БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 1, с. 168–173

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 615.847 + 612.014

ВЛИЯНИЕ ГЕЛИЕВОЙ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ НА МИКРОЦИРКУЛЯЦИЮ В ОКОЛОРАНЕВОЙ ЗОНЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

© 2022 г. А.К. Мартусевич*, **, Е.С. Голыгина*, В.В. Назаров*, *, А.А. Епишкина*, К.С. Малышева***

**Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, 603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1*

***Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия, 603107, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 97*

****ФИЦ «Институт прикладной физики РАН», 603950, Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46*

E-mail: cryst-mart@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.11.2021 г.
После доработки 09.11.2021 г.
Принята к публикации 13.11.2021 г.

Оценено влияние гелиевой холодной плазмы на состояние микроциркуляции в околораневой зоне при экспериментальной термической травме. Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Вистар. Крысам под комбинированным наркозом моделировали контактный термический ожог на площади 20% поверхности тела. У крыс экспериментальной группы, начиная со вторых суток после травмы, ожоговую поверхность равномерно обрабатывали потоком холодной гелиевой плазмы в течение одной минуты (три ежедневных процедуры, расстояние до поверхности кожи – 15 мм.). Холодную плазму генерировали с применением аппарата, созданного в ФИЦ «Институт прикладной физики РАН» (Нижний Новгород). Изучали влияние обработки плазмой на состояние микроциркуляции в околораневой зоне на четвертые сутки после нанесения контактного термического ожога методом лазерной допплеровской флоуметрии на аппарате «ЛАКК-М». Установлено, что при моделировании термической травмы показатель микроциркуляции в околораневой зоне статистически значимо снижается по отношению к здоровым животным (в 1.97 раза). Напротив, обработка раневой поверхности плазмой способствует стимуляции кровотока в микрососудах в рассматриваемой области (на четвертые сутки после нанесения ожога – 72.9% относительно контрольной группы). Таким образом, использование в раннем послеожоговом периоде (вторые-четвертые сутки с момента нанесения травмы) обработки раневой поверхности гелиевой холодной плазмой оказывает положительное влияние на состояние микроциркуляции в околораневой зоне, способствуя интенсификации кровотока за счет NO-зависимых и нейрогенных механизмов и частичному купированию признаков «феномена обкрадывания» в ней.

Ключевые слова: холодная гелиевая плазма, микроциркуляция, термическая травма.

DOI: 10.31857/S0006302922010185

В последние десятилетия отмечается значительный интерес исследователей и клиницистов к потенциальным эффектам холодной плазмы – особого состояния ионизированного газа, охлажденного до температуры, близкой к физиологическим значениям (30–40°C) [1–3]. Наиболее существенные результаты в этом направлении были достигнуты в отношении антибактериальной активности рассматриваемого фактора [1, 4–6], причем подобное действие было продемонстрировано как в условиях *in vitro* (на выделенных культурах микроорганизмов [3–7]), так и *in vivo* (на моделях экспериментальных инфицированных ран [7, 8]).

С другой стороны, абсолютным большинством специалистов изучаются свойства так называемой «атмосферной холодной плазмы», в которой ионизируемым газом служит воздух [1–3, 5, 8]. Это обстоятельство существенно затрудняет стандартизацию биологических эффектов рассматриваемого воздействия, так как компонентный состав атмосферного воздуха вариабелен. В то же время работы, посвященные использованию моногаза (аргона, гелия) для генерации холодной плазмы, единичны [4, 7, 9]. В связи с этим целесообразным представляется уточнение биологических и саногенетических эффектов моно-

компонентной холодной плазмы, в том числе на моделях патологических состояний [9, 10].

С учетом вышеперечисленного целью работы явилась оценка влияния гелиевой холодной плазмы на состояние микроциркуляции в околораневой зоне при экспериментальной термической травме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на 30 белых крысах-самцах линии *Wistar* (возраст – 12–14 мес., масса – 200–250 г), полученных из филиала «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА РФ (Москва). Всех животных содержали в стандартных условиях вивария в клетках при свободном доступе к пище и воде на рационе питания согласно нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ».

