

На правах рукописи



Евсеев Анатолий Константинович

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ И КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ
ГОМЕОСТАЗА**

05.17.03 – технология электрохимических процессов и защита от коррозии

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук**

Москва – 2015

Работа выполнена на кафедре технологии электрохимических процессов ФГБОУ ВПО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» и в лаборатории клеточных и физико-химических медицинских технологий ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ».

Научный консультант: доктор химических наук, профессор
Гольдин Марк Михайлович
главный научный сотрудник технопарка «Экохимбизнес-2000+» ФГБОУ ВПО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Вольфович Юрий Миронович
главный научный сотрудник лаборатории процессов в химических источниках тока ФГБУН Института физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН

доктор химических наук, профессор
Корниенко Василий Леонтьевич
главный научный сотрудник лаборатории плазмохимии и проблем материаловедения ФГБУН Института химии и химической технологии Сибирского отделения РАН

доктор химических наук, профессор
Базанов Михаил Иванович
заведующий кафедрой аналитической химии ФГБОУ ВПО "Ивановский государственный химико-технологический университет"

Ведущая организация: ФГБУН Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН

Защита состоится «16» апреля 2015 г. в ____ часов в конференц-зале (ауд. 443) на заседании диссертационного совета Д 212.204.06 в Российском химико-технологическом университете имени Д.И. Менделеева по адресу: 125047, г. Москва, Миусская пл., 9.

С диссертацией можно ознакомиться в Научно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 212.204.06



В.Т. Новиков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Нарушения окислительно-восстановительной системы гомеостаза (например, гипоксические состояния, ишемия органов) являются в настоящее время весьма распространенными при заболеваниях различной этиологии, включая нарушения эндогенного характера, острые хирургические вмешательства, трансплантацию органов. Своевременная коррекция лечения указанных нарушений требует эффективных диагностических и прогностических методов исследования пациентов. Поэтому особое значение в настоящее время приобретает разработка новых неинвазивных экспресс методов диагностики осложнений при лечении пациентов с гипоксическими состояниями после операции трансплантации органов, так как прогнозирование дисфункции трансплантированного органа должно своевременно сигнализировать клиницистам о необходимости коррекции тактики лечения пациента и, тем самым, избежать осложнений. Особенно важно достоверно прогнозировать и диагностировать криз отторжения органа с помощью неинвазивного метода. Однако имеющиеся в настоящее время методы диагностики криза являются инвазивными, то есть весьма травматичными, поскольку основаны на биопсии органа с последующим гистохимическим исследованием ткани. Кроме того, отсутствуют методы, способные прогнозировать криз отторжения.

Важной проблемой остается до сих пор создание содержащих доноры «активного» кислорода детоксицирующих растворов, не разрушающих ткани, для лечения таких социально значимых заболеваний, как эндогенные токсикозы и острые экзогенные отравления. Эти заболевания приводят к гипоксическим состояниям, однако существующий в настоящее время электрохимически синтезированный «окисляющий» раствор гипохлорита натрия, как известно, помимо лечебного детоксицирующего эффекта обладает рядом побочных действий. Основными типичными осложнениями от применения гипохлоритного раствора являются разрушение сосудистой ткани в месте контакта катетера для его введения в вену и возникновение выраженного гемолиза эритроцитов (содержание свободного гемоглобина в крови достигает 10% при норме 0,02%).

К социально значимым заболеваниям следует отнести также массивные кровотечения, возникающие при травме внутренних органов. Внутрисосудистая остановка кровотечений (гемостаз) осуществляется в настоящее время, как правило, с помощью локального нагревания сосудистой стенки (например, лазером), либо механического сжатия сосуда (клипирование), однако менее травматичным является гемостаз без нагревания («холодный» гемостаз), например, с помощью анодной коагуляции крови. Однако, этот метод не получил широкого применения из-за

использования в качестве рабочего электрода ангиографических проводников с дорогостоящими платиновыми наконечниками.

