

## ИНТЕНСИВНОСТЬ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ ПРИ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ В ДИНАМИКЕ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

Григорьев А.Г.<sup>1</sup>, Власов А.П.<sup>2</sup>, Григорьева А.А.<sup>1</sup>, Щелчкова Н.А.<sup>3</sup>, Болотских В.А.<sup>4</sup>, Шевалаев Г.А.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Научный клинический центр «Медкриология», г. Нижний Новгород, Россия (603081, г. Нижний Новгород, ул. Медицинская, 12), e-mail: medkrio@mail.ru

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева», Саранск, Россия (430005, г. Саранск, ул. Большевикская, 68), e-mail: vap.61@yandex.ru

<sup>3</sup>ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» ЦНИЛ, отдел молекулярно-клеточных технологий, г. Нижний Новгород, Россия (603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1), e-mail: rector@gma.nnov.ru

<sup>4</sup>ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им Н.Н. Бурденко», Воронеж, Россия (394000, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10), e-mail: canc@vsma.ac.ru

<sup>5</sup>ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск, Россия (432017, г. Ульяновск, ул. Льва Толстого, д. 42), e-mail: contact@ulsu.ru

Проведено исследование влияния криокислородного аэрозоля на содержание в крови показателей свободно-радикального окисления, системы перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты и ТБК-активные продукты) у 75 экспериментальных животных, которым моделирован гнойный процесс в подкожной клетчатке. Показано, что криокислородная терапия способствует быстрому подавлению активности гнойно-воспалительного процесса в подкожной ране, одновременно происходит стимуляция процессов регенерации и повышение общей резистентности организма. На фоне проводимой терапии отмечается модуляция свободно-радикальных процессов перекисного окисления липидов в плазме крови и эритроцитах. Применение криокислородной терапии, как монотерапии, так и в сочетании с антибиотическими препаратами приводит к стабилизации системы перекисного окисления липидов, тем самым предотвращается развитие гнойно-воспалительных осложнений. Локальная криокислородная терапия является эффективным методом лечения гнойно-деструктивных ран и может применяться как в комплексном лечении, так и в качестве самостоятельного метода.

Ключевые слова: криокислородная терапия, гнойная рана, перекисное окисление липидов.

## INTENSITY IN LIPID PEROXIDATION OF IN INFLAMMATORY PROCESSES IN THE DYNAMICS COMBINED THERAPY

Grigoryev A.G.<sup>1</sup>, Vlasov A.P.<sup>2</sup>, Grigoriev A.A.<sup>1</sup>, Shchelchkova N.A.<sup>3</sup>, Bolotskih V.A.<sup>4</sup>, Shevalaev G.A.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Scientific Clinical Center «Medkriologiya», Nizhny Novgorod, Russia (603081, Nizhny Novgorod, Str. Medical, 12), e-mail: medkrio@mail.ru

<sup>2</sup>Mordvinian State University, Saransk, Russia (430005, Saransk, street Bolshevistskaya, 68), e-mail: vap.61@yandex.ru

<sup>3</sup>Medical University «Nizhny Novgorod State Medical Academy» Central Research Laboratory, Department of molecular cell technologies, Nizhny Novgorod, Russia (603005, Nizhny Novgorod, pl. Of Minin and Pozharsky, 10/1), e-mail: rector@gma.nnov.ru

<sup>4</sup>Medical University «Voronezh State Medical Academy named after N.N. Burdenko», Voronezh, Russia (394000, Voronezh, street Student, 10), e-mail: canc@vsma.ac.ru

<sup>5</sup>Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia (432017, Ulyanovsk, Lev Tolstoy Str., 42), e-mail: contact@ulsu.ru

The effect of aerosol on cryo oxygen content in the blood indicators of free radical oxidation, lipid peroxidation (diene conjugates and TBA-active products) in 75 experimental animals that simulated purulent process in the subcutaneous tissue. It is shown that kriokislородnaya therapy promotes rapid suppression of the activity of inflammatory processes in the subcutaneous wound, while there is stimulation of the processes of regeneration and increase the overall resistance of the organism. Against the background of the therapy indicated modulation of free radical lipid peroxidation in plasma and red blood cells. Application kriokislородnoy therapy as monotherapy and in combination with atibioticheskimi drugs leads to stabilization of lipid peroxidation, thereby preventing the development of inflammatory complications. Local kriokislородnaya therapy is an effective method of treatment of purulent wounds destructive and can be used in treatment, and as an independent method.

