функцию. Они начинают делиться при повреждениях кожи. Кератиноциты с ровной поверхностью делятся постоянно, обеспечивая смену клеток и обновление эпителия каждые 15-30 дней [7]. Помимо ядра и основных органелл они имеют промежуточные кератиновые тонофиламенты, сформированные из низкомолекулярных кератинов, и включения – гранулы меланина. Тонофиламенты складываются в пучки и образуют тонофибриллы, располагающиеся вокруг ядра и направляющиеся к клеточной мембране, где они заканчиваются в области десмосом.

Десмосомы прикрепляют клетки этого слоя друг к другу по их латеральным и верхним поверхностям. С базальной мембраной, отделяющей эпителиальный пласт от подлежащей соединительной ткани, данные клетки прочно соединены с помощью полудесмосом. Базальная мембрана обеспечивает структурную адгезию эпидермиса и дермы, функцию регулирования диффузии клеток и биологически активных молекул. С другой стороны, она способна связывать некоторые цитокины и факторы роста, выполняя функцию резервуара и контролируя их высвобождение во время физиологического ремоделирования кожи после повреждения [25]. При делении клетки базального слоя переходят в шиповатый слой. Шиповатый слой составляют 5-10 рядов клеток, имеющих кубическую или полигональную форму с центрально расположенным ядром и хорошо развитыми органеллами. Клетки отделены друг от друга узкими межклеточными пространствами, пересеченными отростками клеток – шипиками, прочно связанными между собой десмосомами. В клетках шиповатого слоя происходит синтез высокомолекулярных кератинов и белков оболочки роговой чешуйки. Следующий зернистый слой состоит из двух-пяти слоев уплощенных полигональных клеток, цитоплазма которых содержит крупные базофильные кератогиалиновые гранулы, видимые в световой микроскоп. Размер и количество гранул увеличиваются ближе к верхним слоям клеток. В группу белков этих гранул входят белки, содержащие цистин, а также фосфорилированный богатый гистидином белок - префилаггрин, обеспечивающий после процессинга сборку кератиновых филаментов в волокна. При электронной микроскопии также выявляются пластинчатые гранулы размерами 0,1-0,3 мкм. Это овальные структуры, содержащие пластинчатые диски, образуемые липидами и ферментами. Данные гранулы сливаются с клеточной мембраной и выделяют содержимое в межклеточные пространства, где оно откладывается в виде липидных пластин. Кнаружи от зернистого слоя расположен блестящий слой,

преимущественно выраженный в толстой коже. Он образован уплощенными клетками эпидермиса, не содержащими органеллы, и является зоной перехода от живых клеток к чешуйкам рогового слоя. Цитоплазма данных клеток состоит из плотно упакованных кератиновых филаментов, погруженных в электронно-плотный матрикс из растворенных кератогиалиновых гранул. Он имеет небольшую толщину и вид эозинофильной однородной полосы. Наружный роговой слой эпидермиса представлен 15-20 слоями роговых чешуек – клеток, находящихся на завершающей стадии кератинизации. Это уплощенные безъядерные ороговевшие клетки, содержащие кератиновые волокна, погруженные в матрикс, состоящий из белков филаггринов. Их плазматическая мембрана утолщена вследствие отложения на внутренней поверхности белков, например, инволюкрина. Роговые чешуйки бывают двух типов: с рыхлым и плотным заполнением кератиновых фибрилл. Первые располагаются ближе к зернистому слою, в них обнаруживаются остатки клеточных органелл. Вторые чешуйки находятся более поверхностно. Они состоят из фибриллярных и аморфных белков и утолщенных плазматических мембран. Толщина рогового слоя зависит от скорости продвижения в вертикальном направлении клеток, темпа их отторжения и типа кожи (толщина данного слоя может быть небольшой в тонкой коже). В поверхностных слоях роговых чешуек десмосомы разрушаются, и чешуйки отделяются от эпителиального пласта в процессе десквамации эпителия [2, 4, 7, 9].

Следующий слой - дерма является соединительной тканью. Толщина ее колеблется в зависимости от участка тела от 0,5 до 5 мм. Дерма содержит два слоя с нерезкими границами. Наружный слой – сосочковый образован рыхлой соединительной тканью. Он формирует поверхность дермы с выпячиваниями – сосочками дермы, которые чередуются с эпидермальными гребешками. Данный слой содержит фибробласты, тучные клетки, макрофаги, лейкоциты, прослойки основного матрикса и

коллагеновые волокна, не образующие пучков. Из сосочкового слоя коллагеновые якорные фибриллы проникают в базальную пластинку, прикрепляя дерму к эпидермису. Сетчатый слой более толстый, он состоит из плотной неоформленной соединительной ткани, в основном, из коллагена I типа. В его состав входят крупные пучки коллагеновых волокон и небольшое количество основного матрикса. На гистологических препаратах отмечают продольные и поперечные срезы коллагеновых волокон, образующих переплетающиеся пучки, идущие в разных направлениях. Дерма также содержит производные эпидермиса: волосяные фолликулы, потовые и сальные железы [2, 4, 9].

Гиподерма состоит из рыхлой волокнистой ткани и содержит адипоциты [2, 4].

1.1.2. Раневой процесс у млекопитающих

Рана – это механическое повреждение тканей с нарушением целостности кожи и слизистых оболочек [8]. Ранозаживление – естественный, сложный и динамичный процесс индукции и ограничения воспаления, ремоделирования ткани с целью её репарации при повреждении. Раневой процесс состоит из трех последовательных фаз: воспаления (включающего в себя стадию гемостаза), пролиферации (грануляции) и ремоделирования (созревания) [6, 43]. При этом процессы восстановления хотя и имеют строгую последовательность, но могут накладываться во времени или протекать одновременно [6].

Цель первой воспалительной фазы - очищение раны от разрушенных тканей и продуктов их распада и подготовка к последующим стадиям ранозаживления. Она возникает сразу же после повреждения. Развивается острое воспаление с местными гемостатическими реакциями. Оно характеризуется вазоконстрикцией микрососудов, сменяющейся вазодилатацией и появлением крови в зоне раны, образованием фибрина и

инфильтрацией расположенных вокруг тканей с отграничением зоны повреждения. Активированные тромбоциты привлекают фибробласты, кератиноциты, эндотелиальные клетки и макрофаги посредством дегрануляции с выбросом фактора роста тромбоцитов, инсулиноподобного фактора роста-1, фактора роста эпидермиса [17]. В течение нескольких часов гранулоциты мигрируют через стенку сосудов в зону повреждения, через 16-24 часа в ране преобладают моноциты и макрофаги. В первые сутки после ранения кожи наблюдается утолщение эпидермиса, окружающего рану, в результате увеличения объема клеток и расширения межклеточных пространств, а также его полное или частичное отслоение от подлежащей дермы [6].

Во вторую пролиферативную фазу фибробластами синтезируются фибриновая матрица, фибронектин, гиалуронан, коллаген и протеогликаны. Внеклеточный матрикс способствует адгезии клеток нарастающего эпителиального пласта, их направленной миграции и дифференцировке [5]. Миграция эпителия начинается в области плотного экссудата дна сгустка, содержащего фибриновые нити. При этом нарастающие кератиноциты разрушают фибриновый барьер образуемыми кератиноцитами матриксными металлопротеиназами, например, коллагеназой. Также фибрин подвергается местному фибринолизу плазмином, находящимся внутри самого сгустка. Цитокины, выделяющиеся макрофагами, стимулируют пролиферацию сосудов. Образуются петли капилляров, в которые входят фибробласты, синтезирующие коллаген. Коллаген структурируется в волокна, затем в пучки, превращаясь в фиброзную ткань, придающую прочность образуемому рубцу. Содержание коллагена в ране регулируется продукцией и деградацией коллагена посредством коллагеназы. Со временем снижается экссудация, грануляционная ткань целиком заполняет раневой дефект. Уменьшение раневой поверхности также осуществляется

вследствие раневой контракции, которую обеспечивают миофибробласты грануляционной ткани [10].

В третьей фазе при нормальном течении раневого процесса снижается плотность капилляров и количество фибробластов. Коллаген подвергается ремоделированию, и прочность реорганизованной рубцовой ткани нарастает. Наряду с этим происходит эпителизация – процесс миграции кератиноцитов от краев раны, их пролиферация и дифференцировка. Она начинается одновременно с образованием грануляционной ткани. Эпителизация раны происходит в результате амебоидного движения эпидермальных клеток, открепившихся от подлежащей дермы. В чистых резаных ранах миграция кератиноцитов начинаются уже в первые сутки после нанесения раны. По окончании миграции эпителия происходит дифференцировка клеток, их базальная поверхность устанавливает контакт с фибриновыми нитями сгустка, синтезируется базальная мембрана, якорные фибриллы и полудесмосомы. На первых этапах дифференцировки в верхних слоях вновь образованного эпидермиса отсутствует зернистый слой. Ни кератогиалиновые гранулы, ни кератиносомы в кератиноцитах верхних слоев не встречаются. Поверхностные клетки эпидермиса содержат остатки ядер и распластываются под струпом [17]. Дальнейшая дифференцировка кератиноцитов проявляется в виде кератинизации.

На основании объема образующейся грануляционной ткани и времени заживления выделяют три типа заживления ран. При заживлении первичным натяжением в ране нет нежизнеспособных тканей и нагноения, края раны тесно соприкасаются. Петли новообразованных капилляров в краях раны переплетаются друг с другом, а формирующийся один ряд грануляционной ткани обеспечивает быстрое заживление. Под струпом заживают поверхностные раны без повреждения базального слоя эпидермиса, покрываясь корочкой, защищающей рану от внешней среды. Дефект тканей небольшой и его восполняет один слой грануляционной ткани. Корочка отпадает самостоятельно после образования под ней рубца.

Вторичным натяжением заживают раны с большой зоной повреждения, содержащие нежизнеспособные ткани, инфицированные раны и зияющие. Рана заполняется многослойной грануляционной тканью, заживление происходит дольше, чем при других типах заживления. Эпителизация отсутствует, пока не завершается замещение раневого дефекта грануляциями до уровня кожи [6, 8].

Процесс ранозаживления различается у разных видов животных, в связи с различиями в строении кожи. У животных с кожей, скользящей по подлежащим мышцам, ранозаживление происходит очень быстро за счет контракции раны вследствие наличия подкожного слоя мышц *ranniculus carnosus*. У человека данный слой кожи практически отсутствует, в результате чего кожа, главным образом, заживает посредством эпителизации. Различия в ранозаживлении могут наблюдаться у одного и того же вида. Например, у пони по сравнению с лошадьми наблюдается более раннее начало и окончание воспаления раны, приводящее к быстрой эпителизации. Было обнаружено, что лейкоциты пони вырабатывают больше воспалительных медиаторов, что приводит к усиленной местной защите и раннему переходу к фазе пролиферации [47].

1.2. Низкотемпературная плазма атмосферного давления

1.2.1. Определение терминов

Плазма – это квазинейтральная, частично или полностью ионизированная среда, в которой наряду с нейтральными частицами, присутствуют заряженные – электроны и ионы, а также возбужденные атомы и молекулы [1, 22]. Понятие “квазинейтральный” означает, что количество положительных и отрицательных зарядов в единице объема почти одинаково. Взаимодействие частиц плазмы между собой характеризуется кулоновскими силами притяжения и отталкивания, уменьшающимися с расстоянием медленнее, чем силы взаимодействия

нейтральных частиц. В связи с этим, в плазме друг с другом в одно время взаимодействует большое число частиц. Также на плазму значительно воздействуют электрические и магнитные поля, вызывая образование в ней объемных зарядов и токов. Плазма не имеет четкой формы, также как вещество в газообразном состоянии, однако при приложении электрического и магнитного поля, она принимает определенную конфигурацию. При наличии данных полей электроны испытывают большее ускорение, чем тяжелые ионы, что не приводит к нагреву плазмы. Движение электронов приводит к ионизации частиц и образованию активных форм веществ [1, 49].

Плазма может существовать в широком диапазоне температур без изменения своего состояния, в отличие от других агрегатных состояний. На основании относительных температур ионов, электронов и нейтральных частиц, входящих в состав плазмы, её можно разделить на высокотемпературную и низкотемпературную. Низкотемпературная плазма, в свою очередь, подразделяется на равновесную и неравновесную. Электроны и тяжелые частицы высокотемпературной плазмы находятся в состоянии теплового равновесия друг с другом и, как следствие, имеют высокую температуру 10^5 - 10^9 градусов Кельвина. Низкотемпературная равновесная плазма отличается равенством температуры электронов и тяжелых ионов, основанной на упругих столкновениях между данными частицами. Энергия электронов поглощается тяжелыми частицами, вследствие чего они нагреваются, и частицы плазмы находятся в термодинамическом равновесии. Электроны низкотемпературной неравновесной плазмы имеют высокую температуру до нескольких тысяч градусов Кельвина, тогда как ионы и нейтральные частицы – температуру в 300-400 градусов Кельвина. Из-за разницы температур частиц данную плазму называют неравновесной (не находящейся в состоянии термического равновесия). Возбужденные электроны посредством

столкновений образуют радикалы и возбужденные частицы с высокой реакционной способностью [1, 49].

Газовые разряды, генерируемые при низком давлении, называются плазмой низкого давления. Для данного способа производства плазмы требуются вакуумные системы с откачкой газа. В газовой фазе такой плазмы имеется низкая плотность атомов и низкий уровень столкновений между электронами и тяжелыми частицами. Плазма атмосферного давления генерируется при атмосферном давлении, при этом не требуется вакуумное оборудование [1, 24].

1.2.2. Источники низкотемпературной плазмы атмосферного давления

При генерировании НПАД электрическая энергия используется для диссоциации и возбуждения атомов и молекул без нагрева газовой среды. В качестве среды для создания плазмы обычно используются такие газы, как аргон, гелий, водород, кислород, азот и воздух [1, 19, 21, 28].

Используются несколько типов источников НПАД, в том числе барьерный разряд и плазменная струя атмосферного давления (рис. 1) [1, 24, 49].

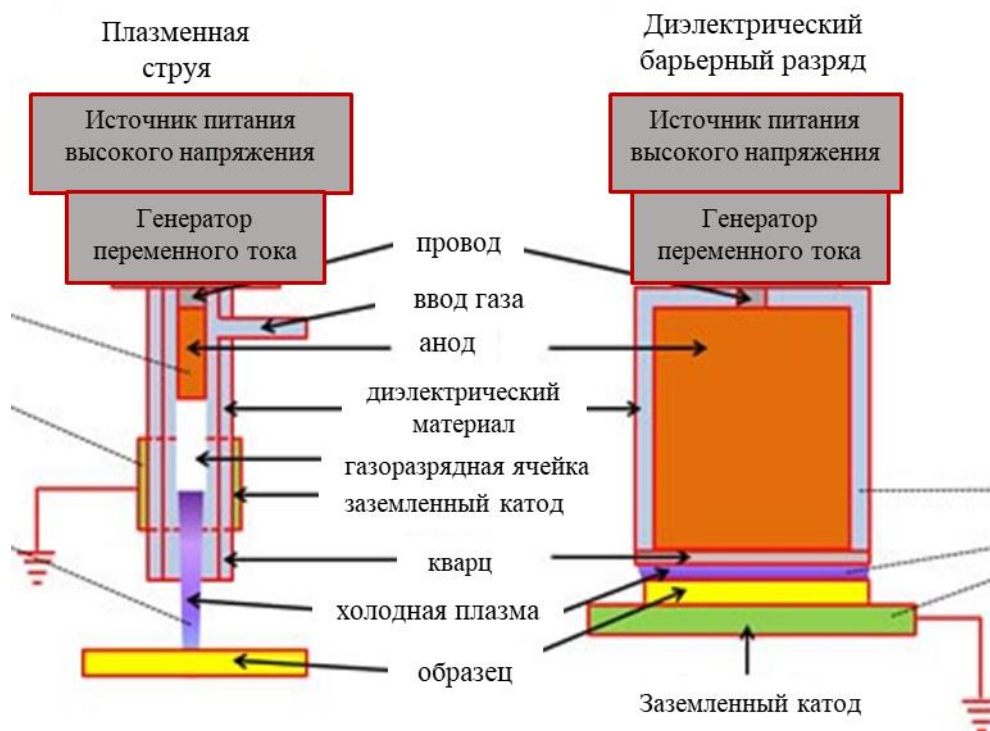


Рисунок 1 – Схема устройств для генерирования НПАД [49]

Устройство для получения барьерного разряда состоит из двух плоских металлических электродов, покрытых диэлектрическим материалом, что повышает устойчивость разряда. Один из электродов – высоковольтный, генерирующий разряд для производства плазмы, другой – заземленный. Между ними происходит ионизация рабочего газа. Существуют различные вариации конфигурации электродов, некоторые электроды являются цилиндрическими, а диэлектрический материал покрывает только один электрод.