Электрохимические технологии, обладая рядом таких существенных преимуществ, как селективность, гибкость, простота и относительно невысокая стоимость, уже продемонстрировали широкие возможности для использования их в различных областях медицины. В настоящее время успешно внедрены в клиническую практику различные электрохимические сенсоры для диагностики параметров жизнедеятельности организма, используется электрохимически управляемая гемосорбция для лечения острых отравлений и эндотоксикозов, развивается метод электрохимической коагуляции для лечения аневризм. Имеется множество примеров использования электрохимических методов в медицине для синтеза лекарственных препаратов, с помощью электролитических покрытий придают биосовместимые свойства различным электропроводным материалам.

Большое количество работ посвящено разработке методов выявления, контроля и количественной оценки нарушений окислительно-восстановительной системы организма, которые основаны на измерениях так называемого «редокс потенциала» (РП), то есть потенциала платинового электрода в тестируемой биологической среде при разомкнутой цепи (ПРЦ). Ранее в течение многих лет предпринимались многочисленные попытки связать величину РП с различными биохимическими показателями крови. Однако отсутствие корректной воспроизводимой методики измерений потенциала платинового электрода при разомкнутой цепи в плазме крови не дало возможности использовать полученные результаты для создания диагностического метода.

Известно, что величины редокс потенциалов биологической среды характеризуют состояние равновесия про- и антиоксидантов в организме. Поэтому представляется важной задача сопоставления величин редокс потенциалов биологической жидкости и уровня ее антиоксидантной активности. Особого внимания в рамках данной проблемы заслуживают вольтамперометрические методы определения антиоксидантов благодаря их простоте, селективности и экспрессности.

Ценность информации, полученной с помощью указанных выше методов, состоит в том, что уровень детектируемых биологически активных веществ, как правило, отражает работу функциональных систем организма и может свидетельствовать о наличии неблагоприятных процессов, протекающих в организме. Это особенно важно для выявления различных патологических состояний на ранней стадии их развития. Указанное выше направление, с нашей точки зрения, является также перспективным для разработки новых диагностических технологий, основанных на измерении потенциалов пораженных твердых тканей и сопоставлении

их с величинами потенциалов здоровых участков.

Основываясь на модели Б. Норденстрема, рассматривающей организм в виде суммы закрытых электрических цепей, а также учитывая развитие в работах М.М. Гольдина теоретические и экспериментальные обоснования электрохимических механизмов взаимодействия форменных элементов крови с электропроводящими материалами, можно прийти к выводу о возможности использования для лечения не только отрицательно заряженных углей-гемосорбентов, но также и положительно заряженных материалов для электрохимического эндоваскулярного гемостаза. Работоспособность этих представлений подтверждается также исследованиями П. Сойера.

Часть настоящей работы выполнена в соответствии с Федеральной целевой программой «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» Министерства образования и науки Российской Федерации (Госконтракт №16.513.11.3022 от 08.04.2011).

Цель работы – разработка диагностических и прогностических электрохимических технологий для исследования состояния пациентов с гипоксическими состояниями с помощью мониторинга ПРЦ платинового электрода и уровня антиоксидантов в плазме крови, а также электрохимических методов коррекции гомеостаза, включая электросинтез окисляющих растворов и электрохимическую «холодную» остановку внутрисосудистых кровотечений.

Достижение поставленной цели потребовало решения следующих задач:

1. Проанализировать электрохимическое поведение платинового электрода в бестоковом режиме в водных растворах и биологических средах, содержащих растворенный кислород и другие окислители, восстановители, антиоксиданты природного происхождения для создания метода предобработки платинового электрода.

2. Разработать электрохимические экспресс методы определения антиоксидантной активности жидких сред организма для контроля состояния пациентов.

3. Исследовать влияние окислительно-восстановительных свойств тестируемых биологических жидкостей на величину и направление отклика потенциала платинового электрода в плазме крови пациентов с гипоксическими состояниями различной этиологии.

4. Выявить связи величины и знака ПРЦ платинового электрода в плазме крови с состоянием окислительно-восстановительной системы гомеостаза для возможности прогнозирования состояния окислительного стресса либо торможения

окислительных процессов в организме тестируемого пациента, разработке диагностических и прогностических электрохимических критериев при лечении пациентов с гипоксическими состояниями при трансплантации органов.

5. Разработать метод электросинтеза окисляющих растворов, содержащих доноры «активного» кислорода, обладающих бактерицидным действием для коррекции гипоксических состояний пациентов с экзо- и эндо-токсиколами и исследовать кинетику окисления некоторых токсикантов.