Keywords: cryo oxygen therapy, purulent wound, lipid peroxidation.

Актуальность темы лечения гнойно-воспалительных заболеваний неуклонно возрастает, вызывая обоснованную тревогу и озабоченность всего медицинского сообщества. Поводом для такого состояния является выраженная распространенность внутрибольничных инфекций, возникающих в результате оказания медицинской помощи. Так, имеются данные, что в России более 2 млн. человек ежегодно поражаются внутрибольничными инфекциями [6, 7].

Значительная часть патогенных микроорганизмов, вызывающих гнойно-воспалительные заболевания, в настоящее время приобрела новые механизмы уклонения от антимикробной цитотоксичности клеток иммунной системы, являясь стимулятором развития синдрома вторичной недостаточности иммунной системы. Также тяжёлое течение острых гнойных процессов активирует перекисное окисление (ПОЛ) на фоне снижения активности антиоксидантной системы [3, 9]. Изменение соотношения биохимических факторов окисления (прооксидантов) и антиоксидантов, регулирующих нормальное течение окислительно-восстановительных процессов, характеризует нарушение метаболизма в тканях раны, что приводит к ослаблению процессов репарации [1, 2]. Проблема активного местного воздействия на очаги инфекции и гнойно-септические осложнения в ранах мягких тканей с целью повышения эффективности их лечения остаётся до сих пор актуальной проблемой хирургии во всем мире.

Интересным представляется оценка влияния местного применения криокислородной терапии, которая сочетает в себе преимущества как классической криотерапии, так и приёмов оксигенации поражённых тканей на динамику показателей перекисного окисления липидов при лечении инфицированной раны.

**Цель исследования:** изучить уровень продуктов ПОЛ у экспериментальных животных с гнойными ранами после использования криокислородного аэрозоля (ККА) в эксперименте.

**Материалы и методы исследования.** Исследование проводилось на 75 белых крысах-самцах породы «Вистар» 6-месячного возраста с массой тела 200-250 г. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, что соответствует нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ». Опыты на животных выполняли в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, регламентированными «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными Приказом МЗ СССР №742 от 13.11.84г. «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и №48 от 23.01.85г. «О контроле за проведением работ с использованием

экспериментальных животных». Все оперативные вмешательства проводили в стерильных условиях под общим обезболиванием.

Способ моделирования инфицированной раны заключался в формировании подкожного кармана размером 4х6 см, в который помещался фетровый диск, пропитанный суспензией, содержащий 0,5 мл  $10^8$  *S. aureus*. Данный способ обеспечивает получение модели инфицированной кожной раны с заданной бактериальной обсемененностью, которая по своим характеристикам максимально приближена к реальному клиническому течению раневого процесса.

Заражение животных проводили клиническим изолятом *S. Aureus* штамм 3904 MRSA (ГБУЗ НО ГКБ № 30 г. Нижний Новгород, хирургическое отделение, трофическая язва), обладающим (на основе данных резистограммы) чувствительностью к офлоксацину, умеренной чувствительностью к пefлоксацину и ципрофлоксацину и не чувствительным к ингибиторзащищенным пенициллинам, цефалоспоринолу, эритромицинолу, азитромицинолу, клиндамицинолу, линкомицинолу, ванкомицинолу, гентамицинолу, оксациллинолу, имипенему. Лечение гнойной раны проводилось с использованием антибиотика пefлоксацина (Абактал®, регистрационный № 008768/01) в терапевтической дозе 8 мг/кг 1 раз в сутки в группах 1 и 2 на 1–5-е сутки после моделирования гнойной раны.

