

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (УлГУ)

Индекс УДК
Рег. № НИОКТР:
Рег. № ИКРБС:



«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по НРиИТ,
д.ф.-м.н., профессор
В.Н.Голованов
« 07 » 2020 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
в рамках договора с ООО «Международная промышленная группа Ф7»
№ 184-Р-2020 от 10.07.2020 г. по теме:

«Оценка эффективности обеззараживания воздуха и изменения
параметров крови человека при использовании аппарата для дезинфекции
УльтраОзон 1.0»

Руководитель НИР,
Директор НИМБЦ,
к.б.н., доцент

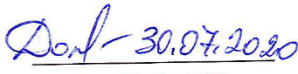
Долгова 30.07.2020 Д.Р.Долгова
подпись, дата

Ульяновск 2020

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

в рамках договора с ООО «Международная промышленная группа Ф7» № 184-Р-2020 от 10.07.2020 г. по теме: «Оценка эффективности обеззараживания воздуха и изменения параметров крови человека при использовании аппарата для дезинфекции УльтраОзон 1.0 (ТУ 32.50.50-001-44527990-2020)»

Организация-Исполнитель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ульяновский государственный университет»

Руководитель темы: К.б.н., доцент кафедры физиологии и патофизиологии медицинского факультета Института медицины, экологии и физической культуры	 30.07.2020 подпись, дата	Долгова Д.Р. (все разделы)
--	---	-------------------------------

Содержание

№ п/п		Стр.
1	Введение. Использование УФ-излучения и озона для дезинфекции в медицинской практике	5
2	Проведение микробиологических тестов на выявление степени загрязнения воздуха и поверхностей, на выявление патогенных микроорганизмов и вирусов до и после процедуры дезинфекции с использованием УльтраОзон 1.0 (ТУ 32.50.50-001-44527990-2020).	11
3	Изучение «противовирусного» цитокинового статуса крови человека после нахождения в аппарате для дезинфекции УльтраОзон 1.0 (ТУ 32.50.50-001-44527990-2020).	16
4	Заключение. Рекомендации по оптимальному и предельно-допустимому нахождению человека в аппарате для дезинфекции УльтраОзон 1.0 (ТУ 32.50.50-001-44527990-2020).	21
5	Список использованной литературы	23

Введение.

Использование УФ-излучения и озона для дезинфекции в медицинской практике.

Широкое биологическое действие ультрафиолетовых лучей дает возможность в определенных дозах использовать их для профилактических и лечебных целей. Ультрафиолетовые лучи относительно мало проникают через кожу и их биологическое действие связано с развитием многих нейрогуморальных процессов, обуславливающих сложный характер влияния их на организм. УФ-лучи с длиной волны от 400 до 315 нм оказывают относительно слабое биологическое действие. Ультрафиолетовые лучи длиной 315-280 нм оказывают сильное кожное и антирахитическое действие. Выраженной бактерицидной активностью, влияющей на протоплазму бактерий, обладает излучение с длиной волн 280-200 нм. Коротковолновое УФ-излучение оказывает на организм человека следующие эффекты:

- бактерицидный и фунгицидный;
- детоксикационный;
- метаболический (во время процедуры улучшается микроциркуляция, в результате чего органы и ткани получают больше кислорода);
- корректирующие свертывающую способность крови (при УФ-облучении крови изменяется способность эритроцитов и тромбоцитов к формированию тромбов, нормализуются процессы свертывания).

Эффективно применяется коротковолновое УФ излучение при ряде воспалительных заболеваний: заболевания кожи (псориаз, нейродермит); риниты, тонзиллиты; абсцессы, фурункулы, карбункулы, острые и хронические заболевания органов дыхания; болезни органов пищеварения (язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, гастрит с повышенной кислотностью); сахарный диабет и др.

Как и любое другое воздействие на организм, ультрафиолетовое излучение имеет ряд противопоказаний к применению, к которым относится индивидуальная гиперчувствительность к УФ-лучам, а также:

- 1) злокачественные новообразования;
- 2) резкое истощение;
- 3) повышенная функция щитовидной железы;
- 4) выраженные сердечно-сосудистые заболевания;
- 5) активный туберкулез легких;
- 6) заболевания почек;
- 7) изменения центральной нервной системы.

УФ-лучи оказывает деструктивно-модифицирующее повреждение на РНК и ДНК клетки. Накопление этих изменений со временем приводит к тому, что поврежденные клетки оказываются неспособными к делению. При этом разные виды микроорганизмов восприимчивы к разным диапазонам ультрафиолетового спектра. Наиболее чувствительны к УФ свету бактерии. Затем в порядке убывания чувствительности идут грибы, дрожжи, бактериальные споры и вирусы [1].

Согласно данным Руководства 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях» (2005) подавление роста на 95% бактерий рода *Staphylococcus* spp. происходит при поверхностной экспозиции 35-74 Дж/см², *Micobacterium Tuberculosis* – 74 Дж/см², бактерии рода *Legionella* – 19-37 Дж/см², *Virus Influenza* – 49 Дж/см² [2].

В то время как большинство бактерий чувствительны к среднему диапазону от 200-300 нм, для уничтожения вирусов нужен ультрафиолет более жесткого излучения. По данным гигиенических исследований, наибольшим воздействием на вирусы обладает УФ с длиной волны от 295 до 320 нанометров.

Исследуя степень устойчивости вируса к УФ излучению обнаружена следующая зависимость - **чем крупнее вирус, тем более он подвержен воздействию ультрафиолета.**

Самыми восприимчивыми к действию УФ излучения являются крупные герпесвирусы, диаметр вириона которых вместе с оболочкой достигает 140-200 нм. Размеры **коронавируса SARS-CoV-2, вызывающего COVID-19, составляют от 80-150 нм, соответственно он также подвержен уничтожению ультрафиолетом.**

Данная восприимчивость уже подтверждена экспериментальными работами. Так, в работе Ragan I. (2020) показано, что рибофлавин и ультрафиолетовое излучение (Mirasol Pathogen Reduction Technology System, Terumo BCT, Lakewood, CO) эффективно снижали титр SARS-CoV-2 до предела обнаружения в плазме крови человека и в среднем на $3,30 \pm 0,26$ в цельной крови [3].

В обзоре [Heßling](#) Martin «Ultraviolet irradiation doses for coronavirus inactivation - review and analysis of coronavirus photoinactivation studies» [4] проанализировано влияние УФ-излучения в качестве физического фактора дезинфекции с противовирусным действием. Отмечается, что измерения дозы облучения, необходимой для инактивации SARS-CoV-2, до сих пор не опубликованы. В экспериментах по инаktivации коронавирусов ультрафиолетовым излучением были оценены для определения дозы ультрафиолетового излучения, необходимой для снижения уровня вируса на 90%. Этот анализ был основан на том факте, что все коронавирусы имеют сходную структуру и одинаковую длину нитей РНК. Авторы полагают, что поскольку коронавирусы не отличаются по структуре от нового SARS-CoV-2 вируса и имеют высокую УФ-чувствительность. Верхний предел, определенный для логарифмической дозы снижения (90% снижения), составляет приблизительно 10,6 мДж/см² (медиана), в то время как истинное значение, вероятно, составляет всего 3,7 мДж/см² (медиана).,

