

Софийски университет ” Св. Климент Охридски“

Медицински факултет

Катедра ”Хирургически болести, акушерство и гинекология“

д-р Мирослав Сашов Зашев

**ИЗПОЛЗВАНЕ НА СТУДЕНА АТМОСФЕРНА ПЛАЗМА  
ПРИ ЛЕЧЕНИЕ НА ХРОНИЧНИ РАНИ**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

За присъждане на образователната и научна степен ”доктор“

Професионално направление: 7.1 Медицина

научна специалност „обща хирургия“ код 03.01.37

Научен ръководител: доц. д-р Радосвет Петров Горнев, дм

СОФИЯ

2020

Дисертационният труд е представен на 116 страници и съдържа 10 таблици и 20 фигури. Библиографската справка включва 169 заглавия, като две са на кирилица. Списъкът на авторските публикации и презентации по темата включва 4 заглавия.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насрочен за защита от катедрен съвет на катедра “Хирургически болести, акушерство и гинекология” към Медицински факултет на Софийски университет “Св. Климент Охридски”.

Публичната защита на дисертационния труд пред Научното жури ще се състои на 18.11.2020 от 14:00 ч. в Аулата на МБАЛ “Лозенец”, ул. Козяк №1, София.

Научно жури

Председател:

проф. д-р Любомир Димитров Спасов, дм

Членове:

проф. д-р Кирил Василев Драганов, дмн.

проф. Д-р Илия Петров Лозев, дмн

проф. д-р Румен Любенов Пандев, дм

доц. Радосвет Петров Горнев, дм

## Съдържание

Използвани съкращения.....	4
Въведение.....	6
Цел и задачи.....	8
Материали и методи.....	9
Лабораторен експеримент .....	15
Резултати.....	19
Клинични случаи.....	41
Дискусия.....	50
Изводи.....	60
Приноси.....	61
Научни публикации свързани с дисертационния труд.....	62
Приложения.....	63
Книгопис.....	68

## **Използвани съкращения**

АН – Артериална недостатъчност

АТФ - Аденозин трифосфат

АХ – Артериална хипертония

ДПНП - Диабетната полиневропатия

иРНК - Информационната рибонуклеинова киселина

МВС - минималната бактерицидна концентрация

ПАВ - Повърхностно активно вещество

ПКК - Пълна кръвна картина

РФ - Растежни фактори

САП - Студената атмосферна плазма

СЗО - Световна здравна организация

ХАНК - Хронична артериална недостатъчност на крайниците

ХВН - Хроничната венозна недостатъчност

АВПИ - Association of the British Pharmaceutical Industry

СЕАР - Clinical-Etiological-Anatomical-Pathophysiological

CFU - Colony-forming unit

CRP - C-reactive protein

CVI - Chronic venous insufficiency

DBD - Dielectric-barrier discharge

DFUs - Diabetic foot ulcers

ЕСМ – екстрацелуларен матрикс

EGF - Epidermal growth factor

FGF-2 - Fibroblast growth factors

HIF-1 - Hypoxia-inducible factor -1

HPA - hypothalamic–pituitary–adrenal axis

IGF-1 - Insulin-like growth factor-1

IL1 - Interleukin-1

IL-10 - Interleukin-10

IL-6 - Interleukin-6

IWII 2016 - International wound infection institute 2016

MIC - минималната инхибираща концентрация

MRSA - Methicillin-resistant Staphylococcus aureus

NO - Nitrous oxide

PAD - Peripheral arterial disease

PDGF - Platelet-derived growth factor

PPAR $\gamma$  - Peroxisome proliferator-activated receptors

PVP-I - Povidone-iodine

ROS - Reactive oxygen species

SMD - Physical cold atmospheric surface microdischarge (SMD) plasma

TGF- $\alpha$  - Transforming growth factor alfa

TGF- $\beta$  - Transforming growth factor beta

TNF-алфа - Tumour Necrosis Factor alpha

UV – Ultraviolet

VAC - vacuum-assisted closure

VEGF -vascular endothelial growth factor

VLUs - Venous leg ulcers

## Въведение

Хроничните рани се определят като рани, които не преминават през фазите на зарастване своевременно и не постигат епителизация с повече от 10% за период от 1 месец.

Физиологичният процес на зарастване се постига чрез четири временно и пространствено припокриващи се фази: хемостаза, възпаление, пролиферация и ремоделиране. Често хроничните рани спират във възпалителната фаза на заздравяването. Въпреки различията в етиологията на молекулярно ниво, хроничните рани имат някои общи черти, в това число прекомерни нива на провъзпалителни цитокини, протеази, свободни радикали и стареещи клетки, наличието на персистираща инфекция, дефицит на стволови клетки, които често също са и с нарушена функция [1], [2]

Първоначалното увреждане на тъканта може да е резултат от множество остри или хронични стимули, включително автоимунни реакции, инфекции или механично увреждане. Всички типове рани имат потенциала да станат хронични, като идентифицирането на основната етиология е ключът към успешното им лечение. Основните етиологични причини за възникване на раните са вследствие на венозна недостатъчност, артериална недостатъчност, декубитус или диабет. Системните фактори - хранителен статус, имunosупресия и инфекция, допринасят в значителна степен за лошото заздравяване на раната. [3], [4]

Грижата за хронични рани се основава на основни принципи, които имат за цел не само да премахнат или подобрят етиологичните причини, но и да се справят с основните системни и метаболитни смущения на индивида като цяло. Едновременно с лечението на свързаните с тях усложнения, или етиологични фактори, локалното третиране на раната играе ключова роля в постигането на подходяща среда, в която може да се извърши възстановяване на тъканите. Разбира се, подходящата диагноза и точна етиологична оценка са задължителни условия за успешното лечение на трудно зарастващи рани. Въпреки утвърдените през годините техники, с използване на локални антисептични разтвори и все по-големия избор от превръзки на пазара, в ежедневната практика се изпитват затруднения с обгрижването на пациентите с хронични рани.

Използването на студена атмосферна плазма набира все по-голяма популярност, като резултати от нейният ефект са представени в редица проучвания. Голяма част от

проведените експерименти са на ин витро модели, където не е възможно възпроизвеждането на реалните механизми и фази на зарастване на раните, но въпреки това резултатите са обнадеждаващи и дават основание за очакван добър ефект от прилагането на студена атмосферна плазма при лечение на хронични рани.

## Цел и задачи

**Цел:** да се изследват, обобщят и представят резултатите от прилагането на студена атмосферна плазма при лечението на трудно зарастващи рани.

### Задачи

1. Да се направи литературна справка, във връзка с механизмите на зарастване на хроничните рани, основните типове хронични рани и приложението на студена атмосферна плазма при лечение им.
2. Да се проведе и анализира лабораторен експеримент върху инокулирани микроорганизми.
3. Да се анализират резултатите от изследваната групата.
4. Да се определи ефекта на приложение на студена атмосферна плазма при лечение на трудно зарастващи рани.
5. Да се изготви протокол за поведение при пациенти с хронични рани



## I. Материал и методи

### 1. Материал

За период от 3 години (2016-2018) са диагностицирани и подложени на лечение със студена атмосферна плазма 52 пациенти с една или повече трудно зарастващи рани. Проучването е проспективно, контролирано и проведено в УБ „Лозенец“. В него бяха включени 47 пациенти, като анализа е направен за първите 30 дни от прилаганото лечение. Пациентите бяха разпределени в две групи в зависимост от честотата на прилагане на студена атмосферна плазма. Трима пациенти отпаднаха поради невъзможност за амбулаторни посещения, а при двама се наложи последваща ампутация на засегнатия крайник.

#### **Включващи и изключващи критерии**

В проучването бяха включени пациенти с наличие на трудно зарастваща рана с давност повече от 30 дни. Първоначалния преглед, както и последващото проследяване, третиране със студена атмосферна плазма и избор на превръзка се осъществява на базата на приет протокол.

#### **Критерии за включване в проучването**

1. Пациенти над 18 години.
2. Наличие на трудно зарастваща рана за период повече от 30 дни

#### **Критерии за изключване от проучването**

1. Лица под 18г.
2. Наличие на ендопротеза от страна на лезията
3. Бременност
4. Отказ на пациента от прилагането на студена атмосферна плазма

## 2. Методи

### 2.1 Диагностични методи

#### 2.1.1 Анамнеза

Анамнезата, както и паспортната част се попълват във формуляр създаден за нуждите на проучването. Последователно се отбелязват придружаващите заболявания и приема на медикаменти, като особено внимание се отделя на търсенето на фактори допринасящи за появата на хронична рана. Целенасочено се описват методите и средствата за лечение до момента, в това число честота на смяна на превръзки, степен на ексудация и избор на почистващ разтвор. При наличие на микробиологичен резултат се анализират вида и микробното число на изолираните микроорганизми, както и резистентността им към антибиотично лечение. Упоменават се наличните рискови фактори – тютюнопушене, нездравословно хранене, икономически и битови условия, стрес, натовареност, консумация на алкохол, наркотични вещества и др. Целенасочено се описва приема антикоагулантни и антиагрегантни медикаменти. Приложение №1

#### 2.1.2 Статус

След снемане на анамнезата се отчита общото състояние на пациента, хабитус, кожният тургор, тегло, ръст, ИТМ, подкожна мастна тъкан, пигментация на кожата, температура, наличие на оперативни цикатрикси, , наличие на видими отоци, варикозни промени и др.

Локален статус: При описание на локалния статус се определя площта на раната, описват се кожният ръб и дъното на раната. При наличие на формиран видим биофилм се определя приблизителната му площ в проценти. Отчита се наличието на свежи грануляции, техния цвят и наличието на спонтанно кървене при снемане на превръзката. Основен белег на възпаление е вида и количеството на ексудата.

Сравняват се двата крайника за наличие на оток, като се извършва измерване за последващо сравнение и отчитане на терапевтичните резултати. Описва се степента на засягане на околната кожа и наличието на мацерации.

След първоначалният преглед, снемане на анамнеза и физикален преглед се взема решение за последващите диагностични и терапевтични подходи. Назначават се лабораторни изследвания и консултация със съдов хирург.

## **2.2. Параклинични изследвания**

### **2.2.1 Лабораторни изследвания:**

За целта на изследването са необходими минимален пакет от лабораторни изследвания включващи ПКК, кръвна глюкоза и CRP, като основен фокус е търсенето на възпалителна активност.

При наличие на артериална недостатъчност е необходимо да се определи степента на съдовото засягане. Целенасочено се сема анамнеза за появата на болка дистално от мястото на предполагаемата обструкция. Анамнезата за поява на болка при ходене или в покой налагат допълнително уточняване на съдовия статус. При стъпало-брахиален индекс  $< 1.0$  се предполага съдова увреда, а при резултата  $< 0,7$  е противопоказна компресивната терапия.

Изследва се венозната система, като се използва CEAP класификацията за стандартизиране на хроничните венозни заболявания на долните крайници.

### **2.2.2. Образни изследвания**

Образнодиагностични изследвания са необходими при пациенти със съмнение за развитие на инфекциозен процес в дълбочина. При съмнение за развитие на остеомиелит е необходимо задължително провеждането на рентгеново изследване и консултация с ортопед преди вземане на решение за започване на лечение със студена атмосферна плазма.

### **2.2.3. Фотодокументиране**

Всички кожни лезии се фотодокументират за последваща оценка на резултатите от проведеното лечение. За целите на проучването използваме мобилното приложение MOWA – Mobile Wound Analyzer даващо възможност за изчисляване площта на раните, както и процентното съотношение между некротичната тъкан, биофилм и наличието на свежи грануляции. Използването на приложението значително улеснява определянето на площта особено при рани с неправилни форми. За калибриране и определяне на точните

размери на раната се използва еднократна принтирана синя точка с размер 2,5 см в диаметър.



Фигура 1: MOWA – Mobile Wound Analyzer – Wound Care Solution

## **2.2.4 Микробиологичен контрол**

Микробиологичен контрол се осъществява на всички рани включени в проучването. Преди вземане на пробата раната не се третира с антисептични разтвори, ако е необходимо се извършва почистване с чист физиологичен разтвор. Съществуват няколко техники за вземане на микробиологична проба, като широко застъпени са метода на Levine и Z – Образната техника. Използват се тампони с памучен връх в твърда транспортна среда Amies. Култивирането се извършва през първите 24 часа. Техниката на Levine включва ротиране на тампона на площ от 1 см<sup>2</sup>, като се прилага дозиран натиск за напояване с течност от раневото ложе. При Z-образната техника се извършва зигзагообразно движение на тампона по цялата ранева повърхност. Прието е, че при тази техника има по-висок риск от контаминация поради по-голямата площ на пробовземане.

## **2.3. Терапевтични методи**

### **2.3.1 Техника за обработка на раната**

Използва се стандартизирана техника при смяна на превръзките. Отчита се влажността на раната за определяне на интервалите за подмяна на превръзката. След снемане на превръзката се поставят стерилни ръкавици. Здравата и незасегнатата кожна зона около раната се обработва трикратно с йод-повидон, като не се допуска навлизане на разтвора върху лезията. За почистване на раната се използва напоена с чист физиологичен разтвор марля. Марлята се поставя върху раната за 5 мин, като след това се извършва механичен дебридман. При необходимост и при наличие на трудно отстраняващи се девитализирани тъкани се използва коремчест скалпел за допълнително почистване на раната. След подсушаване се преминава към третиране със студена атмосферна плазма. Пациентите задължително се информират за прилагането на студена атмосферна плазма, като за целта подписват информирано съгласие. (Приложение №2)

За източник на студена атмосферна плазма беше използван Plasma ONE (MEDICAL SYSTEMS® GmbH, Germany). Третирането на засегнатия участък следва стъпки, приети като протокол за лечение на хронични рани със студена атмосферна плазма. В зависимост от големината на раната се избира крайник с подходящ размер. Продължителността на третирането е в интервал от 2 минути върху зоната на обхват на стъклената проба. Необходимо се спазването на дистанция от 2мм между стъклената проба и раневата повърхност за постигане на адекватно генериране на САП. След приключване, раната отново се обработва с физиологичен разтвор. За постигане на

адекватна хидратация на раната се използва Prontosan gel между смяната на превръзките. За покриване на раната се използва вторична превръзка в зависимост от степента на ексудация. С цел избягване на външно замърсяване на пациентите се препоръчва да не сменят превръзките в домашни условия, както и да не позволяват раната да остава непокрита. При обширни и обилно секретирани рани е възможно промиване на раната с чешмяна вода за период от 10 мин с последващо подсушаване и налагане на стерилна превръзка. Това е възможно при условие, че следващата превръзка в амбулаторни условия е в кратък интервал от време. Не се препоръчва използването на антибиотична пудра, както и разтвори с доказана цитотоксичност.

