

и цинком (II), цинком (II) и кадмием (II), медью (II) и кадмием (II). Именно поэтому увеличение содержания цинка(II) после проведенного лечения также сказалось на уменьшении содержания свинца (II) на 6% и кадмия на 8%. Последний факт особенно важен, учитывая способность цинка (II) индуцировать синтез металлотионеина, который связывает избыток свинца (II) и кадмия (II), чем способствует их детоксикации.

Проведенное радикальное хирургическое лечение и ликвидация гнойных очагов у больных исследуемой группы наряду с нормализацией клинико-лабораторных показателей позволили увеличить уровень содержания в сыворотке крови цинка (II), обладающего протекторными и детоксицирующими свойствами в отношении свинца (II) и кадмия (II).

Выводы

При изучении микроэлементного статуса больных с обширными флегмонами ЧЛО и шеи установлено:

1) у больных имеется контаминация токсичных микроэлементов – кадмия (II) и свинца (II), что способствует нарушению защитных процессов, оказывает дополнительную токсическую нагрузку на организм как при лечении, так и в период послеоперационной реабилитации больных;

2) наличие значительного дефицита цинка (II) в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой;

3) устранение гнойно-воспалительного очага при хирургическом лечении оказывает положительное влияние на всасывание цинка и меди.

Поступила 12.11.06 г.

E. E. TEKUTSKAJA, I. V. TERMAN

SPECTRUM OF TOXIC AND ESSENCIAL MICROELEMENTS AT ILL WITH PYO-SEPTIC COMPLICATIONS FACE AREA AND NECKS

During surgical treatment of the patients with extensive pyo-inflammatory processes in initial part of a digestive significant reduction in the level of Zn (II) concentration and slight increase in Cu (II) content in blood serum before operation comparing with the healthy persons were revealed. After the radical surgical treatment the content of trace elements in blood serum of the patients gradually normalized to the healthy concentration level on average. Zn (II) content in the patients before their discharge from the hospital increased 2,1 times.

С. Р. ФЕДОСОВ, Ю. П. САВЧЕНКО, И. И. ПАВЛЮЧЕНКО, А. А. БАСОВ

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОЦЕНКИ ПРООКСИДАТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ С ГНОЙНОЙ РАНОЙ

*Кафедра общей хирургии, кафедра фундаментальной и клинической биохимии
Кубанского государственного медицинского университета*

Актуальность исследования

Лечение ран является одной из нестареющих проблем хирургии. По данным литературы, в настоящее время пациенты с трофическими язвами и длительно незаживающими ранами составляют до 1,5% от всего населения, или около 10% от числа всех больных общехирургических стационаров. Однако, несмотря на значительное расширение познаний о закономерностях заживления ран, существует недостаток информации о состоянии прооксидантно-антиоксидантного статуса таких пациентов на организменном и местном уровнях, что затрудняет обоснованный выбор прооксидантной или антиоксидантной терапии.

Введение

Прошло уже более 30 лет, как J. M. McCord и I. Fridovich открыли фермент супероксиддисмутазу, которая катализирует реакцию дисмутации двух супероксидных радикалов с образованием перекиси водорода и молекулярного кислорода. Это открытие обозначило новое направление в развитии не только фундаментальной, но и прикладной науки. За истекшие годы было выдвинуто несколько теорий о роли радикалов в биологических системах. Одной из первых была сформулирована теория «окислительного взрыва».