6. Исследовать влияние электрохимических параметров на образование сгустка в крови и плазме крови на электродах из нержавеющей стали, покрытых благородными металлами, для разработки метода «холодного» электрохимического гемостаза.

Научная новизна

В настоящей работе развиты представления об использовании единой электрохимической платформы для разработки методов диагностики и коррекции лечения при различных гомеостатических нарушениях, что обусловлено электрохимической природой протекания большинства важнейших гомеостатических процессов. С помощью электрохимической модели взаимодействия чужеродных материалов с биологическими средами организма была выявлена взаимосвязь тяжести состояния пациента с величиной так называемого РП плазмы или сыворотки крови при ежедневном мониторинге.

Измерения величин РП плазмы у 63 практически здоровых добровольцев был получен статистически значимый диапазон потенциалов, соответствующих норме у здоровых людей, диапазон составил от -60 до -20 мВ.

Впервые было установлено, что изменение величины ПРЦ в плазме или сыворотке крови пациента более чем на 25 мВ за время 24–36 часов свидетельствует о появлении осложнений. Важно, что указанные осложнения могут быть весьма тяжелыми, это многократно показано на примерах лечения пациентов с трансплантированными печенью, почкой и легкими. Действительно, у пациентов из указанных групп одновременно с появлением указанного сдвига величины ПРЦ или на несколько дней позже на основании клинических данных были зафиксированы такие осложнения, как дисфункции трансплантированного органа, воспалительные процессы различной этиологии, состояние окислительного стресса и др.

Весьма важные результаты были получены при измерениях величин ПРЦ в процессе мониторинга ПРЦ плазмы крови пациентов с трансплантированной почкой в послеоперационном периоде. Анализ полученных данных позволил выявить величину порогового потенциала платинового электрода при разомкнутой цепи на пятые сутки после операции трансплантации органа. Это позволило с весьма высокой

вероятностью ($p \leq 0,05$) прогнозировать развитие указанных осложнений и, таким образом, относить пациента к группе риска.

Исследование влияния различных окислителей и восстановителей, в том числе антиоксидантов природного происхождения, на величину ПРЦ платинового электрода в плазме крови и водных растворах 0,9% NaCl, позволили экспериментально подтвердить, что природа сдвигов потенциала во времени и абсолютные величины ПРЦ платинового электрода в плазме и сыворотке крови отражают состояние баланса про- и антиоксидантных систем организма.

Статистический анализ массива данных, полученных при мониторинге величин ПРЦ платинового электрода в плазме крови позволил выделить области величин потенциалов, характерные для различных нарушений гомеостаза (острые церебральные состояния, послеоперационный период лечения пациентов с трансплантированными органами).

Полученные в настоящей работе данные об отклонениях величин ПРЦ платинового электрода в плазме крови от диапазона, характерного для здоровых людей, и сопоставление их с клиническими данными позволило сделать вывод о том, что величины ПРЦ вне диапазона, характерного для здоровых людей, соответствуют нарушениям работы окислительно-восстановительной системы гомеостаза. Сдвиги величин потенциала в положительную область соответствуют преобладанию в организме окислительных процессов и сигнализируют о вероятности возникновения у пациента состояния окислительного стресса, сдвиги величин ПРЦ в отрицательную область соответствуют торможению окислительных процессов, что может замедлять протекание процессов удаления шлаков из организма.

Впервые обнаружено влияние нозологических форм патологических состояний пациента на вид зависимости потенциала платинового электрода в плазме или сыворотке крови от времени. Оказалось, что наличие волнообразных участков на кривой потенциал-время соответствует наличию у пациента воспалительных состояний различной природы (например, пневмония, септические состояния, пиелонефрит - неспецифический воспалительный процесс с преимущественным поражением канальцевой системы почки, преимущественно бактериальной этиологии). Возникновение периодических колебаний потенциала при разомкнутой цепи во времени, по-видимому, связано с активацией нейтрофилов при воспалительных процессах. Продуцирование нейтрофилами активных форм кислорода являться причиной кратковременного периодического возрастания потенциала электрода, которое затем компенсируется антиоксидантной системой, что приводит потенциал к первоначальному значению.

