

На правах рукописи

КУВАКИНА НИНА АРКАДЬЕВНА

ВЛИЯНИЕ ОЗОНИРОВАННОГО ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО РАСТВОРА
НА ВИРУЛЕНТНОСТЬ СИНЕГНОЙНЫХ БАКТЕРИЙ

(экспериментальное исследование)

03.00.07 – Микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Нижний Новгород – 2006

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук Пылаева Светлана Ивановна

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор Перетягин Сергей Петрович

Официальные оппоненты:

Смирнов Сергей Владимирович доктор медицинских наук, профессор

Кочеровец Владимир Иванович доктор медицинских наук, профессор

Ведущая организация:

НИИ физико-химической медицины РАМН

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2006 г. в ____ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном государственном учреждении науки «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского».

Автореферат разослан «_____» _____ 2006 г.

Ученый секретарь

Диссертационного Совета,

кандидат биологических наук

Комбарова С.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы:

В настоящее время, несмотря на наличие огромного арсенала антимикробных препаратов, госпитальная инфекция остается серьезной клинической и экономической проблемой в хирургии, и особенно, в комбустиологии. Инфекционные осложнения отягощают течение ожоговой болезни, увеличивают длительность стационарного лечения и повышают число неблагоприятных исходов (Азолов В.В. и соавт., 2004; Алексеев А.А. и соавт., 1998; Вазина И.Р. и соавт., 2000; Крутиков М.Г., 2005; Boukind L.e.a., 1995; Cioffi W. G. e.a., 1993; Dayoub A.e.a., 1995; Greenfield E. e.a., 1997; Lesseva M. e.a., 1998).

Ожоговая рана в значительно большей степени подвержена инфекции, чем раны при других видах травм, и зачастую она становится источником инвазивной генерализованной инфекции. Серьезную опасность представляет сепсис ранних периодов ожоговой болезни, наиболее часто вызываемый синегнойной палочкой, характеризующийся молниеносным развитием, тяжелым течением и крайне высокой летальностью (Алексеев А.А., 1993; Вазина И.Р. и соавт., 1995, 2000; Gang R. et al., 1999). Подтверждением тому служат данные Нижегородского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии (Вазина И.Р. и соавт., 2002), свидетельствующие о том, что основной причиной гибели обожженных в периодах шока и токсемии остается генерализованная инфекция, 60% случаев которой составляет ранний сепсис.

Устойчивость синегнойной палочки во внешней среде, неприязательность к условиям питания, наличие мощных факторов вирулентности, природная резистентность к антибактериальным препаратам определяют широту ее распространения и формирования госпитальных штаммов, что превращает ожоговый стационар в “эпидемиологический очаг” синегнойной инфекции (Азолов В.В. и соавт.,

1996; Руднов В.А., 2002; Сидоренко С.В., 2003; Komolafe O.O. e.a., 2003; Li T.Z.e.a., 2003). Нерешенность проблемы борьбы с госпитальной синегнойной инфекцией с помощью химиотерапевтических препаратов побуждает проводить поиск других методов и средств.

В последние годы разрабатываются и внедряются новые технологии лечения обожженных, способные подавлять агрессивность и уменьшать вирулентность госпитальной микрофлоры. В этом плане возрастает интерес к озонотерапии. Обладая высоким окислительным потенциалом, озон проявляет бактерицидные, вируцидные, фунгицидные свойства. Технология системного использования озона, растворенного в физиологическом растворе, существенно расширяет спектр его лечебных возможностей за счет оптимизации нарушенного кислородного гомеостаза организма больного. Это позволяет использовать метод не только для местного лечения ожоговых ран, но и для комплексной терапии ожоговой болезни и ее осложнений, в том числе инфекционных (Бояринов Г.А. и соавт., 1998; Верхнев В.А. и соавт., 1999; Вилков С.А. и соавт., 2004; Гречко В.Н., 1999; Костина О.В. с соавт., 1999; Мирошин С.И. и соавт., 1996; Носенко В.М., 2004; Перетягин С.П. и соавт., 2003; Спиридонова Т.Г., 1994).

До настоящего времени не проводилось исследований по влиянию не бактерицидных концентраций озона в озонированном физиологическом растворе, применяемых для парентеральной озонотерапии инфекционных осложнений при ожоговой болезни, на патогенные свойства гемокультур высоковирулентной госпитальной микрофлоры, а также на развитие и течение инфекционного процесса.