Все животные были разделены на три равные группы. Первая группа из 10 животных была интактной, с ними не проводили никаких манипуляций, кроме однократного изучения параметров микроциркуляции на предварительно эпилированном участке кожи спины. Крысам второй и третьей групп (n = 10 в каждой) под комбинированным наркозом (15 мг/кг золетила 50 и 1 мг/мг ксила вет) моделировали по собственной методике [10] контактный термический ожог той же локализации нагретой до 400°С пластиной, соответствующей по площади 20% поверхности тела (экспозиция – 3 с., глубина ожога – II степень, без поражения росткового слоя кожи). У крыс третьей группы, начиная со второго дня после травмы, ожоговую поверхность равномерно обрабатывали потоком холодной гелиевой плазмы в течение 1 мин. Схема эксперимента представлена на рис. 1. Расстояние от «плазменного факела» до поверхности кожи животного составляло 15 мм. Проводили три ежедневных процедуры. В течение процедуры «плазменным факелом» последовательно обрабатывали всю поверхность раны. Холодную плазму генерировали с применением аппарата собственной конструкции, созданного в ФИЦ «Институт прикладной физики РАН» (Нижний Новгород). Прибор генерирует низкотемпературную холодную плазму атмосферного давления в среде инертного газа (гелий, аргон, неон, криптон) с температурой 30–45°С. Конструктивно прибор выполнен в виде моноблока управления и подключенного к нему посредством гибкого шланга аппликатора, в котором генерируется холодная плазма. Встроенный в моноблок контроллер управления позволяет контролировать и регулировать параметры холодной плазмы. Энергия, необходимая для создания плазмы, поступает от блока управления к аппликатору в виде импульсов с амплитудой 10 кВ и длительностью

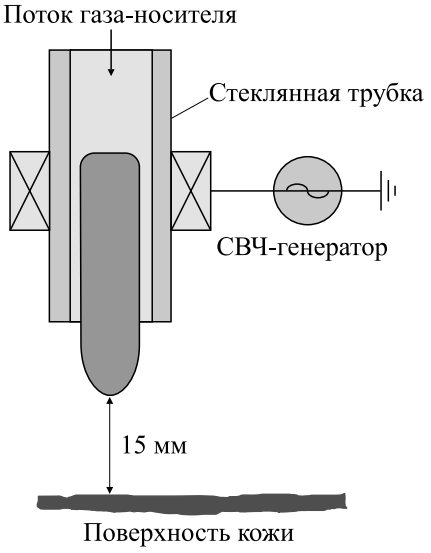

Рис. 1. Схема эксперимента.

2.5 мкс с регулируемой скважностью. Для передачи энергии используется радиочастотный кабель РК 50-2-22, проходящий внутри шланга для подачи рабочего газа. Длительность импульса – 2.5 мкс, скважность – 10. Мощность, вкладываемая в создание плазмы, влияет на степень ионизации газа. В приборе предусмотрена плавная регулировка мощности от 10 до 100% от максимального уровня. Потребляемая мощность не превышает 50 Вт, источник – однофазная сеть 220 В/50 Гц. Рабочий газ из баллона через газовый редуктор под давлением от 1.5 до 4.0 атм подается на рабочий аппликатор через блок управления со встроенным датчиком расхода газа для контроля и регулирования потока плазмы в соответствии с заданным уровнем, регулируемым в пределах 0.2–4.0 л/мин. Исходный газ – гелий (99% чистоты).