Для обработки раны криокислородным аэрозолем использовали криогенный аппарат А.Г. Григорьева «Иней», позволяющий конденсировать газообразный кислород под заданным давлением и размером дисперсности фракционных частиц конденсированного кислорода, в зоне манипуляционного поля (патент РФ № 114837, опубликован в бюл. №11 от 20.04.2011г. ТУ 9437-001- 92371253-2011 РУ ФРС 2012/13516 от 07.06.2012г.).

При работе данного аппарата осуществляется конденсация (сжижение) рабочего газа (воздуха, кислорода, озонированного кислорода) на аппликаторе в ране. Сжиженный рабочий газ выходит из отверстия внутреннего канала канюли аппликатора под давлением пропорциональным давлению подаваемого рабочего газа, которое можно регулировать, что позволяет проводить активную криооксигенацию тканей.

Все животные были распределены на группы: 1 группа – животные, которым после формирования гнойной раны, применяли курсовое введение антибиотика; 2 группа – животные, которым после формирования гнойной раны применяли курсовое введение антибиотика и лечение ККА (крио кислородным аэрозолем) на 3, 5, 14-е сутки; 3 группа – животные, которым после моделирования гнойной раны, применяли лечение гнойной раны ККА; 4 группа – контрольная, которым после моделирования гнойной раны, не оказывалось никакого лечения; 5 группа – интактные.

Лечение ККА проводили в группах 2 и 3 на 3, 5, 14-е сутки после формирования гнойной раны. Забор материала проводился на 5, 10, 14-е сутки после формирования гнойной раны (абсцесса) соответственно дизайну экспериментального исследования.

В указанные временные точки животные подвергались декапитации, после чего осуществляли забор крови. Кровь центрифугировали в течение 15 минут при 250 g. Полученная плазма крови использовалась для определения активных форм кислорода, диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА). Эритроциты трехкратно отмывали физиологическим раствором для определения ДК и МДА. Активность свободно-радикальных процессов в плазме крови изучали методом индуцированной биохемилюминесценции по показателю светосуммы (S). Регистрировали уровень индуцированной хемилюминесценции сыворотки крови на приборе БХЛ-07 (Россия, г. Нижний Новгород) [4]. Светосумма свечения (обратно пропорциональна общей антиоксидантной активности), отражает содержание радикалов  $RO_2\bullet$ , соответствующих обрыву цепи свободнорадикального окисления (СРО). Содержание первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов в плазме крови проводилось в гептановой фазе, в эритроцитах – в спиртовой. Измерение проводили при длине волны 233 нм на спектрофотометре СФ-46. Уровень вторичных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида – в плазме крови и эритроцитах определяли осаждением их на холоде фосфорно-вольфрамовой кислотой, в результате реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) при нагревании образовывали окрашенные комплексы. Интенсивность окраски измерялась на фотоэлектроколориметре (ФЭК) при 535 и 580 нм. Количественные расчеты проводились с учетом молярных концентраций изучаемых продуктов [5].

Полученные данные были обработаны с помощью пакета программ «Statistica 6.0». Для оценки вероятности различий между контрольными и опытными группами использовали U-критерий Манна-Уитни, независящий от формы распределения в группе. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

### **Результаты исследования и их обсуждение**

В данной исследовательской работе была проведена оценка влияния криокислородного аэрозоля на содержание в крови показателей СРО, системы ПОЛ. Ответной реакцией на травму и развитие раневой инфекции является миграция в рану фагоцитирующих клеток. Погибая в ране, они выделяют физиологически активные вещества (кислые и нейтральные гидролазы, простагландины, тромбоксаны и др.), активируют процессы ПОЛ и генерируют медиаторы воспаления [8]. Эти вещества вместе с токсическими продуктами микробов (гемолизин, лейкоцидин, некротоксин и др.), повреждая

окружающую ткань и воздействуя на систему микроциркуляции, поддерживают гнойно-инфекционный процесс и СРО [2].