Окислительный взрыв (ОВ) включает в себя увеличение утилизации кислорода, повышение активности гексозомонофосфатного шунта, синтез перекиси водорода, супероксидного анион-радикала, гипохлорит-аниона [9, 14]. Согласно теории ОВ полиморфно-ядерные лейкоциты крови способны после фагоцитоза вызывать гибель фагоцитированных микроорганизмов путем синтеза активных форм кислорода (АФК). В создании ОВ принимают участие миелопероксидаза, НАДФ(Н)-оксидаза, перекись водорода и галоидные соединения. Образование фagosомы вызывает высвобождение миелопероксидазы из гранул в лизосомальную вакуоль и активацию цитоплазматической НАДФ(Н)-оксидазы. Миелопероксидаза катализирует образование гипохлорит-аниона в присутствии перекиси водорода и хлоридов. НАДФ(Н)-оксидаза катализирует синтез супероксидного анион-радикала в присутствии молекулярного кислорода и НАДФ(Н). Таким образом, начинается лавинообразный синтез АФК, которые оказывают токсическое действие на фагоцитированный биологический объект [15, 16].

Существование системы синтеза свободных радикалов детерминирует необходимость системы их утилизации. Такая система получила название антиоксидантной (АОС). Несмотря на наличие различных

Количество и средний возраст обследованных больных

Нозология	Количество больных, человек (%)	Средний возраст, лет
Группа А (без сахарного диабета)	8 (53,3%)	48,7±4,6
Группа Б (с сахарным диабетом)	7 (46,7%)	

вариантов классификации соединений, входящих в ее состав [1, 10, 12, 13], в целом можно выделить ферментное и неферментное звенья АОС.

Целью исследования явилась оценка практической значимости и целесообразности определения прооксидантно-антиоксидантного статуса в крови и в экссудате гнойной раны в процессе ее эволюции.

Материалы и методы

Изучено состояние АОС в динамике раневого процесса в условиях нескомпрометированного организма условно здорового человека и в условиях организма больного с сахарным диабетом (хроническая патология, безусловно влияющая на прооксидантно-антиоксидантный статус [4]). Дизайн исследования предусматривал разделение пациентов, имевших гнойную рану, на две группы: группа А – не страдающие сахарным диабетом; группа Б – страдающие сахарным диабетом. Характеристика групп приведена в таблице.

Биологические субстраты (кровь и экссудат раны) забирались у пациентов отделения гнойно-септической хирургии краевой клинической больницы № 1 г. Краснодара, выразивших добровольное информированное согласие на участие в медико-биологическом экспериментальном исследовании. Для участия в исследовании отбирались пациенты с площадью раны не менее 20 см². Определение площади раневой поверхности у больных производилось по авторскому методу, основанному на цифровой технологии записи изображения с «ручным» распознаванием образа.

Местное лечение участвовавших в исследовании больных проводилось по стандартной схеме: в I фазе течения раневого процесса применялись повязки с мазью «левомеколь», во II фазе – повязки с антисептиком «йодпирон». Системное лечение не включало лекарственных препаратов с направленной антиоксидантной или прооксидантной активностью.

Кровь забиралась из вен и гепаринизировалась в соотношении 1:10, после чего охлаждалась до 8–10±С. Экссудат раны забирался по методике [8] в авторской модификации, при этом использовались квадраты фильтровальной бумаги площадью 1 см², экспозиция на ране производилась в течение 3 минут, 3 квадрата помещались в 3 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН=7,4), элюирование достигалось путем механического встряхивания пробы в течение 1 минуты, после чего элюент с квадратами фильтровальной бумаги охлаждался до 8–10±С. В связи со способом забора материала в целях стандартизации изучаемые показатели экссудата пересчитывались на 1 см² поверхности раны.

Состояние системы АОС организма оценивали по активности таких ферментов, как каталаза и супероксиддисмутаза, и по уровню окисляемых низкомолекулярных веществ с использованием амперометрического

метода. Интенсивность процессов свободнорадикального окисления оценивали по интенсивности и площади быстрой вспышки хемилюминесценции.