Разработан источник НПАД с незаземлённым электродом, который во время работы генератора приобретает плавающий потенциал. Его роль играет кожа человека, его орган или поверхность образца, помещённого в поток плазмы. Расстояние между поверхностью двух электродов составляет от нескольких миллиметров до сантиметра [1, 19].

Другой тип источника – плазменная струя атмосферного давления. Он состоит из двух коаксиальных или кольцевых электродов в различных конфигурациях, между которыми с высокой скоростью протекает подаваемый газ. Один из электродов заземлен. Плазменная струя выходит

из выходного отверстия генератора, воздействуя на обрабатываемую поверхность, расположенную на расстоянии нескольких сантиметров. Небольшие размеры струи подходят для обработки узких каналов и точечного воздействия на обрабатываемый образец [44].

Один из видов плазменной струи - плазменная «игла» (plasma needle). Она состоит из игольчатого электрода из вольфрама или нержавеющей стали диаметром 1 мм, соединенного с источником тока, и заземленного электрода. Внутренний электрод в виде иглы находится в кварцевой трубке, которая заполняется газом. Наиболее часто используют гелий в связи с минимальным напряжением, необходимым для зажигания разряда. Газ смешивается с воздухом на кончике иглы, где создается микрозаряд. Плазменную «иглу» можно использовать для обработки небольших областей с высокой точностью, например, в стоматологии [33].

Плазменный «карандаш» (plasma pencil) состоит из диэлектрической цилиндрической трубки диаметром 2,5 см со вставленными в трубку двумя дисковидными медными электродами того же диаметра. Они разделены друг от друга расстоянием от 0,3 до 1 см. К электродам прикладываются импульсы высокого напряжения, а газ вводится в отверстия в электродах со скоростью от 1 до 10 литров в минуту. Струя плазмы достигает 5 см [24].

1.2.3. Применение низкотемпературной плазмы атмосферного давления в медицине

В настоящее время проводится большое количество исследований с целью применения НПАД в области здравоохранения, что обусловило появление нового научного направления - «плазменная медицина». Работы проводятся по различным направлениям: это дезинфекция и стерилизация, ускорение регенерации ран, коагуляция крови, повреждающее воздействие на опухолевые клетки.

Механизмы действия НПАД до конца не ясны и активно изучаются, однако, они одинаковы при применении НПАД для любой цели. При взаимодействии НПАД и живых клеток наблюдается появление комбинации различных физических факторов, таких как ультрафиолетовое и инфракрасное излучение, электромагнитное поле и действие химических веществ. К химическим факторам относятся реактивные формы веществ на основе кислорода: гидроксил ($\text{OH}\cdot$), синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), супероксид ($\text{O}_2\cdot^-$), перекись водорода (H_2O_2), озон (O_3), O^+ , O_2^+ , O_4^+ , OH^+ , H_2O^+ , H_3O^+ , и на основе азота: оксид азота II (NO), оксид азота IV (NO_2), нитрат-анион (NO_3^-), оксид азота I (N_2O), тетраоксиддiazота (N_2O_4), N^+ , N_2^+ , N_3^+ , N_4^+ . Кроме того, обнаруживаются положительно заряженные ионы He^+ , He_2^+ , H^+ и электроны [49].

Применение НПАД для дезинфекции и стерилизации

Стерилизация НПАД имеет ряд преимуществ перед другими методами. Это низкая температура обработки, что позволяет стерилизовать чувствительные к высокой температуре материалы в течение небольшого времени воздействия - нескольких минут. Генераторы НПАД выделяют в окружающую среду минимальное количество вредных веществ, что делает их экологически безопасными. При действии вышеперечисленных физических и химических факторов действия НПАД у микроорганизмов не развивается устойчивость к данному воздействию.

Активные формы кислорода и азота играют главную роль при стерилизации плазмой. В исследовании Joshi с соавторами [28] активные формы кислорода вызывали дозозависимые морфологические изменения у *Escherichia coli*: деполяризацию мембраны, перекисное окисление липидов мембраны, повреждение ДНК, уменьшение размеров бактерии и превращение её в кокковидную форму. В другом исследовании при обработке поверхности агара, засеянном клетками *Escherichia coli*,

возникали зоны подавления роста микроорганизмов. При электронно-микроскопическом анализе выявлялись деструктурированные формы клеток с ультраструктурными изменениями в виде отслоения клеточной стенки, образования пустот в цитоплазме, суперспирализации ДНК. Данные изменения были более выражены при скорости потока гелиевой плазменной струи 10 м/с, при которой, предполагается, происходит более активное примешивание окружающего воздуха и образование активных форм кислорода и азота (рис. 2) [45].

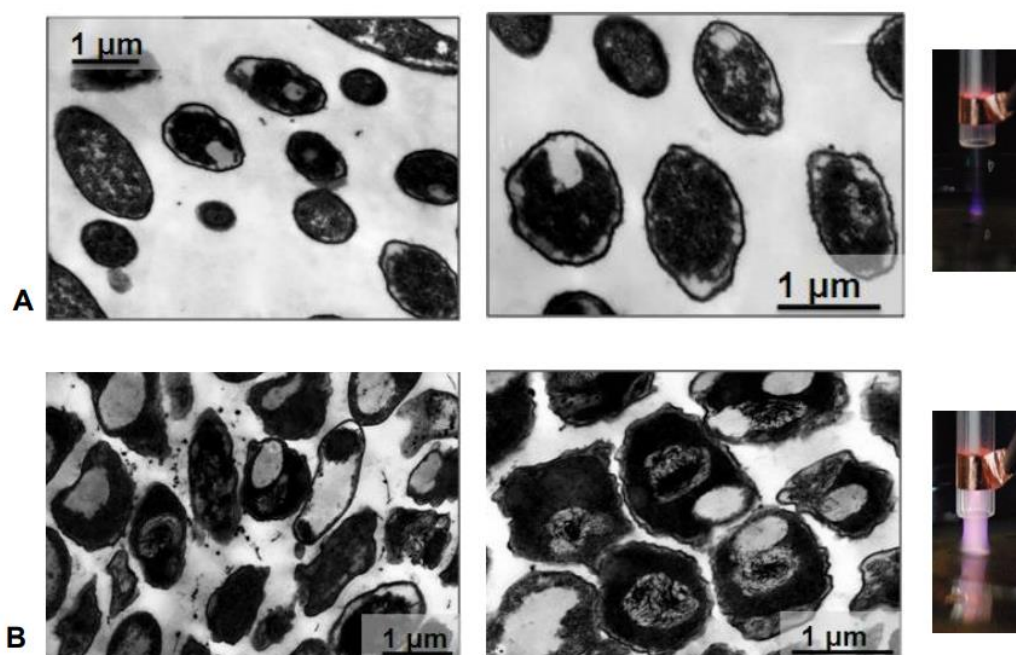


Рисунок 2 – Ультраструктурные изменения в клетках *Escherichia coli* при воздействии НПАД: А – скорость газового потока 3 м/с; В - скорость газового потока 10 м/с [45]

В исследовании Kelly-Wintenberg с соавторами [32] после воздействия тлеющего разряда атмосферного давления в течение 15-90 секунд на клетки *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и эндоспоры *Bacillus subtilis* и *Bacillus pumilus* при исследовании в трансмиссионном электронном микроскопе выявлено разрушение клеточной стенки с высвобождением содержимого клетки. Предполагается, что в разрыве наружной мембраны бактериальной клетки значительную роль играли заряженные частицы. Электростатическая сила,

вызванная накоплением заряда на внешней поверхности клеточной мембраны, может преодолеть прочность мембраны на разрыв, приводя к ее разрушению [36]. Данный эффект имеет важное значение при непосредственном контакте плазменной струи с микроорганизмами.

Влияние ультрафиолетового излучения до конца не выяснено. Известно, что оно зависит от рабочего давления при получении плазмы. Плазма низкого давления может производить ультрафиолетовое излучение в диапазоне длин волн, принимающих участие в процессе стерилизации (200-290 нм). Однако при генерации плазмы при атмосферном давлении ультрафиолетового излучение не возникает [13, 16, 19]. В исследовании Herrmann [23] с соавторами обрабатывали плазменной струей атмосферного давления *Bacillus globigii* в потоке смеси гелия и кислорода и блокировали полученные активные формы кислорода и азота с помощью кварцевого окна, чтобы позволить только ультрафиолетовому излучению соприкасаться со спорами. Значительного снижения количества бактерий после обработки не наблюдали. Однако есть и другие сообщения, напротив, о существенной роли ультрафиолетового излучения в стерилизации. Trompeter с соавторами [46], Heise с соавторами [22] и Park с соавторами [42] использовали аргоновую плазму и пришли к выводу, что инактивация спор обусловлена УФ-излучением.

Применение НПАД в стоматологии

В области стоматологии НПАД применяли для дезинфекции зубных полостей в процессе подготовки перед заполнением кариозной полости зубным цементом и для лечения заболеваний пародонта. Исследования проводили на различных видах бактерий: *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus* [40], *Streptococcus mutans* [20, 50], *Lactobacillus acidophilus* [50] и *Porphyromonas gingivalis* [38]. Jiang с соавторами [27] применяли НПАД для дезинфекции корневых каналов из извлеченных зубов человека,

при этом два зуба размещали на расстоянии 5 мм от выходного отверстия генератора. Затем один из них подвергали воздействию плазмы на основе смеси гелия и кислорода в течение 5 минут, тогда как другой подвергался воздействию того же потока гелия и кислорода в течение пяти минут, но без генерирования плазмы. Наиболее удачные, по сравнению с контролем, результаты по удалению бактериального налета с поверхности зубной эмали наблюдали при обработке холодной плазмой (рис. 3).

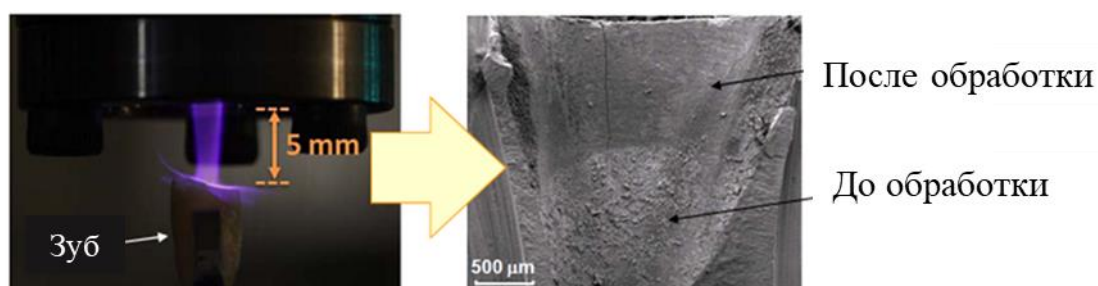


Рисунок 3 – Обработка поверхности зуба НПАД [27]

В настоящее время для отбеливания зубов используют гидроксильные радикалы, образующиеся из перекиси водорода. В исследованиях с использованием НПАД применяют плазму совместно с перекисью водорода или отдельно от нее. В эксперименте Lee с соавторами [37] использовали 28 извлеченных зубов, которые были разрезаны пополам в продольном направлении и разделены на две группы. Дентин и эмалевую поверхность зуба опытной группы обрабатывали плазмой и перекисью водорода в течение 10 минут, в то время как дентин и поверхность зуба контрольной группы обрабатывали только перекисью водорода. Результаты показали трехкратное улучшение отбеливания зубов в опытной группе, по сравнению с контролем (рис. 4). Сообщалось, что большая эффективность отбеливания зубов в обработанной плазмой группе, по сравнению с контролем, была обусловлена как удалением белков с поверхности зуба, так и удвоением концентрации гидроксильных радикалов.

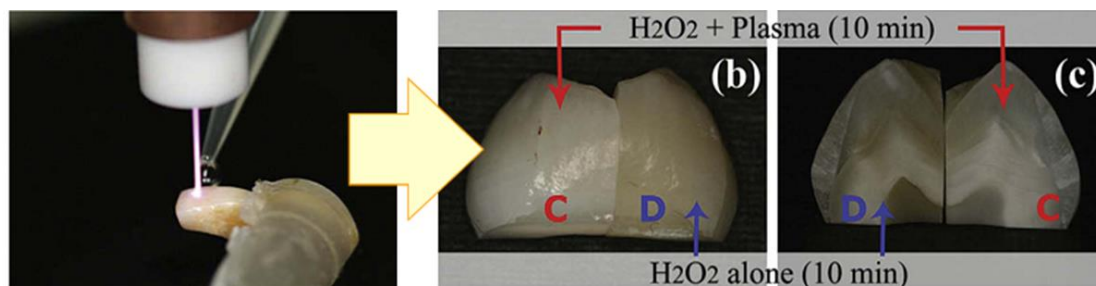


Рисунок 4 – Обработка поверхности зуба (b) и зуба в поперечном разрезе (c): C – перекисью водорода и НПАД; D – перекисью водорода [37]

Применение НПАД в онкологии

Разработаны две базовые стратегии исследования воздействия НПАД в данной области. В первом случае поток плазмы непосредственно контактирует с обрабатываемой поверхностью: клетками на подложке или с подкожно расположенной опухолью. При воздействии НПАД на опухолевые клетки над ними обычно располагается слой клеточной культуры, на который в первую очередь воздействуют физические и химические факторы НПАД. Другая стратегия – это использование обработанных НПАД растворов или сред, после чего их добавляют к клеточным культурам или инъецируют в опухоль на животной модели. Чаще применяют первый способ, однако частота исследований с использованием второго способа в настоящее время возрастает [49].

НПАД используют в исследованиях по лечению новообразований *in vitro* на культурах различных клеточных линий и *in vivo* на животных моделях. В последнее время НПАД показала свое повреждающее действие на более чем 20 типах рака, например, на клетках рака мозга, кожи, молочной железы, колоректального рака, рака легких, рака шейки матки, опухоли печени, опухоли головы и шеи. Около 70% всех исследований по плазменным струям атмосферного давления посвящено устройствам, предназначенным для лечения онкологических заболеваний [49].

При воздействии НПАД онкологические клетки меняют свои морфологические свойства, переходя от распластанной формы к

компактной и уменьшенной в размере, при этом изменяется их горизонтальная поляризация (рис. 5). Данные метаморфозы сопровождаются изменениями цитоскелета, например, повреждением F-актина [30].