Цель работы: определение действия озонированного физиологического раствора на патогенные свойства *Pseudomonas aeruginosa* и оценка влияния парентеральной озонотерапии на течение синегнойной инфекции в ранние сроки после термической травмы.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние озонированного физиологического раствора на ростовые свойства синегнойных бактерий.
2. Определить действие озонированного физиологического раствора на ряд факторов патогенности синегнойных бактерий.
3. Исследовать действие озонированного физиологического раствора на фагоцитабельность синегнойных бактерий.
4. Определить влияние системного воздействия озонированного физиологического раствора на течение синегнойной инфекции в эксперименте на животных с ожогом.

Положения, выносимые на защиту

1. Озонированный физиологический раствор вызывает фенотипические изменения госпитальных штаммов *P. aeruginosa*, снижая их вирулентные свойства.
2. Наиболее выраженное влияние на факторы патогенности синегнойных бактерий оказывает озонированный физиологический раствор с концентрацией озона 1000 мкг/л.
3. Парентеральное введение озонированного физиологического раствора с концентрацией озона 1000 мкг/л значительно ограничивает диссимиляцию возбудителя и сдерживает развитие синегнойной инфекции у животных с ожогами.

Научная новизна

Установлено влияние озонированного физиологического раствора разных концентраций на факторы патогенности госпитальных синегнойных бактерий в эксперименте и выявлено снижение их адгезивности, ростовой способности, увеличение фагоцитабельности. Получены новые данные об изменении плазмидного состава штаммов госпитальных синегнойных бактерий в ответ на негативное действие озона.

Экспериментально обоснована возможность парентерального использования озонированного раствора для снижения вирулентности синегнойных бактерий и сдерживания развития инфекции у животных с ожогом.

Практическая значимость работы

Полученные данные о снижении вирулентных свойств госпитальных синегнойных бактерий под влиянием озонированного физиологического раствора могут послужить основанием для включения озонотерапии в комплекс мер по профилактике и лечению генерализованной синегнойной инфекции на ранних стадиях ожоговой болезни.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены: на научной конференции «Актуальные проблемы травматологии и ортопедии», проводимой в рамках международного форума «Человек и травма» (Н.Новгород, 2001г.); на V и VI Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Озон в биологии и медицине» (Н.Новгород, 2003, 2005 гг.); на VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Проблемы лечения тяжелой термической травмы” (Н.Новгород, 2004 г.), апробация диссертации проведена на заседании Ученого Совета ФГУ «ННИИТО Росздрава» (Н.Новгород, 2006 г.)

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 работ.

Объем и структура диссертации

Диссертация представлена на 125 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения и выводов. Текст иллюстрирован 15 рисунками и 15

таблицами. Список используемой литературы содержит 252 источника, из них: 166 - отечественных и 86 работ иностранных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для решения поставленных задач выполнены эксперименты *in vitro* и *in vivo* с применением озонированного физиологического раствора (ОФР) с тремя концентрациями озона: 200, 600 и 1000 мкг/л.

В экспериментах *in vitro* использованы 9 гемокультур *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с ожоговым сепсисом, лечившихся в Российском ожоговом центре ННИИТО в период 1997-2003 гг., и стандартный штамм *P. aeruginosa* “Тесаков” из Государственной коллекции ГИСК им. Л.А. Тарасевича. У микроорганизмов до и после воздействия ОФР изучали: культуральные свойства, ферментативную активность с помощью тест-систем «Неферм-24» (Lachema, Чехия); чувствительность к антибиотикам диско-диффузионным методом МУК 4.2.1890-04 (2004); ростовые свойства фотометрическим методом с помощью автоматического микробиологического анализатора iEMS Reader “Labsystems” и программы «Микроб»; адгезивную способность по методике В.И. Бриллис и соавт. (1986); фагоцитательность бактерий определяли по индексу завершенности фагоцитоза (ИЗФ) методом З.Е. Матусис и С.И. Пылаевой (1972). Белки наружной мембраны изучаемых штаммов исследовали по Weber и Osborn (1969), внеклеточные белки – по Davis и Ornstein (1992), плазмидные профили – по Kado, Liu (1981) и суммарную плазмидную ДНК по Левановой Г.Ф. (заявка на изобретение № 2006109988 от 23.03.06).

Эксперименты *in vivo* проведены на 145 мышах с глубоким контактным ожогом общей площадью 20% поверхности тела. У 50 животных определяли фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови после трехкратного (через сутки, двое и трое после ожога)

внутрибрюшинного введения ОФР разных концентраций. У 95 животных оценивали влияние ОФР на клиническое течение генерализованной синегнойной инфекции. Для индукции инвазивного типа генерализованной инфекции использовали взвесь стандартного штамма *Pseudomonas aeruginosa* «Тесаков», которую вводили подструпно по 0,1 мл (50 млн МТ), трехкратно: через сутки, двое и трое после ожога. Растворы вводили внутрибрюшинно в те же сроки: животным контрольной группы – по 0,2 мл стерильного физиологического раствора, а животным опытной группы – по 0,2 мл ОФР с концентрацией озона 1000 мкг/л.