Люминол-зависимая H₂O₂-индуцированная хемилюминесценция плазмы крови и экссудата раны измерялась на хемилюминотестере ЛТ-1 производства СП «ХОРОС» (г. Ростов-на-Дону) по методике НИИ-БИ в собственной модификации, в частности, биологический субстрат предварительно осаждали 28%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ) в соотношении 1:10 и центрифугированием на 3000 об./с. в течение 10 минут, в реакционную смесь вносили 100 мкл супернатанта, полученного при осаждении, вместе с 50 мкл 3%-ного раствора этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) и инкубировали 20 минут в сухом термостате при температуре 37° С перед инициацией хемилюминесценции. Изучение динамики процесса производилось с помощью аппаратно-программного комплекса авторской конструкции с программным обеспечением собственной разработки, позволяющего переводить в цифровое представление аналоговый сигнал с выхода хемилюминотестера. Определяли следующие показатели хемилюминесценции: относительная максимальная амплитуда вспышки в сравнении с эталоном ($h_{\text{хем}}, \%$) и относительная площадь вспышки за 25 секунд в сравнении с эталоном ($S_{25\text{хем}}, \%$). Показатели хемилюминесценции биологического объекта рассчитывали относительно значений хемилюминесценции реакционной смеси без биологического образца.

Определение антиоксидантной активности плазмы крови и экссудата раны амперометрическим способом проводилось на анализаторе антиоксидантной активности «Яуза-01-ААА» производства ОАО НПО «ХИМАВТОМАТИКА». Способ основан на измерении электрического тока, возникающего при окислении биологического образца на поверхности рабочего электрода при определенном потенциале, и сравнении полученного сигнала с сигналом стандарта, измеренного в тех же условиях. Использовалась методика производителя с изменениями. В частности, для определения амперометрической антиоксидантной активности ($AOA_{\text{амп}}$) плазмы крови рабочий раствор готовили путем разведения биологической пробы в 100 раз, а экссудата раны – в 50 раз. В качестве стандарта использовали аскорбиновую кислоту. Калибровочный график строили отдельно для малых и больших значений $AOA_{\text{амп}}$. Рассчитывали относительную площадь электрического тока окисления субстрата в сравнении с аскорбиновой кислотой, выраженную в мг/л, эквивалент аскорбиновой кислоты (мг/л ЭАК). Пересчет антиоксидантной активности субстрата, определенной амперометрическим способом, производили, решая уравнение линии тренда калибровочного графика. Линию тренда и ее уравнение получали в Excel (Microsoft Inc., 2003). Для получения решения

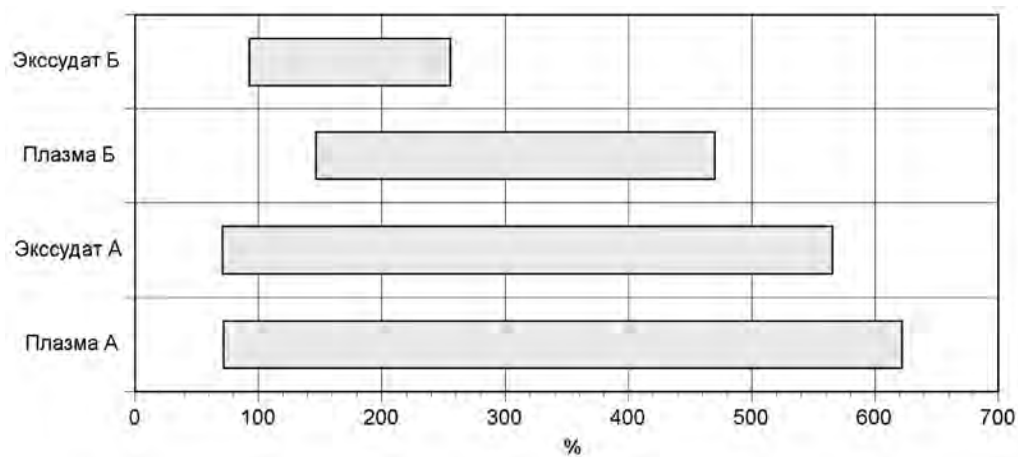


Рис. 1. Разброс относительной площади вспышки хемилюминесценции субстрата (плазма крови и экссудат раны)

