

# **Разработка устройства и технологии элиминации микробных биопленок в хирургии**

## **1) Соответствие проекта тематике заявленной научной платформы**

Несмотря на широкое распространение высоких технологий в современной медицине, проблема профилактики и лечения инфекционных заболеваний, а также осложнений инвазивных вмешательств до настоящего времени относится к числу приоритетных задач хирургии. Известно, что одним из наиболее древних и совершенных механизмов защиты микроорганизмов от неблагоприятных воздействий внешней среды является образование ими микробной биопленки. Доказано, что в организме человека биопленки развиваются на любом материале, контактирующем с жидкостью, и являются основной причиной возникновения и развития очагов инфекции в стоматологии, кардиохирургии, гинекологии, урологии, ортопедии. В составе сообщества бактерии не только механически изолированы матриксом внеклеточных полимерных веществ, но и демонстрируют изменения фенотипа, а также экспрессии специфичных генов, ответственных за усиление продукции компонентов матрикса, сигнальных молекул кооперативного поведения (quorum sensing) и антибиотикорезистентности. Проект направлен на разработку устройства и технологии эрадикации микробных биопленок в хирургии. В результате работ по проекту медицинские учреждения Красноярского края получают доступные и эффективные медицинские изделия, в том числе: ЛПУ стационарного и амбулаторного типа - для решения лечебных и профилактических задач гнойной хирургии, ЛПУ стационарного типа – при оперативном лечении абдоминальной хирургической патологии и ее осложнений.

## **2) Актуальность исследования**

Проблема лечения хирургических инфекций в последние годы не только не теряет актуальности, но и приобретает новое значение, что обусловлено с одной стороны неуклонным ростом числа пациентов, имеющих признаки вторичной иммунодепрессии, а с другой – изменением структуры и свойств доминирующих микробных возбудителей. Так, при развитии инфекций кожи и мягких тканей наиболее значимыми бактериальными агентами в последнее время становятся

полирезистентные стафило- и стрептококки, энтеробактерии, а также представители группы неферментирующих грамотрицательных бактерий. Летальность при развитии тяжелых форм инфекции мягких тканей достигает 25-75%.

Инфекционные осложнения, сопровождающие течение панкреонекроза у 16-47% больных, до настоящего времени являются причиной до 80% случаев летальных исходов заболевания. Основным источником инфицирования участков панкреонекроза считают содержимое тонкой кишки в условиях ее пареза и дисбиоза. Вместе с тем, некоторые исследователи не исключают значимости нозокомиального пути контаминации и даже рассматривают инфицированный панкреонекроз как частный случай проблемы внутрибольничной инфекции. В качестве «проблемных» микроорганизмов, ассоциированных с наибольшей летальностью и максимальными материальными затратами на лечение, в последние годы называют как грамотрицательные неферментирующие бактерии (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*), так и грамположительные (стафилококки и энтерококки), в том числе – метициллинрезистентные. Материальные затраты на лечение данной патологии связаны с потребностью в длительной госпитализации, дорогостоящем медикаментозном обеспечении и исчисляются десятками тысяч долларов в расчете на одного пациента.

Известные способы эрадикации биопленки предусматривают разрушение или преодоление матрикса физическими способами (ультразвуковая (Рисман Б.В., 2011) и лазерная кавитация (Drog N., 2009); фотодинамическая терапия (Fontana S.R., 2009)); биологическими (ферменты, антибиотики и их сочетания (Тец В.В., 2004)) и химическими. Основным недостатком использования химических растворов антисептиков является создание поверхностного натяжения на матриксе. Жидкие антисептики способствуют утолщению липополисахаридного матрикса биопленки и могут приводить к отрыву и распространению фрагментов биопленки (Pusateria C.R., 2009; Izano E.A., 2010). Высокоскоростной поток жидкости стимулирует бактериальную адгезию за счет увеличения частоты столкновений взвешенных клеток и колонизируемой поверхности (O'Toole G.A., 2008). Наиболее эффективным способом воздействия на сформированную биопленку остается

механический (Xavier J.B., 2007; Афиногенова А.Г., 2011), основным недостатком которого является высокая травматичность.