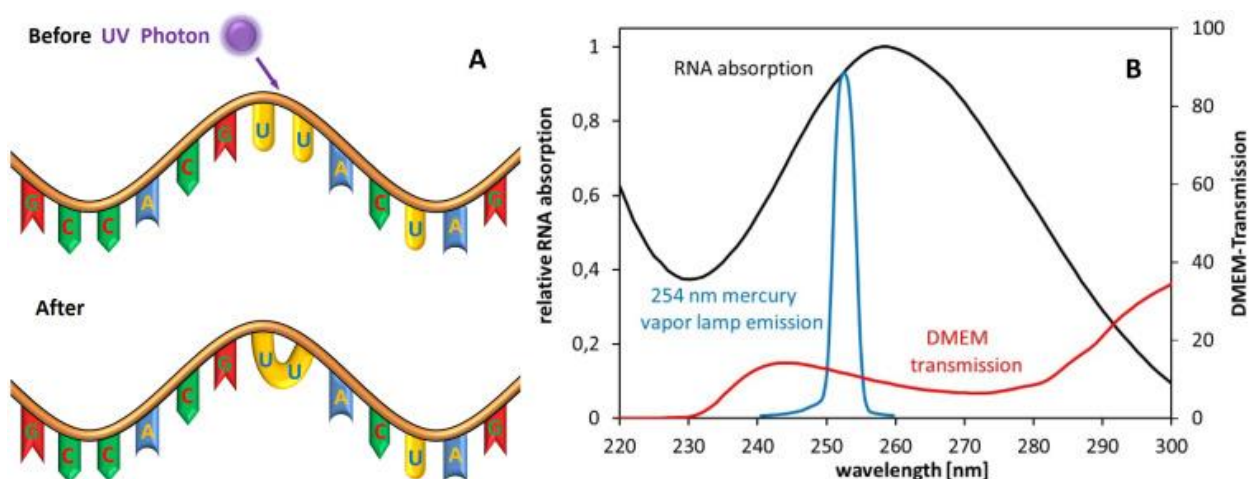


Рис.1 Механизм повреждения ДНК клетки под влиянием УФ-излучения [4]

Исследование японских ученых доказало, что в условиях *in vitro* облучение глубоким ультрафиолетовым светодиодом (DUV-LED) с длиной волны 280 ± 5 нм быстро инактивирует SARS-CoV-2, полученный от пациента COVID-19 [5].

Интересное исследование [Cadnum Jennifer L.](#), опубликованное в мае 2020 года в журнале *Pathogens and Immunity* [6], продемонстрировало хороший эффект УФ дезинфекции для быстрого обеззараживания бункеров безопасности аэропортов. Использована модификация стандартного количественного метода испытаний дисков-носителей Американского общества испытаний и материалов (ASTM E-2197-11) для изучения эффективности УФ-излучения для быстрого обеззараживания пластиковых бункеров безопасности аэропортов, предварительно зараженных инокулированными на 3 площадках метициллин-резистентным золотистым стафилококком (MRSA) и бактериофагами MS2, PhiX174 и Phi6, окруженным РНК-вирусом, используемыми в качестве суррогата коронавирусов. Наблюдалась эффект уменьшения загрязнения на каждом из испытательных участков, включая вертикальные и горизонтальные поверхности, при действии UV в виде 10-, 20-или 30-секундных циклов. 30-секундный цикл соответствовал критериям обеззараживания всех 3 испытательных площадок для всех испытуемых организмов, за исключением бактериофага MS2, который был снижен более чем на $2 \log_{10}$ PFU на каждой площадке.

Положительное влияние ультрафиолета

Под воздействием ультрафиолетовых лучей усиливаются окислительные процессы в организме: с увеличением поглощения тканями кислорода и выделения углекислого газа активируются ферменты, улучшается белковый и углеводный обмен, а также стимулируется кроветворение, регенеративные процессы, кровоснабжение и трофика тканей. Важным положительным эффектом ультрафиолетовых лучей является изменение иммунобиологической реактивности организма. УФ лучи стимулируют выработку антител, повышают фагоцитоз, тонизируют ретикулоэндотелиальную систему. Благодаря этому повышается сопротивляемость организма к инфекциям. Однако, важным фактором в формировании подобных биоэффектов имеет дозировка облучения.

Для ультрафиолетового облучения пользуются солнечным светом, а также искусственными источниками облучения: ртутно-кварцевыми и аргонортутно-кварцевыми лампами. Спектр излучения ртутно-кварцевых ламп характеризуется наличием более коротких ультрафиолетовых лучей, чем в солнечном спектре.

УФ-облучение широко используют, прежде всего, для профилактики различных заболеваний - для оздоровления окружающей человека внешней среды и изменения его реактивности (в первую очередь - повышения его иммунобиологических свойств).

С помощью специальных бактерицидных ламп может производиться стерилизация воздуха в лечебных учреждениях и жилых помещениях, стерилизация молока, воды и т. д. широко используется ультрафиолетовое облучение для предупреждения рахита, гриппа, в целях общего укрепления организма в лечебных и детских учреждениях, школах и др.).

Негативное действие ультрафиолета

Длительное и интенсивное ультрафиолетовое облучение может оказать неблагоприятное влияние на организм и вызвать патологические изменения. При значительном облучении отмечаются быстрая утомляемость, головные боли, сонливость, ухудшение памяти, раздражительность, сердцебиение, понижение аппетита. При сильном облучении развиваются ожоги и дерматиты (жжение и зуд кожи, диффузная эритема, отечность). При этом отмечается повышение температуры тела, головная боль, разбитость.

Высоким потенциалом к использованию в дезинфекционных целях обладает озонирование воздуха и поверхностей. Эта технология гораздо менее распространена, несмотря на то, обеззараживающий эффект озона в 3-5 раз выше, чем ультрафиолетового излучения. Озон эффективнее хлора и любых других известных дезинфектантов. За счет того, что озон оказывает разрушающе-окисляющее воздействие на стенки клетки и цитоплазму, разрушая их структуру. Озон - это газ, который образуется при действии электрического разряда, а также ультрафиолетового света на кислород. Именно поэтому при работе ртутных УФ ламп также образуется небольшое количество озона. При введении в водную или воздушную среду, озон выполняет четыре действия: бактерицидное, дезодорирующее, дезинфицирующее и окислительное. Благодаря очень высокой окислительной и дезинфицирующей способности его активно используют для очистки воды (озонация воды) и воздуха.

Применение озона имеет важные преимущества по сравнению с хлором:

- Из-за применения в малых дозах не дает побочных эффектов. Не загрязняет окружающую среду, но при этом является мощнейшим дезинфектором.
- Позволяет организовать санитарную обработку и дезинфекцию любых поверхностей, материалов, в том числе воды и воздуха.
- Одна молекула озона по своему действию эквивалентна от 3000 до 10000 молекулам хлора, она убивает патогенные микроорганизмы в 3500 раз быстрее, чем молекула хлора. Например, вирус полиомиелита погибает при величине остаточного озона 0,45 лг/л через 2 мин, а при дозе хлора 1 лг/л только через 3 ч. Действие озона на споры, бактерии и вообще любые патогенные микроорганизмы в 300-600 раз

сильнее, чем хлора. Также высока эффективность озонирования для очистки воды. Например, при уменьшения цветности воды (развитие в ней водорослей и фитопланктона) озона нужно в 2,5 раза меньше, чем хлора.

Однако к сложностям применения озона для обеззараживания и дезинфекции относится тот факт, что озон токсичен не только для микроорганизмов, но и для человека. При использовании озона в медицинских и санитарно-гигиенических целях в присутствии людей важно соблюдать безопасные концентрации. Большие концентрации озона (ПДК для озона - 0,1 мг/м³ (№CAS 10028-15-6) допустимы для обеззараживания помещений только без присутствия людей (О ВВЕДЕНИИ В ДЕЙСТВИЕ ГН 2.2.5.1313-03 от 30 апреля 2003 г. «ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ. ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ (ПДК) ВРЕДНЫХ ВЕЩЕСТВ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ. Гигиенические нормативы ГН 2.2.5.1313-03)). В странах ЕС и США ПДК для озона составляет 0,2 мг/м³

Биологические эффекты озона.

Озон способен реагировать с большинством органических и неорганических веществ до их полного окисления, т. е. до образования воды, оксидов углерода и высших оксидов других элементов. На биообъекты установлено селективное действие озона, в частности на соединения, содержащие двойные и тройные связи. К ним относятся белки, аминокислоты и ненасыщенные жирные кислоты (НЖК), входящие в состав липопротеидных комплексов плазмы и липидного бислоя клеточных мембран [7,8]. Наиболее полно изучены реакции озона НЖК, а именно, присоединение его к двойной связи с образованием озонидов. Поскольку плазматическая мембрана клеток представляет собой плотно упакованный слой липидов и белков, то именно она является мишенью озона в клетках. Доказано, что в процессе озонолиза цепи НЖК расщепляются с образованием перекисей, которые оказывают стимулирующее действие на внутриклеточный эритроцитарный обмен, мембрана эритроцита разрыхляется и становится более эластичной и деформабельной [9,10].