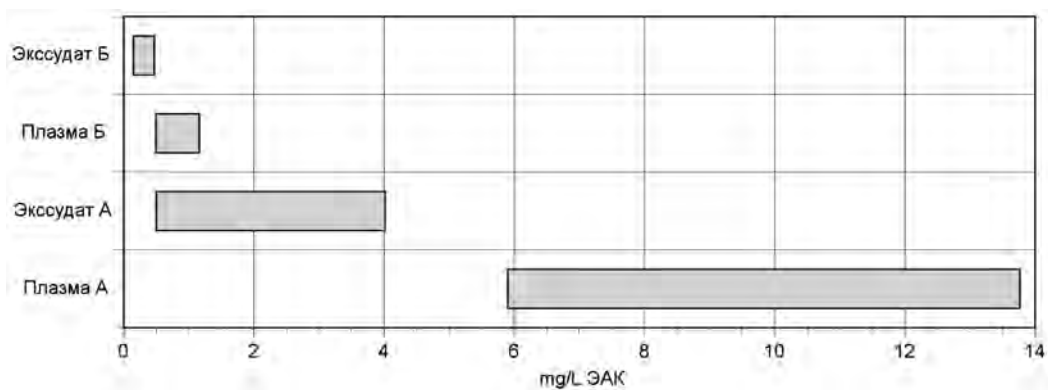


Рис. 2. Разброс относительной площади тока окисления субстрата (плазма крови и экссудат раны)

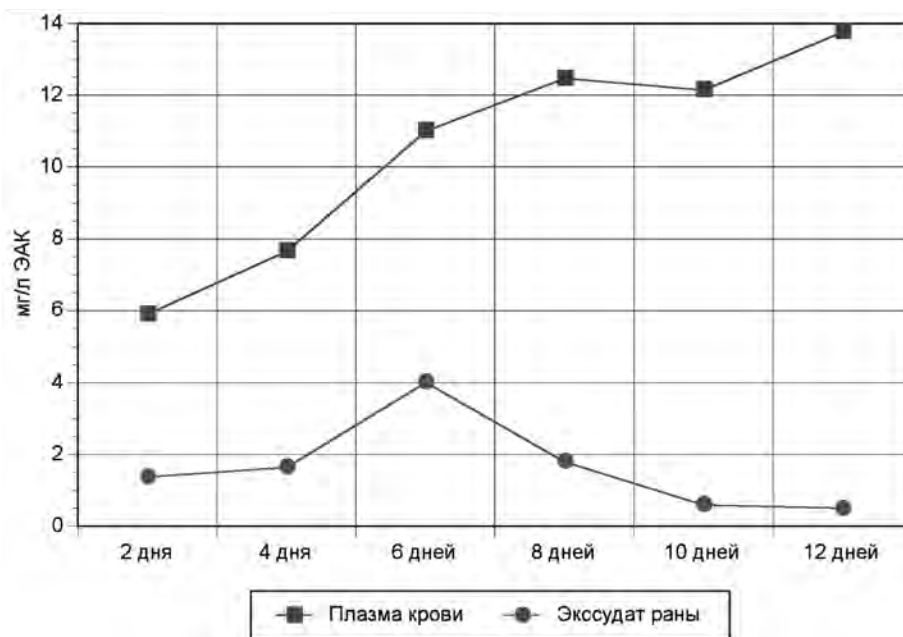


Рис. 3. Динамика относительной площади тока окисления субстрата (плазма крови и экссудат раны) в группе А