Оценка интенсивности окислительных процессов по показатели хемилюминесценции в экспериментальных группах проводилась после первой криокислородной обработки раневой поверхности на 5-е сутки от моделирования гнойной раны (табл.1). Показано, что максимальная активность процессов СРО наблюдалась в группе 4. Значения хемилюминесценции в группе 3 были сопоставимы с интактными значениями. Группы 1 и 2 характеризовались угнетением СРО, что может свидетельствовать о токсическом и сенсibiliзирующем влиянии антибактериального препарата.

**Таблица 1**

Интенсивность свободнорадикальных процессов, определяемая по показателям хемилюминесценции плазмы экспериментальных животных при гнойно-воспалительном процессе (M±m)

Этапы периода наблюдения	Интактные, n=15	Антибиотик, n=4	Антибиотик + ККА, n=4	ККА, n=4	Без лечения, n=4
5-е сутки	315,0±32,5	165,0±24,7*	165,6±22,7* **	263,2±23,9**	368,0±14,3*
10-е сутки		775,0±49,7*	683,2±43,1*	756,0±24,6*	730,6±38,4*
14-е сутки		491,6±39,0*	441,2±45,5*	378,8±48,2**	544,0±21,1*

\* - p<0.05 по отношению к интактной группе; \*\* - p<0.05 по отношению к контрольной группе «без лечения».

После второй обработки гнойной раны (10-е сутки) изучение активности СРО в плазме крови экспериментальных животных выявило многократное увеличение активности данного процесса во всех исследуемых группах относительно интактных показателей, но не отличающиеся между собой. Третья обработка криокислородом вызывала снижение интенсивности СРО относительно предыдущего измерения во всех группах. Однако наиболее высокие значения сохранялись в группе 4, а группа 3 оказалась соизмерима с интактными значениям данного показателя.

Таким образом, наиболее мягким воздействием на систему СРО, выражающимся в плавном росте и постепенном снижении активности процессов окисления, обладает криокислородное воздействие.

На клеточном уровне повреждающее действие активных форм кислорода состоит преимущественно в нарушении организации мембранных структур. СРО влияет на структуру бислоя, изменяя вязкость мембран, инактивируя мембраносвязанные рецепторы и ферменты, увеличивая неспецифическую проницаемость ионов кальция.

Биохимическое исследование активности процессов липопероксидации выявило достоверное увеличение уровня первичных продуктов ПОЛ – ДК – в плазме крови животных после первой обработки криокислородом у животных в группах 1, 2 и 3 относительно

интактных животных ( $3,05 \pm 0,31$ ;  $5,87 \pm 0,14$ ;  $7,37 \pm 0,91$  нмоль/мл соответственно). Причём в группах 2, 3 данный показатель статистически значимо выше значений у животных групп 1 и 4, что может объясняться гипероксигенацией, как стимулятора СРО. Схожие изменения выявлены по уровню ДК и в мембранах эритроцитов. Многократное увеличение их количества выявлено после первой обработки раны в группах 2 и 3 относительно уровня интактной группы, и группах 1 и 4, в которых ККА не применялся.

**Таблица 2**

Содержание диеновых конъюгатов (ДК) в плазме крови и эритроцитах экспериментальных животных при гнойно-воспалительном процессе, нмоль/мл ( $M \pm m$ )