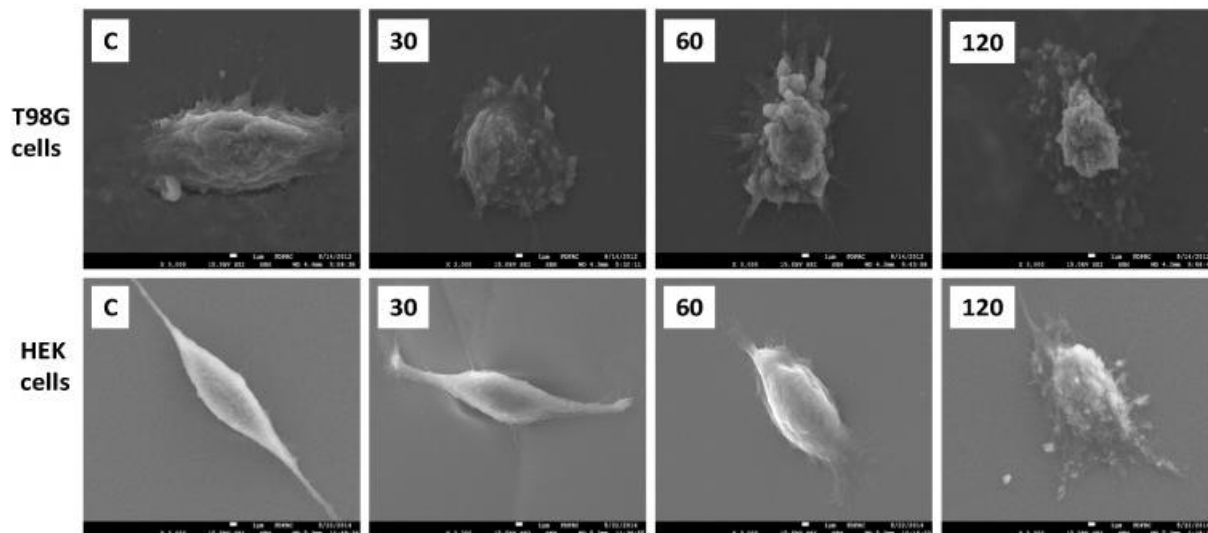


Рисунок 5 – изменения морфологических свойств онкологических клеток под действием НПАД: в левом верхнем углу указана длительность обработки (сек) [30]

Наряду с повреждающим действием, при обработке НПАД восстанавливалась чувствительность резистентных к химиотерапевтическим препаратам клеток. Например, НПАД восстанавливала чувствительность глиобластомы к темозоломиду, ранее резистентной к нему [35]. В ряде исследований авторы добивались увеличения противоопухолевого эффекта при синергетическом действии НПАД и наночастиц [15, 34]. Усиленный противомеланомный эффект был достигнут при применении НПАД и анти-ФАК антител, конъюгированных с наночастицами золота, при обработке клеток наночастицами золота совместно с НПАД, а также золотыми частицами покрытыми полиэтиленгликолем. Данные исследования показывают, что наночастицы могут значительно ослабить или нарушить нормальное функционирование специфических белков или сигнальных путей способных выдержать воздействие активных форм веществ, образующихся при генерировании НПАД.

In vivo проводили опыты с обработкой НПАД подкожных ксенотрансплантатов у мышей: глиомы, карциномы поджелудочной железы, опухолей головы и шеи, нейробластомы, колоректального рака и меланомы. Во всех исследованиях отмечали остановку роста опухоли, а затем уменьшение ее размеров. В исследовании Keidar с соавторами [31] подкожную опухоль мочевого пузыря однократно обрабатывали в течение двух минут НПАД на основе гелия. Через 24 часа опухоли диаметром 5 мм полностью исчезали и больше не рецидивировали. Опухоли большего диаметра уменьшались в размере, а через неделю после процедуры начинали расти вновь. Однако они не достигали своих прежних размеров даже через три недели после проведения эксперимента. Необходимо отметить, что при проведении указанных выше экспериментов кожа над опухолью оставалась интактной и не повреждалась НПАД.

В настоящее время активно исследуют механизмы действия плазмы. Показано, что НПАД вызывает апоптоз клеток, в основном, вызванный разрывом цепи ДНК вследствие значительного повышения внутриклеточной концентрации активных форм кислорода и азота, что ослабляет действие внутриклеточной антиоксидантной системы и вызывает серьезные повреждения ДНК [29]. В результате деструктивных нарушений ДНК клеточный цикл останавливается и происходит апоптоз (рис. 6).

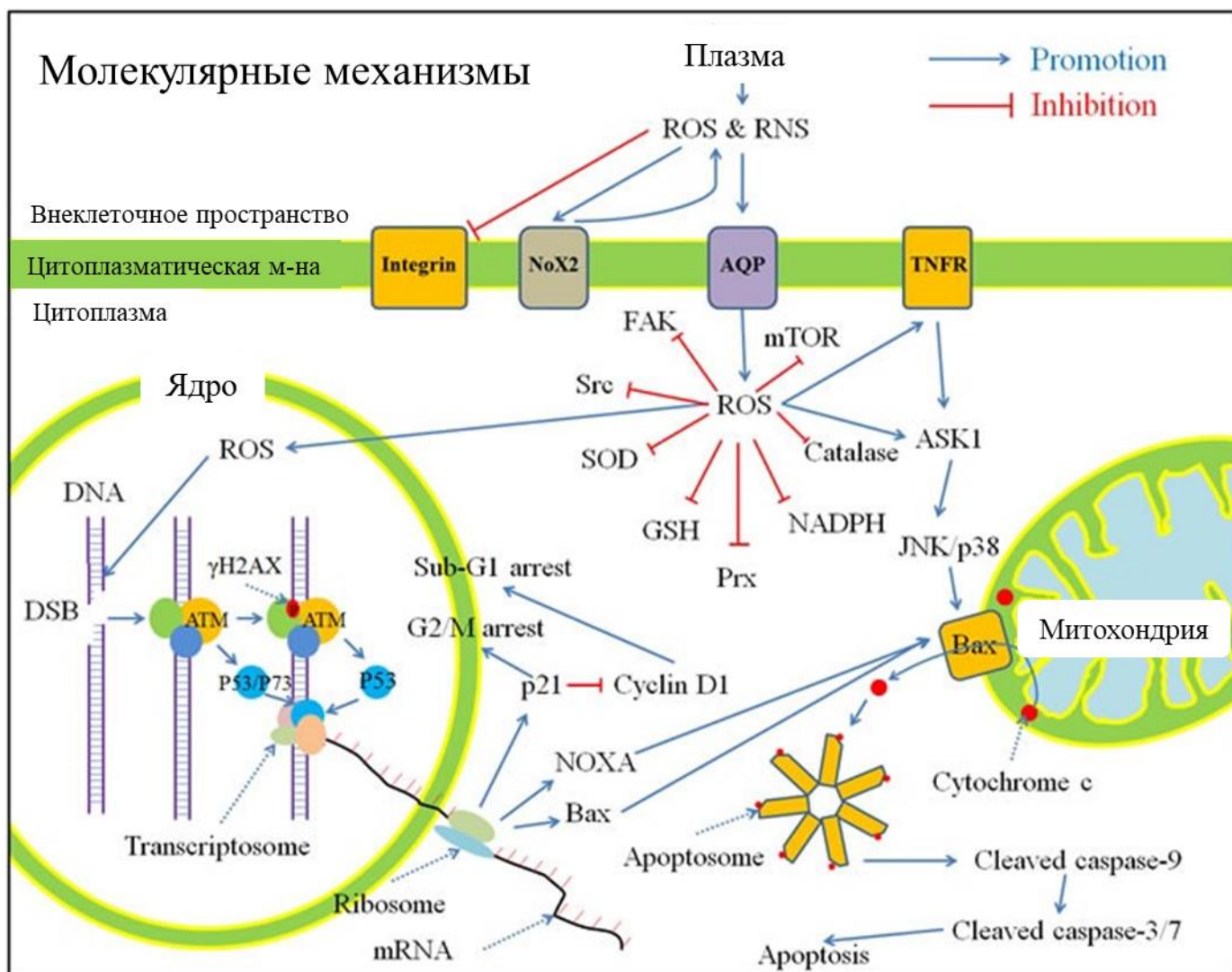


Рисунок 6 - Общая схема противоопухолевого механизма действия НПАД *in vitro*, основанная на публикациях, полученных в конце 2015 года [49]. Сокращения: ROS: активные формы кислорода; RNS: активные формы азота; Nox: НАДФН-оксидаза; AQP: аквапорины; TNFR: рецептор фактора некроза опухоли; FAK: киназа фокальной адгезии; Src: Srcтирозинкиназа; SOD: супероксиддисмутаза; GSH: глутатион; Prx: пероксиредоксин; NADPH: восстановленная форма НАДФ; mTOR: мишень рапамицина млекопитающих; DNA: ДНК; DSB: разрыв двойной цепи; ATM: ген атаксии-телеангиэктазии; mRNA: информационная РНК; ASK: регулирующая апоптоз киназа; JNK: c-Jun N-концевая киназа.

Для проникновения полярных активных форм необходимы ионные каналы и транспортеры, при этом некоторые неполярные вещества способны свободно диффундировать через мембрану (табл.1).

Таблица 1 – Переносчики активных форм кислорода и азота в клетке [49]

Реактивные формы	Механизм диффузии	Каналы/транспортеры
NO	Пассивная диффузия/каналы	AQP 1
H ₂ O ₂	Каналы	AQP 1, 3, 8, 9
NO ₂ ⁻	Транспортеры	NRT 2
NO ₃ ⁻	Каналы/транспортеры	AQP 6, NRT 1, NRT 2
ONOO ⁻	Каналы	Неизвестный анионный канал

Активное образование аквапориновых каналов и внутриклеточных антиоксидантных ферментов, таких как каталаза, может служить вероятным механизмом селективной диффузии активных форм кислорода и азота через цитоплазматическую мембрану опухолевых клеток, в то время как в норме в клетках происходит лишь незначительное повышение их концентрации внутри клетки. В опухолевых клетках наблюдается увеличение числа каналов, например, аквапоринов 1, 3, 8 и 9. Показано, что в наибольшей степени они способствуют проникновению в клетку перекиси водорода [49].

Применение НПАД при заболевании и повреждении кожи

Обработка кожи НПАД безопасна и, как правило, не вызывает её повреждения. Длительность обработки достаточная для повреждения прокариотических и опухолевых клеток недостаточна для деструкции эукариотических клеток. Ультраструктурные изменения в виде вакуолизации кератиноцитов выявляются только после 10 минут обработки НПАД [21]. Повышенная устойчивость к действию НПАД, вероятно, связана с особенностями метаболизма эукариотических клеток и более высоким уровнем клеточной организации, обеспечивающим лучшую защиту от внешних воздействий, при этом немаловажное значение имеет благоприятное соотношение поверхность/объем клетки [21].

Показано применение НПАД для ускорения заживления ран. Данный эффект достигается, в первую очередь, благодаря его бактерицидному

воздействию. В рандомизированном клиническом исследовании Isbary с соавторами [26] 36 пациентов получали лечение плазмой на основе аргона на установке MicroPlaSter® один раз в день в течение 2-5 минут. В среднем, пациенты получили по 8 сеансов, что привело к сокращению содержания микроорганизмов в ране, в том числе MRSA, на 34% (рис. 7). В исследовании Mertens с соавторами [40] у пациента с атопическим дерматитом было выявлено снижение концентрации *Staphylococcus aureus* в 10 раз через два сеанса, при этом уменьшились зона эритемы и зуд. В не рандомизированном исследовании Шулутко с соавторами [12] и Lipatov с соавторами [21] аппаратом “Plazon” были пролечены в общей сложности 105 пациентов с диабетом и гнойными или некротическими ранами нижних конечностей. Данный вид обработки повышал концентрацию оксида азота (NO), вызывал вазодилатацию, стимулировал рост фибробластов и сосудов. Показано, что повышение концентрации NO приводило к ускорению заживления ран на 24,6%, по сравнению с контрольной группой [12].



Рисунок 7 - 61-летний пациент с венозной трофической язвой: А – перед лечением НПАД, Б – после 11 сеансов (23 дней после начала лечения) обработки один раз в день по 2 минуты. Перед началом лечения высевали *Klebsiella oxytoca* и *Enterobacter cloacae*, после 11-го сеанса рост бактерий не отмечали [26]

Установлено, что при воздействии на раны, НПАД также способствует остановке кровотечения [12]. С этой целью в практике широко используют источники низкотемпературной равновесной плазмы, однако,

НПАД также способна коагулировать кровь. Данный эффект достигается путем нетепловой стимуляции естественных механизмов коагуляции крови, что подтверждается анализами крови, подвергшейся воздействию плазмы. В исследовании Fridman с соавторами [19] капля крови донора сворачивалась за 15 минут, в то время как капля, обработанная НПАД в течение 15 секунд, - за 1 минуту. В экспериментах на селезенке кровь останавливалась после 30 секунд обработки, при этом поверхность разреза оставалась влажной, а его температура не повышалась, по сравнению с комнатной даже после 5 минут обработки.

Таким образом, в ряде работ, наряду с бактерицидным действием НПАД, показан также противоопухолевый, ранозаживляющий и кровоостанавливающий эффект. НПАД находит применение в разработках в области стоматологии (удаление зубного налета, дезинфекция корневого канала), дерматологии и хирургии (снижение микробной обсемененности при атопическом дерматите, ускорение заживления хронических язв кожи), а также онкологии. Данные свойства НПАД связаны с комплексным механизмом действия плазмы, включающим в себя физические (ультрафиолетовое и инфракрасное излучение, электромагнитное поле) и химические факторы (активные формы кислорода и азота, позитивно заряженные ионы и электроны).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животная модель кожных ран

Для изучения ранозаживления использовали модель осложненного течения раневого процесса у мышей и крыс на фоне иммуносупрессии, вызванной введением гидрокортизона [3]. Выбор модели основывали на том, что кожные раны у мышей и крыс заживают быстро, и для выявления эффекта воздействия низкотемпературной плазмы требуется замедление скорости эпителизации. Способностью снижать скорость эпителизации ран у экспериментальных животных обладают глюкокортикоиды, которые имеют противовоспалительное, иммунодепрессивное и антипролиферативное действие. Они нарушают синтез простагландинов, подавляют активацию тканевых кининов; уменьшают миграцию макрофагов и лимфоцитов в очаг воспаления, не оказывая цитостатического действия [52]. Гидрокортизон в дозе 25 мг/кг массы тела снижает темп эпителизации кожных ран [3]. Введение гидрокортизона животным осуществляли внутримышечно в дозе 25 мг/кг массы тела на протяжении 7 суток эксперимента, первый раз за сутки до нанесения ран.

Задачей первого этапа исследования было выявление варианта раневой модели, приводящего к наименьшей скорости эпителизации раны и развитию инфекционного процесса в ране. На данном этапе эксперимента использовали 20 белых беспородных крыс-самцов линии Wistar массой 135-140 грамм (питомник РАМН "Рапполово", Россия). Животных содержали в изолированных клетках со свободным доступом к пище и воде. Экспериментальные процедуры проводили в соответствии с требованиями международных норм по работе с экспериментальными животными. Животных разделили на четыре группы по 5 крысы, каждой из которых была выполнена операция по нанесению кожных ран. В качестве контрольной группы использовали животных, не получавших инъекций гидрокортизона и не инфицированных. Второй группе крыс проводили только инъекции гидрокортизона. Третья группа была только

инфицирована. Четвертой группе проводили как иммуносупрессию гидрокортизоном, так и инфицирование кожных ран.

Вторым этапом эксперимента стало использование модели с введением гидрокортизона и инфицированием при обработке ран НПАД. Использовали 20 беспородных белых мышей-самцов возрастом 7-8 недель и массой 20-22 грамма (питомник РАМН “Рапполово”, Россия). Мышей разделили на две группы по 10 мышей в каждой. В опытной группе на 1-3 сутки эксперимента кожные раны обрабатывали НПАД.