Летальность оценивали на 7-е сутки. Выживших мышей забивали. Всех мышей вскрывали с соблюдением правил асептики, проводили гистоморфологические и бактериологические исследования внутренних органов: сердца, легких, печени, почек, селезенки.

Озонированный физиологический раствор получали из стандартного раствора хлорида натрия изотонического 0,9% для инъекций (изготовитель ОАО «Красфарма», г. Красноярск) с помощью аппарата озонотерапии с деструктором озона АОТ-Н-01-Арз-01 (ТУ 9444-001-07513518-97), код ОК – 005(ОКП); 944464; сертификат соответствия № РОСС RU,МЕ 34 ВО1010; срок действия по 14.06.2008, №5319253.

Концентрацию растворенного в физиологическом растворе озона определяли с помощью оптического анализатора концентрации озона в жидкой среде ИКОЖ–5 (№29708-05 в Государственном реестре средств измерений).

Статистическую обработку полученных данных проводили на персональном компьютере с помощью пакета программ “Statistica” (StatSoft-Russia,1998). При статистическом анализе выполняли парные групповые сравнения с использованием критериев Стьюдента и Фишера. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты работы и обсуждение

Изучение ростовых свойств синегнойных бактерий после воздействия ОФР с концентрациями озона 200, 600 и 1000 мкг/л показало дозозависимый эффект действия озона. Чем выше концентрация озона в физиологическом растворе, тем ниже была скорость размножения микроорганизмов и тем медленнее нарастала оптическая плотность взвесей бактерий (рис.1).

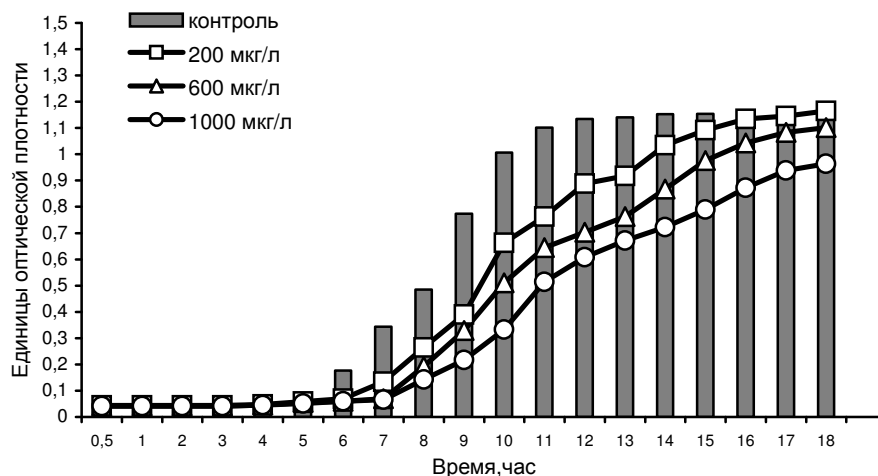


Рис.1. Кривые роста синегнойных бактерий после воздействия ОФР с концентрациями озона 200мкг/л, 600 мкг/л и 1000 мкг/л (усредненные данные по 10 штаммам).

Максимальное угнетающее действие на рост оказывал ОФР с концентрацией озона 1000 мкг/л. Анализ ростовых кривых показал значительные изменения отдельных фаз роста, наибольшие из которых определялись в адаптационную фазу (ЛАГ-фазу). У микроорганизмов, взятых в эксперимент до озонирования, ЛАГ-фаза составляла в среднем 5 часов. После контакта бактерий с ОФР с концентрацией озона 200 мкг/л ЛАГ-фаза удлинилась до 6 часов 50 мин., при действии ОФР с концентрацией озона 600 мкг/л – до 7 ч. 20 мин., при действии ОФР с концентрацией озона 1000 мкг/л – до 7 ч.30 мин.

Биологические свойства *P. aeruginosa* до и после воздействия на них *in vitro* ОФР с концентрациями озона 200, 600 и 1000 мкг/л оставались без изменения. В то же время, анализ антибиотикограмм выявил (таб.1), что у

7 штаммов из 10 под действием ОФР с концентрацией озона 1000 мкг/л происходило изменение чувствительности к наиболее часто применяемым при синегнойной инфекции антибиотикам групп цефалоспоринов и фторхинолонов. ОФР с концентрациями озона 200 и 600 мкг/л не изменял антибиотикограммы культур *P. aeruginosa*.