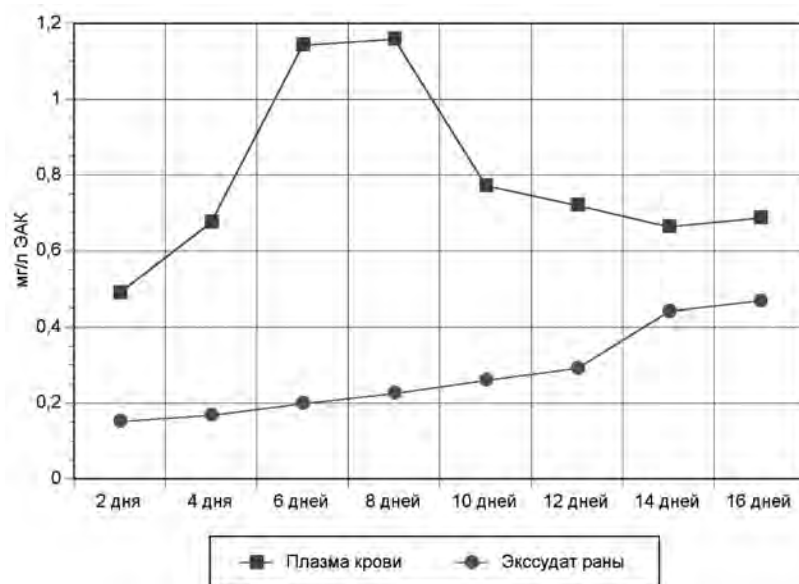


Рис. 4. Динамика относительной площади тока окисления субстрата (плазма крови и экссудат раны) в группе Б

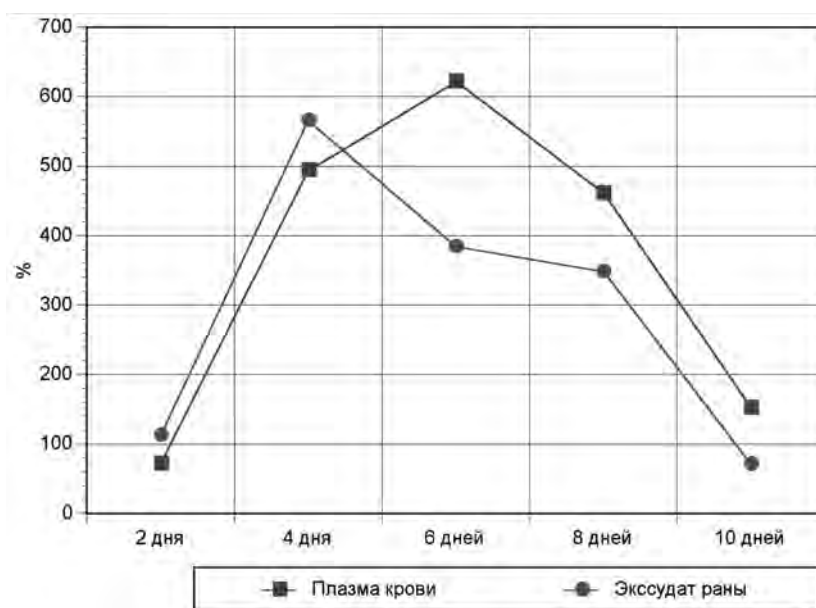


Рис. 5. Динамика относительной площади вспышки хемилюминесценции субстрата (плазма крови и экссудат раны) в группе А

вышеозначенного уравнения использовали PowerToy Calc (Microsoft Inc., 2003).

Активность каталазы исследовали по методу [11]. Количество перекиси водорода, разложившейся под действием фермента за 1 мин при оптимальных условиях ($\text{pH}=7,4$ и температура 37°C), рассчитывали спектрофотометрически и выражали в ммоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Er } 10^9/\text{мин}$.

Для определения активности супероксиддисмутазы использовали методику [6]. Метод основан на способности СОД ингибировать реакцию аутоокисления кверцетина в связи с тем, что одним из промежуточных продуктов этой реакции является супероксидный анион-радикал. Степень ингибирования определяли в

виде разницы между изменением оптической плотности за 5 минут в контрольной и опытной пробах. Контрольной пробой служила проба без биологического материала. Результаты активности СОД выражали в % ингибирования/ $\text{Er } 10^9/\text{мин}$.