Если характеризовать физиологическое действие озона на организм человека, то можно выделить следующие доказанные эффекты:

1. Прямое дезинфицирующее действие при местном применении;
2. Системное антибактериальное и противовирусное действие за счет дискретного образования пероксидов;
3. Повышение пластичности (способности к деформации) мембраны эритроцитов;
4. Увеличение содержания 2,3-ДФГ, ответственного за высвобождение кислорода из эритроцита в тканях;
5. улучшение кислородного метаболизма в эритроцитах и, как следствие этого, повышенное использование глюкозы, распад жирных кислот, а также активация антиоксидантных ферментов [11].

В обзоре Щербатюк Т.Г (2010) «Современное состояние озонотерапии в медицине. Перспективы применения в онкологии» обсуждается биологическая активность озона как достигнутый баланс между прооксидантными свойствами производных озона, с одной стороны, и компонентами антиоксидантной системы защиты - с другой. При использовании озона в медицинской практике ключевой причиной осторожного отношения

является необъективность данных об истинности используемой концентрации озона в озонаторах. В целях получения терапевтического эффекта и исключения токсического воздействия на организм человека необходимо точное измерение и выражение концентрации озона [12].

Озонотерапия разработана для наружного применения для усиления антимикробной защиты организма при воспалительных заболеваниях кожи, а также для получения системных эффектов вследствие индукции низких концентраций активных форм кислорода (регуляция энергетического обмена и окислительно-восстановительного гомеостаза, иммуномодуляции).

Материалы, размещенные на ресурсе Российской ассоциации озонотерапевтов, отражают успешный опыт применения методик системной озонотерапии при лечении COVID-19 [13]

1. Озонированный физиологический раствор (O3SS) может быть эффективным дополнением к схеме лечения пациентов с COVID-19 (Приводится по результатам, полученным в больнице Виамед Вирхен де ла Палома в Мадриде (Испания)).
2. Применение озонированного физраствора у больных пневмонией средней и тяжелой степени тяжести CoVID19 [14]. В это исследование были включены двадцать пять взрослых пациентов, госпитализированных с симптомами COVID-19 легкой и тяжелой степени тяжести, которые соответствовали критериям включения и находились на лечении с 3 по 26 апреля 2020 года в больнице Viamed Virgen De La Paloma, Мадрид, Испания. Выводы: COVID-19 пациентов с легкими и тяжелыми симптомами, получавших внутривенное введение O3SS в качестве дополнительной терапии, продемонстрировали улучшение клинических симптомов, улучшение лабораторных показателей и снижение смертности.
3. ПРИМЕНЕНИЕ ОЗОНОТЕРАПИИ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 (Предварительные результаты Федоровой Т.А., Бакуридзе Э.М., Есаян Р.М., Козаченко И.Ф., Николаевой А.В. ФГБУ «НМИЦ АГП им В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва).

В сообщении отмечается, что на базе ФГБУ «НМИЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России с марта 2020 года развернут инфекционный госпиталь для пациентов с COVID-19 инфекцией. В комплексной терапии используется системную озонотерапию для лечения пациентов с COVID-инфекцией вне зависимости от степени тяжести (легкое, среднетяжелое и тяжелое течение) в частности, проводилось внутривенное капельное введение озонированного физиологического раствора, который готовили непосредственно перед введением на отечественных медицинских озонаторах «МЕДОЗОНС-СИСТЕМ» производства Арзамасского электромеханического завода (Россия) и «УОТА 60-01» производства «Медозон» (Россия). Объем инфузии составляли 400 мл, концентрация озона в растворе 4-5 мг/л после насыщения, вливание со скоростью 20 - 25 мл в минуту, через день, всего 6 процедур на курс. Два раза в неделю пациенты получали внутривенное введение глутатиона (600 мг.) с витамином С (1 г.) в 100 мл физиологического раствора. Озонотерапия проведена 134 пациентам (возраст пациентов - от 18 до 94 лет). Клинические данные совершенно однозначно говорят об эффективности озонотерапии. Все пациенты перенесли терапию без осложнений. Отмечена быстрая нормализация температуры тела (50% больных лихорадили 2-3 недели, после включения озонотерапии - в течение 2-3 дней

температура нормализовалась). Уменьшение одышки в покое и при физической нагрузке (ЧДД менее 22/мин), улучшение показателей сатурации кислородом (SpO₂) повышение ее на 2-3 единицы после внутривенной инфузии. По лабораторным тестам: быстрое снижение С-реактивного белка сыворотки крови (от 200 мг/л до 4 в течение 4-5- дней), значимое снижение уровня ферритина. Отмечено увеличение в крови относительного и абсолютного числа лимфоцитов, концентрации гемоглобина, снижение содержания тромбоцитов (до лечения уровень тромбоцитов - более 500x10⁹/л, в течение 3-х дней - постепенное снижение до нормальных величин). По гемостазиограмме: в течение 5 дней после включения озонотерапии регистрировали снижение уровня фибриногена и уровня D-димера (также все пациенты получали терапию низкомолекулярными гепаринами), но в группе, дополнительно получавшей озонотерапию, нормализация состояния системы гемостаза происходит быстрее на 2-4- дня. Следовательно, пациенты (особенно с легкой и среднетяжелой степенью тяжести) не развивали утяжеления течения заболевания и находились меньшее количество дней в стационаре.

4. Озонотерапия эффективна при лечении от Covid19 и вдобавок усиливает эффект от лекарств. На сегодняшний день, *"более 100 пациентов с Covid19 прошли курс озонотерапии в 15 больницах в Италии, и все их медицинские результаты совпали при оценке эффективности от терапии и улучшения самочувствия"*. Об этом заявил президент итальянского общества кислородной терапии (Sioot) Мариано Франзини на слушаниях в комитете по социальным вопросам Палаты. Озонотерапия, по его словам, "может быть большой помощью и усиливает эффект лекарств; исследования показывают, что вирус быстро отступает" [15].
5. **Кислородно-озоновая терапия как адъювант при SARS-COV-2 инфекции: клиническое исследование.** Oxygen-ozone Therapy as Adjuvant in the Current Emergency in SARS-COV-2 Infection: A Clinical Study. [16].

II. Проведение микробиологических тестов на выявление степени загрязнения воздуха и поверхностей, на выявление патогенных микроорганизмов до и после процедуры дезинфекции с использованием установки «УльтраОзон 1.0».

Для анализа микробиологической загрязненности поверхностей установки, а также поверхностей рук человека и мобильного телефона (как одного из часто контактируемых и сильно загрязненных предметов современного человека) были использованы экспресс-тесты Петритест (ОМЧ), Петритест (Дрожжи/грибы), Петритест на стафилококк (про-во НПО «Альтернатива», г.Саратов, РФ).

Согласно инструкции производителя по применению тестов, стерильным зондом, смоченным физиологическим раствором, отбирали смывы в ладонной поверхности рук испытуемых и мобильного телефона, без предварительного мытья рук и обработки спиртосодержащими или другими дезинфицирующими средствами. Повторно смывы с кожи забирались после нахождения человека в установке «УльтраОзон 1.0» от 30 до 60 секунд. После этого зонды помещались в пробирку Эппендорф 1,5 мл с 300 мкл стерильного физиологического раствора, перемешивались на вортексе и через 10 минут переносились на питательную среду. Для тестов на определение ОМЧ и стафилококка образцы термостатировались при 37°C, для определения дрожжей и грибов – при комнатной температуре (24-25°C). Визуально первые результаты оценивали после 24 часов для ОМЧ, и через 48-72 часа для дрожжей/грибов. Плотность колоний оценивали по следующей схеме (рис.2).