Совместный мониторинг ПРЦ и антиоксидантной активности впервые

позволил рассчитать долю окислительных процессов, имеющих место в тестируемой среде.

Анализ электрохимической модели взаимодействия заряженной металлической поверхности с плазмой крови и тканями позволил предсказать протекание деструктивных процессов и электрохимического активирования образования внутрисосудистого сгустка, что использовано для создания метода «холодного» эндоваскулярного гемостаза.

Практическая значимость

Разработка электрохимических методов диагностики заболевания дает возможность коррекции тактики лечения у пациентов с трансплантированными органами (печенью, почкой и легкими), пациентов с септическими состояниями, а также пациентов с острой церебральной патологией. Преимущества разработанного метода состоят в неинвазивности, экспрессности и простоте определения. Разработаны диагностические и прогностические критерии оценки тяжести состояния, вероятности возникновения осложнений и исхода заболевания пациентов с трансплантированными органами. Обнаружены явления колебаний потенциала во времени, что использовано для разработки метода диагностики воспалительных состояний. Разработаны электрохимические критерии оценки эффективности проведения активных лечебных мероприятий (например, процедур гипербарической оксигенации, пульс-терапии, гемодиализа и других методов эфферентной терапии).

Разработаны методы электрохимического определения антиоксидантной активности биологических сред с использованием электродов электрохимически модифицированных гексацианоферратами переходных металлов, а также с использованием п-бензохинона в качестве медиатора. Сопоставление данных измерений антиоксидантной активности плазмы крови, полученных с помощью разработанных методов, с данными, полученными стандартным спектрофотометрическим методом, показало высокую корреляцию (не менее 0,84).

Разработан способ электросинтеза лечебных растворов, содержащих активные формы кислорода, на базе электроокисления разбавленных сульфатных растворов с содержанием хлорида в электролите не более 1,5 мМ. Доказана бактерицидная активность по отношению к грамотрицательным бактериям при сохранении высокой гемосовместимости синтезированных растворов.

Разработан и испытан на животных метод остановки кровотечений с помощью «холодной» электрохимической коагуляции при использовании ангиографического проводника-электрода с электролитическим родиевым покрытием, что позволило избежать анодного растворения подложки из нержавеющей стали.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Данные анализа электрохимического поведения платинового электрода в водных растворах электролитов с целью разработки методики стандартизации состояния поверхности платинового электрода для измерения величины ПРЦ в плазме и сыворотке крови.

2. Результаты исследования влияния окислителей, восстановителей, в том числе антиоксидантов, на величину ПРЦ платинового электрода в биологических средах.

3. Результаты математического анализа зависимости ПРЦ от времени для диагностики паталогических состояний.

4. Установление статистически достоверного диапазона величин ПРЦ платинового электрода в сыворотке крови практически здоровых добровольцев и пациентов с черепно-мозговой травмой и трансплантированными органами.

5. Диагностические и прогностические критерии состояния и вероятности возникновения осложнений пациентов с трансплантированными органами на основе данных мониторинга ПРЦ в процессе лечения.

6. Результаты исследования взаимосвязи величин и знака изменения ПРЦ с состоянием окислительно-восстановительной система гомеостаза.

7. Электрохимические методы определения антиоксидантной активности биологических сред с помощью ЦВА на стеклоуглеродном электроде, модифицированном гексацианоферратом кобальта, и на платиновом электроде с участием медиатора.

8. Технологические параметры разработанного процесса электросинтеза раствора, содержащего доноры кислорода, и результаты исследования его биологических свойств.

9. Данные по разработанному электрохимическому методу эндоваскулярного гемостаза.

Апробация работы

Материалы работы докладывались VII Европейском симпозиуме по химической технологии (2005); VIII и IX Международных Фрумкинских симпозиумах (2006, 2010); 14 Конференции Московского городского общества гемафереза (2006); II, V–IX Международных конгрессах молодых ученых по химии и химической технологии (2006, 2009–2013); 212, 216, 219, 220, 223, 225 Съездах электрохимического общества США (2007, 2009, 2011, 2013, 2014); 61 и 65 Съездах Международного электрохимического общества (2010, 2014); XIII Съезде федерации анестезиологов и реаниматологов (2012); VI Всероссийском съезде трансплантологов (2012) и других.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 25 статей, в том числе 13 статей в российских рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК, и 3 статьи в международных рецензируемых журналах, включенных в базы данных Scopus и Web of Science. Опубликовано 32 тезиса докладов. Получено 2 патента Российской Федерации.