Полученные результаты подвергались статистическому анализу [5] в системе SPSS 12.0 for Windows (SPSS Inc., 1989–2003). Все собранные данные предварительно подвергались проверке нормальности распределения с помощью W-критерия Shapiro-Wilk и визуального контроля гистограмм. Для выявления различий между группами больных применяли непараметрический Z-критерий Kolmogorov-Smirnov. Для анализа результатов повторяющихся измерений

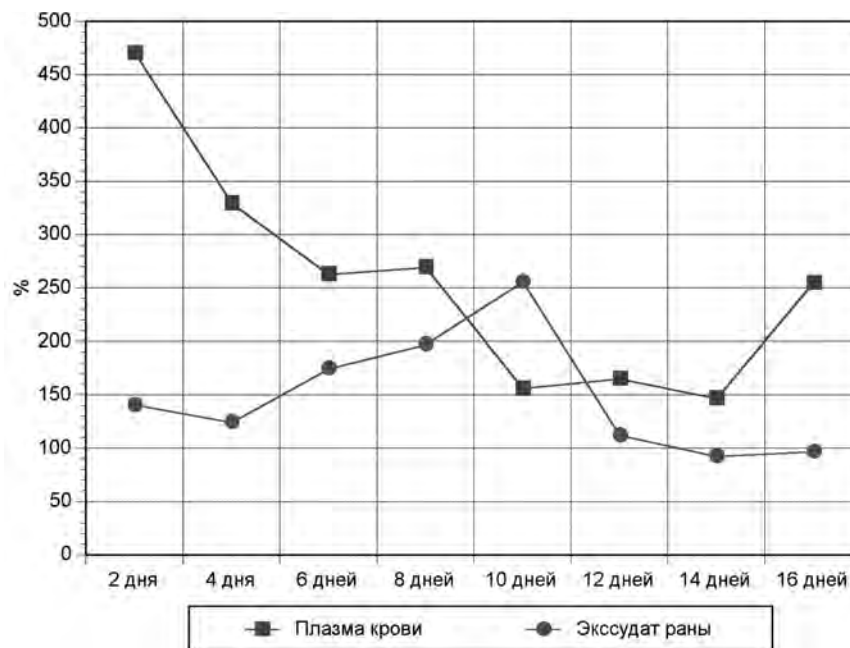


Рис. 6. Динамика относительной площади вспышки хемилюминесценции субстрата (плазма крови и экссудат раны) в группе Б

использовался непараметрический критерий Friedman. Графические средства представления информации создавались в DeltaGraph 5.0 (SPSS Inc., 2001).

Результаты

Среднее значение относительной площади вспышки хемилюминесценции плазмы крови группы А за период исследования превысило этот показатель группы Б на 40,4%, а среднее значение относительной площади вспышки хемилюминесценции экссудата раны группы А превысило этот показатель группы Б на 98,7% ($p < 0,05$). Интересно, что наибольший разброс изучаемых параметров плазмы крови и экссудата раны зафиксирован также в группе А (рис. 1, 2). Среднее значение относительной площади тока окисления плазмы крови группы А за период исследования превысило этот показатель группы Б в 13,3 раза ($p < 0,01$), а среднее значение относительной площади тока окисления экссудата раны группы А превысило в 6 раз ($p < 0,01$) этот показатель группы Б.

Изменения относительной площади тока окисления субстрата и площади вспышки хемилюминесценции в динамике зависели как от группы больных, так и от исследуемого субстрата. В группе А отмечался постоянный рост площади тока окисления плазмы крови, которая увеличилась на 233,6% ($p < 0,05$). Среднее по группе максимальное значение за период наблюдения — 13,77 мг/л ЭАК. Площадь тока окисления экссудата раны достигла максимума на 6-й день, увеличившись на 292,7% ($p < 0,05$), после чего отмечен быстрый спад до уровня ниже исходных значений (рис. 3). Среднее по группе максимальное значение за период наблюдения — 4,02 мг/л ЭАК. В группе Б, напротив, имел место постоянный рост площади тока окисления экссудата раны, которая увеличилась на 309,3% ($p < 0,05$). Среднее по группе максимальное значение за период наблюдения — 0,468 мг/л ЭАК. Площадь тока

окисления плазмы крови достигла максимального значения — 236,8% — на 8-е сутки ($p < 0,05$), после чего произошло быстрое истощение со значительным спадом (рис. 4). Среднее по группе максимальное значение за период наблюдения — 1,16 мг/л ЭАК.