Таблица 1.

Изменение чувствительности синегнойных бактерий к антибактериальным препаратам до и после воздействия ОФР с концентрацией озона 1000 мкг/л

Название антибиотика	Номер (название) штамма																			
	396		21		539		Тес.		768		445		852		419		479		480	
Цефоперазон	R	I*	S	S	R	R	S	S	S	S	R	I*	R	R	S	S	R	R	R	I*
Цефтазидим	S	S	R	R	I	I	S	S	S	S	I	I	R	I*	S	S	R	R	I	I
Ципрофлоксацин	S	S	R	I*	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	I*	R	I*	R	R

S – чувствителен, I – умеренно-устойчив, R – устойчив, * – изменение R → I

Исследования адгезивной способности *P. aeruginosa* – одного из важных факторов патогенности – показали, что культуры имели высокий и средний исходный индекс адгезивности (ИА). Концентрация озона в ФР в 200 мкг/л разнонаправленно влияла на микробные клетки: у одних штаммов снижала, а у других – стимулировала их адгезивную способность (рис.2).

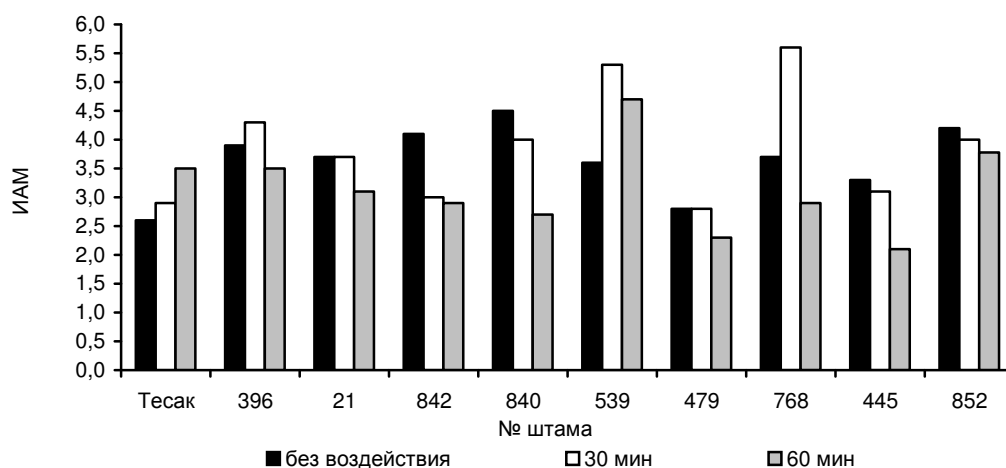


Рис.2. Уровень ИА синегнойных бактерий до и после воздействия ОФР с концентрацией озона 200 мкг/л.

После воздействия ОФР с концентрацией озона 600 и 1000 мкг/л у всех штаммов уровень ИА снижался и более половины из них переходили из разряда высоко- и средне-адгезивных – в разряд неадгезивных (рис. 3, 4).

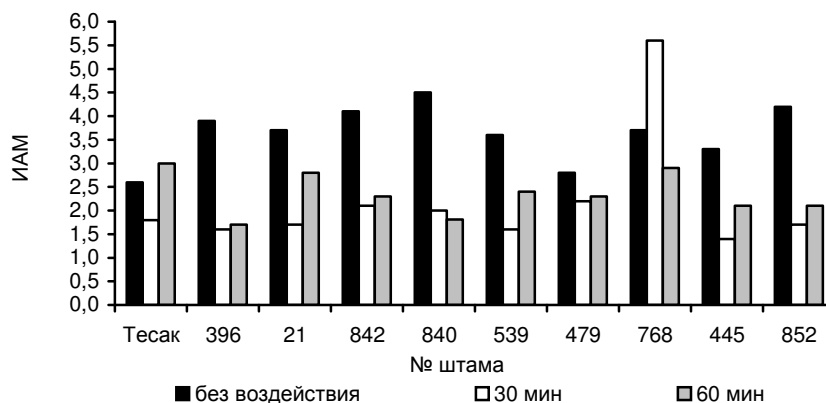


Рис.3. Уровень ИА синегнойный бактерий до и после воздействия ОФР с концентрацией озона 600 мкг/л.