За избора на превръзка се следват следните принципи:

- Поддържат адекватна влажност с възможност за изпарение на ексудата.
- Не залепват към раневата повърхност
- Не позволяват прорастване на нова тъкан към повърхността на превръзката
- Сигурно фиксиране към околната здрава тъкан
- Удобна за носене

### 2.3.2 Компресивна терапия

Компресивната терапия се оказва задължителна при пациенти с оток на крайниците, и венозна недостатъчност. Ластични бинтове се навиват до нивото над коляното, като пръстите на долните крайници остават открити за контрол на оросяването. Целта е да се постигне компресия отговаряща на Class I или II. За целта може да бъдат използвани, ластични бинтове с маркер даващ информация за степента на компресия. Процедурата се извършва след края на превръзката при пациент в легнало положение и повдигнат крайник на нивото на гръдния кош за 5 мин. В зависимост от активността на пациента, може да се препоръча и носенето на ластични чорапи, но трябва да се отчете необходимостта от честата им смяна поради замърсяване особено при силно ексудирани рани. Обикновено в първите дни след налагане на ластична компресия, пациентите се оплакват от болка. В такъв случай е възможно разхлабване на превръзката и повдигане на крайника. Не се препоръчва налагането на вече използван бинт. На пациентите се препоръчва повдигането на крайниците над нивото на гръдния кош за период от 30 мин. по 3-4 пъти на ден.

## 2.4. Лабораторен експеримент

За нуждите на проучването и с цел оценка на in-vitro ефективността на студената атмосферна плазма беше подготвен и проведен лабораторен експеримент включващ най-често изолираните микроорганизми от хронични рани.

За източник на студена атмосферна плазма беше използван Plasma ONE (MEDICAL SYSTEMS® GmbH, Germany) (фиг. 2). Plasma One генерира студена атмосферна плазма чрез йонизация на атмосферния въздух. Апаратът е регистриран като медицинско изделие (Class IIa). Използваната стъклена проба с диаметър от 34 мм и конвексна форма. (фиг. 3)



Фигура 2: Plasma ONE (MEDICAL SYSTEMS® GmbH, Germany)



Фигура 3: Експериментална постановка

#### 2.4.1 Подготовка на експеримента

Тестването се проведе с референтни щамове на *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, от BD Microtrol Discs (Becton Dickinson, US). За достоверност на резултатите, експерименталната постановка се проведе двукратно в две последователни седмици, като се използваха нови лиофилизирани дискове.

Леофилизираните дискове се инокулират в Мозъчно-сърдечен бульон (Brain Heart Infusion broth) при 35°C за 18 часа. След това бактериите се пренасят на хранителна среда с йозе. На 4-тия ден от свежите колонии беше подготвена 0,5 суспензия на стандарт McFarland (приблизително  $10^8$  CFU/ml). Концентрациите на работните разтвори са определени количествено по метода на Кох. За нуждите на експеримента се извършиха разреждания до  $10^5$  и  $10^3$  CFU/ml. Средния CFU/ml след отброяване се определи, като  $1.4 \times 10^5$  и  $1.4 \times 10^3$  (5.15 и 3.15 log CFU/ml) за *S. aureus*,  $1.3 \times 10^5$  и  $1.3 \times 10^3$  (5.11 и 3.11 log CFU/ml) за *E. coli* и  $1.1 \times 10^5$  и  $1.1 \times 10^3$  (5.04 и 3.04 log CFU/ml) за *P. aeruginosa*.

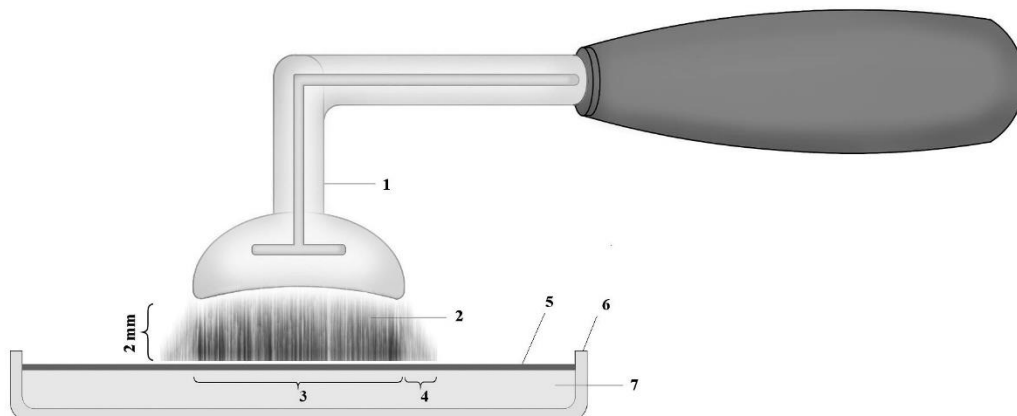


Обем от 100µl от всяка работна суспензия беше посят на хранителна среда Mueller-Hinton II върху петри и разпределен равномерно по повърхността с шпатула на Drigalski. Обработката със студена атмосферна плазма е извършена незабавно върху всяко петри в ламинарен бокс. Работната повърхност на крайника се разполага неподвижно на 2 мм от повърхността на петрито. (Фиг. 4) Всеки от шамовете е обработен за времеви интервал от 30, 60, 120 и 300 сек. Между различните шамове стъкленият крайник се почиства с 70% ethanol. Контролните петрита са оставени за 300 сек в условията на ламинарен бокс. Всички петрита са поставени в инкубатор на 35°C, като след 24 часа се измерва зоната на инактивация и преброяване на оцелелите колонии. За всеки времеви интервал и за всеки шам са подготвени по 3 петрита. Неекспозирани на плазма петрита са използвани за контрола.

#### **2.4.2 Критерии за оценка**

За оценка на ефективността на студената атмосферна плазма са определени следните показатели:

1. Диаметър на зоната на инактивация спрямо диаметъра на работната част на апарата.
2. Диаметър на разширената зона на инактивация показваща разпространението на заредените частици по повърхността на петрито.
3. Дозов ефект изчислен спрямо времето на експозиция и намаляването на CFU в третираната зона (оцелели CFU в третираната зона при различните времеви интервали).



Фигура 4: 1. Работен накрайник; 2. Зона на експозиция; 3. Зона на инактивация; 4. Разширена зона на инактивация; 5. Работна суспензия; 6. Петри; 7. Хранителна среда

### 2.4.3 Статистически методи

Данните са въведени и обработени със статистическия пакет IBM SPSS Statistics 19.0. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе прието  $p < 0.05$ .

Приложени са следните методи:

1. Дескриптивен анализ
2. Вариационен анализ
3. Графичен анализ
4. Тестове  $\chi^2$  и точен тест на Фишер за оценка на връзката между категорийни променливи
6. Непараметричен тест на Колмогоров-Смирнов и Шапиро-Уилк
7. Т-тест на Стюдънт за определяне на значими разлики в две средни от две независими извадки

## II. Резултати

### 1. Резултати от приложението на студена атмосферна плазма върху петри с инокулирани микроорганизми

Преброяването на колонии беше извършено едновременно с отчитане на резултата на 24 час от инкубацията. Изчисляването на CFU/ml е извършено по метода на Кох. Измерването на диаметрите се извърши ръчно с линия, като бяха отчетени средните стойности от измерванията в четирите посоки. Данните са представени на таблица 1 и таблица 2.

Таблица 1: Резултати от измерванията на петрита инокулирани с  $10^3$  CFU/ml

Времени интервал, sec	микроорганизъм CFU/ml	Среден диаметър, cm	SD	Съотношение м/у. ЗИ и ЗЕ, cm <sup>2</sup>	Среден брой колонии	Зона на инактивация, cm <sup>2</sup>	Оцелели колонии, %
30	S. aureus 1.4x10 <sup>3</sup>	3,63	0,06	1,07	2	10,3	8,4
60		3,87	0,06	1,14	2	11,8	8,7
120		4,17	0,06	1,23	0	13,7	1,1
300		4,37	0,15	1,28	0	15,0	0,0
30	E. coli 1.3x10 <sup>3</sup>	3,67	0,06	1,07	0	10,6	0,0
60		3,63	0,06	1,17	5	10,3	21,2
120		3,97	0,06	1,28	0	12,4	1,3
300		4,37	0,06	1,28	0	15,0	0,0
30	P. aeruginosa 1.1x10 <sup>3</sup>	3,37	0,06	1,03	13	8,9	83,0
60		3,37	0,06	1,06	0	8,9	0,0
120		3,50	0,00	1,03	0	9,6	1,9
300		3,60	0,10	1,06	1	10,2	5,5

Легенда: SD – Стандартно отклонение; ЗИ – Зона на инхибиция; ЗЕ – зона на експозиция (фиг.4 т.2.)

Времени интервал, sec	микроорганизъм CFU/ml	Среден диаметър, cm	SD	Съотношение м/у. ЗИ и ЗЕ, cm <sup>2</sup>	Среден брой колонии	Зона на инактивация, cm <sup>2</sup>	Оцелели колонии, %
30	<b>S. aureus</b> 1.4x10 <sup>5</sup>	3,63	0,06	1,07	11	10,3	0,4
60		3,83	0,06	1,13	10	11,5	0,4
120		4,00	0,10	1,18	6	12,6	0,2
300		4,33	0,06	1,28	3	14,7	0,1
30	<b>E. coli</b> 1.3x10 <sup>5</sup>	3,47	0,06	1,02	ND	9,5	ND
60		3,57	0,06	1,05	ND	10,0	ND
120		3,77	0,06	1,11	ND	11,2	ND
300		3,83	0,06	1,13	0	11,5	0
30	<b>P. aeruginosa</b> 1.1x10 <sup>5</sup>	3,20	0,00	0,94	ND	8,0	ND
60		3,27	0,06	0,96	ND	8,4	ND
120		3,37	0,06	0,99	ND	8,9	ND
300		3,53	0,06	1,04	2	9,8	0,1

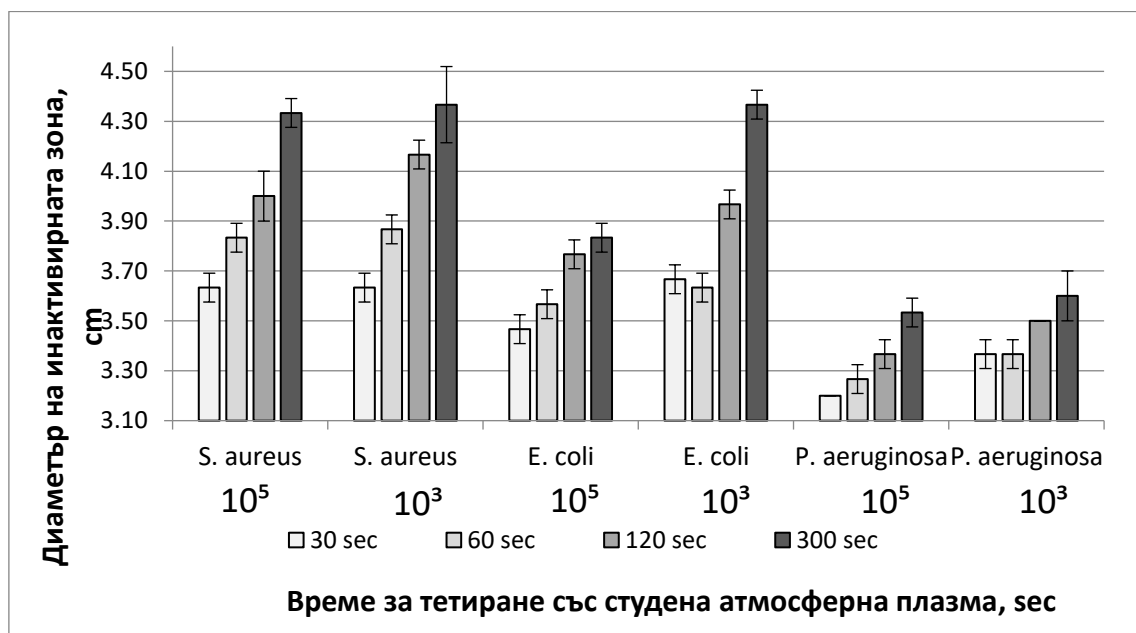
Таблица 2: Резултати от измерванията на петрита инокулирани с 10<sup>5</sup> CFU/ml

Легенда: SD – Стандартно отклонение; ЗИ – Зона на инхибиция; ЗЕ – зона на експозиция (фиг.4 т.2.) ND – неопределена

*Staphylococcus aureus* показва по-висока чувствителност при двете разреждания в сравнение с другите два щама. Средните стойности се различават с малки отклонение, като превес има разреждането от 10<sup>3</sup> CFU/ml. Диаметърът флукутира между 3.63 cm и 4.5 cm след 30 и 300 sec на третиране със студена плазма. Най-голяма разлика се отчита при *Escherichia coli*, където и при двете разреждания се отчитат сходни резултати при облъчването за 30 и 60 сек, като с увеличаване на времето до 300 сек се отчита разширяване на зоната с 0,54 cm за 10<sup>3</sup> в сравнение с петритата от 10<sup>5</sup>.