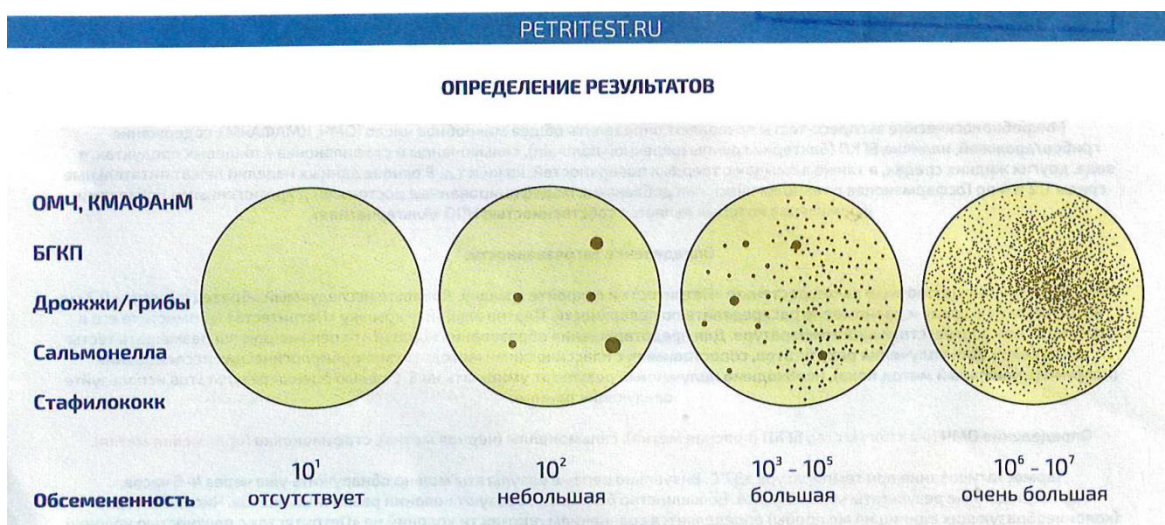


Рис.2 Оценка обсемененности питательных сред при работе с экспресс –тестами Петритест

При оценке общего микробного числа (ОМЧ) наблюдается снижение количества КОЕ от 40 до 75% (рис.3-8). Исходная обсемененность рук испытуемых ($n=15$) была выраженной и составляла – от 10^3 до 10^6 . В ряде случаев наблюдалось снижение вероятного количества микроорганизмов (рассчитанное из КОЕ) на порядок, т.е. в 10 раз.

Эффективное снижение общего микробного числа на поверхности рук испытуемых наблюдается при нахождении в установке более 30 сек. При нахождении испытуемого в установке «УльтраОЗОН» 1.0 60 секунд эффект по снижению ОМЧ сравним с 30 секундами, однако следует отметить, что различная эффективность обеззараживания зависит от исходной индивидуальной обсеменности поверхности рук человека. В 3

экспериментальных сериях показано, что подавление роста стафилококка на ладонной поверхности рук человека и мобильного телефона после нахождения в установке «УльтраОЗОН» 1.0 происходит в 1,5 -2,8 раза. Рост дрожжей/ грибов также подвержен ингибированию при кратковременном (30 или 60 сек) нахождении испытуемого в установке «УльтраОЗОН» 1.0.

Наблюдаемое снижение КОЕ в микробиологических тестах с использованием подложек Петритест позволяет предполагать бактерицидный эффект совместного использования озонированного воздуха и рассеянного УФ-излучения в течение короткого периода нахождения в установке (от 30 секунд).

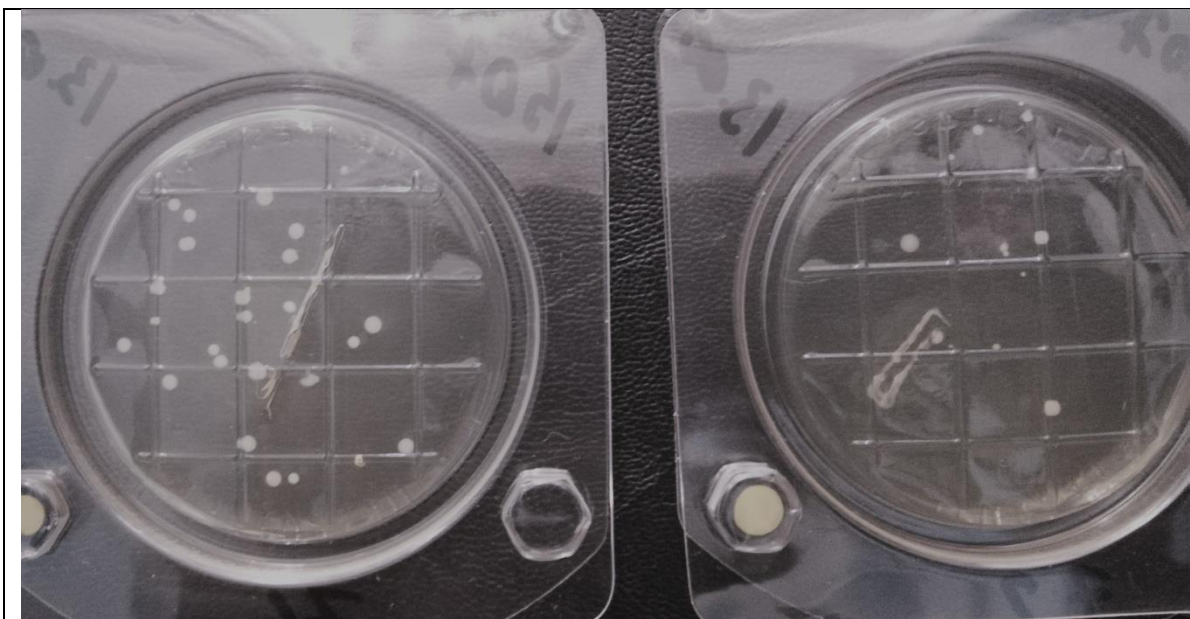


Рис.3 Фотографии колоний на среде Петритест ОМЧ через 24 часа после термостатирования (слева – смывы с рук человека (№3) до эксперимента, справа – смывы с рук после 40 секунд нахождения в установке УльтраОзон 1.0).



Рис.4 Фотография подложки Петритест Дрожжи/грибы. 6.1 – смывы с рук испытуемого (№6) до эксперимента, 6.2 – смывы с рук после 30 секунд нахождения в установке УльтраОзон 1.0

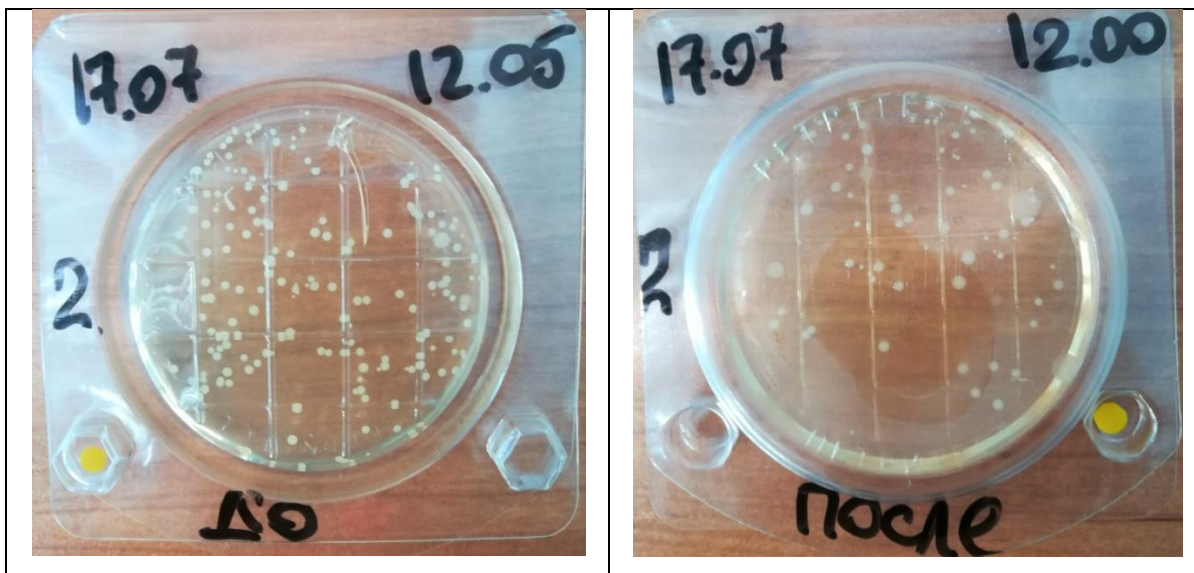


Рис.5 Фотографии колоний на среде Петритест ОМЧ через 24 часа после термостатирования (слева – смывы с рук человека (№2) до эксперимента, справа – смывы с рук после 60 секунд нахождения в установке УльтраОзон 1.0).