Этапы периода наблюдения	Интактные, n=15	Антибиотик, n=4	ККА+ антибиотик, n=4	ККА, n=4	Без лечения, n=4
Плазма					
5-е сутки	$3,05 \pm 0,5$	$3,05 \pm 0,31^*$	$5,87 \pm 0,14^{**}$	$7,4 \pm 0,9^{* **}$	$3,04 \pm 1,2$
10-е сутки		$9,0 \pm 0,8^*$	$3,9 \pm 0,6^{**}$	$3,82 \pm 0,5^*$	$12,3 \pm 2,4^*$
14-е сутки		$10,2 \pm 2,1^*$	$5,0 \pm 0,7^{* **}$	$2,9 \pm 0,5^{**}$	$10,1 \pm 1,6^*$
Эритроциты					
5-е сутки	$9,4 \pm 2,0$	$13,0 \pm 2,9^*$	$39,32 \pm 6,1^{**}$	$31,2 \pm 12,6^{**}$	$5,86 \pm 1,2^{* **}$
10-е сутки		$18,8 \pm 2,0^*$	$5,1 \pm 0,6^{* **}$	$6,5 \pm 0,51^{**}$	$2,58 \pm 0,3^{* **}$
14-е сутки		$1,1 \pm 0,3^*$	$17,6 \pm 1,8^{* **}$	$15,9 \pm 2,1^{* **}$	$8,1 \pm 1,0^{**}$

\* -  $p < 0.05$  по отношению к интактной группе; \*\* -  $p < 0.05$  по отношению к контрольной группе «без лечения»

При изучении содержания вторичного продукта ПОЛ – МДА – в сыворотке и мембранах эритроцитов показан рост данного показателя после первой процедуры в группах 2 и 3 ( $11,7 \pm 0,9$ ;  $12,5 \pm 0,5$  – в плазме;  $23,7 \pm 1,9$ ;  $30,0 \pm 1,0$  мкмоль/л – в мембранах эритроцитов соответственно) по сравнению с интактными животными ( $4,3 \pm 0,5$  и  $13,07 \pm 1,0$  мкмоль/л) и животными групп 1 и 4 ( $4,4 \pm 0,38$ ;  $4,7 \pm 0,6$  – в плазме;  $9,6 \pm 0,7$ ;  $14,4 \pm 0,4$  мкмоль/л – в мембранах эритроцитов), которым воздействие ККА не применялось (табл. 3).

Таким образом, после 1-го воздействия ККА (5-и сутки после моделирования гнойной раны) показано увеличение ДК и МДА в сыворотке и мембранах эритроцитов в группах 2 и 3, что может отражать ускорение процессов СРО у животных, которым применялось воздействие ККА.

На 10-е сутки после моделирования гнойной раны фиксировали нарастание концентрации ДК в плазме крови в группах 1 и 4 относительно данных интактных животных и в группах животных 2 и 3, которым применялось воздействие ККА.

Повторная обработка раневой поверхности ККА в опытных группах привела к снижению уровня ДК в плазме крови и в мембранах эритроцитов относительно предшествующего измерения. Особенно выраженным снижением уровня ДК в сравнении с

первым измерением было у животных групп 2 и 3, к которым применялось воздействие ККА, что также может указывать на ускорение процессов этапов метаболизма ДК при ПОЛ.

**Таблица 3**

Содержание МДА в плазме крови и эритроцитах экспериментальных животных при гнойно-воспалительном процессе, нмоль/мл (M±m)

Этапы периода наблюдения	Интактные, n=15	Антибиотик, n=4	ККА+антибиотик, n=4	ККА, n=4	Без лечения, n=4
Плазма					
5-е сутки	4,3±0,5	4,4±0,38	11,7±0,9*	12,5±0,5* **	4,7±0,6
10-е сутки		3,3±0,4	3,4±0,32	5,52±0,6	3,1±0,4
14-е сутки		1,8±0,21*	6,1±0,80* **	2,21±0,1*	2,10±0,18*
Эритроциты					
5-е сутки	13,07±1,0	9,6±0,7* **	30,0±1,0* **	23,7±1,9 **	14,4±0,4*
10-е сутки		10,5±1,2*	11,6±0,9	11,3±1,3	11,5±1,1
14-е сутки		15,9±2,1* **	24,8±3,3	18,6±1,8*	17,6±1,2*

\* - p<0.05 по отношению к интактной группе; \*\* - p<0.05 по отношению к контрольной группе «без лечения».

После повторного воздействия криокислородным аэрозолем динамика уровня МДА в плазме и мембранах эритроцитов в опытных группах была направлена в сторону снижения, по сравнению с предшествующим сроком измерения.