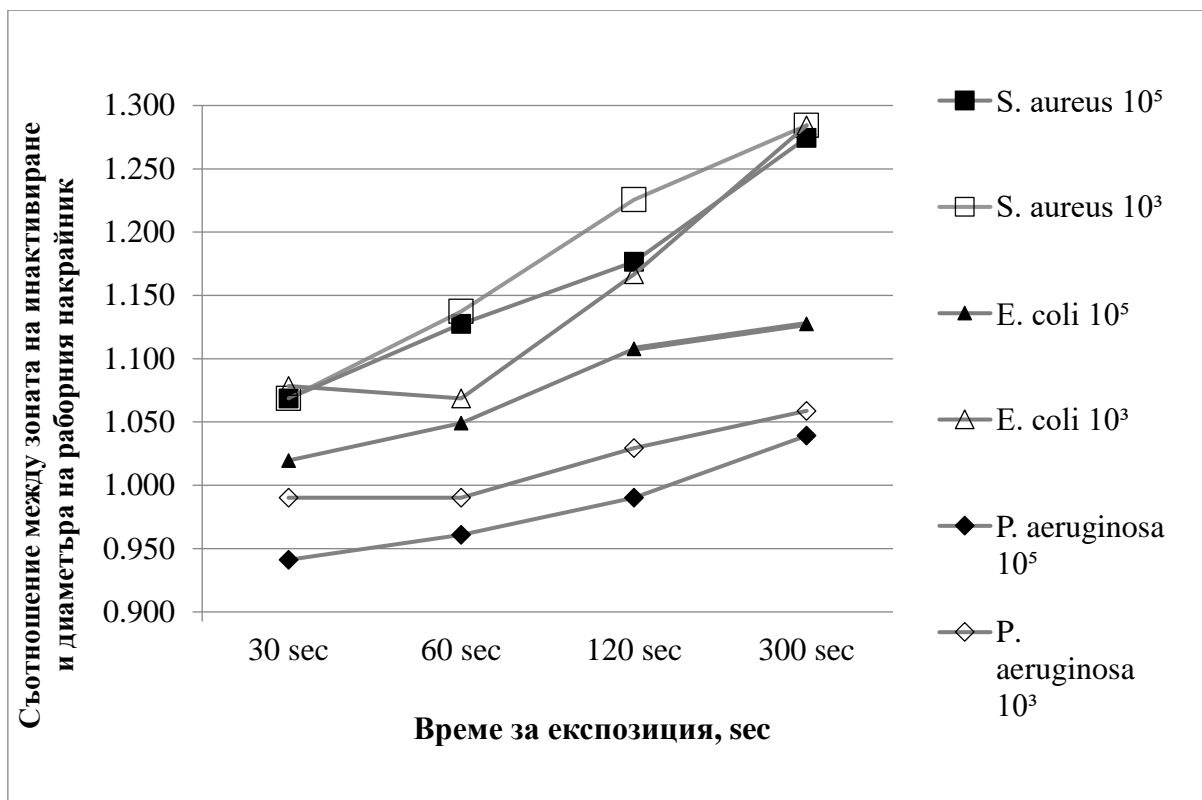
*Pseudomonas aeruginosa* показва по-голяма резистентност по отношение на времеви интервал. Най-големият измерен диаметър при максималния интервал на третиране е

средно 3.60 см, като за *S. aureus* и *E. coli* такава зона на инхибиране се постига още на 30-тата секунда.



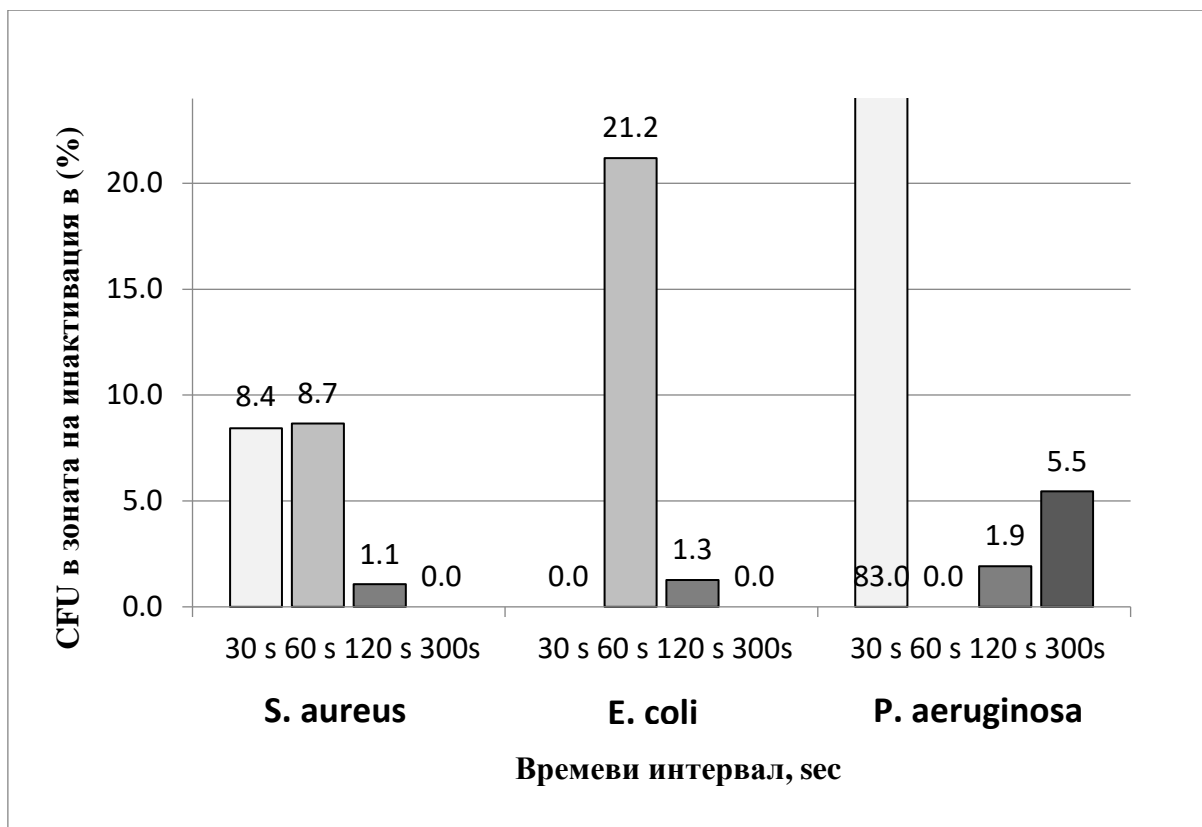
Фигура 5: Графично представяне на резултатите от измерванията от зоната инактивация. Средният размер е изчислен след измерване с линия на най-дългата и най-късата страна.

Подобни резултати се наблюдават и в съотношението между диаметъра на инактивация и диаметъра на работния накрайник на апарата. Високи стойности се наблюдават при *S. aureus* ( $10^5$  и  $10^3$ ) и *E. coli* ( $10^3$ ), докато *P. aeruginosa* показва стойност под 1.0 след 30 и 60 sec на третиране. При времеви интервал от 300 sec, съотношението е около 1.050. Тясна връзка между размера на работния накрайник и зоната на инактивация се наблюдава при *P. aeruginosa*, където стойностите варират около 1.0 с  $\pm 0.59$  отклонение. Фиг. 6



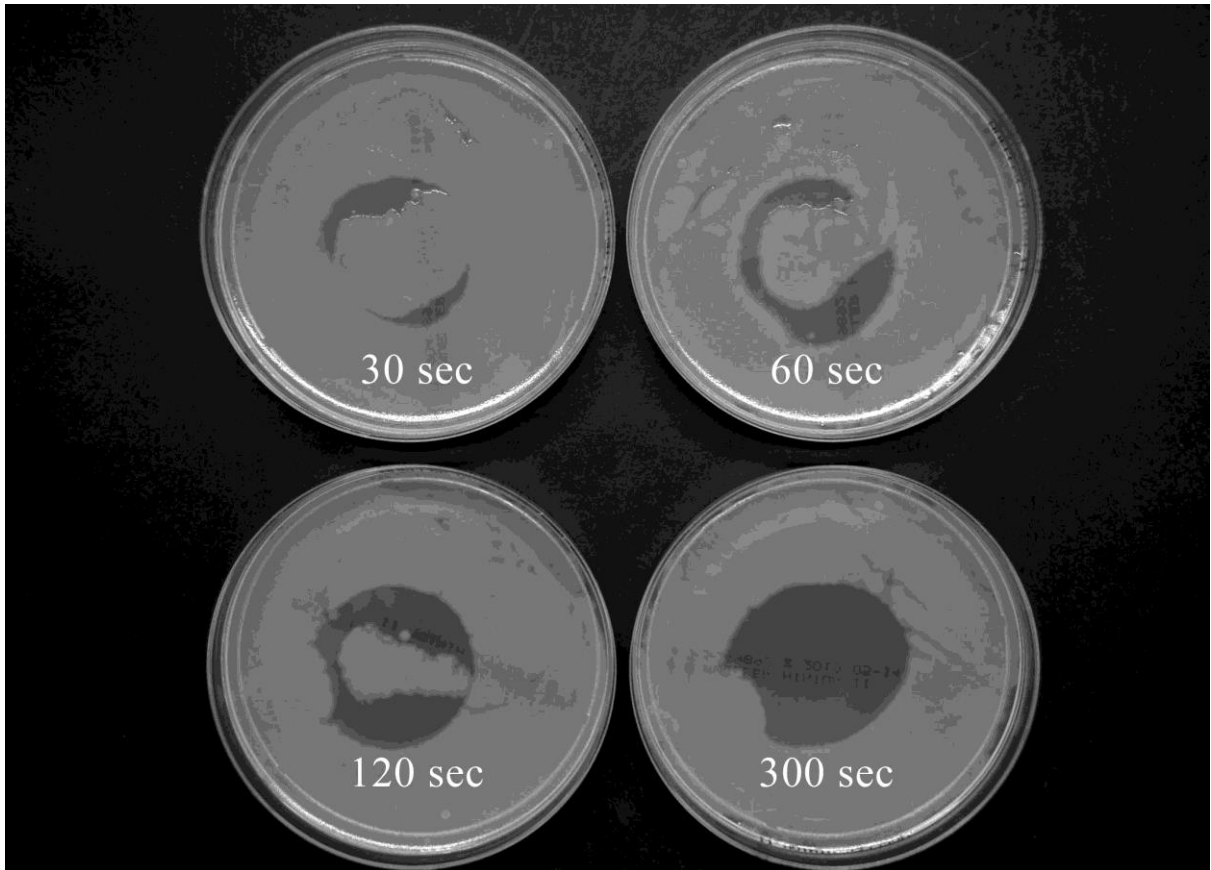
Фигура 6: Графично представяне на съотношението между диаметъра на индуцираната от плазмата зона на инактивация и размера на работния накрайник. Стойностите се повишават с увеличаване на времето.

Данните от отчитане на ефективността от плазмата при инактивирането на CFU са показани на фиг. 7. Като цяло, CFU в зоната на инактивация при трите щам са по-малко и оптимални за преброяване, като това е най-водно в групата на разреждането от 10<sup>3</sup> CFU/ml.



Фигура. 7: Ефективност на студената атмосферна плазма изчислена на база оцелели колонии при групата инокулирана с  $10^3$  CFU/ml от всеки щам. Резултатите показват процент растящи колонии сравнено с очакваното количество попаднали бактерии в зоната на инактивация. Точните данни са показани в таблица 1

При  $10^5$  CFU/ml преброяването е невъзможно поради конфлуентен растеж и риск от допускане на грешка. В групата на  $10^5$  само при *S. aureus* беше възможно преброяване, докато при *E. coli* и *P. aeruginosa* времевите интервали от 30, 60 и 120 сек дадоха почти слети колонии. Фиг.8



Фигура 8: Бактериална инактивация през различните времеви интервали при *Pseudomonas aeruginosa*  $1.1 \times 10^5$  CFU/ml.

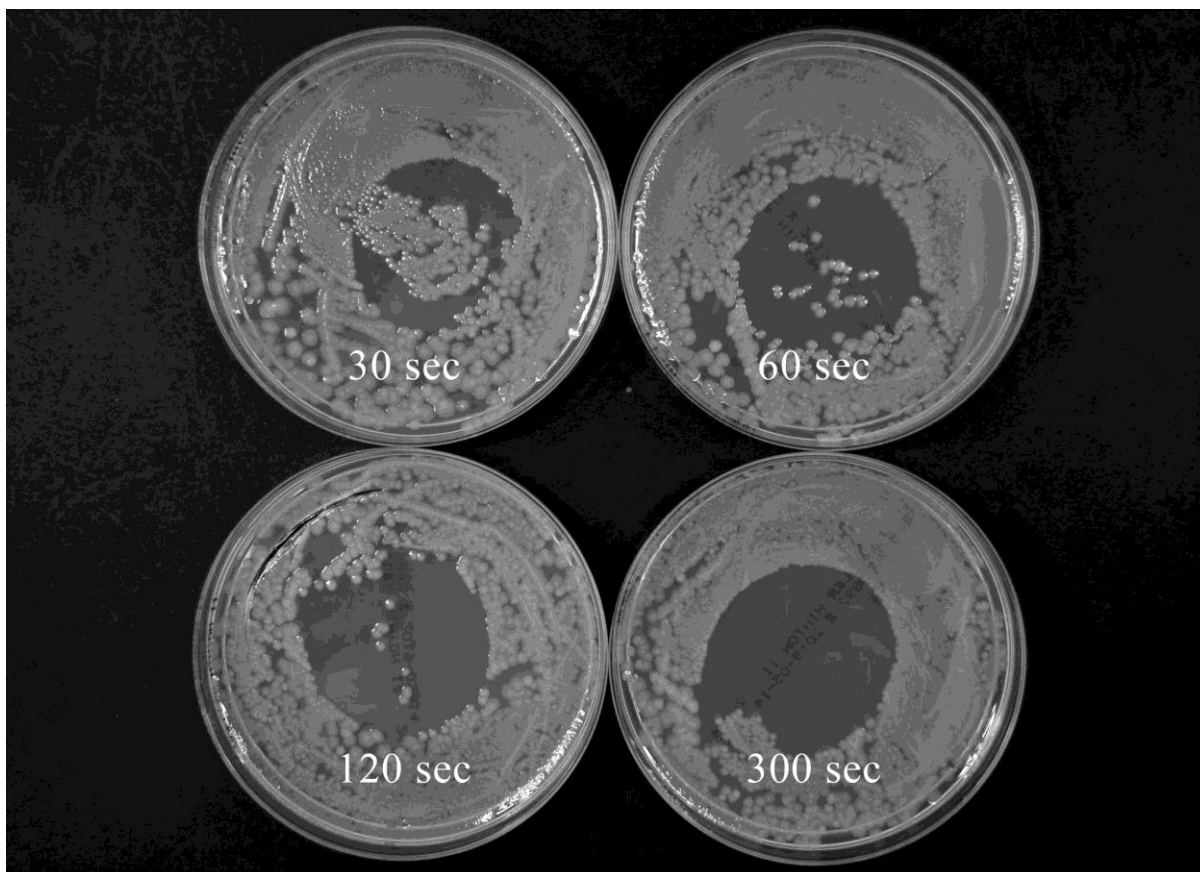
Ефективността на плазмата е по-изразена при *S. aureus* сравнено с останалите два щамове, като резултатите показват редуция на CFU свързана с увеличаване на времевия интервал на действие при двете разреждания. Броят на колонии при *E. coli* и *P. aeruginosa* при  $10^5$  варират през различните времеви интервали, но запазват тенденция за редуция с увеличаване на времето на експозиция.