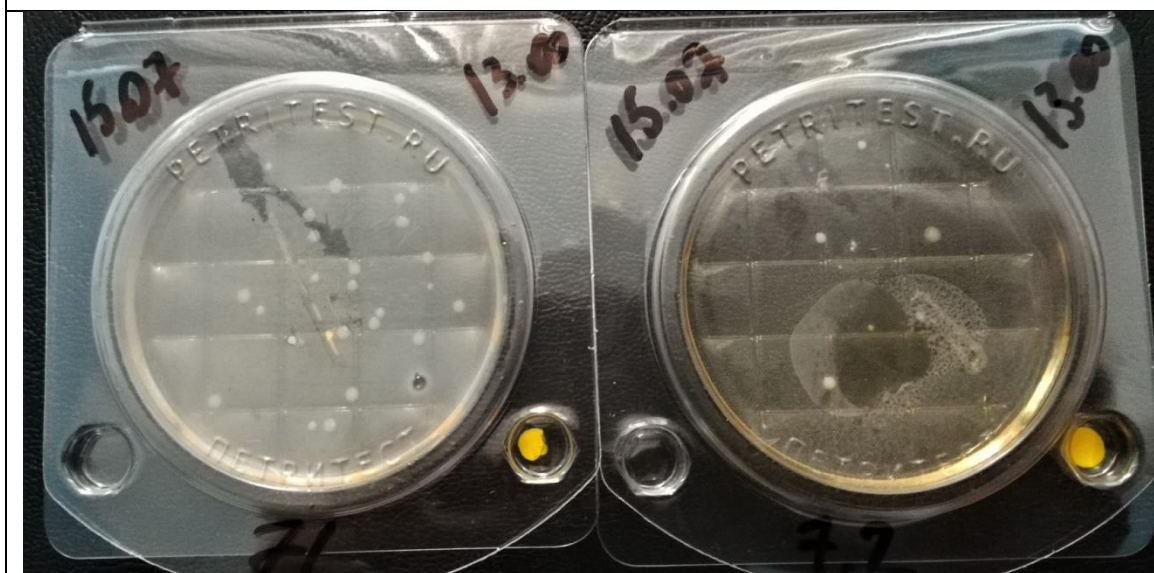


Рис. 6 Фотографии колоний на среде Петритест ОМЧ через 24 часа после термостатирования (слева – смывы с рук человека (№7) до эксперимента, справа – смывы с рук после 40 секунд нахождения в установке УльтраОзон 1.0).

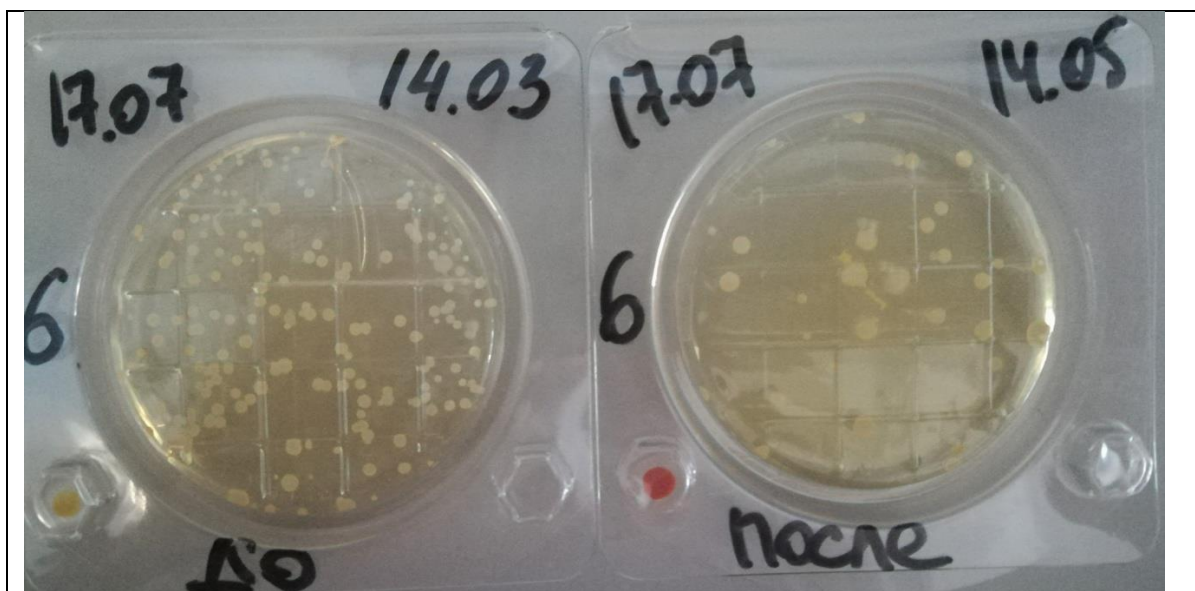


Рис. 7 Фотография подложки Петритест ОМЧ. слева – смывы с рук испытуемого (№6) до эксперимента, справа – смывы с рук после 60 секунд нахождения в установке УльтраОзон 1.0

С целью анализа эффективного удаления нуклеиновых кислот с поверхностей и воздуха установкой УльтраОзон 1.0 была использована ДНК бактериофага лямбда (про-во ООО «Сибэнзим», Россия). Дезактивация РНК и ДНК в лабораторных условиях при работе с микроорганизмами III-IV группы патогенности с применением открытых ламп короткого УФ-излучения на длине волны 254 нм, имеющего максимальный бактерицидный эффект, успешно реализуется в ламинарных шкафах. В эксперименте использовались смывы с поверхностей ламинарного шкафа БАВ-"Ламинар-С"-1,2 (про-во «Ламинарные системы», Россия) – отрицательный контроль; смывы с поверхностей лабораторного помещения (положительный контроль); смывы с внутренней поверхности установки УльтраОзон 1.0, находившегося в режиме работы более 15 минут (пробы 1, 2, 3). На каждую их поверхностей предварительно наносили водный раствор, содержащий 36 нг/мкл ДНК бактериофага лямбда, и оставляли на 3 минуты. Внутри установки в работающем режиме аппликация раствора на корпус наносилась в верхней части (0,5 м от УФ ламп) – проба 1, средней части (1,3 м от источника УФ) – проба 2 и нижней части (2 м) – проба 3. Собранный материал анализировался методом ПЦР в реальном времени (амплификатор CFX96, BioRad, USA).

На рис. 8 представлено влияние на относительную концентрацию копируемых ампликонов ДНК бактериофага лямбда при 3-минутной экспозиции на поверхности установки «УльтраОзон 1.0».

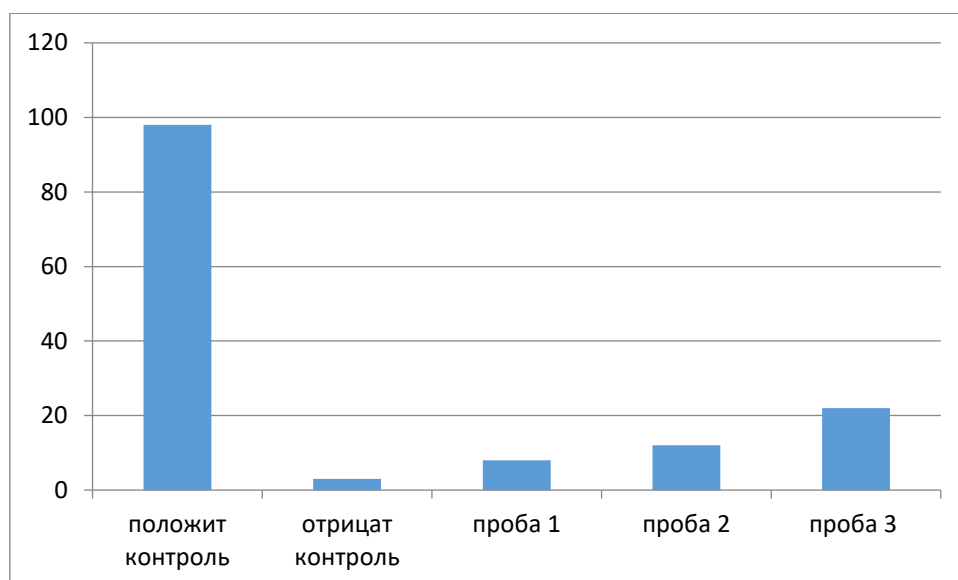


Рис.8 Относительное количество ампликонов (в %) после обработки проб ДНК бактериофага в разных участках установки «УльтраОзон 1.0»

Согласно данным литературы и информации разработчиков ламинарных шкафов, при использовании открытых УФ ламп коротковолнового излучения значительное падение УФ-интенсивности с увеличением расстояния от источника: 2 см – 9,3 мВт/см²/с, 25 см- 1,3 мВт/см²/с, 50 см – 0,7 мВт/см²/с. Вместе с тем, эффективность УФ-излучения в установке «УльтраОзон 1.0», реализованного одновременно с озонированием воздуха и поверхностей и с обеспечением циркуляции воздушного потока, безусловно, приводит к умножению дезинфицирующего эффекта.