Бактерицидные свойства медицинского озона используются в медицине с начала прошлого века. В хирургической практике наибольшее распространение при санации гнойных ран, полостей получили озонированные растворы. Значения минимальной подавляющей концентрации озона в растворе определены на типовых штаммах микроорганизмов в планктонной форме и по разным данным варьируют от 0,5 до 10 мг/л. Винником Ю.С. и соавт. (2011, 2013) изучено влияние озono-кислородной газовой смеси в концентрации 40 мг/л на планктонные и структурированные в биопленку клинические штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *MRSA*. Показано, что в отличие от широко применяемых на практике растворов антисептиков (в т.ч. озонированного физиологического раствора в концентрации 8 мг/л), озono-кислородная газовая смесь с концентрацией 40 мг/л способствует эффективной неспецифической эрадикации сообществ вышеуказанных микроорганизмов. Результаты исследования Fontes B. и соавт. (2012) свидетельствуют об эффективной эрадикации колоний *Escherichia coli*; *MRSA*; *MSSA*; ванкомицинрезистентного *Enterococcus faecalis*; *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующей  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра; карбапенемрезистентного *Acinetobacter baumannii* и чувствительной только к карбапенемам *Pseudomonas aeruginosa* после пятиминутного воздействия озono-кислородной газовой смесью в концентрации 20 мг/л.

До настоящего времени в практике инвазивных технологий отсутствуют средства и методы, позволяющие использовать локальный поток озono-кислородной смеси для эрадикации микробных биопленок на поверхности биологических объектов без превышения предельно допустимой концентрации озона в зоне рабочего пространства.

### **3) Научный коллектив**

#### **Научный руководитель от ВУЗа:**

д.м.н., профессор Винник Ю.С.,

#### **Другие участники проекта:**

к.м.н., доцент Теплякова О.В., к.б.н., доцент Перьянова О.В., д.м.н., проф. Кириченко А.К., д.м.н., доц. Малиновская Н.А., к.б.н., доц. Хохлова О.Е., Ильинов А.В. (руководитель проекта, клинический ординатор), Плахотникова А.М. (клинический ординатор), Дегтярев Е.В. (клинический интерн), Зенкина А.Е. (студентка 5 курса), Пируева Т.А. (студентка 4 курса)

#### **4) Финансовая модель**

I этап: Проведение экспериментально-клинических исследований и разработка технологии эрадикации микробных биопленок озono-кислородной газовой смеси посредством оригинального устройства. Стоимость этапа - 200 т.р.

II этап: Ограниченные клинические испытания технологии эрадикации микробных биопленок при лечении обширных гнойных ран, а также инфицированного панкреонекроза – на базе Правобережного гнойно-септического центра г. Красноярск. Стоимость этапа - 300 т.р.

III этап: Сертификация в Росздравнадзоре инновационного медицинского изделия «Устройство для эрадикации микробных биопленок озono-кислородной газовой смесью». Подготовка производственно-технической документации, организация и сертификация в Роспотребнадзоре мелкосерийного производства на базе индустриального партнера проекта (ООО НПО «Пульсар», г. Красноярск). Стоимость этапа - 500 т.р.

#### **5) Конкурентные преимущества проекта**

Аналоги устройства, производимые на территории РФ отсутствуют. Ближайшими аналогами являются установки БОЗОН-N-STOMAT (производства НПП “Эконика”, Украина) и HealOzone 2130 C (производства «KaVo», Германия). Обе установки предназначены для эндодонтической антисептической обработки каналов зуба озono-кислородной газовой смесью.

Общими недостатками являются особенности конструкции, ограничивающие область клинического использования исключительно потребностями стоматологии:

1. герметизация области обработки от внешней среды с помощью силиконовой каппы,

2. низкая производительность генераторов озона, входящих в состав принципиальных схем устройств,
3. низкая максимальная продолжительность воздействия.