При *E. coli* се наблюдава пълна инактивация при експозиция от 30 и 300 sec докато при интервала от 1 минута броят на CFU е намален до 21%. Идентични резултати се наблюдават и при *P. aeruginosa*, като пълна инактивация при този щам се отчита след едноминутна експозиция.

От друга страна, по-линейна редуция на CFU е видна при тестовите групи  $10^5$  и при двата Грам-отрицателни щамове, въпреки че точен брой колонии не се изброяват, както е показано на фиг. 9. Като цяло процентът на оцелелият CFU във всички щамове се



променя между по-къси интервали и въпреки статистически по-високата степен на преживяемост при  $10^3$  групата, продължителна експозицията от 2 минути при *S. aureus* и 5 минути при *P. aeruginosa* и *E. coli* успя да постигне бактериална редукция в диапазона 94-100%.



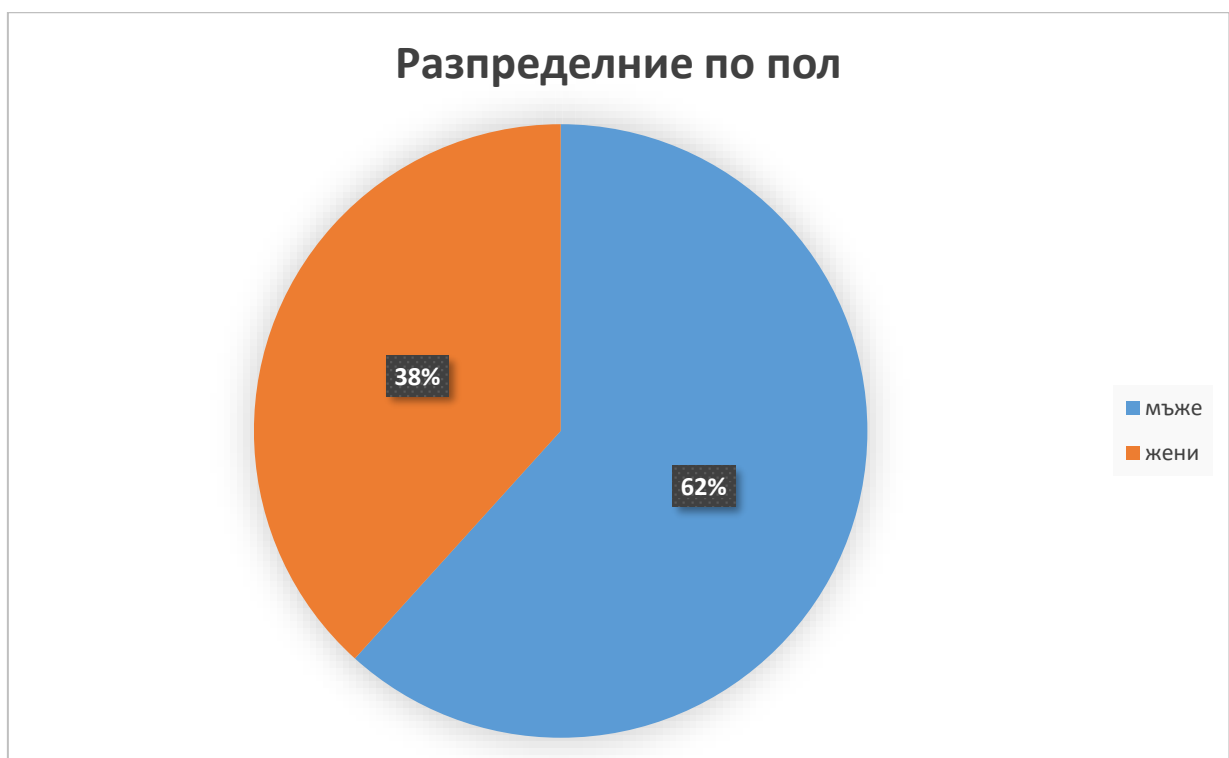
*Фигура 9: Бактериална инактивация през различните времеви интервали при Escherichia coli  $1.3 \times 10^5$  CFU/ml*

## 2. Резултати от приложението на студена атмосферна плазма при пациенти с хронични рани

Обект на проучването са 47 пациенти диагностицирани с хронична рана, лекувани амбулаторно в УБ „Лозенец“ за периода от 2017 год. до 2019 год.

### 2.1. Разпределение по пол

От проведеня анализ е видна по-високата честота на пациентите от мъжки пол ( 29 пациента)



Фигура 10: Разпределение по пол, n=47

### 2.2. Разпределение по възраст

Разпределението по възраст е представено в три възрастови интервала: 20-50 год.; 51-70 год. и пациенти над 70 години.

Забелязва се тенденция за увеличаване на честотата на пациенти с хронична рани с напредване на възрастта.



Фигура 11: Разпределение по възраст

Основната група от пациенти е в интервала 51-70 години, което най-вероятно е свързано с влошаване на здравето и появата на придружаващи заболявания с напредване на възрастта. Намаляването на броя на пациентите над 70 години е свързано с общата продължителност на живота и затрудненията за чести амбулаторни превръзки.

За определяне на нормалното разпределение на групата е използван статистически тест.

Таблица 3: Резултати от тест за нормалност

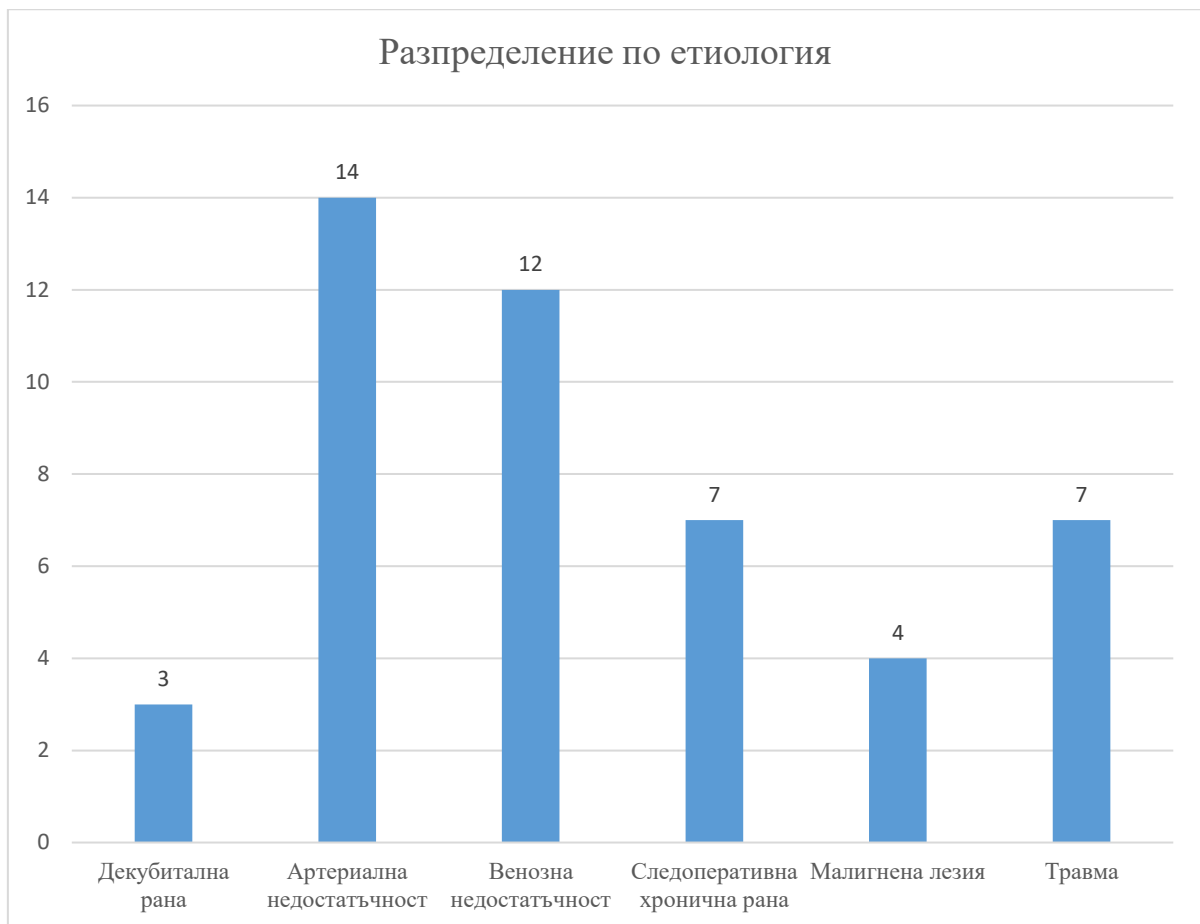
#### Tests of Normality

пол	Kolmogorov-Smirnova			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
Възраст	мъже	.310	29	<b>.000</b>	.783	29	<b>.000</b>
	жени	.278	18	<b>.001</b>	.808	18	<b>.002</b>

Тестовите Kolmogorov-Smirnova и Shapiro-Wilk показват, че разпределението на възрастта по пол не е нормално, което се дължи на по-честата поява на хронична рана сред възрастното население.

### 2.3. Разпределение по етиология

В изследваната група се наблюдават 6 основни етиологични процеса, водещи до хронична рана – декубитална рана, артериална недостатъчност, венозна недостатъчност, следоперативни трудно зарастващи рани, малигнена лезия и травма.



Фигура 12: Разпределение по етиология

Липсва друга честа причина за хронична рана, а именно диабетното стъпало. Това се дължи на факта, че при пациентите от изследваната група с локализация на лезията „стъпало“ не се наблюдава придружаващо заболяване захарен диабет.

При анализа прави впечатление по-високата честота на хроничните рани вследствие на артериална недостатъчност и венозна недостатъчност, като посттравматичните и раните след оперативна намеса заемат трето място.

За статистическо сравняване по възраст и етиология се използва Chi-Square тест във варианта – точен критерий на Фишер при който се отхвърля нулевата хипотеза и се приема, че между двата фактора се открива статистическа зависимост ( $p < 0.05$ ).

Таблица 4: Chi-Square test по възраст и етиология.

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2- sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	32.776 <sup>a</sup>	10	.000	.000		
Likelihood Ratio	30.883	10	.001	.001		
Fisher's Exact Test	23.107			.001		
Linear-by-Linear Association	11.985 <sup>b</sup>	1	.001	.000	.000	.000
N of Valid Cases	47					

Таблица 5: Разпределение на пациентите по възраст и етиология

		Етиология					
		Декубитална рана	Артериална недостатъчност	Венозна недостатъчност	Следоперативна хронична рана	Малигнена лезия	Травма
Възраст	20-50	0	1	0	0	3	4
	51-70	0	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	1	2
	>70	3	3	4	1	0	1
Общо		3	14	12	7	4	7

В таблица 5 е представено разпределението на пациентите спрямо етиологичния фактор и възрастовия интервал. Прави впечатление липсата на декубитална рана във възрастовия интервал 20-70 год., като всички пациенти с тази етиология са над 70

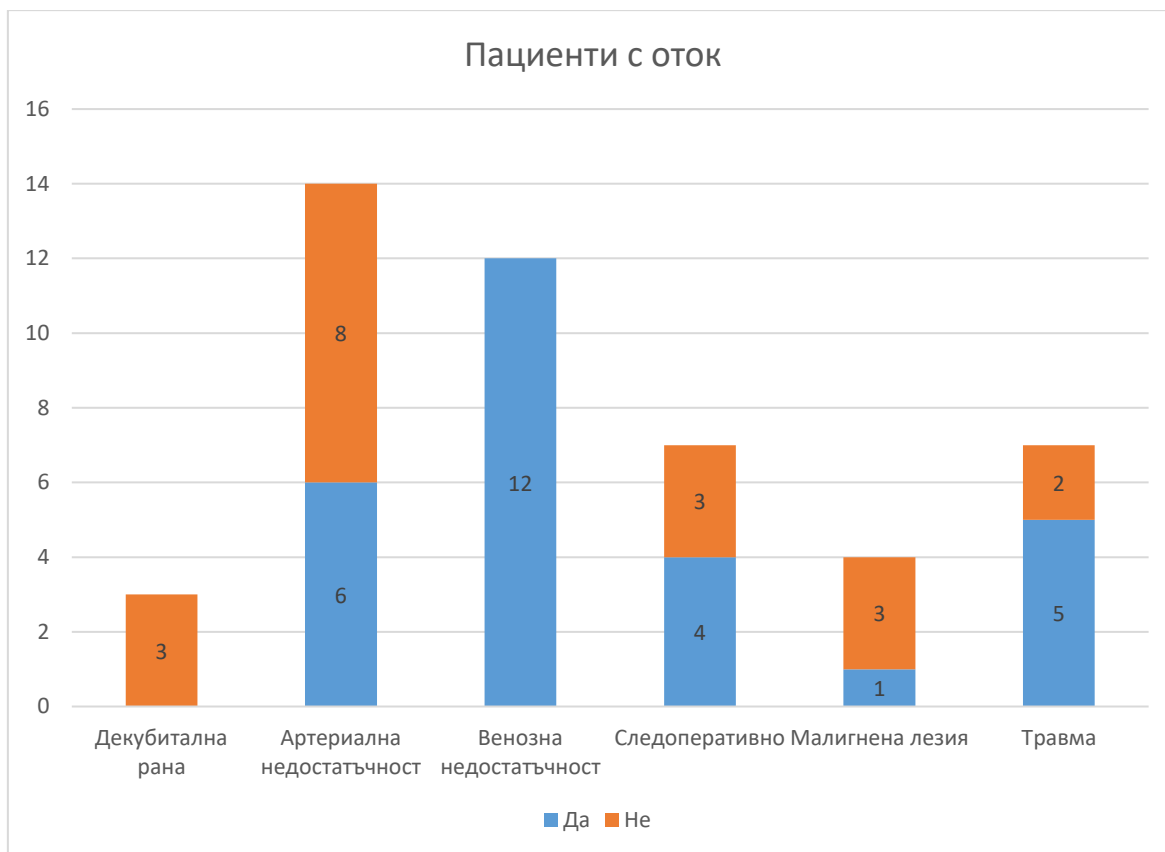
годишна възраст. Това вероятно се дължи на фактора залежаване и коморбидитет в тази възрастова група сравнено с останалите две. Пациентите със следоперативна хронична рана са основно в групата 51-70 години, като само един пациент е над 70 годишна възраст.