3. Изучение «противовирусного» цитокинового статуса крови человека после нахождения в аппарате для дезинфекции УльтраОзон 1.0 (ТУ 32.50.50-001-44527990-2020).

Для участия в эксперименте 20 добровольцев обоего пола (возраст от 20 до 40 лет) знакомили с целями, задачами и методами исследования, а также получали у них информированное согласие на участие в экспериментальной части НИР. До начала исследования испытуемые опрашивались на предмет наличия хронических заболеваний, непереносимости УФ-излучения и озона, наличие аллергических заболеваний. Не допускались лица с симптомами ОРВИ (повышенной температуры, кашля, насморка). За 3 дня до эксперимента у испытуемых забиралась венозная кровь. Повторно забор венозной крови проходил после нахождения человека в установке «УльтраОзон 1.0» в течение 30-60 секунд через 15 минут. Постановка ИФА – исследований проходила на базе лаборатории иммунологии Научно-исследовательского медико-биологического центра НИТИ им. С.П.Капицы ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». Использованы наборы производства «Вектор-Бест» (г.Новосибирск, Россия).

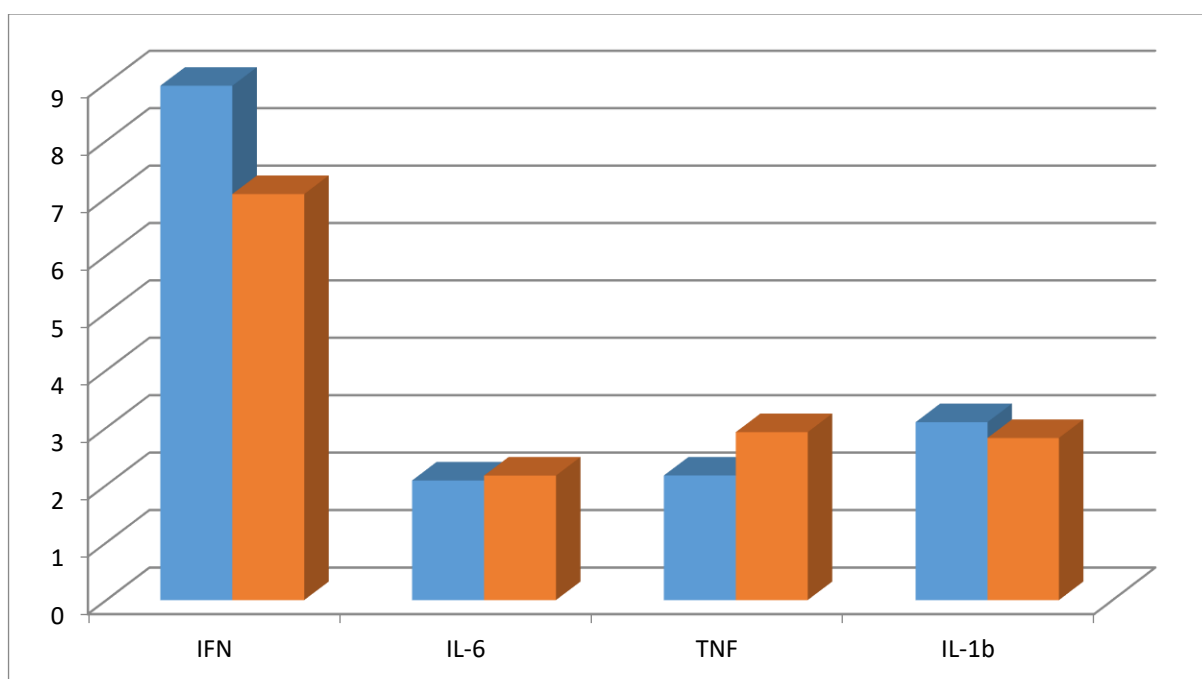


Рис.9 Уровень провоспалительных «противовирусных» цитокинов (в пг/мл) в сыворотке крови до (синие столбики) и после (красные столбики) нахождения испытуемых в течение 30-60 секунд в установке «УльтраОзон 1.0»

IFN-гамма –интерферон, IL-6 – интерлейкин -6, TNF –фактор некроза опухоли, IL1b – интерлейкин 1 бета

При проведении анализа параметров крови испытуемых - здоровых добровольцев в возрасте от 20 до 40 лет выявлено, что концентрация провоспалительных цитокинов (гамма-интерферона γ -IFN, фактора некроза опухоли α TNF, интерлейкина-1 IL1-beta, интерлейкина-6 IL-6) в периферической крови в подавляющем большинстве имеет тенденцию к снижению (рис.9). Пределы колебаний изученных цитокинов у испытуемых находились в референсных значениях группы доноров, представленных в инструкции производителя наборов «Вектор-Бест». Причем отмечен следующий факт: при повышенных исходных значениях провоспалительных цитокинов у человека наблюдалось значительное снижение уровня цитокина в крови после нахождения в «УльтраОЗОН» 1.0 (отмечено в 15% случаев).

В условиях облучения крови человека *in vitro* наблюдался противоположный эффект: на 5 образцах венозной крови человека после 1, 3, 5 минутного нахождения в установке УльтраОЗОН относительно контрольного образца, находившегося ввне, отмечено что в большинстве случаев (80%, 4 образца из 5) уровень цитокинов возрастал, что может быть косвенным подтверждением стимуляции озона лейкоцитов периферической крови. Однако для реализации данного эффекта необходимо более длительное воздействие, которое стало возможным при облучении крови *in vitro*.

Одним из механизмов биологического действия озона является иммуномодулирующий эффект. Он реализуется через стимуляцию ядерного транскрипционного фактора NF-kB, контролирующего синтез медиаторов воспаления, в частности исследованных цитокинов. На системном уровне (целостный организм) при отслеживании краткосрочного влияния озона усиление синтеза провоспалительных цитокинов лейкоцитами крови человека в данном эксперименте не отмечен, что наблюдалось в условиях *in vitro* (по времени в несколько раз превышающее экспозицию в установке).

Озоно-кислородная смесь модулирует окислительно-восстановительные реакции, так как свободные радикалы нейтрализуются антиоксидантами; в данном случае умеренные концентрации озона являются стимуляторами антиоксидантой системы защиты организма, и происходит стимуляция кислородного метаболизма. Попадание озона в организм человека приводит к иммуномодулирующим эффектам, поскольку АФК действуют как мессенджеры при активации NF-kB, индуцируют экспрессию генов (рис.10).