В группе А к 4–6-му дню наблюдался значительный рост относительной площади хемилюминесценции как в плазме крови (865,2% от исходного уровня, $p < 0,01$), так и в экссудате раны (502,9% от исходного уровня, $p < 0,01$), который сменился не менее быстрым уменьшением (рис. 5). В плазме крови среднее по группе максимальное значение за период наблюдения — 621,8%, в экссудате раны — 565,6%. В группе Б отмечалось длительное снижение (на 68,8% от исходного уровня, $p < 0,05$) относительной площади хемилюминесценции плазмы крови, лишь на 16-й день сменившееся некоторым подъемом (на 73,3% от исходного уровня, $p > 0,05$), а относительная площадь хемилюминесценции экссудата раны медленно увеличивалась (182,0% от исходного уровня, $p < 0,05$), достигнув максимума в последней трети периода наблюдения (рис. 6). В плазме крови среднее по группе максимальное значение за период наблюдения — 470,2%, в экссудате раны — 255,5%.

Выводы

1. В процессе эволюции раны у соматически здоровых пациентов на 4-е сутки как на организменном, так и на местном уровне отмечается преобладание оксидативных процессов, которое частично нивелируется активацией факторов АРЗ. Развившееся смещение прооксидантно-антиоксидантного статуса относительно купируется к 10-м суткам.

2. В процессе эволюции раны у пациентов с сопутствующим сахарным диабетом на организменном уровне отмечается замедление скорости уменьшения активности оксидативных процессов, которое, вероятно, связано с коррекцией гликемического профиля и системным лечением сахарного диабета после госпитализации.

На местном уровне обращают внимание запаздывание и уменьшение интенсивности активации прооксидантных факторов и отсутствие реакции системы АРЗ на их активацию. Наиболее вероятно, что описываемые изменения отражают общее истощение как оксидативной, так и антиоксидантной системы с установлением равновесия между ними на более низком уровне.

3. Динамическое определение антиоксидантно-прооксидантного статуса как на уровне организма больного, так и на местном уровне (в ране) представляет практический интерес, так как позволяет проводить индивидуальную коррекцию лечения. Особенно важным представляется осуществление такого мониторинга непосредственно в ране, так как позволяет определить этапность смены препаратов с прооксидантной направленностью на препараты антиоксидантного ряда.

Практические рекомендации

На основании вышеизложенных результатов исследования можно предположить, что проведение терапии, направленной на коррекцию дисбаланса прооксидантно-антиоксидантного статуса, должно носить следующий характер.

1. В местной терапии гнойных ран у больных без сопутствующих заболеваний (сахарный диабет и т. п.) до 4–6-го дня следует применять прооксидантные препараты (гипохлорит натрия, нейтральный анолит), а позже антиоксидантные препараты (бета-каротин, каротин и др.).

2. В системной терапии у больных с гнойными ранами и сопутствующими заболеваниями (сахарный диабет и т. п.) первые 4–6 дней желательно применение антиоксидантной терапии. У больных с небольшой площадью дефекта кожных покровов возможно назначение пероральных форм антиоксидантов, содержащих токоферол, бета-каротин, липоевую кислоту, ацетилцистеин. У больных с большой площадью раневой поверхности, имеющих выраженные сдвиги в работе антиоксидантной системы и значительный дисбаланс прооксидантно-антиоксидантного равновесия, следует применять внутривенное введение ионола или олифена из расчета 0,5–1,0 г/сутки [7].