#### 2.4. Разпределение на пациенти с наличие на оток

Отокът на засегнатия крайник нарушава циркулацията, което от своя страна води до забавяне на зарастването. В наблюдаваната група пациентите с оток са 60%, като при пациентите с етиология венозна недостатъчност наличието на оток е 100%.



Фигура 13: Разпределение на пациентите с оток

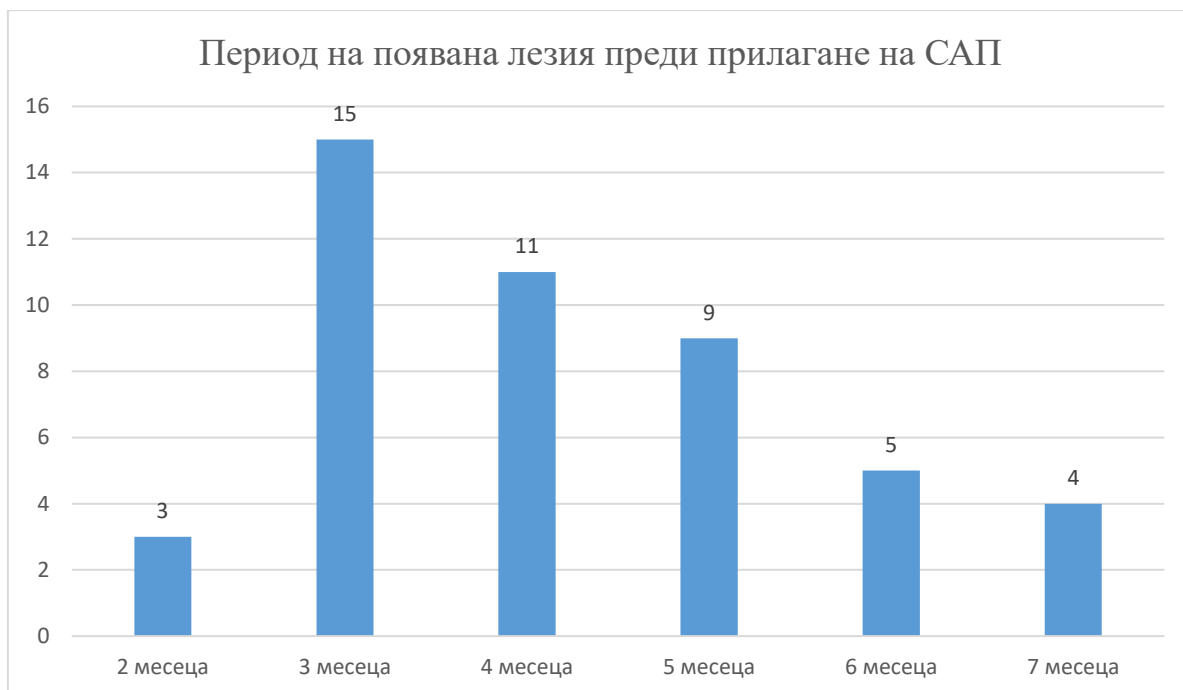


*Фигура. 14: Разпределение по етиология и наличие на оток.*

При пациентите с етиологичен фактор декубитална рана не се наблюдава наличие на оток. Не се открива статистически значима връзка между двата показателя възраст и наличие на оток при прилагане на Fisher's Exact Test ( $p > 0.05$ ), но такава се открива при анализирани за етиология и наличие на оток ( $p < 0.05$ ).

### **2.5. Разпределение на пациентите по продължителност на прилаганото лечение преди използване на студена атмосферна плазма.**

Разпределението на пациентите според продължителността на наличието на рана преди прилагане на студена атмосферна плазма е както следва:

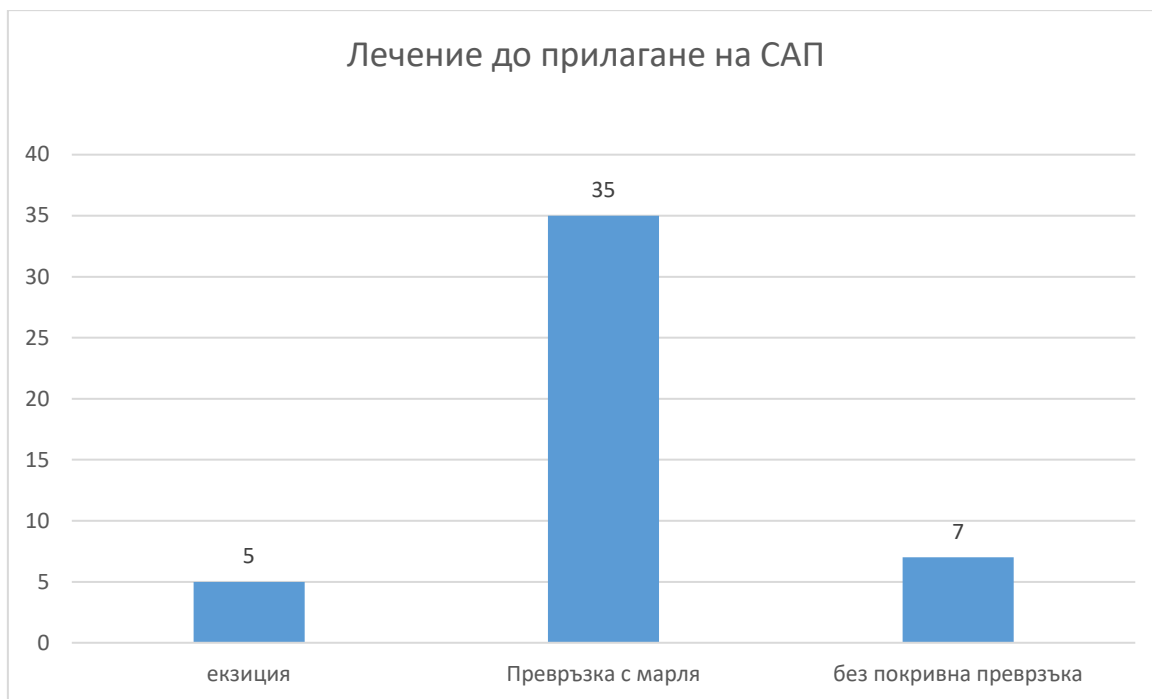


*Фигура 15: Период на поява на лезията преди прилагане на САП*

Основната група пациенти са с анамнеза за незарастваща рана за период между 3 и 5 месеца (n=35) на фона на 9 случая над 5 месеца и само 3 под 3 месеца.

За този период раната е била подлагана на обработка с антисептични разтвори и покривна превръзка с марля при 35 пациента. Хирургична обработка с ексцизия е извършена при 5-ма пациенти, а при 7 раната е оставяна без обработване и на открито (без покривна превръзка).





*Фигура 16: Провеждано лечение преди прилагане на САП*

Очаквано по-голямата част от пациентите са подлагани на периодични превръзки с антисептична обработка на раната. Прави впечатление малкият брой, подложени на хирургична ексцизия ( $n=5$ ). Близко 15% от пациентите са оставили лезията без покривна превръзка, което може да доведе до допълнително контаминиране и неблагоприятно действие на факторите на околната среда.

Таблица 6: Провеждано лечение спрямо периода на поява на лезия преди прилагане на САП

Месеци		Лечение			Общо
		Ексцизия	Превръзка	Открита рана	
Период на поява на лезия преди прилагане на САП	2	0	3	0	3
	3	0	15	0	15
	4	1	10	0	11
	5	2	4	3	9
	6	1	1	3	5
	7	1	2	1	4
Общо		5	35	7	47

Прави впечатление, че пациентите с не обработвана и оставяна на открито рана са в групата с по-продължителна незарастваща лезия.

Очаквана е и липсата на хирургическа ексцизия в началото на формиране на кожна лезия, когато все още се очаква добър ефект от прилагането на стандартните превръзки с използване на антисептични разтвори.

Открива се и статистическа значима връзка между периода на незарастването на раната и прилаганото лечение ( $p < 0.05$ ). Както е видно от горната таблица, пациентите при които е прилагана обработка с поставяне на превръзка са с по-кратка анамнеза за хронична рана.

## 2.6 Анализ на резултатите от микробиологичния контрол на хроничните рани.

Съществуват достатъчно литературни данни за връзката между инфекцията на раната и времето за нейното зарастване.

При изследваната група пациенти е проведено микробиологично проследяване на всички пациенти на първи ден преди започване на лечението с САП и контролна проба на 14-ти ден за оценка на ефективността на прилаганото лечение.



*Фигура 17: Разпределение на изолираните микроорганизми.*

При 38 (81%) от пациентите се изолират микроорганизми, а при 9 от пациентите (19%) не се изолират такива. Най-честите изолирани микроорганизми от раневата повърхност са *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* съответно 28%;21% И 19%. В изследваната група значително по-рядко се изолират *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* и *Candida albicans*, поради което те са обединени в група „ други“ (n=6;13%)

Не се открива статистически значима връзка между изолираните микроорганизми и етиологията довела до формиране на хронична рана.  $p > 0.05$

Резултатите от извършената контролна проба на 14-ти ден са представени във фиг. 18.



*Фигура 18: Изолирани микроорганизми на 14-ти ден*

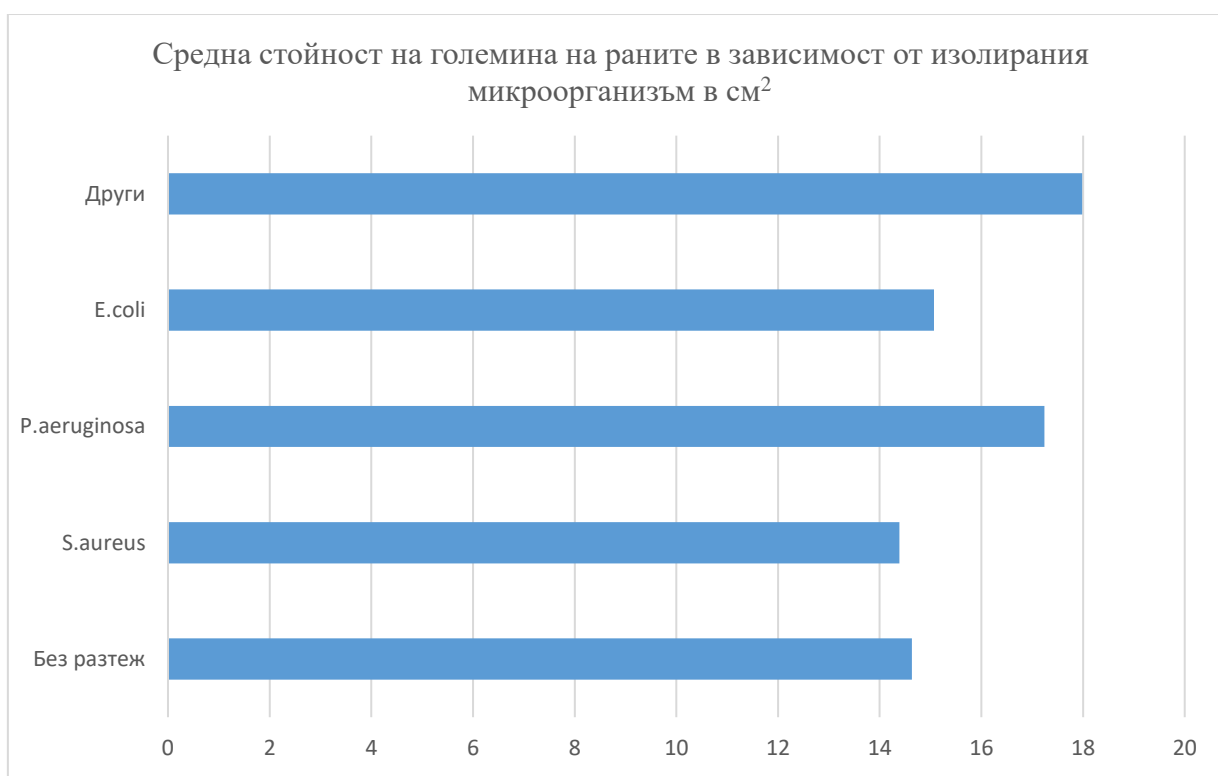
Прави впечатление значителното увеличаване на пробите без изолиране на микроорганизми 72%, което представлява ефективност на прилаганата терапия по отношение на потискане на бактериалния растеж от 63%.

Всички кожни лезии са фотодокументирани. С помощта на специализиран софтуер е изчислена площта на кожната лезия в квадратни сантиметра. Измерването е извършено на първи, четиринадесети и тридесети ден.

Таблица 7 : Представяне на резултатите от измерванията на площта на раните в см<sup>2</sup>.

	N 47	Минимална	Максимална	Средна	Стандартно отклонение
1 ден		2.10	42.70	15.6302	8.74786
14 ден		1.50	37.80	12.6681	8.13142
30 дни		0.40	31.00	8.1702	6.58786

През първи ден най-голямата измерена рана е 42.7 см<sup>2</sup>, а на 30 ден 31.0 см<sup>2</sup>. Средните стойности са съответно 15.63 см<sup>2</sup> и 8.17 см<sup>2</sup>



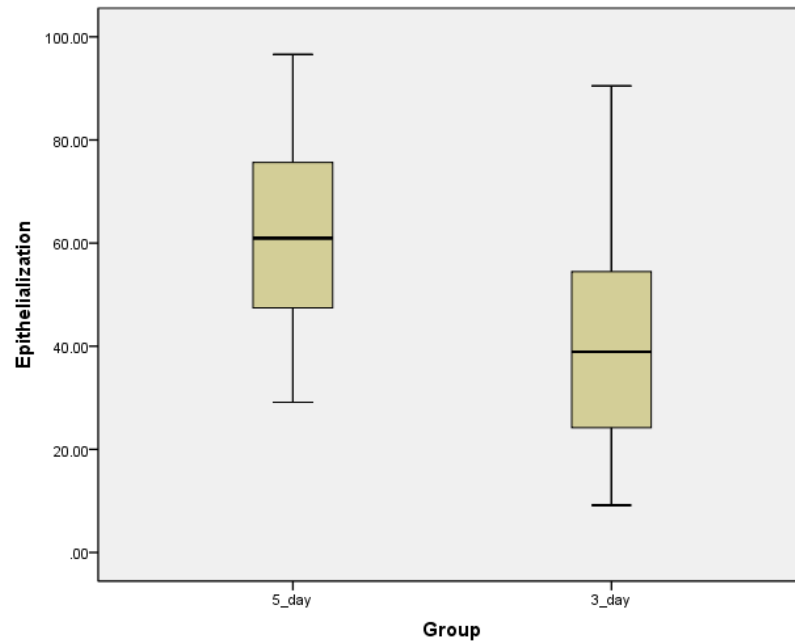
Фигура 19: Средна стойност на големина на раните в зависимост от изолирания микроорганизъм в см<sup>2</sup>.