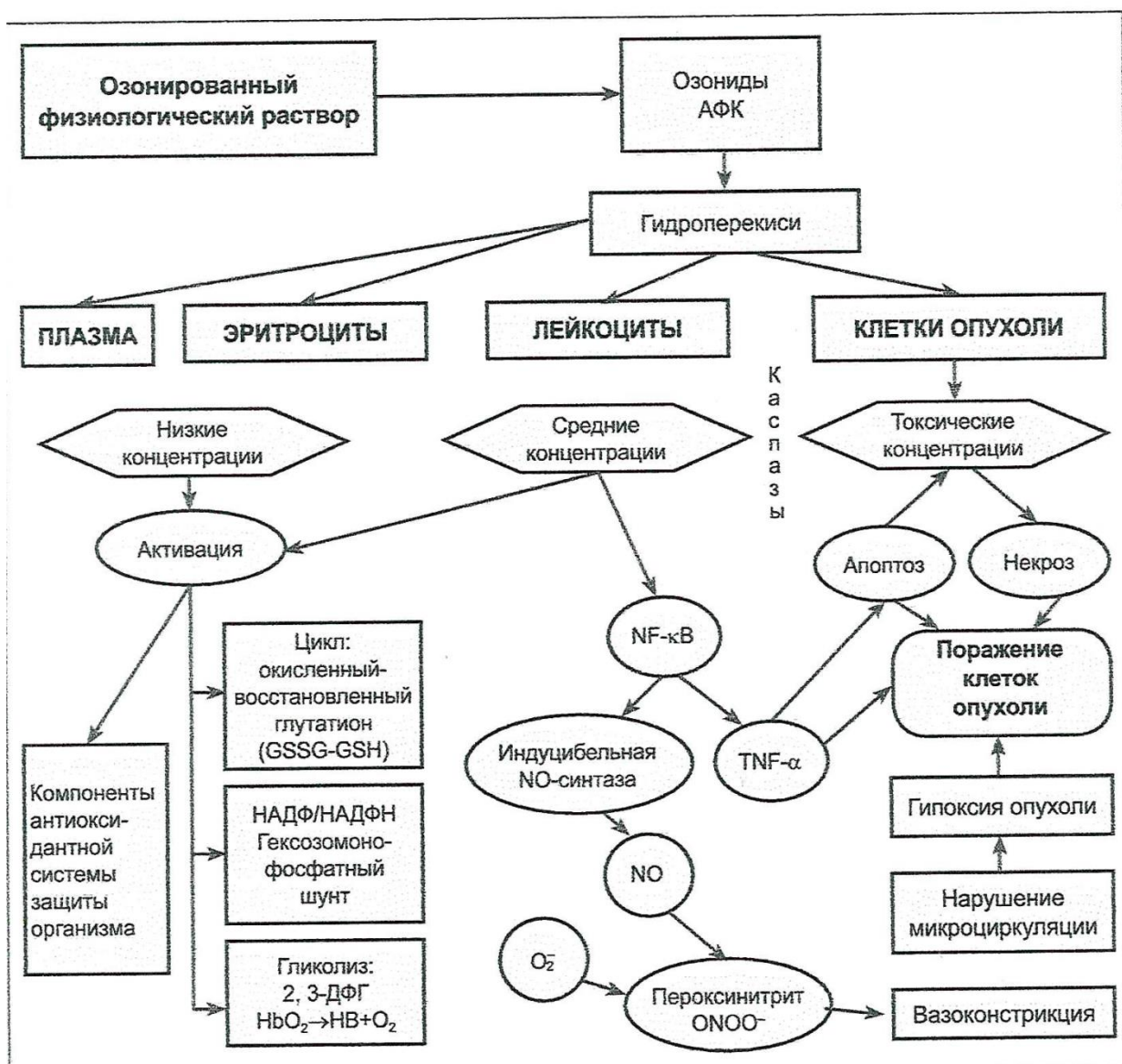


Рис. 10 Биологические эффекты озонотерапии (Щербатюк Т.Г., 2010)

Озон, вдыхаемый в составе воздушной смеси в установке, быстро поступает в кровоток через легкие, и имеет чрезвычайно высокую реакционную способность. В этой связи особого внимания заслуживает изучение влияния озона на кровь, в частности, на эритроциты как активные участники окислительно-восстановительных реакций. Было оценено влияние озона на состояние про-и антиоксидантного статуса плазмы и эритроцитов крови испытуемых после кратковременного нахождения в установке «УльтраОЗОН» 1.0 (30-60секунд).

Известно, что интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в организме находится под контролем антиоксидантной системы (АОС). При этом важен баланс

процессов в данной системе. Если АОС не в состоянии справиться с токсическим влиянием озона и увеличение ее активности недостаточно для поддержания ПОЛ на стационарном уровне, то происходит нарушение баланса ПОЛ-АОС. Это сопровождается накоплением в крови продуктов, которые обладают мембранеструктивным эффектом и вызывают нарушения реологических свойств крови (Павлова О.Е., 1998). Уровень малонового альдегида (МДА) – как вторичного продукта ПОЛ в эритроцитах является информативным показателем интенсивности процессов свободнорадикального окисления в мембранах клетки. Уровень МДА в гемолизате эритроцитов и плазме ЭДТА-стабилизированной крови определяли в тесте с тиобарбитуровой кислотой по методу Андреевой Л.И. (1988). Концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) – основного компонента антиоксидантой защиты эритроцитов оценивали по методике Ellman E. (1972) в модификации Карпищенко А.И. В эксперименте на добровольцах в гемолизате эритроцитов наблюдалось снижение уровня МДА как в плазме, так и в эритроцитах и увеличения концентрации глутатиона восстановленного (GSH) (рис.11, 12). Эти данные свидетельствуют об отсутствии оксидативного стресса на уровне крови после кратковременного пребывания в установке УльтраОзон 1.0. Напротив, данные сдвиги кислородного метаболизма отражают положительное влияние озона на компоненты крови здорового человека, которое проявляется в усилении антиоксидантов и подавлении ПОЛ.



Рис.11 Уровень МДА и GSH (мкмоль/л) в гемолизате эритроцитов испытуемых до и после нахождения в установке УльтраОзон 1.0

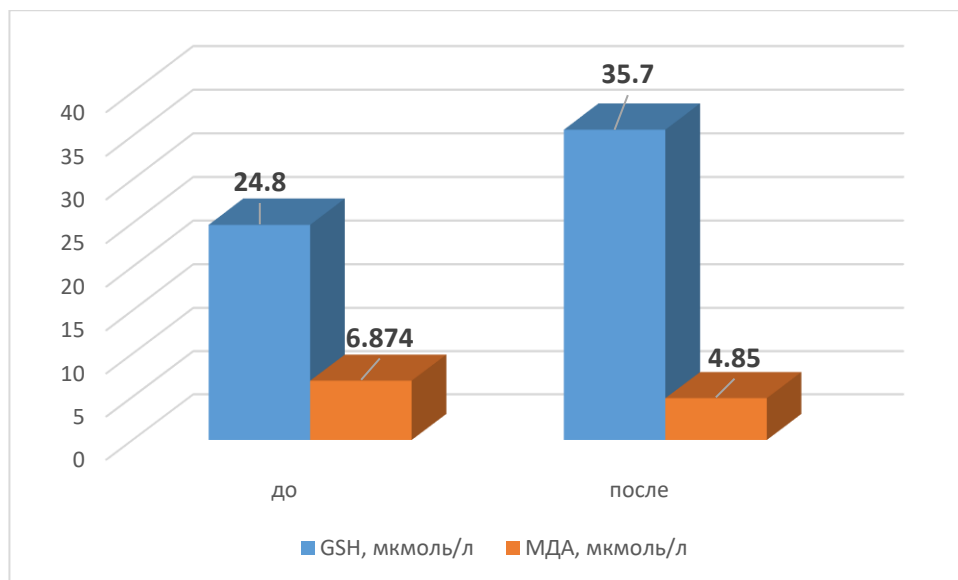


Рис.12 Уровень МДА и GSH (мкмоль/л) в плазме крови испытуемых до и после нахождения в установке УльтраОзон 1.0

Поскольку эффекты озонотерапии дозозависимы, а параметры свободно-радикального гомеостаза, на который прежде всего направлено действие озон-кислородной смеси, индивидуальны и динамичны, то озонотерапевтические методы воздействия на организм необходимо проводить на фоне биохимического контроля состояния про- и антиоксидантной системы организма [17].

Согласно данным Обуховой Л.М. (2008), воздействие озона на белки плазмы крови заключается в их окислительной модификации, направление и степень которой определяются как используемой концентрацией озона, так и структурными особенностями белковых молекул. Низкие дозы озона способны снижать уровень окислительной модификации белков плазмы крови больных [18].