Личный вклад автора

Все представленные данные получены автором лично или при его участии и непосредственном руководстве. Автору принадлежит определяющая роль в выборе направления исследований, в выборе и проверке экспериментальных подходов, использованных в работе, в проведении экспериментальных исследований, а также в обсуждении и обобщении полученных результатов, подготовке и оформлении публикаций.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 279 страницах и состоит из введения, обзора литературы, методик исследования, результатов эксперимента и их обсуждения, представленных 4 главами, в которых также кратко проанализированы литературные данные, посвященные объектам исследования, приложения. Материал иллюстрирован 130 рисунками и 42 таблицами. Список литературы включает 370 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** освещается актуальность проблемы, обосновывается выбор объектов исследования, формулируется цель работы.

Глава 1 посвящена анализу развития и современного состояния медицинских электрохимических приложений, в том числе методам измерения редокс потенциала в биологических средах, связи измеряемой величины потенциала с гомеостатическими параметрами при нормальных и различных патологических состояниях организма, корреляции величин ПРЦ с биохимическими показателями крови, выявлению трудностей измерений величин ПРЦ в водных и биологических средах, анализу электрохимического поведения платинового электрода при разомкнутой цепи в водных и биологических средах, методам определения антиоксидантной активности, проблемам создания лечебных окисляющих растворов, содержащих доноры активного кислорода, путем электросинтеза, а также методам электрохимическим методам лечения острых кровотечений с помощью коагуляции крови.

В **главе 2** «Методики исследования» описаны экспериментальные установки, электрохимические, спектрофотометрические и биологические методы исследования, а также методы электрохимического синтеза, использованные в работе.

Электрохимические исследования проводили с применением потенциостатов IPC-Pro L, IPC-Pro MF, IPC-Compact (НПФ «Вольта», Россия), во всех исследованиях в качестве электрода сравнения использовали насыщенный хлорсеребряный электрод. Электросинтез окисляющих растворов, содержащих дозоры «активного» кислорода, и осаждение покрытий благородных металлов (золото, рутений, палладий, родий) осуществляли с применением стабилизированного источника питания НУ3005-2 (MASTECH, Гонконг).

Анализ концентрации окислителей в синтезированных растворах, определение окисляющей активности синтезированных растворов по отношению к лекарственным препаратам (хлорпротиксену) и определение степени гемолиза эритроцитов при взаимодействии окисляющих растворов с цельной кровью проводили на спектрофотометре DU 800 (Beckman Coulter, США).

Морфофункциональный анализ эритроцитов проводили с помощью метода, основанного на окрашивании клеток витальными (прижизненными) флуорохромными красителями с последующим анализом во флуоресцентном микроскопе Eclipse 80i (Nikon, Япония).

В качестве биологических сред для исследований *in vitro* использовали цельную кровь, плазму крови и сыворотку крови практически здоровых добровольцев и пациентов с различными патологическими состояниями.

Эксперименты с использованием животных *in vivo* проведены с соблюдением принципов гуманного обращения с животными.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программного обеспечения Statistika 6.0 (StatSoft, США). Операционные характеристики метода (чувствительность (Se), специфичность (Sp) и точность (Ac)) измерения ПРЦ платинового электрода в биологических средах определяли с помощью матрицы решений (табл. 1) по уравнениям 1-3.

Таблица 1. Общий вид матрицы решений для расчета характеристик метода

		Болезнь	
		присутствует	отсутствует
Результат теста	положительный	a (истинно положительные)	b (ложноположительные)
	отрицательный	c (ложноотрицательные)	d (истинно отрицательные)