При оценке активности ПОЛ на 14-е сутки моделирования гнойной раны после 3-го ККА воздействия было отмечено сохранение высокого уровня ДК в плазме крови в группах 1 и 4, а в группах 2 и 3 сохранялась отрицательная динамика данного показателя.

На мембранах эритроцитов наблюдалось увеличение ДК в группах 2 и 3.

Для МДА на 14-е сутки при 3-м измерении были отмечены более высокие титры у животных групп 2 и 3. В плазме зарегистрировано снижение уровня МДА во всех группах, кроме группы 2, а на мембранах эритроцитов наблюдался рост данного показателя, причём максимальное значение отмечено также в группе 2, что может свидетельствовать о большей интенсивности метаболизма антиоксидантного каскада СРО на конечном этапе сочетанной терапии, когда курс антибактериального препарата закончен, соответственно нивелирован его токсический эффект, а лечение воздействием ККА, продолжается.

Исходя из совокупности получаемых в исследовании результатов, данная методологическая схема сочетанного применения антибиотиков и криокислородного воздействия (когда на начальном этапе применяется совместно антибиотик и ККА, а на конечном – только ККА) в лечении первично-инфицированных и гнойных ран может оказаться наиболее клинически эффективна.

**Выводы:**

1. Крeиокислородная терапия способствует быстрому подавлению активности гнойно-воспалительного процесса в подкожной ране, одновременно происходит стимуляция процессов регенерации и повышение общей резистентности организма.
2. На фоне проводимой терапии отмечается модуляция свободнорадикальных процессов перекисного окисления липидов в плазме крови и эритроцитах.

### Список литературы

1. Белова С.В., Бабушкина И.В., Гладкова Е.В., Мамонова И.А., Карякина Е.В., Коршунов Г.В. Регенерация экспериментальной гнойной раны и процессы свободнорадикального окисления при использовании наночастиц металлов и хитозана // Дальневосточный медицинский журнал. - 2014. - №3. - С.79-81.
2. Власов А.П., Трофимов В.А., Крылов В.Г. Системный липидный дистресс-синдром в хирургии. – Москва: Наука. – 2009. – 224 с.
3. Дроник И.И. Роль свободнорадикального окисления в возникновении гнойного процесса в пародонте у больных хроническим генерализованным пародонтитом I-II степени тяжести // Клиническая медицина. - 2014. - Том XIX. - №4. - С.127-130.
4. Иванова И.П., Трофимова С.В., Пискарев И.М. Хемилюминесценция, индуцированная реакцией Фентона, - математическое моделирование процесса; особенности, параметры и условия применения для биомедицинских исследований // Современные технологии в медицине.- 2014.- Т. 6. - № 4. - С. 14-25.
5. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. - М.: «ГЭОТАР-Медиа». - 2009. - 800 с.
6. Миронов А.Ю., Жилина С.В., Дмитриенко О.А. Архитектоника микробной экологии в отделении гнойной хирургии городской клинической больницы // Клиническая лабораторная диагностика. - 2012. - № 7.- С. 53 - 58.
7. Фадеева Т.В., Верещагина С.А., Филатова Л.С. Микробиологическая оценка послеоперационной раневой инфекции в многопрофильной хирургической клинике // Инфекции в хирургии. - 2007. - № 4. – С. 14-20.
8. Шаркова В.А., Лайман Е.Ф., Баранова Н.А. Структура таксономических групп микрофлоры ран при различных типах хирургического вмешательства // Аллергология и иммунология. - 2011. - Т.12. - №1. - С. 96-97.
9. Kim Y.W., Vyzova T.V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease // Blood. – 2014. - Jan 30. – Vol. 123(5). – P.625-631.

**Рецензенты:**

Смолькина А.В., д.м.н., профессор кафедры госпитальной хирургии медицинского факультета им. Т.З. Биктимирова ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск;

Рубцов О.Ю., д.м.н., профессор кафедры факультетской хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», г. Саранск.