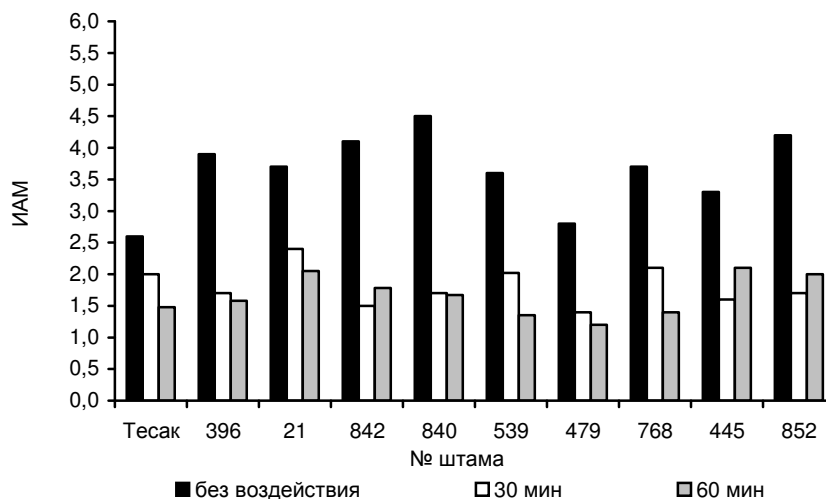


Рис.4. Уровень ИА синегнойный бактерий до и после воздействия ОФР с концентрацией озона 1000 мкг/л.

Максимальное по эффективности и продолжительности действие оказывал ОФР с концентрацией озона 1000 мкг/л.

Наличие у микроорганизмов R-плазмид – ДНК содержащих элементов, обуславливающих так называемую плазмидную резистентность, является одной из причин появления и распространения полирезистентных штаммов в клинических условиях. Изучение плазмидного состава показало наличие R-плазмид у всех исследованных синегнойных бактерий: у всех штаммов присутствовала наиболее распространенная для *P. aeruginosa* R-плазида с молекулярной массой 40 МД, и более половины – содержали вторую представительную плазмиду с величиной 60 МД. Воздействие ОФР с концентрациями озона 600 и 1000 мкг/л не элиминировало плазмиды, но приводило к модификационным изменениям микроорганизмов: у трети культур увеличивалось число копий плазмид и возрастало суммарное количество плазмидной ДНК в среднем с 15% до 27%.

Увеличение копийности плазмид и общего количества плазмидной ДНК свидетельствовало о негативном влиянии ОФР на бактерии, поскольку обычно число копий каждой плазмиды удерживается на строго определенном уровне, специфичном для этой плазмиды.

Наряду с плазмидными профилями у опытных штаммов синегнойных культур изучены белки наружной мембраны и внеклеточные белки, которые являются не только уникальной штаммовой характеристикой, но и обладают токсическими свойствами и играют значительную роль в патогенезе многих заболеваний бактериальной природы. Анализ протеинограмм белков наружной мембраны изучаемых псевдомонад подтверждал их госпитальное происхождение. Внутри двух групп штаммов, выделенных в разное время (с 1997 по 2001 гг.), выявлены культуры, имеющие одинаковый рисунок расположения белковых фракций.

Сравнение электрофореграмм обработанных и необработанных ОФР культур не показало различий в спектрах белков наружной мембраны и

внеклеточных белков. Это свидетельствует о наличии у госпитальных синегнойных бактерий мощных адаптационных механизмов, благодаря которым они сохранили способность выживать в неблагоприятных условиях, что особенно важно для сохранения патогенности и вида в целом.

Способность противостоять фагоцитозу у псевдомонад связана с секрецией слизи и цитотоксинов, обладающих антифагоцитарной активностью. Фагоцитированные палочки, будучи защищенными от воздействия механизмов иммунной системы и лекарственных препаратов, не только активно размножаются, но и проходят избирательную селекцию под слабым воздействием клеточных протеаз и гидролаз, дают более устойчивые L-формы бактерий. Все это способствует быстрому изменению их чувствительности к антибиотикам – феномену, отмеченному при ожоговой болезни и раневом сепсисе. Проведенными исследованиями показано увеличение фагоцитабельности синегнойных палочек после их обработки ОФР: индекс завершенности фагоцитоза псевдомонад возрастал прямо пропорционально увеличению концентрации озона в ОФР, действовавшему на них (рис.5).