$$Se = \frac{a}{a+c} \quad (1)$$

$$Sp = \frac{d}{b+d} \quad (2)$$

$$Ac = \frac{a+d}{a+b+c+d} \quad (3)$$

В главе 3 «Измерение потенциала при разомкнутой цепи в биологических средах» на основе анализа электрохимического поведения платинового электрода в водных растворах при разомкнутой цепи предложена стадия предварительной комбинированной обработки этого электрода непосредственно перед измерением потенциала в анализируемой среде. Разработанный метод предобработки платинового электрода обеспечил заданное значение ПРЦ в водном растворе 0,1 М Na₂SO₄ перед проведением измерений в биологических средах с помощью сочетания химического взаимодействия поверхности платины с восстановителем в виде водного раствора 0,1 М Na₂SO₃ и электрохимической обработки в режиме циклической развертки потенциала. Использование указанной предобработки позволило снизить погрешность измерений ПРЦ до величины, не превышающей 3% как в водных, так и биологических средах. Подчеркнем, что, в отличие от практикуемой до настоящего времени фиксации дискретной величины измеряемого потенциала через некоторый интервал времени, в настоящей работе регистрировалась зависимость изменения потенциала платинового электрода от времени измерения, поскольку анализ данной зависимости позволяет получить дополнительную информацию об исследуемых процессах, протекающих в биологических средах.

Обнаружено (рис. 1), что при добавлении антиоксидантов к физиологическому раствору с добавками белков (кривая 2) характер зависимости потенциала при разомкнутой цепи от времени отличается от физиологического раствора (кривая 1), но близок к зависимостям, полученными в реальных биологических средах (плазма крови, кривая 3). Таким образом, можно заключить, что основным потенциалопределяющим фактом в биологических средах является соотношение окислителей и восстановителей (про- и антиоксидантов) в системе. При этом зависимость потенциала от времени может быть описана простейшим логарифмическим уравнением (рис. 2).

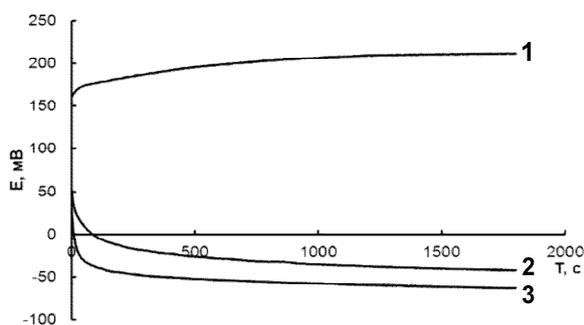


Рис. 1. Зависимость ПРЦ от времени в растворах: 1 – 0,9% NaCl + 10% альбумин, 2 – 0,9% NaCl + 10% альбумин + 3 мМ аскорбиновой кислоты, 3 – сыворотка крови.

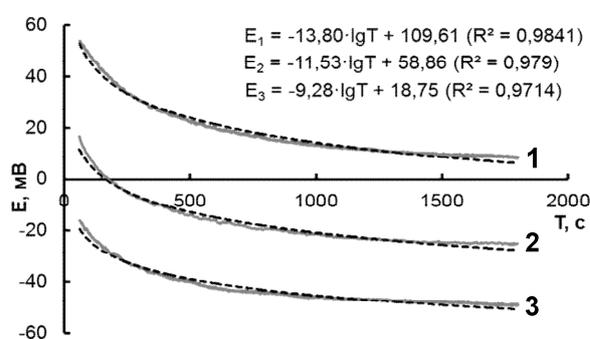


Рис. 2. Примеры экспериментальных (сплошная) и расчетных (пунктир) зависимостей ПРЦ от времени в сыворотке крови.

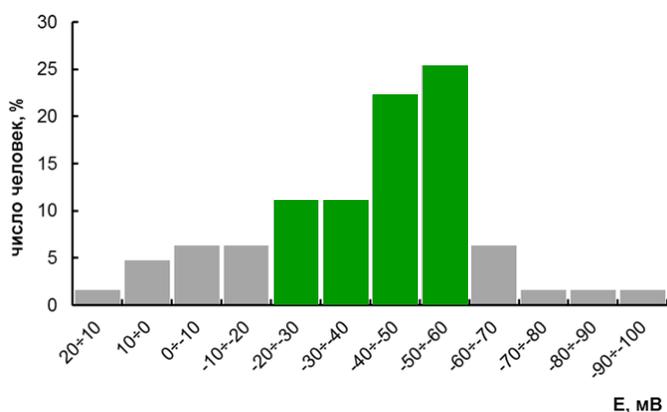


Рис. 3. Распределение величины ПРЦ платинового электрода в сыворотке крови практически здоровых людей (n=63).