Состояние микроциркуляции регистрировали в околораневой зоне (2–3 мм от края раны) после проведения трех процедур обработки (на четвертые сутки послеожогового периода) методом лазерной допплеровской флоуметрии на аппарате «ЛАКК-02» (НПО «Лазма», Москва) [11]. Запись ЛДФ-граммы продолжали в течение 3 мин. Анализ данной ЛДФ-граммы позволял рассчитать показатель микроциркуляции, характеризующий усредненную интенсивность кровотока по сосудам малого диаметра за указанный период. Показатель микроциркуляции представляет собой среднее арифметическое значение параметра микроциркуляции, измеряемого в перфузионных единицах. Расчет проводили с помощью встроенного программного обеспечения комплекса. Кроме того, на основании амплитудно-частотного анализа колебаний интенсивности микроцир-

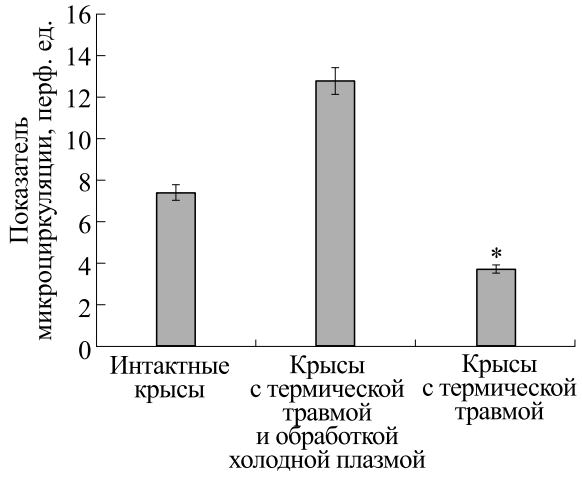

Рис. 2. Показатель микроциркуляции у здоровых и обожженных животных с учетом проведения обработки холодной гелиевой плазмой; * – различия с уровнем интактных крыс статистически значимы, $p < 0.05$.

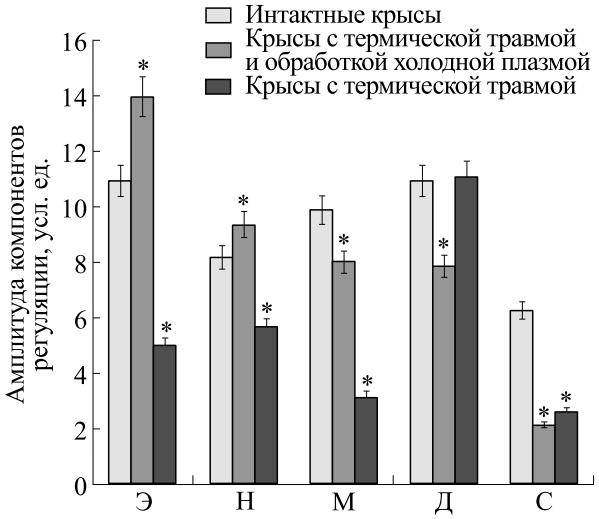

Рис. 3. Амплитуда компонентов регуляции микроциркуляции у здоровых и обожженных животных с учетом проведения обработки холодной гелиевой плазмой; Э – эндотелиальный, Н – нейрогенный, М – миогенный, Д – дыхательный и С – сердечный компоненты; * – различия с уровнем интактных крыс статистически значимы, $p < 0.05$.

куляции (по соответствующим частотным диапазонам) были определены амплитуды внутренних (эндотелиальный, нейрогенный и миогенный) и внешних (дыхательный и сердечный) факторов регуляции. Также по их соотношению с помощью встроенного программного обеспечения был рассчитан показатель шунтирования, указывающий на степень участия шунтирующих путей в обеспечении микроциркуляции. Подобный подход полностью соответствовал методологии, заложенной разработчиками данной технологии [11]. Границы всех частотных диапазонов были откорректированы в соответствии с нормативами, описанными для крыс [12].

Полученные данные были обработаны статистически в программном пакете Statistica 6.1 for Windows. Данные представляли в виде среднего значения и среднеквадратичного отклонения. Нормальность распределения значений параметров оценивали с использованием критерия Шапиро–Уилка. С учетом характера распределения признака для оценки статистической значимости различий применяли *H*-критерий Краскала–Уоллеса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Основным регистрируемым параметром при проведении лазерной допплеровской флоуметрии является показатель микроциркуляции. Установлено, что при моделировании термической травмы значение этого показателя в околораневой зоне существенно снижается относительно здоровых животных (в 1.97 раза; $p < 0.05$). Напротив, обработка раневой поверхности на четвертые сутки после нанесения ожога способствует стимуляции кровотока по микрососудам в рассматриваемой области (на 72.9% относительно контрольной группы; $p < 0.05$). Это свидетельствует о положительном влиянии гелиевой холодной плазмы на интенсивность микроциркуляции (рис. 2).