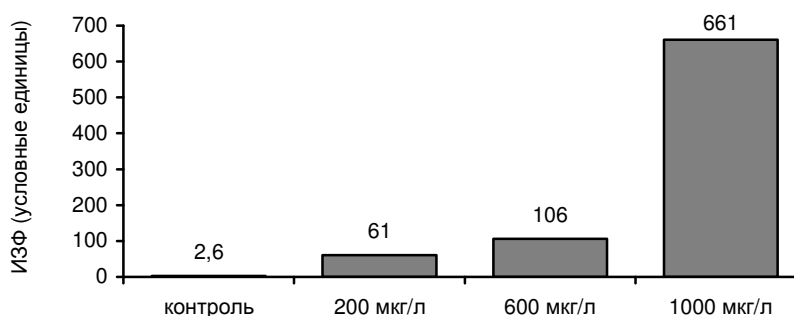
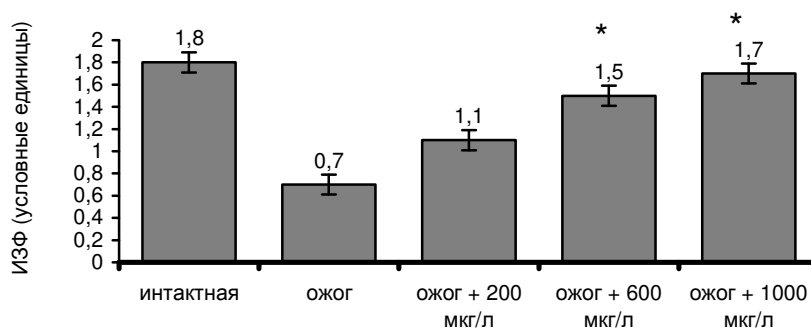


Рис. 5. Зависимость фагоцитабельности синегнойных бактерий от концентрации озона в физиологическом растворе.

ОФР с концентрацией озона 1000 мкг/л оказывал самое сильное действие на микробные клетки, в результате чего более половины из

исследуемых штаммов синегнойной палочки практически полностью уничтожались нейтрофилами.

Исследование ИЗФ нейтрофилов крови обожженных мышей на фоне парентерального введения ОФР показало достоверное повышение этого показателя у мышей опытных групп. Ожог приводил к резкому снижению ИЗФ. Введение животным ОФР способствовало дозозависимой коррекции ИЗФ (рис.6).



* Статистически достоверные изменения в сравнении с группой без лечения

Рис. 6. Изменения ИЗФ нейтрофилов периферической крови у обожженных животных на фоне парентерального введения ОФР с различными концентрациями озона.

Максимальный эффект наблюдали в группе животных с введением ОФР с насыщающей концентрацией озона 1000 мкг/л.

Парентеральное введение ОФР животным стимулирует фагоцитарную активность нейтрофилов крови при термической травме.

Таким образом, активация фагоцитоза синегнойной палочки под влиянием озона зависит от его воздействия как на бактериальную клетку, так и нейтрофилы.

При исследовании системного влияния озонированного физиологического раствора на течение синегнойной инфекции у животных с ожогом оценивали летальность в контрольной и опытной группах.

Достоверных изменений летальности не наблюдалось, зарегистрирована лишь тенденция ($p=0,2$) к ее снижению.

Вместе с тем, у животных на фоне введения ОФР выявлено достоверное снижение обсемененности внутренних органов как у погибших к 7-м суткам животных, так и у переживших этот срок. Бактериологические исследования показали (таб. 2), что *P. aeruginosa* выделялась у 100% погибших животных контрольной группы и у 78,5% опытной группы ($p<0,05$).

Таблица 2

Обсемененность внутренних органов экспериментальных животных,
погибших к 7 суткам

Количество животных в группе		Число случаев выделения <i>P. aeruginosa</i> из внутренних органов				
всего	с выделением <i>P. aeruginosa</i>	печень	почки	легкие	сердце	селезенка
Контроль n =23	23	23	23	23	23	23
Опыт n=14	11	11	11	10	11	11

Среди животных, доживших до 7 суток (табл. 3) синегнойная палочка высевалась у 56% животных контрольной группы и лишь у 19% – опытной группы ($p < 0,05$).

Таблица 3

Обсемененность внутренних органов экспериментальных животных,
доживших до 7 суток

Количество животных в группе		Число случаев выделения <i>P. aeruginosa</i> из внутренних органов				
всего	с выделением <i>P. aeruginosa</i>	печень	почки	легкие	сердце	селезенка
Контроль n =31	18	18	16	13	12	15
Опыт n=26	5	5	5	4	4	4

Очевидно, что эффект сдерживания развития синегнойной инфекции был связан с изменением биологических свойств *P. aeruginosa* «Тесаков» под влиянием системного введения ОФР. С целью проверки этого предположения у вариантов культур *P. aeruginosa* «Тесаков», выделенных из внутренних органов экспериментальных животных без введения и с введением ОФР, а также варианта до эксперимента, сравнивались антибиотикограммы и биохимические свойства.