Наблюдаемые изменения крови испытуемых после нахождения в установке «УльтраОзон 1.0» не позволяют предполагать токсических эффектов озона (проявлении оксидативного стресса/стимуляции воспалительных цитокинов) в тех концентрациях, которые получает человек при кратком нахождении в установке (в течение 30 или 60 секунд).

По субъективным оценкам участники эксперимента не испытывали в установке «УльтраОЗОН» 1.0 неприятных ощущений - головокружения, тошноты, головных и или иных болей, страха/тревоги.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

При проведении НИР «Оценка эффективности обеззараживания воздуха и изменения параметров крови человека при использовании аппарата для дезинфекции УльтраОзон 1.0 (ТУ 32.50.50-001-44527990-2020)» получены данные, свидетельствующие об эффективном обеззараживании воздуха и поверхностей и отсутствии токсических эффектов на организм человека, в частности:

- при проведении микробиологического анализа с использованием экспресс-тестов Петритест (ОМЧ), Петритест (Дрожжи/грибы), Петритест на стафилококк с целью выявления степени загрязнения воздуха и поверхностей наблюдается снижение количества КОЕ от 40 до 75% .

- при анализе ДНК бактериофага лямбда методом ПЦР показано, что при аппликации раствора, содержащего 36 нг/мкл ДНК фага, на поверхность установки наибольшая степень деградации ДНК отмечалась в верхней и средней части установки на расстоянии 0,5 и 1,3м от УФ-ламп.

- при проведении анализа параметров крови испытуемых выявлено, что нахождение в установке «УльтраОЗОН» 1.0 (ТУ 32.50.50-001-44527990-2020) не вызывает повышения уровня провоспалительных цитокинов (гамма-интерферона γ -IFN, фактора некроза опухоли α TNF, интерлейкина-1 IL-1-beta, интерлейкина-6 IL-6), в большинстве случаев вызывая их снижение. Наблюдается также снижение продуктов перекисного окисления липидов (показатель окислительного стресса) и повышение антиоксидантной системы (глутатиона восстановленного) в плазме и эритроцитах после пребывания в установке от 30 до 60 секунд.

На основании анализа результатов можно предложить следующие рекомендации:

- оптимальным временем нахождения человека в установке «УльтраОЗОН» 1.0 (ТУ 32.50.50-001-44527990-2020) можно считать интервал 30-45 сек.

- концентрация озона ,использованная в данной установке, имеет обеззараживающий эффект и не создает на уровне организма здорового человека выраженных негативных эффектов в виде окислительного стресса и стимуляции воспалительных цитокинов.

- для нижней части установки для улучшения обработки поверхностей тела человека возможно усиление циркуляции озono-воздушной смеси.

Биологическая активность озона - это результат изменения свободнорадикального статуса организма в ответ на поступление активных форм кислорода и озоновых метаболитов. Низкие концентрации озона не проявляют токсического действия, так как свободные радикалы нейтрализуются антиоксидантной системой. Озоно-воздушная смесь

в низких концентрациях модулирует окислительно-восстановительные реакции за счет стимуляции антиоксидантной системы, также оказывает активацию клеточного и гуморального иммунитета (Risevuti G., 2020).

В технологическом решении установки УльтраОзон 1.0 (ТУ 32.50.50-001-44527990-2020) объединены 2 подхода, которые при совместном кратковременном действии усиливают дезинфицирующий, в частности вирицидный, эффекты, а также запускают физиологические процессы, направленные на неспецифическую защиту организма.

Согласно экспериментальным данным Carpendale M.T., 1991, 1993 вирицидная активность озона связана с активацией перекисного окисления липидов мембраны капсулированных вирусов, что затрудняет их связывание со специфическими рецепторами клеток. Международной ассоциацией озонотерапевтов в 2020 г. в клиниках Испании инициирована работа «Клиническая эффективность терапии коронавирусной инфекции с помощью озона и антиоксидантной терапии» (Hernandes A., 2020).

Таким образом, установка УльтраОзон 1.0 (ТУ 32.50.50-001-44527990-2020) эффективно обезвреживает поверхности, в частности поверхности рук человека, не оказывает негативного, токсического эффекта на параметры крови человека.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Ультрафиолетовое излучение и его влияние на организм http://05.rospotrebnadzor.ru/371/-/asset_publisher/m7XL/content
2. Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях. Руководство Р 3 5 1904-04. Москва, Минздрав России, 2005.
3. Izabela Ragan , Lindsay Hartson , Heather Pidcoke, Richard Bowen, Raymond Goodrich Pathogen reduction of SARS-CoV-2 virus in plasma and whole blood using riboflavin and UV light // PLoS One. 2020 May 29; 15(5):e0233947. doi: 10.1371/journal.pone.0233947. eCollection 2020.
4. Heßling M, Hönes K, Vatter P, Lingenfelder C. Ultraviolet irradiation doses for coronavirus inactivation - review and analysis of coronavirus photoinactivation studies. // GMS Hyg Infect Control. 2020 May 14;15:Doc08. doi: 10.3205/dgkh000343. eCollection 2020.
5. Hiroko Inagaki , Akatsuki Saito , Hironobu Sugiyama , Tamaki Okabayashi , Shouichi Fujimoto Rapid inactivation of SARS-CoV-2 with Deep-UV LED irradiation // Emerg Microbes Infect. 2020 Jul 16;1-8. doi: 10.1080/22221751.2020.1796529
6. Jennifer L Cadnum , Daniel F Li , Lucas D Jones , Sarah N Redmond , Basya Pearlmutter , Brigid M Wilson , Curtis J Donskey Evaluation of Ultraviolet-C Light for Rapid Decontamination of Airport Security Bins in the Era of SARS-CoV-2 Pathog Immun. . 2020 May 22;5(1):133-142. doi: 10.20411/pai.v5i1.373. eCollection 2020.
7. Sunnen G.V. Ozon in medicine / G. V. Sunnen. — New York, 1989. — Vol. 3. — P. 1–16.
8. Разумовский, С. Д. Озон и его реакции с органическими соединениями / С. Д. Разумовский, Г. Е. Зайков. — М.: Наука, 1974. — 312 с.
9. Бояринов, Г. А. Озонированное искусственное кровообращение (экспериментальное обоснование и результаты клинического применения) / Г. А. Бояринов, В. В. Соколов. — Н. Новгород: изд-во «По-кровка», 1999. — 318 с.
10. Kontorschikova, C. N. Ozone as a regulator of physiological processes in the organism / C. N. Kontor-schikova, I. E. Ocrut, J. R. Yefremenko // Proceedings of the 15th World Congress. — London, 2001. — P. 242–252.
11. Ковальчук Л.С. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОЗОНОТЕРАПИИ // Проблемы здоровья и экологии. 2007. С.93-101
12. Щербатюк Т.Г. Современное состояние озонотерапии в медицине. Перспективы применения в онкологии // Современные технологии в медицине. 2010. №1. С.99-106.

13. <https://www.covid19.ozonetherapy.ru>
14. Schwartz, A.; Martínez-Sánchez, G.; Menassa de Lucía, A.; Mejía Viana, S.; Alina Mita, C. Complementary Application of the Ozonized Saline Solution in Moderate and Severe Patients with Pneumonia Covid-19: Efficacy and Tolerability. Preprints 2020, 2020060233 (doi: 10.20944/preprints202006.0233.v1).
15. Marini S, Maggiorotti M, Dardes N Bonetti M, Martinelli M, Re L, Carinci F, Tavera C. Promoter of the study: NUOVA F.I.O. (Italian Oxygen-Ozone Federation); PMID: **32462858** DOI: 10.23812/20-250-E-56
16. https://www.huffingtonpost.it/entry/ossigeno-ozono-terapia-efficace-in-piu-di-cento-pazienti-covid_it_5ed7d214c5b697ffe751227a
17. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободно-радикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб: Фолиант; 2000; 104 с
18. ОБУХОВА Л.М., ВЕДУНОВА М.В., КОНТОРЩИКОВА К.Н. ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ОЗОНА НА БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ // ВЕСТНИК НОВЫХ МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ – 2008 – Т. XV, № 4 – С. 30.