Во время манипуляции по нанесению кожных ран мышей наркотизировали золетилом (Zoletil 100) (30 мг/кг веса, внутривенно). Перед нанесением полнокожных ран у животного в области операционного поля на спине между лопатками ножницами состригали шерсть. Остатки шерсти удаляли с помощью крема для депиляции (EvelineCosmetics), наносимого на три минуты. Затем операционное поле последовательно обрабатывали однократно 5% спиртовым раствором йода и 70% этиловым спиртом. С помощью стерильного стилета для биопсии кожи Dermo-punch диаметром 5 мм (SteryLab, Италия) через оттянутую кожную складку на спине между лопатками наносили две полнослойные кожные раны глубиной до поверхностной фасции мышц с удалением слоя panniculus carnosus. Panniculus carnosus – это слой поперечно-полосатой мускулатуры дермы животных, значительно редуцированный у человека [41]. Он позволяет коже двигаться независимо от слоя подлежащих мышц и отвечает за быстрое сокращение кожи при нарушении ее целостности. Вырезанный участок кожи удаляли с помощью пинцета и ножниц. Для фиксации краев раны приклеивали (клей суперМомент универсальный, цианакрилатный), а затем пришивали (шовный материал лавсан 4-0) силиконовое кольцо толщиной 1 мм с диаметром внутреннего отверстия 8 мм [18, 48] (рис. 8). После проведенных манипуляций за животными наблюдали до выхода из наркоза. День нанесения раны считали началом эксперимента и обозначали как “0 сутки”.

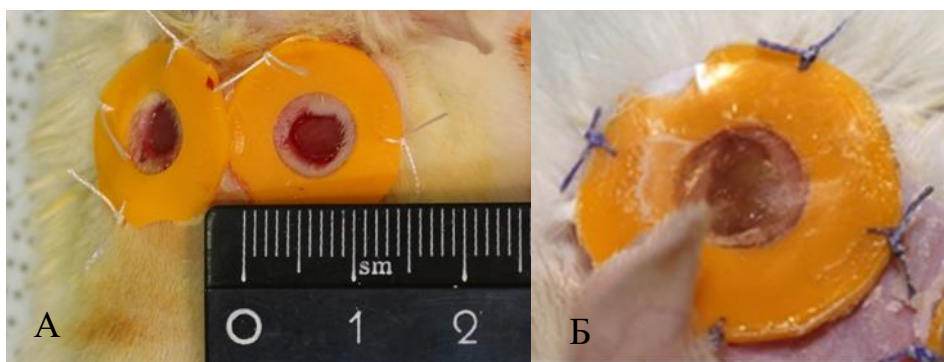


Рисунок 8 – Внешний вид кожной раны. А – до инфицирования раны; Б – после внесения суспензии и закрытия раны прозрачной пленкой

Культуральные среды, условия роста и характеристика культур микроорганизмов

В работе использованы следующие микроорганизмы: грамположительные *Staphylococcus aureus* и грамотрицательные *Pseudomonas indica*. Культуры бактерий выращивали на жидкой питательной среде бульоне ВНИ (BrainHeartInfusionBroth, «GibcoDiagnostics», США). Все грамположительные и грамотрицательные бактерии инкубировали в аэробных условиях при 37°C в течение 18-24 часов.

Инфицирование ран

В раны вносили 0,1 мл суспензии *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas indica* в количестве 1×10^8 КОЕ/мл. После внесения микроорганизмов поверхность ран закрывали прозрачной пленкой (рис. 8). Инфицирование осуществляли ежедневно.

Морфометрия раны

Морфометрическое исследование проводили на нулевые, третьи и пятые сутки опыта. Обработку изображений, полученных с помощью цифрового фотоаппарата, и измерение площади ран выполняли с помощью программы ImageJ 1.35r (НИН, США).

Источник низкотемпературной плазмы атмосферного давления

Для плазменной обработки ран животных использовали источник плазменной струи барьерного разряда в потоке гелия. Барьерный разряд зажигали внутри разрядной ячейки, которой служила кварцевая трубка, оборудованная системой электродов «внутренний стержень – внешнее кольцо» (рис. 9). Медная проволока диаметром 1,5 мм, зафиксированная по оси трубки на расстоянии 7,5 мм от её края, использовалась в качестве высоковольтного электрода. Заземлённый электрод – внешнее кольцо – был выполнен из полоски медной фольги шириной 5 мм, намотанной на внешней стороне трубки на расстоянии 5 мм от среза. Формирующая поток плазмы кварцевая трубка служит в качестве диэлектрического барьера.



Рисунок 9 – Разрядная ячейка с системой электродов

Расход газа регулировали с помощью регулятора расхода газа РРГ-12 с верхним пределом регулирования 900 л/ч (Эточприбор, Россия). На рисунке 10 представлена функциональная электрическая схема экспериментальной установки для генерирования плазменной струи на основе барьерного разряда [45]. На рисунке 11 представлен внешний вид установки.

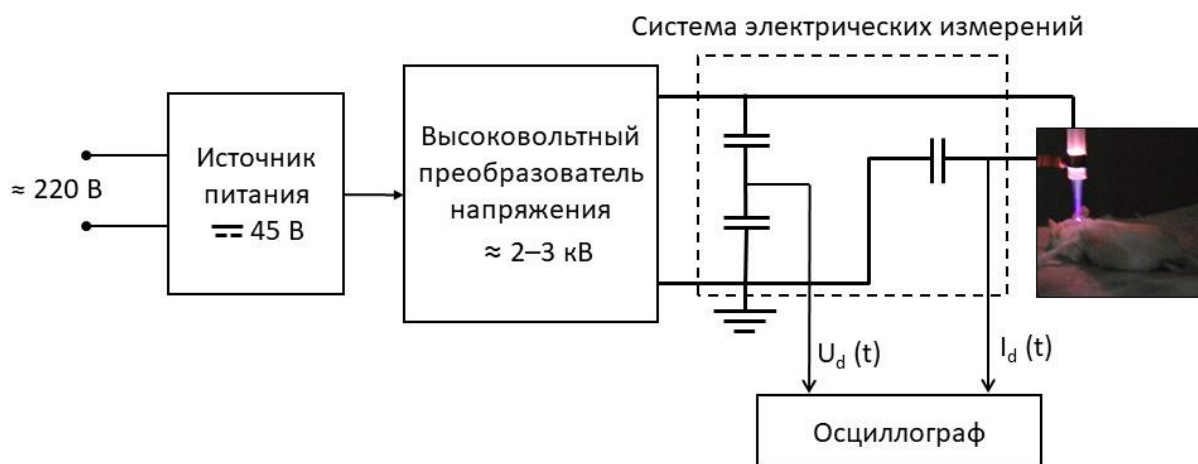


Рисунок 10 – Функциональная электрическая схема экспериментальной установки [45]



Рисунок 11 – Внешний вид экспериментальной установки

Для генерирования барьерного разряда в потоке гелия разработан высоковольтный преобразователь напряжения (ВПП), который преобразует постоянное напряжение 10-45 В в переменный синусоподобный импульс с амплитудой 2-3 кВ. ВПП позволяет модулировать сигнал напряжения по частоте, что в свою очередь обеспечивает регулирование средней мощности, вкладываемой в разряд, приблизительно от 25 до 220 мВт.

В опытных группах на первые, вторые и третьи сутки эксперимента кожные раны обрабатывали НПАД, источником которой служил

барьерный разряд со средней мощностью 160 мВт. Чтобы ограничить подвижность животного, его помещали в пластиковую бутылку с вырезом над раной. Бутылку размещали на столике, поверхность которого находилась на расстоянии 4,5 см от выходного отверстия генератора плазменной струи. Расстояние до раневой поверхности составляло около 3 см. Обработку проводили в течение 4 минут.

Окрашивание метиленовым синим и основным фуксином

Биопсию ран выполняли на третьи и шестые сутки в обоих экспериментах. Для проведения электронно-микроскопических исследований с целью правильной ориентации препаратов на ультратоме LKB-8800 (LKB, Швеция) делали полутонкие срезы. После переноса срезов на предметные стекла на срезы помещали раствор, состоящий из 0,130 г метиленового синего, 0,02 г азура II, 10 мл глицерина, 10 мл метанола, 50 мл воды и 30 мл смеси, в свою очередь содержащей 1,338 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,908 г K_2HPO_4 и 100 мл воды. Препараты исследовали в световом микроскопе (Leica, Германия) и фотографировали [10].

Электронно-микроскопическое исследование

При электронной микроскопии объектами выступали сегменты раны, фиксированные по методу Nayat 2,5%-ным раствором глутаральдегида на растворе Хенкса (pH=7,2) в течение 2 часов при температуре 4°C (Nayat, 1974). После обработки раствором Хенкса препараты фиксировали 1%-ным раствором четырехокси осмия (OsO_4) на основе раствора Хенкса на протяжении 2 часов при температуре 4°C. Фиксированные OsO_4 препараты после отмывки раствором Хенкса опускали в 2%-ный раствор уранилацетата на ацетатном буфере (pH=5,2) при 40°C на 1 час [10].

Затем препараты обезвоживали в серии этиловых спиртов возрастающей концентрации, в смеси спирта и ацетона и в чистом ацетоне. После этого препараты помещали в смолу Spurr. Для выявления зон

препарата оптимальных для электронно-микроскопического изучения изготавливали полутонкие срезы для ориентирования материала в световом микроскопе. Затем на ультратоме LKB-8800 (LKB, Швеция) готовили ультратонкие срезы. Контрастирование срезов осуществляли по методу Reynolds уранилацетатом и цитратом свинца. Готовые препараты просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100C (JEOL, Япония) [10, 11].

Статистический анализ

Полученные в результате морфометрического исследования результаты выражали в процентах от изначальной площади раны и проводили статистическую обработку с помощью компьютерной программы Excel (MicrosoftInc), рассчитывая среднюю арифметическую, стандартную ошибку средней арифметической, доверительный интервал. Достоверность различий между средними величинами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента (уровень значимости $p < 0,05$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Морфометрический анализ

Посредством морфометрии оценивали динамику изменения площади раны. Морфометрический анализ кожных ран первой части опыта показал, что иммуносупрессия, вызванная введением гидрокортизона, инфицирование и совместное действие данных факторов не приводили к статистически значимому снижению скорости эпителизации на первые-третьи сутки опыта. Разница в темпе заживления ран наблюдалась на пятые сутки от нанесения раны. Морфометрия площади раневого дефекта выявила наибольшее снижение скорости заживления ран при одновременном использовании гидрокортизона и инфицировании: у мышей данной группы площадь дефекта составила $78,1 \pm 15\%$ ($n=8$) от исходной площади раны, что указывало на развитие иммуносупрессии и осложнение течения раневого процесса. Тогда как крысы группы контроля отличались наилучшим заживлением и наличием ран площадью $47,5 \pm 15\%$ ($n=8$) (рис. 12).

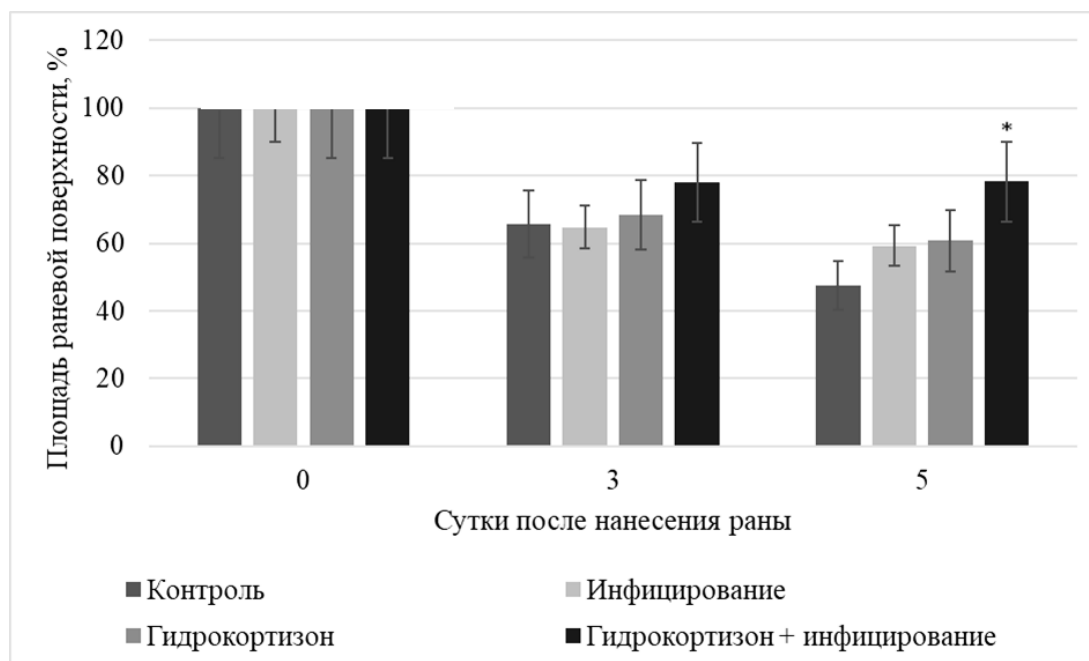


Рисунок 12 – Динамика заживления раневой поверхности у животных разных экспериментальных групп.

* – $p < 0,05$ относительно контрольной группы на 5-е сутки.

Морфометрический анализ площади ран группы животных при обработке кожных ран НПАД показал, что статистически значимого снижения скорости уменьшения раневого дефекта на первые-третьи сутки после нанесения раны выявлено не было. Скорость заживления раны в опытной группе была значительно выше, чем в контрольной на пятые сутки эксперимента: у мышей данной группы площадь раневого дефекта составила $47,1 \pm 15\%$ ($n=16$) от исходной площади раны. Животные контрольной группы характеризовались наличием ран площадью $73,5 \pm 15\%$ ($n=16$) (рис. 13).

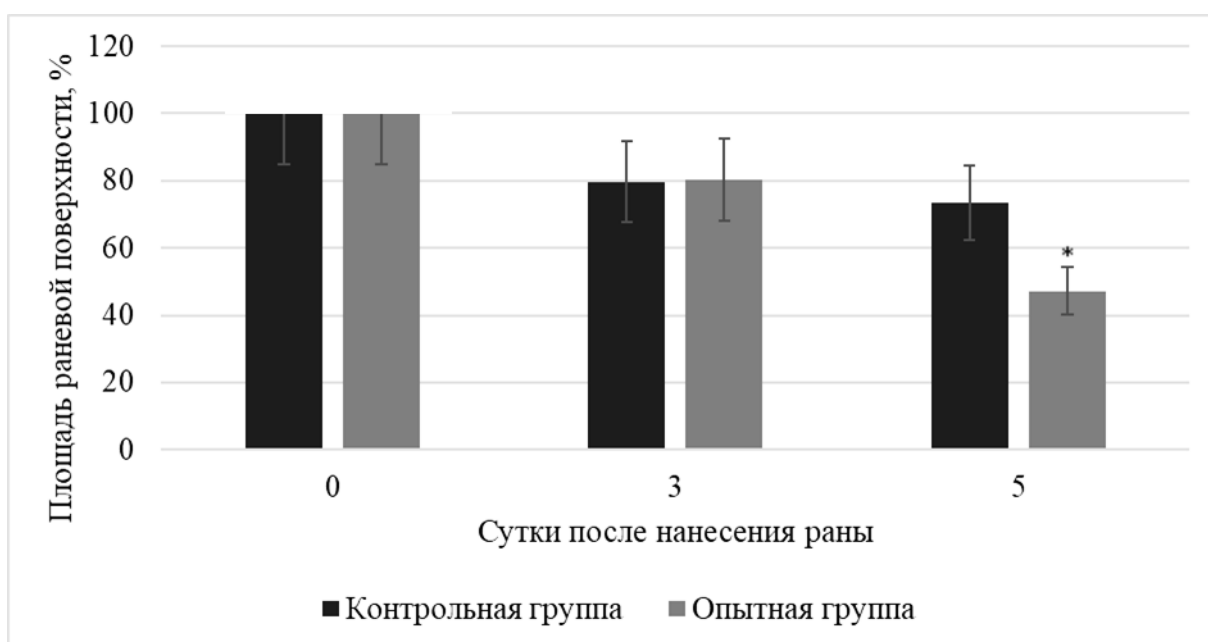


Рисунок 13 – Динамика заживления раневой поверхности у животных контрольной и опытной групп.