Системное воздействие ОФР с концентрацией озона 1000 мкг/л приводило к нарушению метаболизма микробной клетки. Исследование основных ферментативных свойств *P. aeruginosa* «Тесаков» показало нестабильность семи признаков из 28 анализируемых.

Анализ антибиотикограммы (рис.7) выявил увеличение зон задержки роста культуры практически возле всех дисков с антипсевдомонадными антибиотиками, за исключением цефоперазона и ципрофлоксацина, и что особенно важно, в отношении азтреонама, нетилмицина и цефтриаксона штамм становился вместо умеренно-устойчивого – чувствительным. Расширение спектра чувствительности к антибиотикам стало результатом изменений, происходящих в клеточной стенке микроба под действием озона, за счет чего, по-видимому, упростилось проникновение антибиотика внутрь.

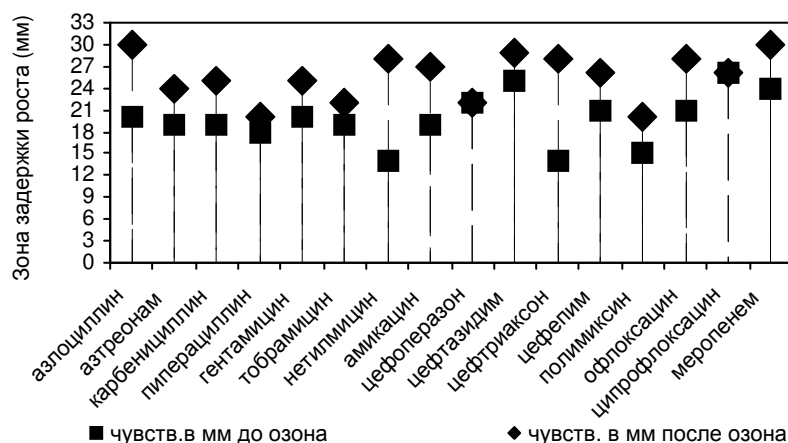


Рис. 7. Изменение чувствительности к антибиотикам у *P.aeruginosa* "Тесаков", выделенного из организма животного с ожогом и синегнойной инфекцией после введения ОФР с концентрацией озона 1000 мкг/л.

Сопоставляя полученные данные, можно заключить, что максимальной эффективностью *in vitro* и *in vivo* обладал ОФР с концентрацией озона 1000 мкг/л. Прямое воздействие ОФР *in vitro* на госпитальные штаммы синегнойных бактерий приводило к снижению ростовых свойств, утрате адгезивной способности, увеличению фагоцитательности, модификационным изменениям плазмид. Под действием системного влияния ОФР *in vivo* *P. aeruginosa* изменяла ферментативную активность и чувствительность к антибактериальным препаратам.

Таким образом, действие озона, используемого в виде ОФР на госпитальные штаммы *P. aeruginosa* как *in vitro* так и *in vivo*, сопровождается снижением у них патогенных и вирулентных свойств, что свидетельствует о серьезных фенотипических изменениях.

ВЫВОДЫ

1. Озонированный физиологический раствор в условиях *in vitro* угнетает ростовые свойства госпитальных синегнойных бактерий. Наибольшие изменения определяются в ЛАГ-фазе и выражаются в удлинении ее времени на 1.50 ч – 2.30 ч.

2. Озонированный физиологический раствор снижает адгезивность и повышает фагоцитабельность госпитальных синегнойных бактерий, но не оказывает влияния на спектры белков наружной мембраны и внеклеточных белков. Степень выраженности обнаруженных изменений пропорциональна концентрации озона в озонированном физиологическом растворе. Максимальное влияние на факторы патогенности синегнойных бактерий оказывает озонированный физиологический раствор с концентрацией озона 1000 мкг/л.

3. Воздействие на госпитальные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* озона, используемого в виде озонированного физиологического раствора, сопровождается фенотипическими изменениями, приводящими к снижению их вирулентных свойств.

4. Выявленное в экспериментах *in vitro* увеличение количества копий плазмид у одной трети штаммов свидетельствует о негативном влиянии озонированного физиологического раствора на внехромосомные генетические элементы псевдомонад – R-плазмиды.