Анализ факторов регуляции позволил уточнить механизмы обнаруженного эффекта (рис. 3). Выявлено, что для эндотелиального компонента регуляции, отражающего высвобождение эндотелиоцитами монооксида азота, тенденция сдвига полностью аналогична динамике ПМ. Так, у крыс, которым проводили обработку раны холодной плазмой, амплитуда эндотелиального фактора возрастала на 28% ($p < 0.05$), тогда как без применения рассматриваемого воздействия снижалась на 54% относительно контрольной группы ($p < 0.05$). Похожие изменения регистрировали и для нейрогенного компонента: при использовании гелиевой холодной плазмы наблюдали увеличение показателя на 14.6% по сравнению с интактными крысами ($p < 0.05$), а у животных, которым только наносили термическую травму – уменьшение значения параметра (на 30.1%; $p < 0.05$).

По миогенному фактору в обеих основных группах отмечали единую тенденцию к снижению его амплитуды, однако она была выражена в различной степени. Так, при локальном воздей-

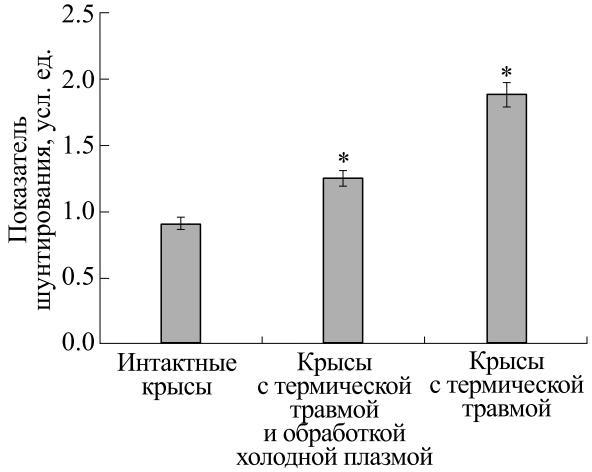

Рис. 4. Показатель шунтирования у здоровых и обожженных животных с учетом проведения обработки холодной гелиевой плазмой; * – различия с уровнем интактных крыс статистически значимы, $p < 0.05$.

ствии холодной плазмы указанный сдвиг относительно здоровых животных был минимальным (–19.3%; $p < 0.05$), тогда как крысы, которых не подвергали действию рассматриваемого фактора, демонстрировали резкое снижение уровня показателя (в 3.10 раза; $p < 0.05$).

Оценка влияния холодной плазмы на «внешние», пассивные факторы регуляции кровотока по микрососудам позволила выявить иные закономерности по сравнению с описанными выше активными факторами (рис. 3). Так, по дыхательному компоненту в случае обработки раны холодной плазмой обнаружено значимое снижение относительно интактных крыс (на 28.1%; $p < 0.05$), а в отсутствие данного воздействия амплитуда указанного фактора сохранялась на уровне здоровых животных. Это, по нашему мнению, свидетельствует о компенсаторной, индуцированной холодной плазмой перестройке регуляторного баланса микроциркуляции в сторону внутрисосудистых компонентов, тогда как при стандартном течении раневого процесса происходит смещение превалирующей роли к «внешним» механизмам, что может рассматриваться как негативная тенденция.

Сердечный компонент регуляции, связанный с участием пульсовой волны в обеспечении микроциркуляции, однотипно снижается в обеих основных группах (в 2.92 и 2.38 раза соответственно для крыс, получавших обработку холодной плазмой и не получавших таковой; $p < 0.05$ для обоих случаев). При этом межгрупповые различия по данному показателю статистически незначимы.