* – $p < 0,05$ относительно контрольной группы на 5-е сутки.

3.2. Сравнительный электронно-микроскопический анализ ультратонких срезов

Были изготовлены ультратонкие срезы кожных ран крыс из первой части эксперимента. В группе крыс с применением иммуносупрессии гидрокортизоном совместно с инфицированием раны на третьи сутки эксперимента выявлено большое число разрушенных бактериальных

клеток, расположенных между многослойными роговыми чешуйками. Под чешуйками расположены неструктурированные клетки эпидермиса (рис. 14). Данные изменения могут свидетельствовать о нарушении процесса заживления на данном участке раны.

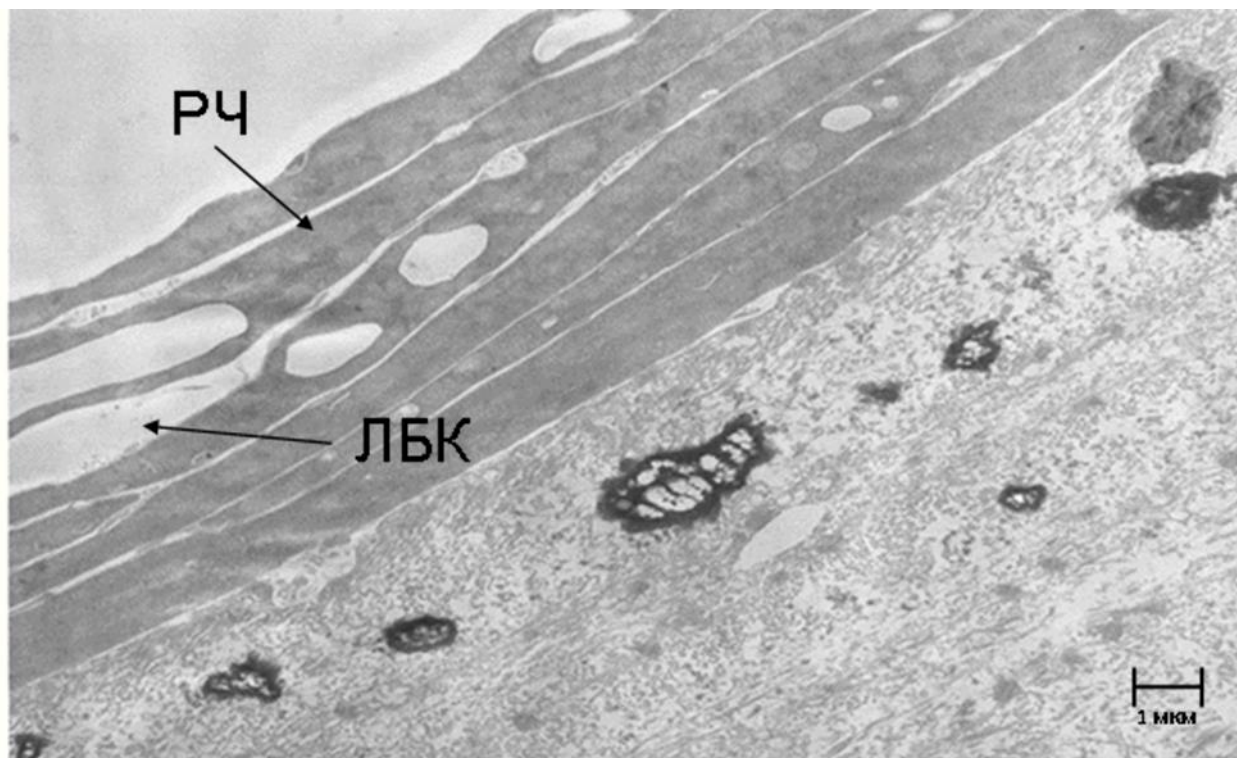


Рисунок 14 - Ультратонкий срез инфицированной раны мышцы в области края раны на третьей сутки опыта. Увеличение $\times 2000$. Обозначения: РЧ – роговые чешуйки, ЛБК – лизированные бактериальные клетки. Масштабная линейка – 1 мкм.

На ультратонком срезе фрагмента неинфицированной раны из группы контроля видны многослойные формирующиеся чешуйки. Между чешуйками расположено незначительное число разрушенных бактериальных клеток. Под чешуйками структурированные клетки - дегенерирующие клетки зернистого слоя эпидермиса (рис. 15).

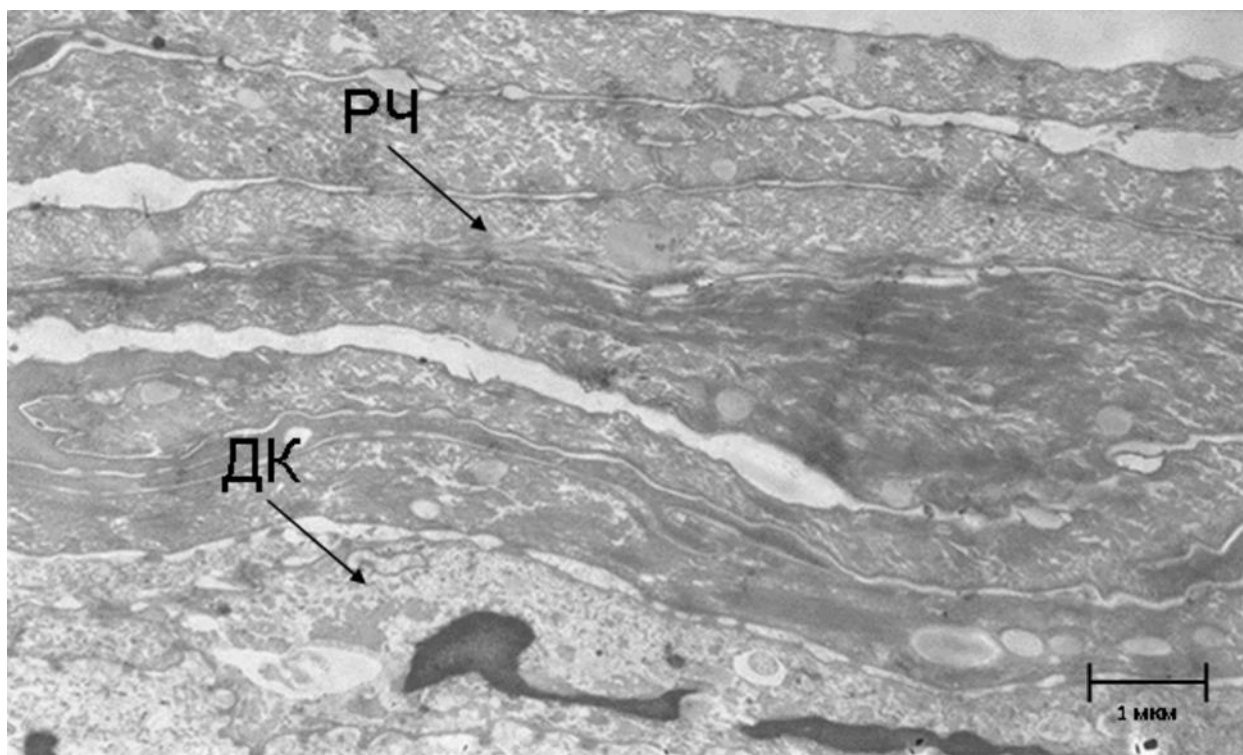


Рисунок 15 - Ультратонкий срез неинфицированной раны мыши в области края раны на третьей сутки опыта. Увеличение $\times 4000$. Обозначения: РЧ – роговые чешуйки, ДК – дегенерирующая клетка. Масштабная линейка – 1 мкм.

Были изготовлены ультратонкие срезы препаратов из второй части эксперимента при воздействии НПАД. На третьей сутки существенных отличий в строении кератиноцитов нарастающего эпителия в препаратах животных исследуемых групп выявлено не было (рис. 16, 17, 18). Клетки эпидермиса имели неправильную или округлую форму, крупное ядро с гетерохроматином. Также они характеризовались светлой цитоплазмой, содержащей рибосомы. Результаты исследования ультратонкого строения клеток нарастающего эпителия свидетельствуют о высоком уровне их биосинтетической активности.

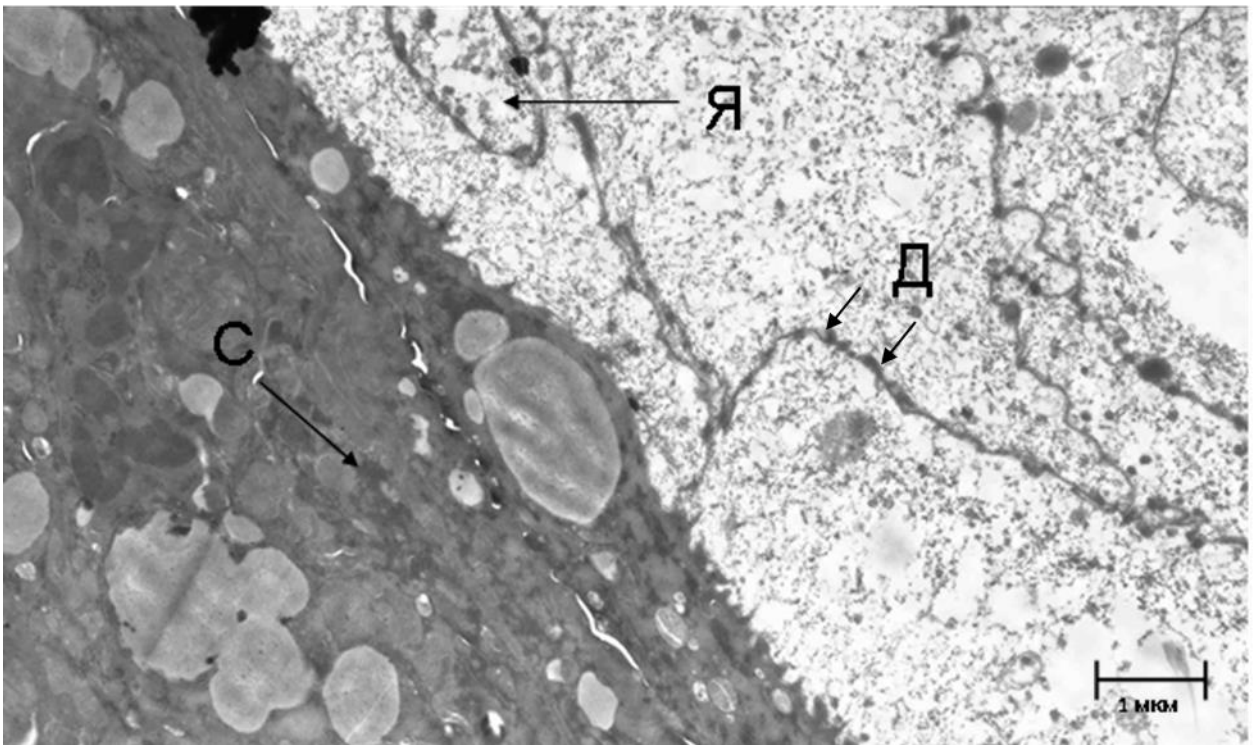


Рисунок 16 - Ультратонкий срез раны мышцы контрольной группы в области края раны на третьи сутки опыта. Увеличение $\times 5000$. Обозначения: Я – ядро кератиноцита, С – струп, Д – десмосомы. Масштабная линейка – 1 мкм.

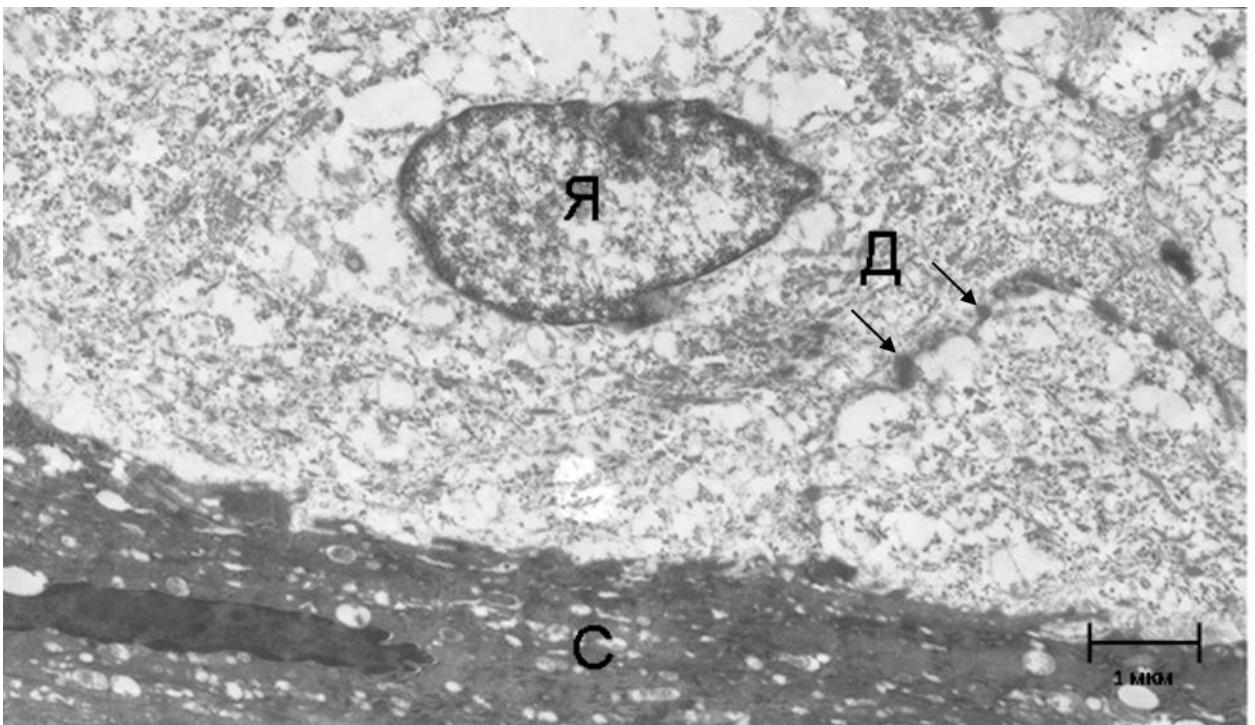


Рисунок 17 - Ультратонкий срез раны мышцы опытной группы в области края раны на третьи сутки опыта. Увеличение $\times 6000$. Обозначения: Я – ядро кератиноцита, С – струп, Д – десмосомы. Масштабная линейка – 1 мкм.