3. В системной терапии больных с гнойными ранами и сопутствующими заболеваниями (сахарный диабет и т. п.), учитывая снижение уровня эндогенных антиоксидантов, необходима коррекция работы низкомолекулярного звена антиоксидантной системы. Показано использование препаратов липоевой кислоты (тиоктагид, берлитион, эспапон) для внутривенного введения в дозе до 600 мг в первые 14 дней, а в последующем применение поддерживающей терапии оральными формами (берлитион ораль, тиогамма) в дозе до 300–600 мг в сутки в течение 3–4 месяцев с целью улучшения микроциркуляции и регенерации тканевых структур. Помимо препаратов липоевой кислоты важным представляется также комплексное применение других антиоксидантов: витамина С, токоферола и убихинона, как веществ, функционирующих в одной цепи [2, 3].

Поступила 20.01.07 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М. И., Клебанова Е. М. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета (лекция) // Проблемы эндокринологии. 2000, № 46 (6). С. 29–34.

2. Балаболкин М. И., Креминская В. М. Диабетическая невропатия // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2000, № 10 (100). С. 57–64.

3. Балаболкин М. И., Креминская В. М., Клебанова Е. М. Роль окислительного стресса в патогенезе диабетической невропатии и возможность его коррекции препаратами а-липоевой кислоты // Проблемы эндокринологии. 2005, № 3 (51). С. 22–33.

4. Герасимов А. М., Фурцева Л. Н. Биохимическая диагностика в травматологии и ортопедии. М.: Медицина, 1986. 236 с.

5. Дубнов П. Ю. Обработка статистической информации с помощью SPSS. М.: АСТ, 2004. 221 с.

6. Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы медицинской химии. 1990, № 2. С. 88–91.

7. Оковитый С. В. Клиническая фармакология антиоксидантов. "ФАРМиндекс-Практик", 2003, вып. 5. С. 85–111.

8. Ромм А. Р., Шерстнев М. П., Волков В. В., Владимиров Ю. А. Действие лазерного излучения на перекисную хемилюминесценцию раневого экссудата // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1986, № 102 (10). С. 426–428.

9. Babior B. M., Kipnes R. S., Curnutte J. J. Biological defence mechanism. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. J. Clin. Invest. 1973, № 52. P. 742.

10. Bast A., Haenen G. R. M. M., Doelman C. J. A. Oxidants and antioxidants: State of the art. Amer. J. Med. 1991, № 91, Suppl. 3C. P. 25–135.

11. Beers R., Sizer I. A Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase. J Biol Chem. 1952, № 195. P. 133.

12. Cantoni O., Fumo M., Cattabeni F. Role of metal ions in oxidant cell injury. Biol. Trace. Elem. Res. 1989, № 21. P. 277–281.

13. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press, 1999.

14. Iyer G. Y. N., Islam M. F., Quastel J. H. Biochemical aspects of phagocytosis. Nature (London), 1961. № 192. P. 535.

15. Masataka S., Johnston R. B. Jr. Macrophage microbicidal activity. Correlation between Phagocytosis-associated Oxidative Metabolism and the Killing of Candida by Macrophages. The Journal of Experimental Medicine. 1975, № 141. P. 257–262.

16. Rosen H., Klebanoff S. J. Bactericidal activity of a superoxide anion-generating system. J. Exp. Med. 1979, № 149. P. 27–39.

**S. R. FEDOSOV, YU. P. SAVCHENKO,
I. I. PAVLICHENKO, A. A. BASOV**

THE PRACTICAL IMPORTANCE OF ESTIMATION OF PROOXIDATIVE-ANTIOXIDATIVE STATUS OF PATIENTS WITH PURULENT WOUND

The investigation of prooxidative-antioxidative status of patients with purulent wounds was led. It was been showed that during the evolution of the wound of somatically health patients. For the first days the noticed predominance of oxidative processes quickly reduced both on a local and on a system level. The patients with diabetes mellitus was revealed the slowing down of the abatement of activity of oxidative processes speed and the leak of the ARZ system's reaction on their activation.