Также нами проведен анализ вовлеченности шунтирующих путей в сброс крови вне микроциркуляторного русла у животных в послеожоговом периоде в зависимости от применения гелиевой холодной плазмы на основании изучения показателя шунтирования. Установлено, что у крыс при стандартном течении раневого процесса данный показатель возрастает в 2.07 раза по сравнению со здоровыми животными ($p < 0.05$; рис. 4), что свидетельствует о формировании в околораневой зоне «феномена обкрадывания» [11]. Напротив, при проведении экспериментальной обработки раны холодной плазмой фиксировали менее выраженный прирост показателя шунтирования (на 37.4% относительно контрольной группы; $p < 0.05$). Это указывает на более рациональное распределение кровотока между капиллярным нутритивным руслом и артерио-венозными шунтами в случае воздействия изучаемого фактора.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время изучение биологического действия холодной плазмы на различные биообъекты преимущественно ограничивается оценкой локальных эффектов данного фактора [1, 6, 7]. Он связан с повреждающим влиянием образующихся в процессе обработки холодной плазмой высоких концентраций радикалов, в том числе – активных форм кислорода [2]. Именно на этом принципе базируется антибактериальный эффект, наиболее часто находящий применение для данного физического фактора [1, 4, 5]. В то же время имеются единичные работы, в которых указывается четкое дозозависимое влияние времени обработки на концентрацию генерирующихся радикалов [3, 8], причем при крайне не-

продолжительном воздействии она соответствует физиологическому диапазону [2]. Однако эффекты подобных режимов применения холодной плазмы практически неизвестны, тем более – на системном (организменном) уровне [7]. В связи с этим важным представлялось установить их наличие на примере наиболее чувствительной системы – гемодинамики, в нашем случае – микроциркуляции. Выявлено, что при моделировании ожоговой раны в околораневой зоне наблюдаются негативные перестройки кровотока по сосудам малого диаметра, заключающиеся не только в снижении интегрального параметра – показателя микроциркуляции, но и изменении баланса регуляторных факторов в сторону внесосудистых. Это проявляется в угнетении эндотелиального компонента, который, по мнению авторов метода, связан с высвобождением монооксида азота сосудистой стенкой [11] на фоне активации дыхательного фактора. Кроме того, при экспериментальной термической травме в околораневой зоне резко возрастает показатель шунтирования, что свидетельствует об увеличении сброса крови из артериального в венозное русло, минуя капилляры, формируя «феномен обкрадывания» тканей [11, 12].