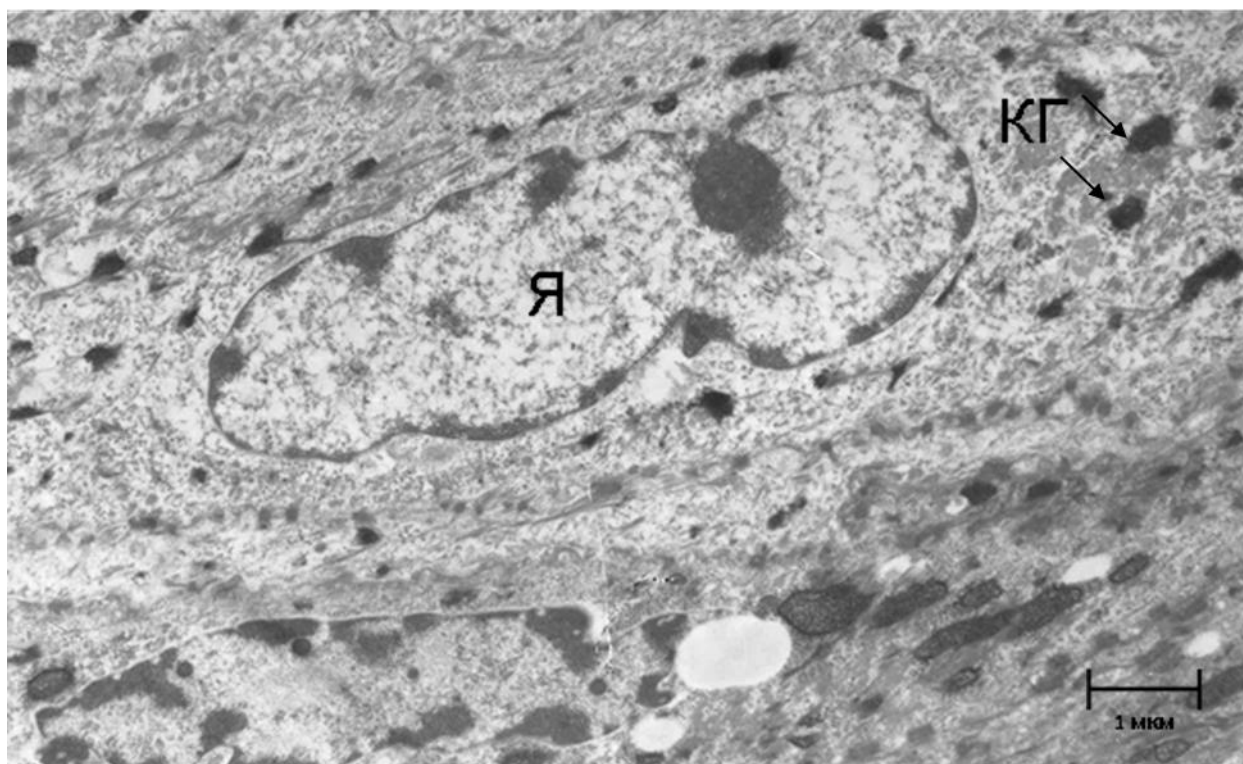


Рисунок 18 - Ультратонкий срез раны мышцы опытной группы в области края раны на третьи сутки опыта. Увеличение $\times 6000$. Обозначения: Я – ядро кератиноцита, КГ – кератогиалиновые гранулы, Д – десмосомы. Масштабная линейка – 1 мкм.

На поверхности, в толще струпа и под ним в контрольной группе отмечали рост бактериальных клеток и их скопления в виде колоний с образованием биопленок как на третий, так и на шестой день эксперимента (рис. 19). На шестые сутки также были выявлены группы деструктурированных бактериальных клеток в толще струпа (рис. 20). Полученные данные свидетельствуют об активном образовании биопленок при развитии иммунодепрессии на фоне введения гидрокортизона.

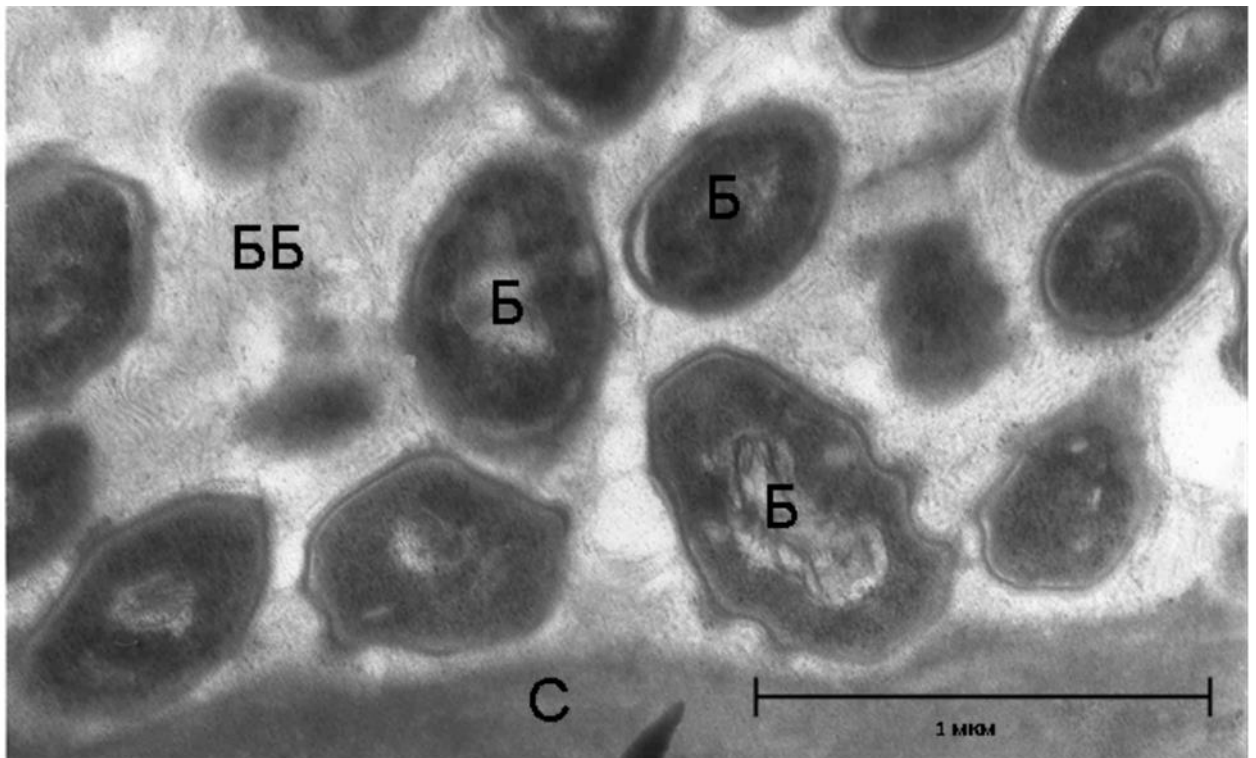


Рисунок 19 - Ультратонкий срез кожи мыши контрольной группы в области края раны на третьи сутки опыта. Увеличение $\times 20000$. Обозначения: С- струп, ББ – бактериальная биопленка, Б - бактерия. Масштабная линейка – 1 мкм.

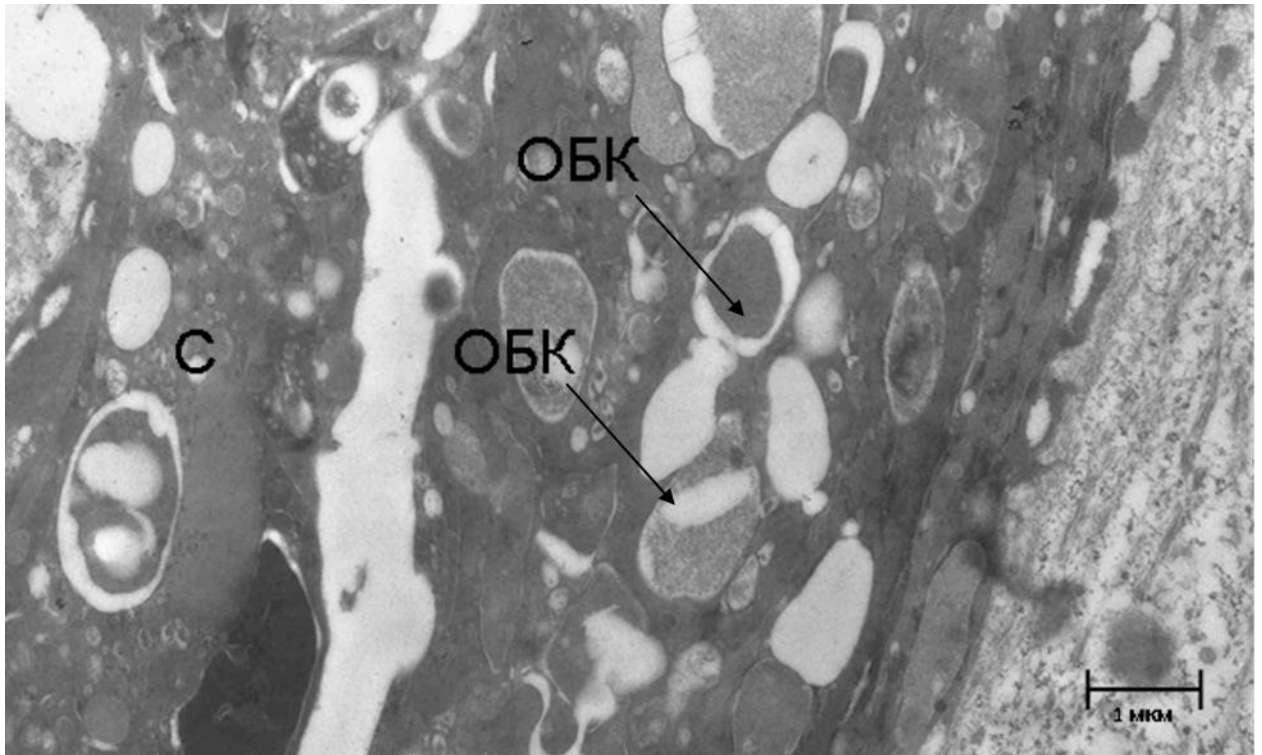


Рисунок 20 - Ультратонкий срез кожи мыши контрольной группы в области края раны на шестые сутки опыта. Увеличение $\times 6000$. Обозначения: С - струп, ОБК – остатки бактериальных клеток. Масштабная линейка – 1 мкм.

На ультратонких срезах группы мышей с обработкой НПАД на третий день эксперимента выявлены разрушенные бактериальные клетки - остатки бактериальной клеточной стенки, расположенные между слоями роговых чешуек (рис. 21, 22). На шестые сутки также выявлялись лизированные бактериальные клетки и крупные пустоты, заполненные клеточным детритом, в толще роговых чешуек (рис. 23). Развития биопленок после воздействия НПАД выявлено не было, что свидетельствует о бактерицидном воздействии НПАД.

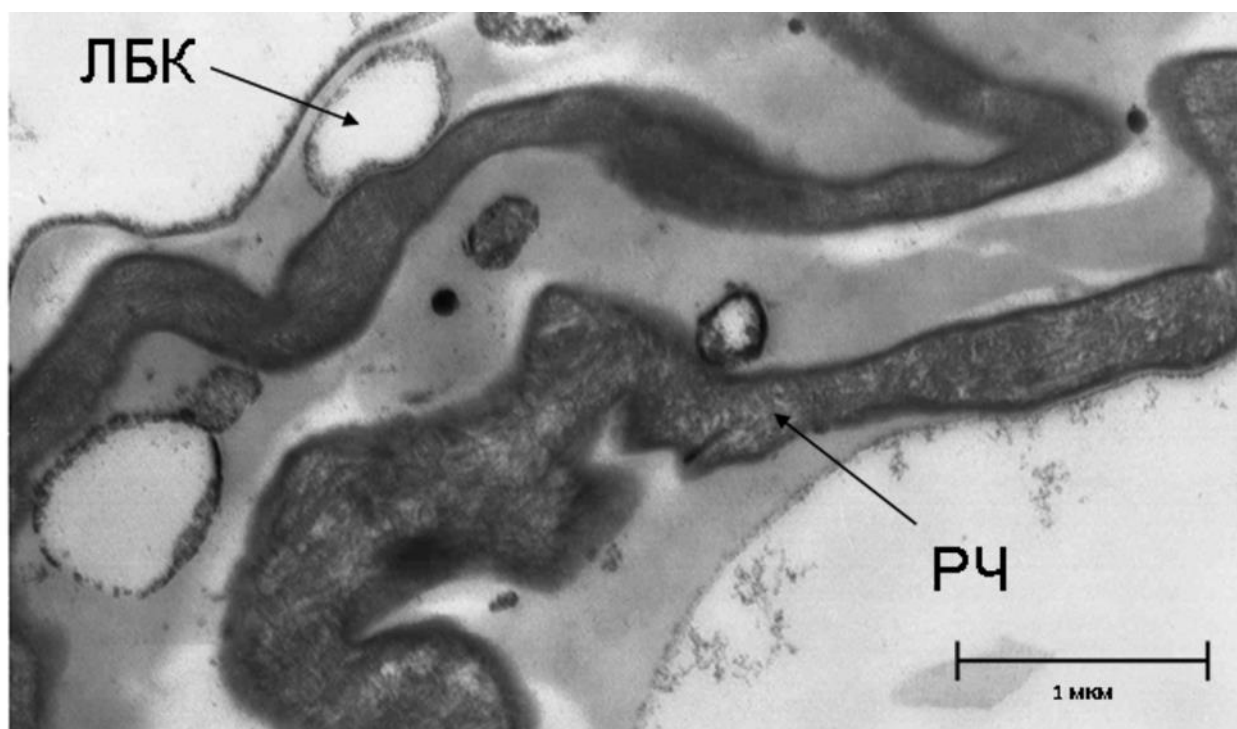


Рисунок 21 - Ультратонкий срез кожи мыши в области края раны после обработки НПАД на третьи сутки опыта. Увеличение $\times 10000$. Обозначения: РЧ – роговые чешуйки, ЛБК – лизированные бактериальные клетки. Масштабная линейка – 1 мкм.

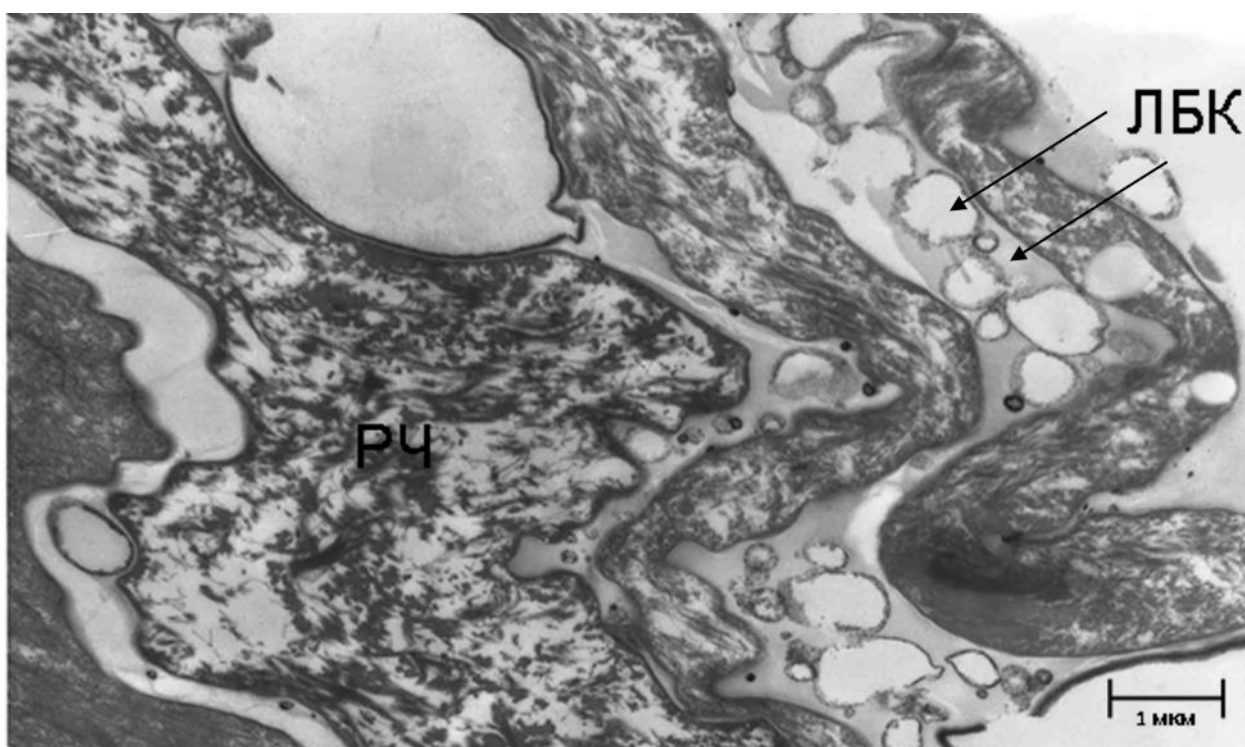


Рисунок 22 - Ультратонкий срез кожи мыши в области края раны после обработки НПАД на третьи сутки опыта. Увеличение $\times 6000$. Обозначения: РЧ – роговые чешуйки, ЛБК – лизированные бактериальные клетки. Масштабная линейка – 1 мкм.