От извършен анализ с t- тест по отношение зависимостта между изолирания микроорганизъм и средният размер на раната на първи ден не се открива статистически значима връзка между променливите. От представените данни в таблица 9, може да се заключи, че изолираният микроорганизъм не повлиява размера на раната. Прави впечатление по-големите средни стойности при *P. aeruginosa* и обобщените микроорганизми в група „Други“.

Таблица 8: Представяне на резултатите от измерванията на площта на раните в см<sup>2</sup>.

	Изолирани микроорганизми	Брой	Средна	Стандартно отклонение	p
	Без изолирани микроорганизми	9	14.6333	5.64424	
	<i>S. aureus</i>	13	14.3862	10.10016	0.948
	<i>P. aeruginosa</i>	10	17.2400	7.92930	0,426
	<i>E. coli</i>	9	15.0667	7.56224	0,892
	Други	6	17.9833	13.61402	0.517

Пациентите бяха разделени в две групи по отношение на честота на прилагане на САП. Първата група от 22 (47%) пациента са третирани 5 поредни дни от седмицата, а втората група от 25 пациента - 3 дни в седмицата (53%). Разпределението е направено на случаен принцип и не е свързано с етиологичен фактор, възраст или пол. Анализирани са резултатите от площта на епителизация на 30 ден от започналото лечение.



*Фигура 20: Хистограма сравняваща епителизацията изчислена на 30 ден след прилагане на САП в процент.*

Средната стойност при първата група (5 дни) е 60.9%, а във втората група (3 дни) е 41.4%. Виден е по-високият процент епителизация в групата с по-често прилагане на студена атмосферна плазма.

За да се анализира ефективността на прилагания метод статистически се обработиха данните от изследваната група по отношение на размера на раната на 30 ден и изолираните микроорганизми в началото на терапията.

Използван е t-тест (Стьюдент), като резултатите са представени в следващата таблица.

Таблица 9: Представяне на резултатите от измерванията на площта на раните в см<sup>2</sup> на 30-ти ден и изолираните микроорганизми в началото на терапията.

Изолирани микроорганизми	N	Средна	Стандартно отклонение	p
Без изолирани микроорганизми	9	8.0222	3.8680	
<i>S. aureus</i>	13	7.4076	6.8313	0.810
<i>P. aeruginosa</i>	10	9.630	8.5913	0.613
<i>E. coli</i>	9	6.3555	4.2740	0.399
Други	6	10.3333	9.1594	0.508

От представените резултати прави впечатление липсата на връзка между изолирания микроорганизъм и постигнатата епителизация на 30 ден. Такава връзка не се намира дори и при пациентите без изолиран микроорганизъм, която може да се приеме като контролна в този случай. Може да се приеме, че ефекта от лечение със студена атмосферна плазма не зависи от контаминацията, като тези резултати са валидни за 30 дневен курс на лечение. Както е описано подробно в литературната справка САП има ефект върху всички фази от зарастването на раните, в това число регулация на растежни фактори, трансформация на колаген и др.



## Клинични случаи

### Клиничен случай №1



**Мъж на 62 години с хронична рана от 7 месеца. Причина за раната е вземане на венозен графт по време на кардиохирургична операция.**

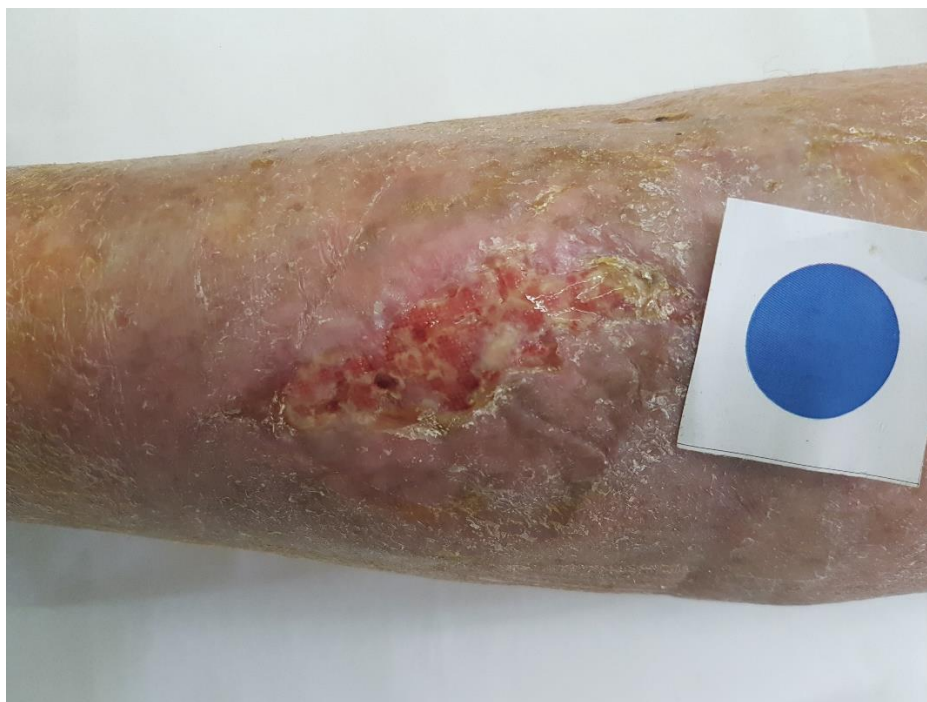
**Клиничен случай №2**





**Пациент с венозна недостатъчност с хронични незарастващи рани на двете подбедрици. След прилагане на САП се постигна значителна деконтаминация и поява на свежи гранулация. С оглед големите размери на раната, пациентът беше насочен за свободна кожна пластика.**

### Клиничен случай №3



Жена на 72 години с хронична венозна недостатъчност. Силно изразени отоци на двата долни крайника. Като причина за появата на рана се отчита травма.

**Клиничен случай №4**



**Мъж на 82 години след широка ексцизия по повод меланом. Наблюдава се значителна епителизация 30-дни след прилагане на САП.**

## Клиничен случай №5



Пациент на 59 години с изразен обезитас. Опериран в миналото по повод карцином на ректума. На по-късен етап е извършена пластика на коремната стена с поставяне на полипропиленова тъканна протеза (платно). След инфектиране на платното се формира фистула със значителна секречия. Разнообразните накрайници

позволяват адекватна обработка на кухини за постигане на значителен бактерициден ефект.

### Клиничен случай №6





Мъж на 48 години с артериална недостатъчност. След извършване на дебридман се пристъпи към прилагане на студена атмосферна плазма. На 14- ден при микробиологичния контрол се постигна негативна проба. Забелязва се и значителна виталност на свежите грануляции.



## Клиничен случай №7



Жена на 74 години с изразени промени по кожата на подбедрицата вследствие на дългогодишна венозна недостатъчност. След съчетаване на дебридман, компресивна терапия и прилагане на студена атмосферна плазма се постигна пълна епителизация на формираната лезия.

## Дискусия

Хроничните рани оказват голямо влияние върху качеството на живот, а в комбинация с коморбидитета и необходимостта от специфични грижи представляват и сериозен разход за болниците и доставчиците на здравни услуги по целия свят. [5] Познаването на етиологията и еволюцията на развитие на хроничната рана ни позволяват адекватно да приложим целия арсенал от добре познати и утвърдени методи за ускоряване на раневото зарастване.

Заздравяването на раните е комплексен процес, който е свързан с възпалителен отговор на тъканта, клетъчна пролиферация/миграция и кожно ремоделиране. При нормалните рани най-общо първоначално настъпилата фаза на възпалителен отговор продължава средно 24-48 ч. след тъканната увреда. Втората фаза продължава от 48-ия час нататък до около 10-ия ден, по времето на която се формира круста и интензивно се извършват процеси на клетъчна миграция и пролиферация. Тази фаза е съпътствана от ангиогенеза в областта на засегнатия участък. Кожното ремоделиране започва в последващия етап и обикновено може да продължи около година и дори повече. В повечето случаи остава белег и в мястото на зарастване не се съдържа нормалната и типична за кожата тъкан. От своя страна хроничните рани не преминават през типичните стадии на зарастване и в оказания ред, който е характерен за нормалните рани. Те често остават във фазата на възпалителния отговор прекалено дълго, без да преминават в следващата фаза. Това определя и подбора за лечение на хроничните рани.

Освен цялостно почистване чрез отстраняване на девитализирани и некротични тъкани, комбинирани с третиране с антисептични агенти и прилагане на антибиотици в настоящите актуални препоръки за лечение на рани не са застъпени новите подходи. В тази връзка трябва да се отчетат възможностите и потенциала на студената атмосферна плазма.

Първата стъпка при лечението на хроничните рани започва със справяне с проблема с бактериалната флора, колонизираща раните и съответно необходимостта от бактериална дезинфекция на раните. Студената плазма ефективно инактивира широк спектър от микроорганизми, включително спори, вируси и гъбички [6], [7] Последните проучвания изясняват точните механизми на нарушаване на жизнеспособността на микроорганизмите, медирани от свободните радикали. [8]

Плазмата е претърпяла значително развитие от 90-те години на миналия век и продължава да привлича повече внимание от изследователи и инженери в световен мащаб.[9] Около приложението на студена плазма се формира ново интердисциплинарно поле наречено плазмена биомедицина. Независимо от вида газ, използван по време на производството на плазма, той наподобява силно бактерициден коктейл от различни заредени частици. Когато достигне бактериалната или кожната повърхност, той предизвиква различни реакции както в клетките на бактериите, така и в тъканите. Необходими са допълнителни проучвания, както по отношение на максималното допустимо време за прилагана САП върху човешката тъкан, така и анализ на потенциала на генерираната плазма от различните източници. При използване на източници на плазма с атмосферен въздух влияние оказва както температурата на околната среда, така и влажността на въздуха и околното атмосферно налягане. При източници използващи газ (аргон, водород и др.) значение има както потока на подавания газ, така и разстоянието до третирана зона. Интересът към плазмената медицина е огромен и се очаква в бъдеще да има отговори на тези въпроси. Необходими са повече данни за оценка на страничните ефекти върху здравата околна тъкан и лигавица, изложени на плазма.[10]

Комплексното поведение при лечение на рани включва и избор на антисептичен разтвор за обработка на раневата повърхност. Антисептиците са оценявани предимно използвайки *in vitro* модели, като точна оценка на цитотоксичността по отношение на всяка отделна клетъчна популация не би могла да бъде направена. Тази цитотоксичност изглежда зависи от концентрацията, тъй като някои антисептици в ниски концентрации не са цитотоксични, въпреки че запазват антибактериалната си активност *in vitro*. Тъй като резултатите от *in vitro* не винаги са предсказуеми за това какво може да се случи *in vivo*, са проведени множество изследвания върху животински и човешки модели. Резултатите от тези проучвания са противоречиви. [11] Друг аргумент срещу употребата на антисептици при отворени рани, както първоначално заявява Флеминг през 1919 г., е, че антисептиците не са толкова ефективни срещу бактерии, които се намират в рани, както срещу бактерии *in vitro*. Присъствието на ексудат, серум или кръв намалява тяхната активност. На практика обаче няколко бактериологични проучвания показват, че антисептиците могат да намалят броя на бактериите в раните. Изследвана е бактерицидната активност на разтвор на повидон йод в заразени рани на морски свинчета и потенциалната терапевтична полза. Въпреки, че той може значително да намали бактериалното число 10 минути след прилагането, този ефект не е продължителен. [12]

Четири дни след еднократно прилагане на PVP-I не е било отчетено намалено микробно число, нито обективно повлияване на раневата инфекция.

В проучване от 2009 год. е изследвана цитотоксичността на основните антисептици използвани при третиране на раните. Резултатите показват значителна бактерицидна ефективност на Octenisept и Polyhexanide (Prontosan) и по-малка ефективност на добре познатия Braunol. По отношение на цитотоксичността към кератиноцитите и фибробластите Prontosan показва сигнификантно по-малка цитотоксичност в сравнение с Octenisept и Braunol. [13]

Установено е, че инфекциите могат да забавят заздравяването дори да причинят влошаване състоянието на раната и увеличаване на нейния размер. Микробните патогени забавят заздравяването на раните чрез няколко различни механизма, като продукция на възпалителни медиатори, метаболитни продукти и токсини и поддържане на активирания състояние на неутрофилите, които произвеждат цитолитични ензими и свободни кислородни радикали. Освен това, бактериите се конкурират с клетките-гостоприемници за хранителни вещества и кислород, необходими за заздравяването на раната. Инфекцията на раната може също да доведе до тъканна хипоксия, да нарани крехката грануляционна тъкан, да намали броя на фибробластите и производството на колаген и да забави реепителизацията на увреждането. Всички хронични рани се колонизират от бактериална популация. В допълнение, към употребата на антисептици за намаляване на бактериалното число на раната са разработени няколко други подхода, включително дебридман, почистване и апарати за пулсиращи струйни промивки за отстраняване на девитализирана тъкан и прилагане на локални антибиотици. Като цяло антисептиците се предпочитат пред локалните антибиотици поради бързо развиващата се резистентност. Антибиотичната резистентност на флората на кожната рана се очертава като значителен проблем и трябва да се вземат мерки за предотвратяването ѝ. Агенти, които са цитотоксични или причиняват забавяне на заздравяването на раните, се използват като резервни.