5. Выявлено, что госпитальные синегнойные бактерии, подвергнутые прямому действию озонированного физиологического раствора, теряют способность противостоять фагоцитозу, индекс завершенности фагоцитоза возрастает в сотни раз, а парентеральное введение озонированного физиологического раствора животным с термической травмой значительно стимулирует фагоцитарную активность нейтрофилов крови.

6. Введение экспериментальным животным с ожогом и синегнойной инфекцией озонированного физиологического раствора с концентрацией озона 1000 мкг/л ограничивает диссеминацию возбудителя, что свидетельствует о сдерживании развития инфекции.

**СПИСОК РАБОТ,
ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Кувакина Н.А. Сравнительное изучение адгезивных свойств изолятов синегнойных бактерий // Третья Нижегородская сессия молодых ученых: Тез. докл.-Н.Новгород, 1998.- С.211-211.

2. Пылаева С.И., Гординская Н.А., Кувакина Н.А. и соавт. Проблема нозокомиальных инфекций в травматологической клинике // 2 Всерос. науч.-практ. конф. «Внутрибольничные инфекции- проблемы эпидемиологии, клиники, диагностики и лечения».-М., 1999.- С.199-199.

3. Кувакина Н.А., Пылаева С.И., Перетягин С.П. Экспериментальные предпосылки использования озона для борьбы с синегнойной госпитальной инфекцией // Материалы науч. конф. «Актуальные проблемы травматологии и ортопедии» в рамках междунар. форума «Человек и травма».- Н.Новгород , 2001.- С.199-200.

4. Кувакина Н.А., Пылаева С.И., Перетягин С.П., Стручков А.А. Влияние озонированного физиологического раствора на адгезивные свойства гемокультур синегнойных бактерий // «Гомеостаз и инфекционный процесс»: Тез. докл. III Общерос.конф. с междунар. участием.- М., 2002.- С. 59-59.

5. Кувакина Н.А., Пылаева С.И. Изучение адгезивной способности синегнойных бактерий в условиях воздействия на них ОФР// «Новые технологии в физиотерапии, озонотерапии и курортологии»: Тез. конф. – Харьков, 2002 .- С.161-161.

6. Кувакина Н.А., Пылаева С.И., Перетягин С.П., Стручков А.А. Обоснование эффективности использования озона для борьбы с госпитальной синегнойной инфекцией //«Актуальные проблемы термической травмы»: Матер. междунар. конф.- Санкт-Петербург, 2002.- С.176-177.

7. Кувакина Н.А., Куракина Т.В. Влияние различных концентраций озонированного физиологического раствора на адгезивность госпитальных изолятов синегнойных бактерий // Нижегородский медицинский журнал.- 2003. - Приложение «Озонотерапия».- С.19-20.

8. Кувакина Н.А., Пылаева С.И., Гординская Н.А. Влияние озонированного физиологического раствора на патогенность госпитальных синегнойных бактерий // Нижегородский медицинский журнал. – 2004.- Приложение «Комбустиология». – С. 83-84.

9. Леванова Г.Ф., Мазепа В.Н., Кашников С.Ю., Мартынова Н.Е., Кувакина Н.А., Никитин В.А. Плазмидный анализ как один из способов генотипирования бактерий // Матер. науч. конф., посвящ. 75-летию Нижегородского ННИИЭМ: Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний.- Н.Новгород, 2004.- С.241-244.

10. Кувакина Н.А., Пылаева С.И. Исследование ростовых свойств гемокультур синегнойных бактерий после воздействия озонированного физиологического раствора разных концентраций // Нижегородский медицинский журнал. – 2005. - Приложение «Озонотерапия».- С.22-23.

11. Стручков А.А., Перетягин С.П., Кувакина Н.А., Пылаева С.И., Гординская Н.А. Антисептические свойства озонированных растворов // Вестник физиотерапии и курортологии. - 2006.- №5.- С. 21-22.

СПИСОК ЗАЯВОК НА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

1. Способ озонирования физиологического раствора / С.П. Перетягин, А.А. Стручков, Н.А. Кувакина, Н.С. Перетягина, Н.В. Кулешина (РФ): Положительное решение на выдачу патента РФ по заявке №2004126456 от 30.08.2004г.

2. Способ оценки антибактериального действия озонированного физиологического раствора / Н.А. Кувакина, С.И. Пылаева, С.П. Перетягин,

А.А Стручков (РФ): Положительное решение на выдачу патента по заявке №2004126457 от 30.08.2004г.

3. Способ определения суммарного содержания плазмидной ДНК в бактериях / Г.Ф. Леванова, С.Ю Кашников, В.Н. Мазепа, Н.А. Кувакина (РФ): Заявка на патент № 2006109988 от 23.03.06г.