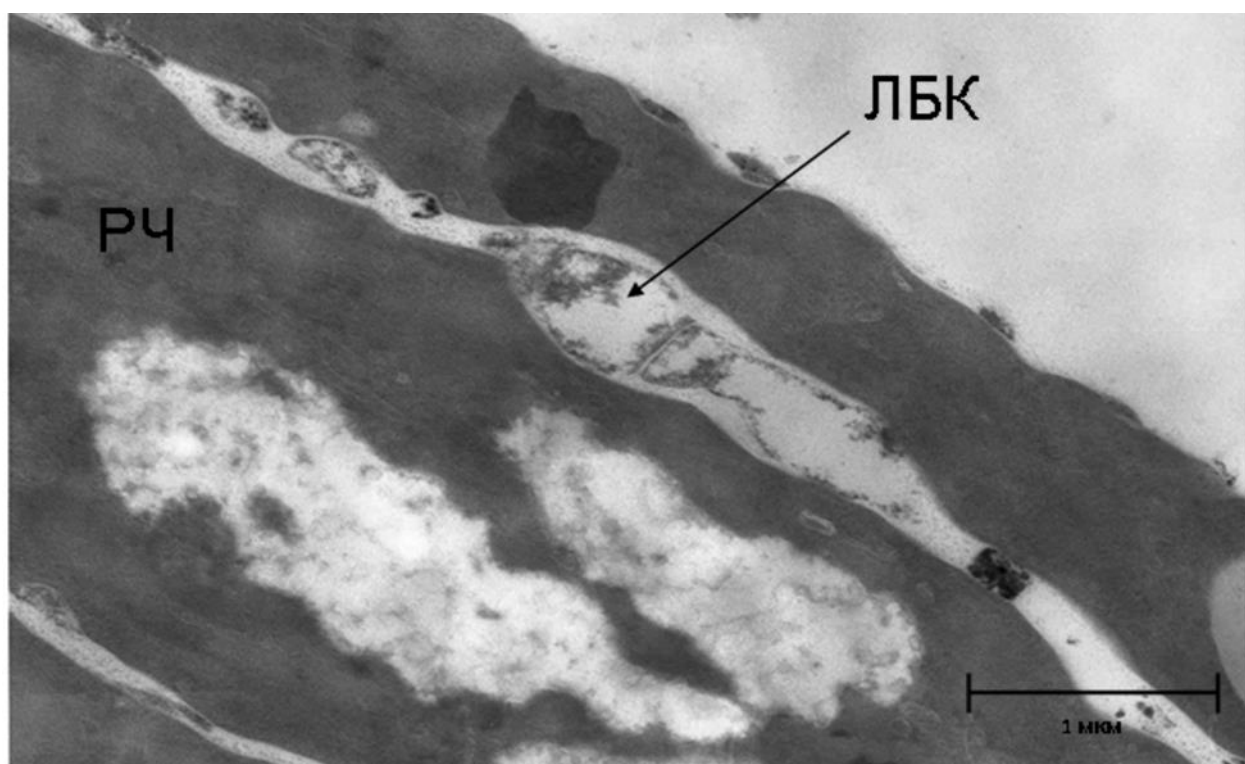


Рисунок 23 - Ультратонкий срез кожи мыши в области края раны после обработки НПАД на шестые сутки опыта. Увеличение $\times 10000$. Обозначения: РЧ – роговые чешуйки, ЛБК – лизированные бактериальные клетки. Масштабная линейка – 1 мкм.

На шестые сутки около ядра и цитоплазматической мембраны клеток зернистого слоя опытной группы в большом количестве отмечены крупные включения неправильной формы с высокой электронной плотностью, вероятно, гранулы кератогиалина (рис. 24, 25). Также клетки имели большое количество десмосом, расположенных в один ряд. Таким образом, ультраструктурная строение данных клеток свидетельствовало о достаточно высоком уровне метаболической активности и дифференцировки клеток. В контрольной группе выраженность кератогиалиновых гранул была меньшей (рис. 26).

Следует отметить, что деструктивных изменений в тканях, обработанных НПАД, обнаружено не было.

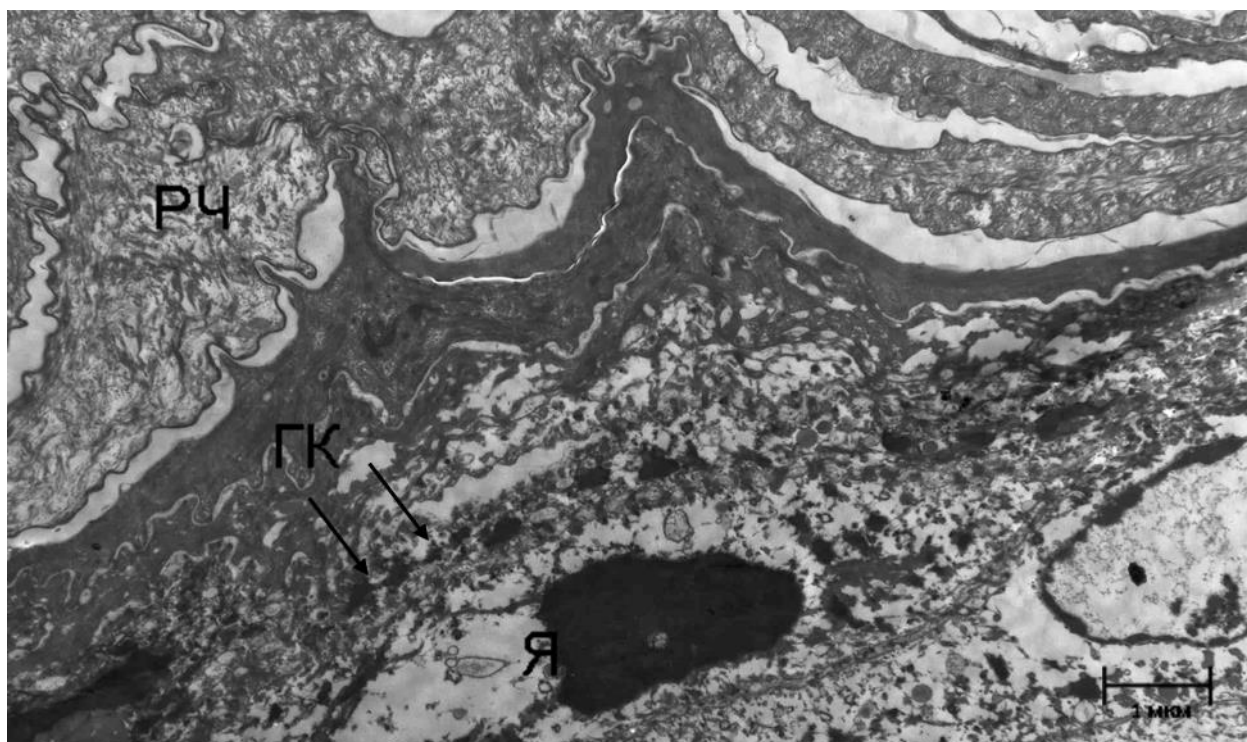


Рисунок 24 - Ультратонкий срез кожи мыши после воздействия НПАД на шестые сутки опыта. Зернистый слой. Увеличение x5000. Обозначения: Я – ядро кератиноцита, ГК – гранулы кератогиалина, РЧ – роговые чешуйки. Масштабная линейка – 1 мкм.

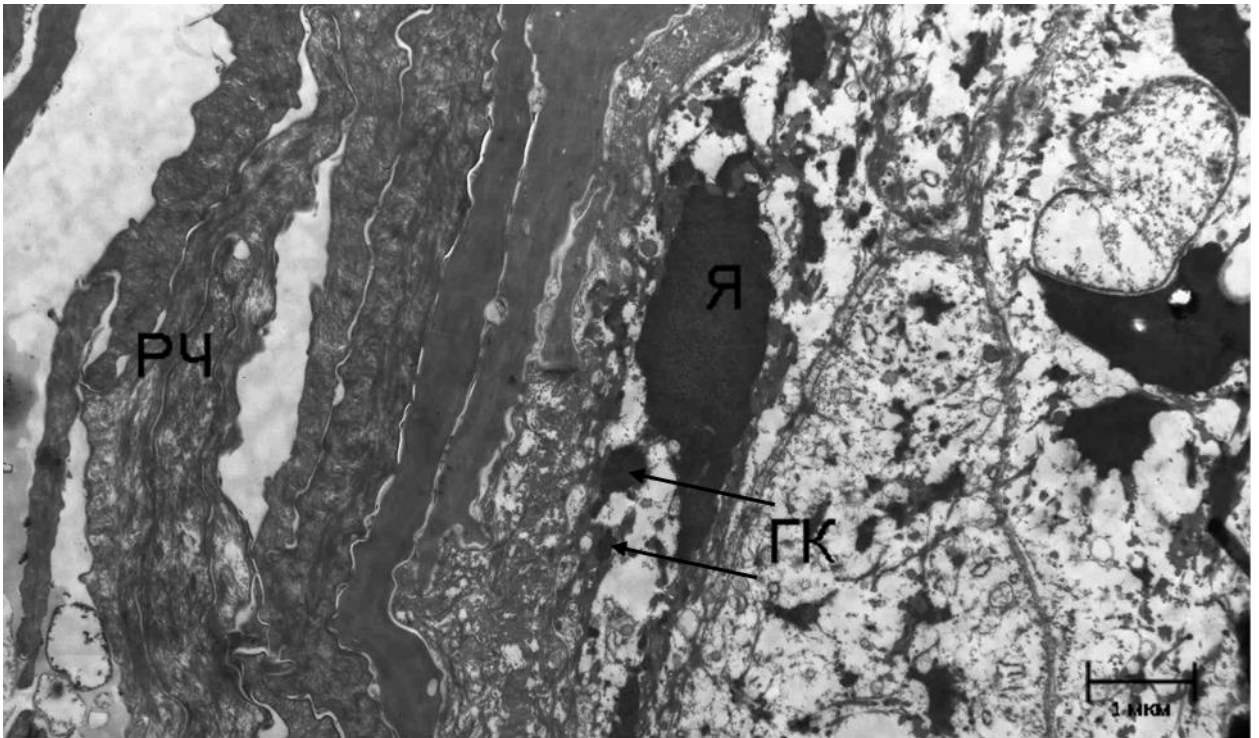


Рисунок 25 - Ультратонкий срез кожи мыши после воздействия НПД на шестые сутки опыта. Зернистый слой. Увеличение x5000. Обозначения: Я – ядро кератиноцита, ГК – гранулы кератогиалина, РЧ – роговые чешуйки. Масштабная линейка – 1 мкм.

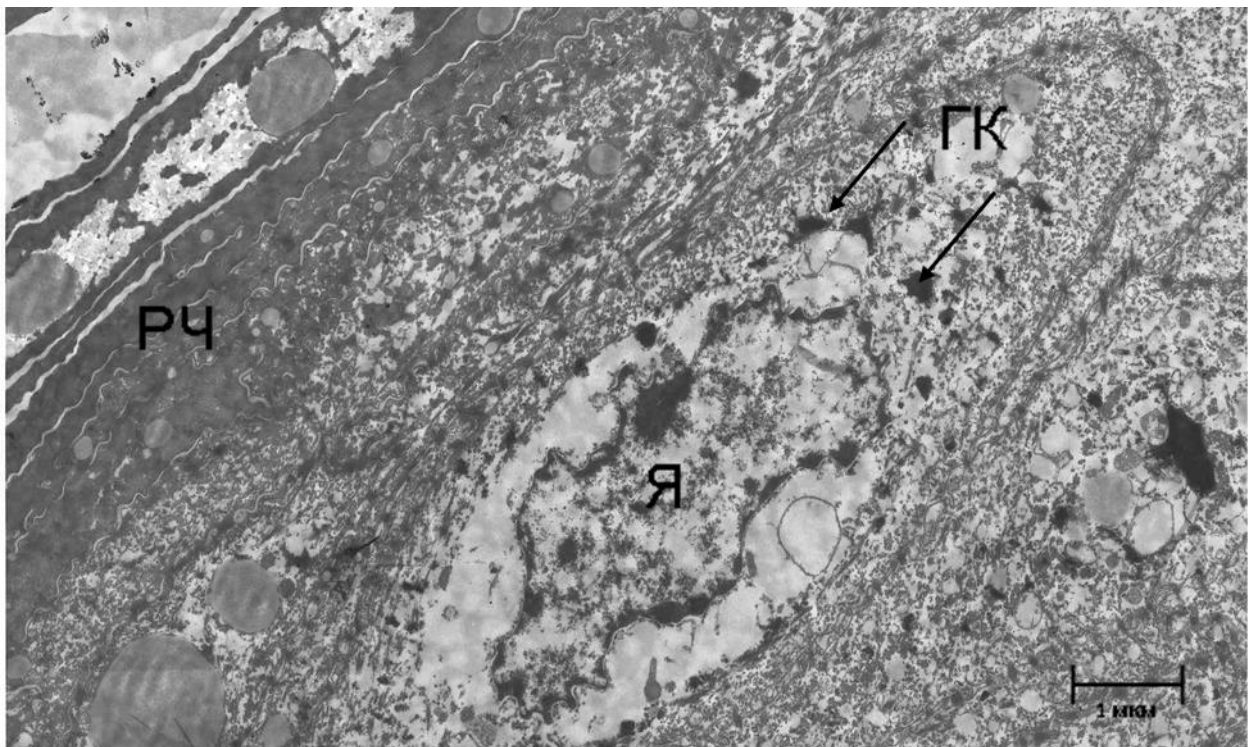


Рисунок 26 - Ультратонкий срез кожи мыши контрольной группы на шестые сутки опыта. Зернистый слой. Увеличение x5000. Обозначения: Я – ядро кератиноцита, ГК – гранулы кератогиалина, РЧ – роговые чешуйки. Масштабная линейка – 1 мкм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процесс заживления кожной раны является сложным процессом, требующим системного ответа иммунных клеток, гемопоэтических клеток и резидентных клеток кожи. Кроме того, одной из главных причин осложнения процесса заживления является развитие бактериальной инфекции. Несмотря на существование большого числа методов и подходов к лечению ран, в настоящее время остро стоит вопрос о необходимости новой концепции по предотвращению осложнений в виде воспаления раны и новой стратегии лечения хронических ран. Наиболее перспективным методом может являться применение низкотемпературной плазмы атмосферного давления на основе гелиевой плазменной струи.

Целью работы являлось определение влияния гелиевой плазменной струи атмосферного давления на морфофизиологические свойства тканей в инфицированных кожных ранах мышей и крыс. При этом оценивали динамику уменьшения площади раневой поверхности под влиянием низкотемпературной плазмы атмосферного давления с помощью измерения площади участка раны и исследовали действие гелиевой плазменной струи на ультраструктуру клеток тканей и микроорганизмов в области раны.

Для проведения работы была выбрана модифицированная модель осложненного течения раневого процесса у крыс и мышей на фоне иммуносупрессии, обусловленной действием гидрокортизона. Проводили морфометрические и электронно-микроскопические исследования раневых дефектов. Данные экспериментов показали, что применение холодной плазменной струи атмосферного давления на основе гелия способствовало ускорению эпителизации раневой поверхности вследствие деструкции бактериальных клеток и предотвращения развития биопленок на поверхности раны. Возможно, усиление регенерации кожи возникало

вследствие непосредственного действия плазменной струи на клетки нарастающего эпидермиса.