Преимуществами оригинального устройства для эрадикации микробных биопленок являются:

1. полифункциональность: возможность обработки как внутренних полостей и органов – при наличии гнойно-деструктивных процессов - так и наружных поверхностей (ран, трофических язв) организма человека;
2. возможность выбора концентрации озона в подаваемой смеси в диапазоне от 10 до 80 мг/л за счет совместимости устройства с высокопроизводительными генераторами озона;
2. возможность сочетания местного антисептического и гемостатического воздействия гемостатического воздействия при использовании высоких концентраций озono-кислородной газовой смеси.

## **6) Инновационность**

Инновационность проекта подтверждена следующими правоохранными документами:

1. Озоновый наконечник. Патент РФ на полезную модель №131300 от 20.08.2013.
2. Озоновый накопитель. Патент РФ на полезную модель №131297 от 20.08.2013.
3. Реверсивный газатор. Положительное решение о выдаче патента на полезную модель по заявке №2013109628 с приоритетом от 4.03.2013.
4. Устройство для локальной обработки биологических объектов озono-кислородной газовой смесью. Положительное решение о выдаче патента на полезную модель по заявке № 2014124812 с приоритетом от 17.06.2014.

## **7) Информация о профильных публикациях, грантах и соисполнителях**

### **Публикации:**

1. Винник Ю.С., Аксютенко А.Н., Тяпкин С.И., Теплякова О.В. Возможности применения методик локальной и системной озонотерапии в лечении распространенного перитонита // Сибирское медицинское обозрение.- 2010.-N 3.- С.8-12.

2. Винник Ю.С., Перьянова О.В., Теплякова О.В., Онзуль Е.В. Значение оценки пленкообразующей способности бактерий в выборе дренажа при инфицированном панкреонекрозе // Вестник хирургической гастроэнтерологии.- 2010.- №3.- С.105.
3. Винник Ю.С., Перьянова О.В., Онзуль Е.В., Теплякова О.В. Микробные биоплёнки в хирургии: механизмы образования, лекарственная устойчивость, пути решения проблемы // Новости хирургии. - 2010. - №6.- С.115-125.
4. Онзуль Е.В., Теплякова О.В. Биопленки и особенности их образования микроорганизмами на полимерах различного происхождения при панкреонекрозах // Медицинский академический журнал.-2010.-№5.- Санкт-Петербург, изд-во Северо-Западного отделения РАМН.- 2011.- С.89.
5. Перьянова О.В., Теплякова О.В., Онзуль Е.В. Влияние антисептических препаратов на биопленки, образованные микрофлорой инфицированного панкреонекроза // Актуальные вопросы неотложной и восстановительной хирургии: сборник научно-практических работ, посвященный 80-летию профессора М.И.Гульмана.- Красноярск, Версо.- 2011.- С.262-263.
6. Теплякова О.В., Винник Ю.С., Перьянова О.В., Миллер С.В., Онзуль Е.В., Попов В.О. Значение адгезивной активности ассоциантов инфицированного панкреонекроза в выборе дренажного полимера // Вестник хирургической гастроэнтерологии.-2011.-№3.- С.94.
7. Онзуль Е.В., Теплякова О.В., Деулина В.В., Варыгина С.А., Мазурова К.В. Значение образования микроорганизмами биофильмов при панкреонекрозах на полимерах различного происхождения // Академический журнал Западной Сибири.-2010.-№4.- Тюмень, Вектор-Бук.- 2011.- С.31-32.
8. Винник Ю.С., Теплякова О.В., Перьянова О.В., Онзуль Е.В., Козлов В.В. Значение пленкообразующей способности культур стафилококков в выборе дренажного полимера и местных антисептиков при инфицированном панкреонекрозе // Вестник экспериментальной и клинической хирургии.-2011.- №4.- С.643-647.
9. Онзуль Е.В., Теплякова О.В. Изучение особенностей образования микроорганизмами биопленок при панкреонекрозах на полимерах различного происхождения // Современные технологии и возможности реконструктивно-

восстановительной и эстетической хирургии: материалы II международной конференции.-2010.- Москва, Медиа-Сфера.- 2011.- С.234-235.

10. Хохлова О.Е., Дробушевская А.И., Теплякова О.В., Перьянова О.В., Винник Ю.С. Роль *S.aureus*, MRSA в развитии инфекций кожи и мягких тканей // Вестник Сибирского государственного аэрокосмического университета имени академика М.Ф. Решетнёва.-2011.- №7.- С.15-19.