Курсовая обработка ожоговой раны холодной гелиевой плазмой приводила к восстановлению кровотока по микрососудам вплоть до его стимуляции, что обеспечивалось приростом эндотелиального компонента, косвенно указывающего на вазодилятирующий эффект изучаемого воздействия. Аналогичная динамика имела место в отношении нейрогенного компонента, а по миогенному его угнетение, связанное с травмой, частично компенсировалось. Напротив, активность внесосудистых факторов регуляции (дыхательного и сердечного) компенсаторно снижалась. Также важно отметить, что экспериментальная терапия ожоговой раны холодной гелиевой плазмой способствовала частичному купированию возникающего в этом случае «феномена обкрадывания». Все вышеперечисленное позволяет положительно характеризовать влияние гелиевой холодной плазмы на состояние микроциркуляции в околораневой зоне ожога.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили установить, что использование в раннем послеожоговом периоде (вторые-четвертые сутки с момента нанесения травмы) процедур обработки раневой поверхности гелиевой холодной плазмой оказывает положительное влияние на состояние микроциркуляции в околораневой зоне, способствуя интенсификации кровотока за счет NO-зависимых и нейрогенных механизмов и частичному купированию признаков «феномена обкрадывания» в ней.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-00652).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа с животными соответствовала правилам Европейской Конвенции ET/S 129, 1986 и директивам 86/609 ESC. Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями локального этического комитета Университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (протокол № 3 от 18.02.2018 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Y. Alkawareek, S. P. Gorman, W. G. Graham, and B. F. Gilmore, Int. J. Antimicrob. Agents **43**, 154 (2014).
2. D. Dobrynin, D. Fridman, G. Friedman, and A. Fridman, New J. Phys. **11**, 1 (2009).
3. T. Von Woedtke, S. Reuter, K. Masur, and K. D. Weltmann, Phys. Rep. **530**, 291 (2013).
4. Б. Б. Балданов, Ц. Р. Ранжуров, Ч. Н. Норбоев и др., Вестн. ВСГУТУ **4**, 56 (2015).
5. N. H. Alshraiedeh, S. Higginbotham, P. B. Flynn, et al. Int. J. Antimicrob. Agents **47**, 446 (2016).
6. P. B. Flynn, A. Busetti, E. Wielogorska, et al., Sci. Rep. **6**, 26320 (2016).
7. S. A. Ermolaeva, A. F. Varfolomeev, M. Yu. Chernukha, et al. J. Med. Microbiol. **60**, 75 (2011).
8. C. Wiegand, S. Fink, O. Beier, et al. Skin Pharmacol. Physiol. **29**, 257 (2016).
9. А. К. Мартусевич, А. Г. Соловьева, Д. В. Янин и др., Вестн. новых мед. технологий **24** (3), 163 (2017).
10. A. K. Martusevich, A. G. Galka, and E. S. Golygina, Plasma Medicine **10** (2), 113 (2020).
11. А.И. Крупаткин и В. В. Сидоров, *Лазерная допплеровская флоуметрия микроциркуляции крови* (Медицина, М., 2005).
12. F. Bajrovic, M. Čenčur, M. Hožič, et al., Pflügers Arch. **439**, 158 (2000).
13. A. V. Vorobyov, A. K. Martusevich, A. G. Solovyova, et al., Bull. Exp. Biol. Med. **147** (4), 424 (2009).

The Effect of Cold Helium Plasma on Microcirculatory Flow in the Peri-Wound Area After Experimental Thermal Injury

A.K. Martusevich*, **, E.S. Golygina*, V.V. Nazarov*, *, A.A. Epishkina*, and K.S. Malysheva***

**Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, pl. Minina i Pojarskogo 10/1, Nizhny Novgorod, 603005 Russia*

***Nizhny Novgorod State Agricultural Academy, prosp. Gagarina 97, Nizhny Novgorod, 603107 Russia*

****Federal Research Center "Institute of Applied Physics", Russian Academy of Sciences, ul. Ulyanova 46, Nizhny Novgorod, 603950 Russia*

This study aimed at evaluating the effect of cold helium plasma on the indices of microcirculatory flow in the peri-wound area after experimental thermal injury. The experiments were performed with male Wistar rats. After combined exposure to anesthetics, thermal burn was simulated in contact with the rat skin affecting 20% of the total body surface area. On day 2 after burn induction, injuried tissues of rats from the experimental group were treated in a smooth and even manner with a cold helium plasma jet located at a distance of 15 mm from the skin of the rat for 1 min (3 daily procedures). Cold plasma was generated using a device designed at the Institute of Applied Physics of the Russian Academy of Sciences (Nizhny Novgorod). We studied the effect of cold helium plasma on the indices of microcirculatory flow in the peri-wound area on day 4 after injury and evaluated changes by using laser Doppler flowmetry (the LAKK-M device). It was found that during simulation of thermal injury, an observed reduction (1.97 times) in the index of microcirculatory flow in the peri-wound area is statistically significant relative to healthy animals. On the contrary, treatment of the wound surface on day 4 after burn induction stimulates blood flow in microvessels in the area under study (by 72.9% relative to a control group). Thus, the local use of cold helium plasma for treatment of injured tissues (on days 2 to 4 after injury) causes a positive effect on the index of microcirculatory flow in the peri-wound area thereby intensifying blood flow through NO-dependent and neurogenic mechanisms and contributing to partial elimination of «the phenomenon of theft».

Keywords: cold helium plasma, microcirculation, thermal injury