Предложена е обективна, клинично полезна крайна точка за наличието на инфекция: ако има  $<10^5$  бактерии / g тъкан, раната е само колонизирана, докато над  $10^5$  / g тъкан е инфектирана. Това разбиране за концентрация беше залегнало и при провеждането на лабораторния експеримент, като се използваха разреждания от  $10^3$  и  $10^5$ . Също така е необходимо да се прави разлика между инцидентна положителна

култура и истински патоген, засягащ раната. Повтарящите се повърхностни култури в раната са с ограничена употреба, нито потвърждаващи, нито изключващи продължаваща инфекция; по-скоро клиничната диагноза на заразена рана остава от първостепенно значение. Доказано е, че изолати от различни части на една и съща рана имат различни микрофлора.[14]

Предизвикателство пред лечението на хронични рани остава способността на част от бактериалните видове да формират биофилм. Специфичната структура, хидрофобните свойства и „защитните механизми“ на биофилма го правят изключително резистентен към стандартните и добре познати подходи при лечение на рани. При наличие на биофилм е необходимо да се използва антисептичен агент с повърхностно активно вещество (ПАВ), което да успее да преодолее хидрофобните свойства на екстрацелуларния матрикс. Наличието на формиран биофилм не е достъпен за невъоръжено око. За неговото съществуване може да се предполага при наличие на лъскава ранева повърхност с наличие на тънък белезникав филм, без да бъде определен категоричен визуален индикатор (IWI, 2016). Редица автори застават зад становището, че справянето с биофилма може да превърна една хронична незарастваща рана в зарастваща [15]. Масово за борба с биофилма се прилагат и различните форми на дебридман, както и прилагане на специално създадени за целта превръзки. Разбира се мястото на хирургичният дебридман е незаменима част от лечението на хронични рани, но трябва да вземе предвид и големия потенциал на студената плазма. В допълнение на осъществения лабораторен експеримент при подготовката на този труд в бъдеще се предвижда да бъде подготвен и проведен експеримент за оценка ефективността на САП, генерирана от Plasma one върху биофилм формиращи микроорганизми. При използване на САП се постига значителна редукция и ограничаване на развитието на биофилм формиращите микроорганизми. Това се наблюдава и при изследване на Patenall et al. през 2018 г; където резултата показва значителна редукция (4-5 log) на бактериалната жизненост при биофилми отглеждани 8 часа и 2 log редукция при тези отглеждани 12 часа. Времето за приложение и при двата теста е 5 мин плазма

Антимикробната резистентност е все по-голям проблем при лечение на хроничните рани. Антимикробни средства се предлагат в различни форми за локално приложение, като най-често се използват бацитрацин А, неомицин, фуцидин, мупироцин, ретапамулин. С широкото му използване, честотата на резистентност към мупироцин се увеличава, до

11-65%. [16] С цел ограничаване на антибиотичната резистентност, СЗО предлагат използването на локални антибиотици при особено внимание. [17]

Все повече продукти на пазара включват сребърни соли като част от активните си съставки – в това число импрегнирани със сребро превръзки и сребро-съдържащи разтвори. Напоследък среброто бива включено в различни продукти за третиране на рани като хидроколоиди, алгинати, пяни, кремове и гелове, но всеки от тях се различава по начина, по който се освобождават сребърни йони. Налице е напредък в технологията на освобождаване с откриването на нанокристална структура на среброто. Повечето патогенни организми загиват инвитро при концентрация 10-40 ppm (parts per million). Нанокристалната система от сребро убива всички микроби в раната, включително фунги, MRSA и ванкомицин-резистентни ентерококи (VRE).[18], [19]

В практиката се използват широка гама от превръзки – хидроколоиди, пяна, хидрогелове, пасти и други прости незалепващи за язвите превръзки. Мета анализ от 42 рандомизирани контролирани проучвания с повече от 1,000 пациенти не доказват сигнификантно различие в получения резултат след прилагане на различните видове превръзки. Тъй като няма ясно и категорично доказателство за предимствата на един тип превръзки спрямо друг, изборът на превръзка при лечението на хронични рани може да се направи според цената, удобството при прилагане, както и личните предпочитания на пациента и/или лекаря. [20]

При провеждането на лабораторния експеримент, като цел беше поставена да се оцени ефикасността на САП, генерирана от Plasma one мобилно устройство, предназначено за използване в медицината и стоматологията. Въз основа на предишни проучвания при лечение на трудно зарастващи рани тестването се проведе върху най-често изолираните микроорганизми *S. aureus*, *E. coli* и *P. aeruginosa*

Преди провеждане на теста беше направен задълбочен анализ на литературата, като за съжаление не беше открита информация за същия генератор на САП, както и информация за неговата ефективност върху зарастването на рани и бактериалната деконтаминация.

След анализиране на резултатите от проведения експеримент се забелязва значително намаляване на броя на CFU и при двете разреждания. Получените резултати са в съответствие с наскоро публикуваните резултати от Baldanov et al. и Feng et al. И двете

проучвания съобщават за увеличаване на диаметъра на зоната на инактивация на *E. Coli* и *S. aureus* при по-продължително прилагано лечение [21], [22], което съответства на представените резултати в този труд. При този експеримент *S. aureus* се оказва най-податлив на плазма и въпреки леките вариации на анализа, друг екип съобщава за значително намаляване на *S. aureus* CFU след експозиция от 30 секунди [23]. Това допълнително доказва, че ефикасността на устройството на САР и Plasma ONE е в обща корелация с откритията на други изследователски екипи. Освен това, резултатите водят до заключението, че освен високата си ефективност срещу някои често изолирани патогени, генерираната плазма не се ограничава до точков ефект, но има потенциал да се разпространи с увеличаване на времето.

*Pseudomonas aeruginosa* притежава способности за образуване на биофилм, който значително затруднява терапевтичните възможности [24]. Съществуват проучвания за повишена уязвимост на *P. aeruginosa* при приложение на САР. Противно на нашите наблюдения, Olatunde et al отчитат, че като цяло намаляването на бактериалното число е по-голямо за грам  $-$  сравнено с грам  $+$ . Освен това Baldanov et. al. съобщава, че диаметърът на зоната за инактивиране се увеличава с увеличаване на времето на третиране. За разлика от това, в нашето проучване при *P. aeruginosa* не отчетохме нито едно значително увеличение на диаметъра на зоната дори след третиране от 300 сек в двете групи разреждания. Не наблюдавахме и по-високо намаляване на бактериалното число в сравнение с другите два щама .

Всъщност САР, генерирана от плазма ONE, има най-малък ефект върху *Pseudomonas* в нашия анализ. Причини за това могат да бъдат характеристиките на източника на плазма и потентността на генерираната плазма, разликите в щамовете, подобрите хранителни среди и мътността на работните суспензии и др. Въпреки това резултатите показват значително намаляване при разреждане от  $10^5$ , видимо след 300 сек, докато в групата от  $10^3$  редукция на CFU, достига плато след 60 секунди, показваща пряка връзка между времето на експозиция и бактериалния товар. Точното време на лечение, необходимо за пълно ерадиране на бактериите в група от  $10^5$ , остава неизвестно, което може да бъде посочено като недостатък на анализа.

Трябва да се има предвид, че при изолиране на *Pseudomonas* е необходимо увеличаване на времето за третиране със САР. Разбира се това важи при използване на Plasma One, като източник на студена атмосферна плазма.

За разлика от генераторите, където се използва газ (аргон, хелий или водород), при Plasma one е необходимо да се поддържа дистанция от 2 мм между работната част и третираната повърхност за адекватна продукция на заредени частици. В изследването се наблюдава увеличаване на оцелелите колонии при *S. aureus*, увеличаване на дистанцията между крайника и третираната зона.[25]

Използването на студена атмосферна плазма при лечение на рани не се ограничава само с бактериалната деконтаминация. Доказано е, че плазмата подпомага раневото зарастване през различните му фази. Както беше споменато по-рано, втората фаза на заздравяване при клетъчните типове, участващи в заздравителния процес, са главно фибробласти и кератиноцити. Доказано е, че терапията със студената атмосферна плазма увеличава пролиферацията на фибробластите и тяхната миграция, като симулира освобождаването на фибробластен растежен фактор. Множество изследвания са проведени относно взаимодействието на плазмата с кератиноцитите. Използвани са различни източници и системи за лечение с плазма, в това число plasma jet (kINPen), SMD и DBD, както и различни типове кератиноцити, за да се проследи техният отговор към лечението. Получените резултати показват, че терапията със студена атмосферна плазма повлиява положително пролиферацията. Също така се установява, че стимулиращи дози при лечение с плазма могат да предпазват епителните клетки при зарастването на раните като се благоприятства пролиферацията и диференциацията им.

В *in vivo* проучванията се наблюдава значителна епителизация при рани на миши модели [26]. Синтеза на колагенови влакна, скъсената инфламаторна фаза и ускорената неоангиогенеза са значително потенцирани след приложение на САП сравнено с контролна група. Ускорената епителизация се наблюдава и в изследваната група пациенти, както е представено по-горе. Открива се връзка с честотата на приложение на плазма и процента на епителизация. Видно е, че в групата при която се прилага САП 5 последователни дни от седмицата се достига процент епителизация от около 60% в сравнение с 40% при трикратното приложение седмично. Представените резултати са за 30 дневен период на проследяване. Това определя дозозависим ефект демонстриран и при лабораторния експеримент по отношение на времевия интервал на третиране със САП.



В допълнение, повече макрофаги и неутрофили са открити в рани след приложение на САП. Schmidt et al през 2019 показаха, че въпреки, че не се наблюдава пролиферация на кератиноцити след лечение със САП, секретията на IL-8 от кератиноцитите е била значително увеличена. Също така се стимулират антимикробните пептиди от семейството на  $\beta$ -дефензините от кератиноцитите както и генната експресия на ключови регулатори, важни за възпалението [27]. По този начин изглежда, че положителният ефект на САП е двукратен - от една страна директна бактерицидна активност и индиректно чрез насърчаване на синтеза на  $\beta$ -дефенсини, а от друга - участие на имуно-медиирани механизми като регулацията на IL-8, която сама по себе си индуцира хемотаксис главно в неутрофили [28] и има мощни ангиогенни свойства [29], [30]. Всички тези механизми едновременно с прилагането на плазма до голяма степен ползват каскада за заздравяване на рани и значително ускоряват преминаването през описаните фази.

Както е описано в литературния обзор, много трудно може да се пресъздаде идеалният модел за оценка на САП. Въпреки това има достатъчно доказателства за участието на САП при потенциране на всички фази на зарастването на раните.

В изследваната група преобладават мъжете с 62%, срещу 38% жени. По-голямата част от включените в проучването са във възрастовия интервал 51-70 години, като най-застъпени са лезиите причинени вследствие на артериална и венозна недостатъчност. 74% от пациентите са с поява на хронична незаздравяваща рана за период между 3 и 5 месеца преди прилагане на САП.

Наблюдаваният по-слаб ефект на плазмата при *Pseudomonas* представен в лабораторния *in vitro* модел не се наблюдава при изследваната група, където независимо от изолирания микроорганизъм ефекта на плазмата е значителен. Обяснение на този резултат може да се търси също така и в регулацията и потенцирането на растежните фактори участващи в раневото зарастване, както и общите защитни сили на макроорганизма. При 81% от пациентите в изследваната група се изолират микроорганизми, като най-честите са *Staphylococcus aureus*. В проучване публикувано през 2009 година в България, се наблюдават изолирани микроорганизми при 62,8%, като водещи отново са *S. aureus*. [31] Това кореспондира и с данни от литературата, като за разлика от антибиотиците и средствата за локална дезинфекция, не се наблюдава никаква резистентност след продължително приложение на САП. Maisch et al. докладват значителна деколонизация

на метицилин резистентните стафилококи и *E. Coli*, без засягане на нормалната кожа при експеримент върху прасета. [32]

Ангиогенезата е друг много важен процес, съпътстващ втората фаза на заздравяване на раните, която включва растежни фактори, цитокини, ROS и NO, които могат да се осигурят допълнително чрез лечението със САП. Kim et al. използват оптична кохерентна томография (ОСТ), която успешно позволява да бъде установен и наблюдаван индуцирания от приложеното лечение със САП процес на ангиогенеза. [33]

Отстраняването на некротична тъкан и заедно с нея бактериалната ѝ контаминация чрез дебридмант е метод, използван отдавна за подпомагане на заздравяването при венозните язви. Проведени са няколко проучвания, чиито резултати доказват ползите за зарастване на рани при лечение, включващо дебридмант. Счита се, че при повечето рани със сигнификантно количество некротична тъкан трябва да се изключи артериална недостатъчност, тъй като чисто венозните язви рядко имат нужда от голям по обем дебридмант.

Използването на кожна присадка (графт) при пациенти с големи по размер или рефракторни на друго лечение рани може да бъде полезна стъпка към лечението на този тип хронични рани. Кожните присадки обикновено не са ефективни ако има персистиращ оток, който е често срещан при венозна недостатъчност. [34] Студената атмосферна плазма може да се използва, както за подготовка на раневото ложе преди използването на кожна присадка, така и за етапите след нейното приложение. J. Heinlin et al изследват група от 40 пациенти и наблюдават положителен ефект по отношение реепитализацията, формирането на круста и състоянието на заобикалящата кожа. Важен резултат от проучването е липсата на развитие на инфекция при всички пациентите, като същевременно не са наблюдавани странични ефекти и нежелани реакции. [35]

Многобройните проучвания за ефективността на студента атмосферна плазма даде възможност за обособяване на изцяло нов клон в медицината наречен „Плазмена медицина“.

Благодарение на лесното и достъпно приложение на САП при лечение на трудно зарастващи рани позволи натрупване на значителен опит и познания за ефективността

на метода. Едно от основните предимства на САП е липсата на странични ефекти и активното повлияване при всички фази на раневото зарастване. В бъдеще се очаква по-активно да бъдат проучени спецификите на отделните източници на САП и максимално допустимото време на експозиция.

От първостепенно значение за осигуряването на оптимално заздравяване на раните е агресивният контрол на диабета и васкуларните заболявания, които могат да увредят образуването на грануляционна тъкан. Кортикостероидите, които инхибират лимфоцитната функция и синтеза на колаген, трябва да бъдат премахнати, когато е възможно. Пациентите с диабет и налична полиневропатия се обучават за ежедневна грижа и контрол на долните крайници с цел ранно разпознаване на всяко нараняване и особено внимание при избор на обувки и подходящи стелки.

Комбинирането на САП с добре познатите и утвърдени техники при грижата за хроничната рана ще доведе до значително ускоряване на раневото зарастване.