11. Миллер С.В., Винник Ю.С., Теплякова О.В., Перьянова О.В. Динамика этиологической структуры и антибиотикочувствительности микрофлоры инфицированного панкреонекроза // Анналы хирургии.-2011.-№5.- С.54-61.

12. Винник Ю.С., Малков А.Б., Шестакова Л.А., Зыкова Л.Д., Сергеева Е.Ю., Теплякова О.В., Гайдабура Г.В., Ильинов А.В. Способ моделирования действия различных концентраций озono-кислородной смеси в эксперименте и система для её введения в брюшную полость // Сибирское медицинское обозрение. - 2012. - №2.- С.23-25.

13. Khokhlova O. E., Iwao Y., Takano T., Hung W-C., Nishiyama A., Peryanova O., Sidorenko S., Yashenko S.V., Kamshilova V.V., Kotlovsky Y.V., Teplyakova O.V., Reva I., Salmina A., Yamamoto T. Spread of ST239 and ST8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Krasnoyarsk, Russia and their molecular characterization // Abstract of the Japan-Russia International Workshop 2013.- Tokyo, IMERC.- 2013.- P.62.

14. Vinnik Y.S., Yakimov S.V., Mikitin I.L., Karapetyan G.E., Teplyakova O.V., Yakimova Y.S. The application of low-frequency ultrasound and ozonated oil in the treatment of patients with longly healed foul diseases of soft tissues // Revista Española de Ozonoterapia.-2013.- Vol.3. № 2. Supplement 1.- P.68-69.

15. Винник Ю.С., Теплякова О.В., Перьянова О.В., Тяпкин С.И., Соседова Е.В. Адгезивная активность микроорганизмов в выборе дренажного полимера и местных антисептиков при инфицированном панкреонекрозе // Анналы хирургической гепатологии.-2013.-№4.- С.100-108.

16. Теплякова О.В., Перьянова О.В., Винник Ю.С., Хохлова О.Е. Состояние и свойства микрофлоры инфицированного панкреонекроза // Вестник клуба панкреатологов.-2012.-№4.- С.23-26.

17. Винник Ю.С., Салмина А.Б., Теплякова О.В., Дробушевская А.И., Малиновская Н.А., Пожиленкова Е.А., Моргун А.В., Гитлина А.Г. Динамика локальной экспрессии коннексина-43 и рецепторов основного фактора роста фибробластов у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями кожи и мягких тканей на фоне сахарного диабета второго типа // Вестник хирургии им. И.И. Грекова.-2014.-№4.- С.47-52.

18. Винник Ю.С., Теплякова О.В., Плахотникова А.М., Перьянова О.В., Кириченко А.К., Малиновская Н.А., Гитлина А.Г. Методы эрадикации возбудителей хирургических инфекций в составе микробных биопленок // Анналы хирургии.- 2014.-№3.- С.5-12.

### **Гранты:**

Проект поддержан грантом ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры России" на 2009-2013 гг. по направлению "Комплексное исследование стратегии выживания микробных сообществ методами молекулярно-генетического анализа, лазерной и атомно-силовой микроскопией" (мероприятие 1.4 "Поддержка развития внутрироссийской мобильности научных и научно-педагогических кадров путем выполнения научных исследований молодыми учеными и преподавателями в научно-образовательных центрах"), номер госрегистрации в ЦИТИС - 01201281879

### **Соисполнитель проекта:**

Полное наименование: Общество с ограниченной ответственностью  
Научно-производственное объединение «ПУЛЬСАР»

Сокращенное наименование: ООО НПО «ПУЛЬСАР»

Директор Четвергов Николай Васильевич  
(на основании Устава)

Адрес юридический 660028, Россия, г. Красноярск,  
и фактический: ул. Телевизорная, 1, стр. 101

а/я 11945

ИНН 2458000849 КПП 246301001 ОКПО 10183533 ОКАТО 04401371000

ОГРН 1022401794128

Тел. (391) 256-04-20, 252-94-95

E-mail: pulsar@ozon.kras.ru