ВЫВОДЫ

1. При выборе раневой модели установлено, что наименьшая скорость регенерации раневого дефекта у животных наблюдалась на фоне иммуносупрессии, обусловленной введением гидрокортизона и одновременным инфицированием раны, при этом на пятые сутки с начала эксперимента площадь не заживших ран в опыте составляла $78,1 \pm 15\%$ от исходной, а в контроле раневая поверхность оставалась на $47,5 \pm 15\%$ площади.
2. Электронно-микроскопическими и морфометрическими методами установлено, что воздействие НПАД на раны способствует активации роста клеток эпителиального пласта и ускоряет регенерацию тканей кожного покрова животных.
3. Морфометрический анализ динамики заживления кожных ран мышей в течение пяти суток при обработке НПАД показал, что площадь ран в опытной группе составляла $47,1 \pm 15\%$ от исходной. В контроле на пятые сутки раны оставались не зажившими на $73,5 \pm 15\%$ площади.
4. На ультраструктурном уровне в тканях ран животных на шестые сутки обработки НПАД отмечено появление крупных включений гранул кератогиалина, большое количество десмосом и ряд морфологических свойств клеток, свидетельствующих об их высоком уровне метаболической активности и дифференцировке.
5. На электронно-микроскопическом уровне показано, что воздействие НПАД на кожные раны животных приводит к гибели бактерий на поверхности раны и в толще струпа, а также препятствует развитию биопленок в верхних слоях раневого дефекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балданов Б.Б. Источники неравновесной аргоновой плазмы на основе слаботоковых высоковольтных разрядов :Дис ... д-ра техн. наук: 01.04.04. - Томск, 2017. - 234 с.
2. Быков В.Л. Частная гистология человека (краткий обзорный курс). 2-е изд. - СПб.: СОТИС, 1997.
3. Варюшина Е.А. Модель осложненного течения раневого процесса у мышей на фоне иммуносупрессии, вызванной введением гидрокортизона / Е.А. Варюшина, М.А. Анциферова, Г.В. Александров [и др.] // Цитокины и воспаление - 2004. - Т. 4. - С. 14-20.
4. Гистология : атлас : учебное пособие / Л.К. Жункейра, Ж. Карнейро; пер. с англ. под ред. В.Л. Быкова. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 576 с.
5. Ефимов Е.А. Посттравматическая регенерация кожи / Е.А. Ефимов. - М.: Медицина, 1975.
6. Клиническая хирургия: национальное руководство: в 3 т. / под ред. В.С. Савельева, А.И. Кириенко. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. - Т.1. - 864 с.
7. Парамонов Б.А., Порембский Я.О., Яблонский В.Г. Ожоги: Руководство для врачей. - СПб.: СпецЛит, 2000. - 480 с.: ил.
8. Петров С.В. Общая хирургия. - СПб.: Издательство "Лань", 1999. - 672 с.
9. Практикум по общей гистологии: учебное пособие / Баскаков А.В., Обухов Д.К., Полевщиков А.В., Серговская Т.В., Харазова А.Д., отд. ред. д-р биол. наук проф. Полевщиков А.В. - СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2007. - 108 с.
10. Розломий, В.Л. Влияние интерлейкина-1 бета на регенерацию эпидермиса при заживлении кожных ран на фоне иммуносупрессии

- :Дис. ... кандидата медицинских наук : 03.03.04, 14.03.03. - Санкт-Петербург, 2011. - 150 с.
11. Рыбальченко О.В. Электронно-микроскопическое исследование межклеточных взаимодействий микроорганизмов при антагонистическом характере взаимоотношений / О.В. Рыбальченко // Микробиология. – 2006. - № 4. – С. 550-555.
 12. Шулутко А.М. NO-терапия у больных сахарным диабетом, осложненным гнойно-некротическими поражениями нижних конечностей /А.М. Шулутко, Н.В. Антропова, Ю.А. Крюгер // Хирургия. 2004. - №12. - С. 43—46.
 13. Birmingham J.G. Mechanisms of bacterial spore deactivation using ambient pressure nonthermal discharges / J.G. Birmingham // IEEE T Plasma Sci. -2004. – Vol. 3. – P. 1526–1531.
 14. Borena B.M. Regenerative Skin Wound Healing in Mammals: State-of-the-Art on Growth Factor and Stem Cell Based Treatments /B.M. Borena, A. Martens, S.Y. Broeckx, E. Meyer, K. Chiers, L. Duchateau, J.H. Spaas // Cell Physiol Biochem. - 2015. - Vol. 36. - P. 1-23.
 15. Cheng X. Synergistic effect of gold nanoparticles and cold plasma on glioblastoma cancer therapy / X. Cheng, W. Murphy, N. Recek, D. Yan, U. Cvelbar, A. Vesel, M. Mozetič, J. Canady, M. Keidar, J.H. Sherman // Journal of Physics D: Applied Physics. –2014. - Vol. 47
 16. Choi J.H. Analysis of sterilization effect by pulsed dielectric barrier discharge / J.H. Choi, I. Han, H.K. Baik, M.H. Lee, D.W. Han, J.C. Park, I.S. Lee, K.M. Song, Y.S. Lim // J Electrostat. – 2006. – Vol. 3. – P. 17-22.
 17. Clark R.A.F. Wound repair: Overview and general considerations. - The Molecular, Cellular Biology of Wound Repair, Plenum Press, New York, 1996. - P. 3-35.
 18. Dunn L. Murine Model of Wound Healing / L. Dunn, H.C. Prosser, J.T. Tan, L.Z. Vanags, M.K. Ng, C.A. Bursill //J. Vis. Exp. – 2013. – Vol. 75.

19. Fridman G. Applied plasma medicine / G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A.B. Shekhter, V.N. Vasilets, A. Fridman // Plasma Processes Polym. – 2008. – Vol. 3. – P. 503-533.
20. Goree J. Killing of S-mutans bacteria using a plasma needle at atmospheric pressure / J. Goree, B. Liu, D. Drake, E. Stoffels // IEEE Transactions on Plasma Science. – 2006. – Vol. 3. – P. 1317-1324.
21. Heinlin, J. Plasma medicine: possible applications in dermatology / J. Heinlin, G. Morfill, M. Landthaler, W. Stolz, G. Isbary, J.L. Zimmermann, T. Shimizu, S. Karrer // JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. – 2010. – Vol. 8. – P. 968-976.
22. Heise M. Sterilization of polymer foils with dielectric barrier discharges at atmospheric pressure / M. Heise, W. Neff, O. Franken, P. Muranyi // Wunderlich J. Plasmas Polym. – 2004. – Vol. 3. – P. 23-33.
23. Herrmann, H.W. Decontamination of chemical and biological warfare, (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet (APPJ) / H.W. Herrmann, et al. // Physics of Plasmas. – 1999. – Vol. 6. – Issue 5. – P. 2284-2289.
24. Hoffmann C. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology / C. Hoffmann, C. Berganza, J. Zhang // Medical Gas Research. - 2013. - P. 3-21.
25. Iozzo R.V. Basement membrane proteoglycans: from cellular to ceiling / Iozzo R.V. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol., - 2005. - Vol. 6.- P. 646-656.
26. Isbary G. A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients / G. Isbary, G. Morfill, H. Schmidt, M. Georgi, K. Ramrath, J. Heinlin, S. Karrer, M. Landthaler, T. Shimizu, B. Steffes, W. Bunk, R. Monetti, J. Zimmermann, R. Pompl, W. Stolz // British Journal of Dermatology. – 2010. – Vol. 163. – P. 78-82.
27. Jiang C. Nanosecond Pulsed Plasma Dental Probe / C. Jiang, M. Chen, A. Gorur, C. Schaudinn, D.E. Jaramillo, J.W. Costerton, P.P. Sedghizadeh,

- P.T. Vernier, M.A. Gundersen // Plasma Processes Polym. – 2009. – Vol. 6. – P. 479-483.
28. Joshi S.G. Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli* / S.G. Joshi, M. Cooper, A. Yost, M. Paff, U.K. Ercan, G. Fridman, G. Friedman, A. Fridman, A.D. Brooks // Antimicrob Agents Chemother. – 2011. – Vol. 55. – P. 1053-1062.
29. Kalghatgi S. Effects of Non-Thermal Plasma on Mammalian Cells / S. Kalghatgi, C.M. Kelly, E. Cerchar et al. // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6. - № 1.
30. Kaushik N.K. Altered Antioxidant System Stimulates Dielectric Barrier Discharge Plasma-Induced Cell Death for Solid Tumor Cell Treatment / N.K. Kaushik, N. Kaushik, D. Park, E.H. Choi // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9.
31. Keidar M. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy / M. Keidar, R. Walk, A. Shashurin // British Journal of Cancer. – 2011. – Vol. 105. – P. 1295-1301.
32. Kelly-Wintenberg K. Use of a one atmosphere uniform glow discharge plasma to kill a broad spectrum of microorganisms / K. Kelly-Wintenberg, A. Hodge, T.C. Montie, L. Deleanu, D. Sherman, J.R. Roth, P. Tsai, L. Wadsworth // J Vac Sci Technol A-Vacuum Surfaces and Films. – 1999. – Vol. 3. – P. 1539-1544.
33. Kieft I.E. Electrical and optical characterization of the plasma needle / I.E. Kieft, E.P. vdLaan, E. Stoffels // New J Phys. - 2004. - Vol. 6, №1. - P. 149-163.
34. Kim G.C. Air plasma coupled with antibody-conjugated nanoparticles: a new weapon against cancer / G.C. Kim, G.J. Kim, S.R. Park, S.M. Jeon, H.J. Seo, F. Iza, J.K. Lee // Journal of Physics D: Applied Physics. – 2009. – Vol. 42.

35. Koritzer J. Restoration of sensitivity in chemo-resistant glioma cells by cold atmospheric plasma / J. Koritzer, V. Boxhammer, A. Schafer, T. Shimizu, T.G. Klampfl, Y.F. Li, C. Welz, S. Schwenk-Zieger, G.E. Morfill, J.L. Zimmermann, J. Schlegel // *PloS one*. - 2013. - Vol. 8, №5.
36. Laroussi M. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric pressure plasmas: Review, analysis, and prospects / M. Laroussi // *IEEE T Plasma Sci*. – 2002. – Vol. 3. – P. 1409-1415.
37. Lee H.W. Tooth bleaching with nonthermal atmospheric pressure plasma / H.W. Lee, G.J. Kim, J.M. Kim, J.K. Park, J.K. Lee, G.C. Kim // *J Endod*. – 2009. – Vol. 35. – P. 587-591.
38. Mahasneh A. Inactivation of *Porphyromonas gingivalis* by low-temperature atmospheric pressure plasma / A. Mahasneh, M. Darby, S.L. Tolle, W. Hynes, M. Laroussi, E. Karakas // *Plasma Med*. – 2011. – Vol. 3. – P. 191-204.
39. Mertens N., Helmke A., Goppold A., Emmert S., Kaemling A., Wandke D. Low temperature plasma treatment of human tissue. Second International Conference on Plasma Medicine. San Antonio, Texas, USA, 2009.
40. Morris A.D. Cold plasma technology: bactericidal effects on *Geobacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus* microorganisms / A.D. Morris, G.B. McCombs, T. Akan, W. Hynes, M. Laroussi, S.L. Tolle // *J DentHyg*. – 2009. - Vol. 83. – P. 55-61.
41. Naldaiz-Gastesi N. Identification and Characterization of the Dermal Panniculus Carnosus Muscle Stem Cells / N. Naldaiz-Gastesiet al. // *StemCellReports*. – 2016. – Vol. 7. – P. 411-424.
42. Park B.J. Sterilization using a microwave-induced argon plasma system at atmospheric pressure / B.J. Park, D.H. Lee, J.C. Park, I.S. Lee, K.Y. Lee, S.O. Hyun, M.S. Chun // *Phys Plasmas*. – 2003. – Vol. 3. – P. 4539-4544.
43. Ross R. The fibroblast and wound repair. - *Biological Reviews*, 1968. - Vol. 43. - P. 51-91.

44. Schütze A. The atmospheric-pressure plasma jet: a review and comparison to other plasma sources / A. Schütze, J.Y. Jeong, S.E. Babayan, J. Park, G.S. Selwyn, R.F. Hicks // *IEEE Trans Plasma Sci.* - 1998. - Vol. 26, №3. - P. 1685-1694.
45. Stepanova O. Bactericidal Effect of DBD Plasma Jet Generated in Laminar and Pre-Turbulent Helium Flows / O. Stepanova, O. Rybalchenko, M. Pinchuk, A. Astafiev, O. Orlova, V. Spodobin, A. Kudryavtsev // *Plasma Medicine.* – 2017. – Vol. 7. – P. 187-200.
46. Trompeter F.J. Reduction of *Bacillus Subtilis* and *Aspergillus Niger* spores using nonthermal atmospheric gas discharges / F.J. Trompeter, W.J. Neff, O. Franken, M. Heise, M. Neiger, S.H. Liu, G.J. Pietsch, A.B. Saveljew // *IEEE T Plasma Sci.* – 2002. – Vol. 3. – P. 1416-1423.
47. Wilmink J.M. Second-intention repair in the horse and pony and management of exuberant granulation tissue / J.M. Wilmink, P.R. van Weeren // *Vet Clin N Am Equine Pract.* - 2005. - Vol. 21. - P. 15-32.
48. Wong V.W. Surgical Approaches to Create Murine Models of Human Wound Healing / V.W. Wong, M. Sorkin, J.P. Glotzbach, M.T. Longaker, G.C. Gurtner // *J. of Biomedicine and Biotechnology.* – 2011. – Vol. 2011.
49. Yan D. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality / D. Yan, J.H. Sherman, M. Keidar // *Oncotarget.* - 2017. - Vol. 8, №9. - P. 15977-15995.
50. Yang B. Oral bacterial deactivation using a low-temperature atmospheric argon plasma brush / B. Yang, J. Chen, Q. Yu, H. Li, M. Lin, A. Mustapha, L. Hong, Y. Wang // *J Dent.* – 2011. – Vol. 39. – P. 48-56.
51. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/ru/>, свободный. – Загл. с экрана.

52.Регистр лекарственных средств России [Электронный ресурс]. –
Режим доступа : https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_606.htm ,
свободный. – Загл. с экрана.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Опубликованные научные работы по теме ВКР

1. Порохняк И.Д., Астафьев А.М., Степанова О.М., Фонтуренко А.Ю. Воздействие плазменной струи барьерного разряда в потоке гелия на клетки *Escherichia Coli* M17 // *Фундаментальная наука и клиническая медицина: Тезисы XX международной медико-биологической конференции молодых исследователей.* – СПб.: Изд-во СПбГУ. - 2017. – С. 442-443.
2. Степанова О.М., Халикова Л.Р., Порохняк И.Д., Астафьев А.М., Орлова О.Г., Рыбальченко О.В., Кудрявцев А.А. Инактивация клеток *Escherichia Coli* M17 под действием гелиевой плазменной струи барьерного разряда в зависимости от скорости течения газа // *Тезисы докладов Второй российской конференции с международным участием “Физика – наукам о жизни”.* - СПб.: ФТИ им. А.Ф. Иоффе. - 2016. – С. 70.
3. Порохняк И.Д., Степанова О.М., Рыбальченко О.В. Воздействие низкотемпературной плазмы атмосферного давления на биопленки инфицирующих кожные раны микроорганизмов // *Цитокины и воспаление.* – 2017. – Т. 16. - № 3. – С. 94-95.
4. Порохняк И.Д., Астафьев А.М., Французова И.В. Воздействие гелиевой плазменной струи атмосферного давления на морфофизиологические свойства микроорганизмов и тканей кожных ран животных // *Фундаментальная наука и клиническая медицина: Тезисы XXI международной медико-биологической конференции молодых исследователей.* – СПб.: Изд-во СПбГУ. - 2018. – С. 344-345.