## Изводи

1. Използването на студена атмосферна плазма е лесен за приложение метод, допълващ добре познатите техники за третиране на хронични рани.
2. Ефектът на прилагане на САП е сравним при отделните третирани микроорганизми, като се наблюдава известна резистентност на *P. aeruginosa* при проведения лабораторен експеримент.
3. Установихме дозозависим ефект на САП по отношение на времевия интервал на приложение.
4. Бактериалният растеж е забавен (инхибиран) извън зоната на директно действие на работната част на апарата в т.нар. разширена зона.
5. Най-честата локализация за формиране на хронична рана е подбедрицата.
6. Постигнатата епителизация на 30-ти ден след приложение на САП не зависи от вида на изолирания микроорганизъм.
7. В групата пациенти с по-често приложение на САП (5 последователни дни в седмицата) се наблюдава по-бърза епителизация на 30-ти ден от лечението.

## Приноси

1. Направен е задълбочен анализ на литературата за ефектите и приложението на студена атмосферна плазма.
2. За първи път в България е проведен лабораторен експеримент с приложение на студена атмосферна плазма върху инокулирани микроорганизми.
3. За първи път в България студена атмосферна плазма се включва в комплексното лечение на хронични рани.
4. Предлага се протокол за лечение на хронични рани включващ прилагането на студена атмосферна плазма.

Научни публикации свързани с дисертационния труд

1. Д-р Радосвет Горнев, Д-р Мирослав Зашев, Д-р Ваня Митова, Димитър Пенчев, **Съвременни енергийни източници в хирургичната практика – биофизични ефекти и специфика на използване**. Списание MD, брой:4, 2014, стр.:111-114,
2. М. Зашев, В. Митова, Р. Горнев. **Студена плазма при лечение на трудно заздравяващи рани**. XV Национален конгрес по Хирургия с международно участие. 2016. ISBN: 1314-297 Стр. 251
3. Д-р Мирослав Зашев, доц. д-р Радосвет Горнев дм. **Механизъм на действие и биологичен ефект на студената атмосферна плазма при лечение на хронични рани**. Списание MD, брой:6, 2019, стр.:96-98
4. Miroslav Zashev, Deyan Donchev, Ivan Ivanov , Radosvet Gornev. Efficacy of Plasma ONE apparatus for disinfection of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* bacteria from the solid surface. Journal of Theoretical and Applied Physics, 2020. (Под печат)

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### Протокол за оценка на пациент с хронична рана

Име:.....

Години

--	--

Пол:

М	Ж
---	---

Причина за поява на раната

1 - декубитална рана
2 - артериална недостатъчност
3 - Венозна недостатъчност
4 - следоперативно
5 - малигнена лезия
6 - травма
7- диабетно стъпало

Начало на поява на раната.....

Третиране до момента

1 - ексцизия
2 - превръзки с антисептици
3 – без превръзка
4 – прилагане на антибиотици

Придружаващи заболявания

1 - Диабет
2 - АХ
3 - АН
4 - Злокачествено новообр.
5 - Малнутриция
6 - Варици
7 - други
8 - не

Оток

1 - да
2 - не

Прием на медикаменти

1 - не
2 - кортикостероиди
3 - антихипертензивни
4 - антикоагуланти/антиагреганти
5 - антидиабетни
6- химиотерапия
7 - други

Изолирани микроорганизми.....

Нутритивен статус.....

Площ на раната 1-ви ден.....



Площ на раната 7-ми ден.....

Площ на раната 21-ви ден.....

Площ на раната 30-ти ден.....

План за лечение

.....

.....

.....

.....

.....

.....

**Декларация за информиране съгласие за провеждане на лечение на хронична рана с използването на студена атмосферна плазма**

**Същност на процедурата:**

Действието на студената атмосферна плазма (САП ) се основава на йонизацията на газовете във въздуха, като създава “заредени частици”. Метода се определя като безопасен и не е свързан с болка или други неприятни усещания по време на процедурата. Продължителността на процедурата е индивидуална и се определя в зависимост от площта на раната. Приложението на студена атмосферна плазма в съчетание с останалите добре познати методи за лечение на рани цели елиминиране на раневата инфекция, намаляване на вероятността за нова контаминация и ускоряване на епителизацията на раната.

**Противопоказания на терапията:**

- Повърхностен метал или други импланти в областта, където ще се прилага терапията
- Бременност
- Пейсмейкър или вътрешен дефибрилатор

**Пациентът декларира, че:**

- е прочел и разбрал предоставената информация за процедурата,
- раната/раните могат да бъдат фотографирани преди терапията за преценка на резултата
- е предоставил възможно най-пълна и достоверна информация за здравословното си състояние

Пациентът има право да задава въпроси и да получи отговори свързани с прилаганото му лечение. С това пациентът дава разрешение да се извърши процедурата.

.....

Дата.....

Подпис.....

**Протокол за прилагане на студена атмосферна плазма**

При използване на източник на студена атмосферна плазма н Plasma ONE (MEDICAL SYSTEMS® GmbH, Germany) е препоръчително да се следват следните стъпки:

Първоначално засегнатата зона се оценява, като последователно се отчитат площта на раната, нейната дълбочина, раневия рѳб и наличието на девитализирани и некротични участъци в раневото ложе. Следва първоначално почистване с физиологичен разтвор или антисептичен разтвор с доказана ниска токсична активност. При необходимост се преминава към дебридман.

В зависимост от големината на раната се избира накрайник с подходящ размер. Продължителността на третирането е в интервал от 2 мин върху зоната на обхват на стъклената проба. Необходимо се спазването на дистанция от 2мм между стъклената проба и раневата повърхност за постигане на адекватно генериране на САП. След приключване, раната отново се обработва с физиологичен разтвор. За постигане на адекватна хидратация на раната се използва Prontosan gel между смяната на превръзките. За покриване на раната се използва вторична превръзка в зависимост от степента на ексудация. С цел избягване на външно замърсяване на пациентите се препоръчва да не сменят превръзките в домашни условия, както и да не позволяват раната да остава непокрита.

За избора на превръзка се следват следните принципи:

- поддържат адекватна влажност с възможност за изпарение на ексудата.
- не залепват към раневата повърхност
- не позволяват прорастване на нова тъкан към повърхността на превръзката
- сигурно фиксиране към околната здрава тъкан
- удобна за носене.

## Книгопис

- [1] R. G. Frykberg and J. Banks, “Challenges in the Treatment of Chronic Wounds.,” *Adv. wound care*, vol. 4, no. 9, pp. 560–582, Sep. 2015.
- [2] T. A. Mustoe, K. O’Shaughnessy, and O. Kloeters, “Chronic Wound Pathogenesis and Current Treatment Strategies: A Unifying Hypothesis,” *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 117, no. SUPPLEMENT, pp. 35S-41S, Jun. 2006.
- [3] B. Vasudevan, “Venous leg ulcers: Pathophysiology and Classification,” *Indian Dermatol. Online J.*, vol. 5, no. 3, p. 366, Jul. 2014.
- [4] F. Werdin, M. Tennenhaus, H.-E. Schaller, and H.-O. Rennekampff, “Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds.,” *Eplasty*, vol. 9, p. e19, Jun. 2009.
- [5] J. Posnett, F. Gottrup, H. Lundgren, and G. Saal, “The resource impact of wounds on health-care providers in Europe.,” *Journal of wound care*, vol. 18, no. 4. MA Healthcare London , pp. 154–161, 29-Apr-2009.
- [6] N. N. Misra, B. K. Tiwari, K. S. M. S. Raghavarao, and P. J. Cullen, “Nonthermal Plasma Inactivation of Food-Borne Pathogens,” *Food Eng. Rev.*, vol. 3, no. 3–4, pp. 159–170, Dec. 2011.
- [7] T. Maisch *et al.*, “Contact-free inactivation of *Candida albicans* biofilms by cold atmospheric air plasma.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 12, pp. 4242–4247, Jun. 2012.
- [8] O. O. Olatunde, S. Benjakul, and K. Vongkamjan, “Dielectric barrier discharge cold atmospheric plasma: Bacterial inactivation mechanism,” *J. Food Saf.*, vol. 39, no. 6, Dec. 2019.
- [9] H. LI and D. LIU, “Editorial: Plasma biomedicine,” *Plasma Sci. Technol.*, vol. 20, no. 4, p. 040101, Mar. 2018.
- [10] A. Laurent *et al.*, “Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species,” *Cancer Res.*, vol. 65, no. 3, pp. 948–956, Feb. 2005.
- [11] A. Iwasawa and Y. Nakamura, “Cytotoxic effect of antiseptics: comparison In vitro. In vivo examination of strong acidic electrolyzed water, povidone-iodine, chlorhexidine

- and benzalkonium chloride,” *Kansenshogaku Zasshi.*, vol. 77, no. 5, pp. 316–322, 2003.
- [12] A. Iwasawa and Y. Nakamura, “Cytotoxic effect and influence of povidone-iodine on wounds in guinea pig,” *Kansenshogaku Zasshi.*, vol. 77, no. 11, pp. 948–956, 2003.
- [13] T. Hirsch *et al.*, “Evaluation of toxic side effects of clinically used skin antiseptics in vitro,” *J. Surg. Res.*, vol. 164, no. 2, pp. 344–350, Dec. 2010.
- [14] M. Schneider, C. W. Vildozola, and S. Brooks, “Quantitative assessment of bacterial invasion of chronic ulcers,” *Am. J. Surg.*, vol. 145, no. 2, pp. 260–262, Feb. 1983.
- [15] G. Zhao *et al.*, “Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds,” *Adv. Wound Care*, vol. 2, no. 7, pp. 389–399, Sep. 2013.
- [16] P. A. Lio and E. T. Kaye, “Topical Antibacterial Agents,” *Infectious Disease Clinics of North America*, vol. 23, no. 4, pp. 945–963, Dec-2009.
- [17] “Prevention and management of wound infection: guidance from WHO’s Department of Violence and Injury Prevention and Disability and the Department of Essential Health Technologies. 2008.” 2008.
- [18] G. Dharmshaktu, A. Singhal, and T. Pangtey, “Colloidal silver-based nanogel as nonocclusive dressing for multiple superficial pellet wounds,” *J. Fam. Med. Prim. Care*, vol. 5, no. 1, p. 175, 2016.
- [19] K. A. A. Rahim and A. M. A. Mohamed, “Bactericidal and antibiotic synergistic effect of nanosilver against methicillin-resistant staphylococcus aureus,” *Jundishapur J. Microbiol.*, vol. 8, no. 11, pp. 1–6, Nov. 2015.
- [20] S. Palfreyman, E. A. Nelson, and J. A. Michaels, “Dressings for venous leg ulcers: systematic review and meta-analysis.” *BMJ*, vol. 335, no. 7613, p. 244, Aug. 2007.
- [21] B. B. Baldanov, T. V. Ranzhurov, A. P. Semenov, and S. V. Gomboeva, “Cold atmospheric argon plasma jet source and its application for bacterial inactivation,” *J. Theor. Appl. Phys.*, vol. 13, no. 2, pp. 95–99, Jun. 2019.
- [22] H. Feng *et al.*, “The Interaction of a Direct-Current Cold Atmospheric-Pressure Air Plasma With Bacteria,” *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 37, no. 1, pp. 121–127, Jan. 2009.

- [23] S. Becker *et al.*, “Effects of cold atmospheric plasma (CAP) on bacteria and mucosa of the upper aerodigestive tract,” *Auris Nasus Larynx*, vol. 46, no. 2, pp. 294–301, Apr. 2019.
- [24] L. R. Mulcahy, V. M. Isabella, and K. Lewis, “Pseudomonas aeruginosa biofilms in disease,” *Microb. Ecol.*, vol. 68, no. 1, p. 1, Jul. 2014.
- [25] X. Liao, Q. Xiang, D. Liu, S. Chen, X. Ye, and T. Ding, “Lethal and sublethal effect of a dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma on staphylococcus aureus,” *J. Food Prot.*, vol. 80, no. 6, pp. 928–932, Jun. 2017.
- [26] A. Schmidt, T. von Woedtke, B. Vollmar, S. Hasse, and S. Bekeschus, “Nrf2 signaling and inflammation are key events in physical plasma-spurred wound healing.,” *Theranostics*, vol. 9, no. 4, pp. 1066–1084, 2019.
- [27] S. Arndt *et al.*, “Effects of Cold Atmospheric Plasma (CAP) on  $\beta$ -Defensins, Inflammatory Cytokines, and Apoptosis-Related Molecules in Keratinocytes In Vitro and In Vivo,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, p. e0120041, Mar. 2015.
- [28] M. E. Hammond *et al.*, “IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors.,” *J. Immunol.*, vol. 155, no. 3, pp. 1428–33, Aug. 1995.
- [29] P. Kumar, S. Kumar, E. P. Udupa, U. Kumar, P. Rao, and T. Honnegowda, “Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing,” *Plast. Aesthetic Res.*, vol. 2, no. 5, p. 243, 2015.
- [30] R. J. Bodnar, “Chemokine Regulation of Angiogenesis During Wound Healing,” *Adv. Wound Care*, vol. 4, no. 11, pp. 641–650, Nov. 2015.
- [31] Е. К. Дарданов Д., Г. Киров, Б. Мошев, И. Лозев, Д. Тодоров, “Лечение на хронични инфектирани рани на долните крайници,” in *Раневи усложнения – инфектирани рани, атонични рани, келоид, принципи на хирургично лечение. 2009, СУБ. (79НП)*, 2009, pp. 94–101.
- [32] T. Maisch *et al.*, “Decolonisation of MRSA, S. aureus and E. coli by cold-atmospheric plasma using a porcine skin model in vitro,” *PLoS One*, vol. 7, no. 4, p. e34610, Apr. 2012.
- [33] K. P. Arjunan, G. Friedman, A. Fridman, and A. M. Clyne, “Non-thermal dielectric barrier discharge plasma induces angiogenesis through reactive oxygen species,” *J. R.*

- Soc. Interface*, vol. 9, no. 66, pp. 147–157, Jan. 2012.
- [34] J. E. Jones, E. A. Nelson, and A. Al-Hity, “Skin grafting for venous leg ulcers,” *Cochrane Database Syst. Rev.*, no. 1, Jan. 2013.
- [35] J. Heinlin *et al.*, “Randomized placebo-controlled human pilot study of cold atmospheric argon plasma on skin graft donor sites,” in *Wound Repair and Regeneration*, 2013, vol. 21, no. 6, pp. 800–807.