Статистический анализ массива данных измерения потенциала при разомкнутой цепи у практически здоровых людей (рис. 3) позволил установить, что статистически значимый диапазон этих величин составляет от -60 до -20 мВ, причем группа крови, резус фактор и пол пациента не оказывают существенного влияния на границы указанного диапазона.

Как известно, различные заболевания приводят к нарушениям функционирования определенных систем организма, весьма часто при этом имеют место нарушения окислительно-восстановительной системы. Эти нарушения приводят либо к ишемическим состояниям (смещение равновесия в сторону преобладания антиоксидантов), либо к состоянию так называемого окислительного стресса (преобладание прооксидантов в организме). Поскольку величина «редокс потенциала» является интегральным отражением указанной картины, любое изменение окислительно-восстановительного равновесия должно отразиться на изменении ПРЦ. Структура и объем исследования представлен в таблице 2.

Таблица 2. Структура и объем исследования

Группа	Количество обследованных пациентов	Количество проведенных анализов
Пациенты с острой церебральной патологией	16 (12 мужчин, 4 женщины)	116
Пациенты с острыми септическими состояниями	23 (16 мужчин, 7 женщин)	70
Пациенты с трансплантированной печенью	64 (40 мужчин, 24 женщины)	615
Пациенты с трансплантированной почкой	59 (42 мужчины, 17 женщин)	967
Пациенты с трансплантированными легкими	7 (4 мужчины, 3 женщины)	143

Выбор категории пациентов с острой церебральной патологией

(нейротравмами) связан с предположением о том, что нарушение тканевого обмена кислорода с последующей его корректировкой путем проведения гипербарической оксигенации, должно отразиться на величине ПРЦ. Действительно, было обнаружено различие величин ПРЦ в сыворотке крови до и после проведения сеанса гипербарической оксигенации (рис. 4). Оказалось, что после сеанса гипербарической оксигенации величина ПРЦ, как правило, смещается в область потенциалов, характерную для практически здоровых людей. Этот эффект указывает на выравнивание баланса между про- и антиоксидантами крови.

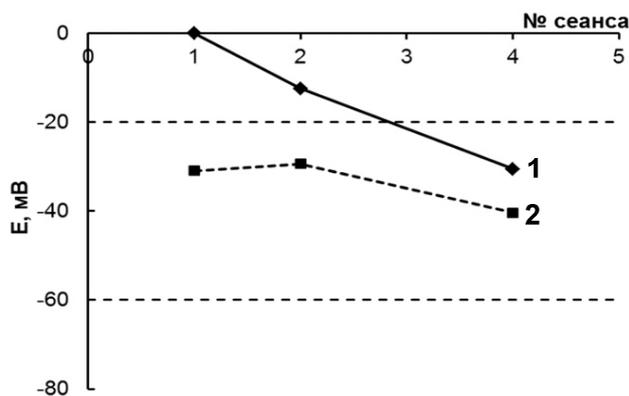


Рис. 4. Динамика изменения ПРЦ сыворотки крови пациента Г. по мере проведения лечения.

С одной стороны можно предположить, что при гипербарической оксигенации повышенное содержание активных форм кислорода активизирует выработку организмом антиоксидантов. С той же вероятностью наблюдаемое явление может быть связано с ускорением процесса окисления недоокисленных продуктов обмена и, как следствие, со

снижением уровня эндогенной интоксикации организма.

Оба указанных предположения были подтверждены сопоставлением величин ПРЦ, изменений антиоксидантной активности сыворотки крови и уровня средних молекул (маркером эндогенной интоксикации организма).

Острые септические состояния, как правило, приводят к развитию гипоксических состояний и дисфункции органов и систем вплоть до полиорганной недостаточности. Поэтому можно предположить, что септические состояния также будут сопровождаться нарушениями баланса про- и антиоксидантов в организме.

Действительно, исследование пациентов с септическими состояниями показало, что у данной группы пациентов отмечаются более положительные величины средних значений ПРЦ (от -10,1 до +30,5 мВ) по сравнению с группой практически здоровых людей. Кроме этого, наблюдались серьезные различия характера зависимости потенциала от времени по сравнению с группой практически здоровых. Это проявлялось как в отклонении от логарифмического характера указанной зависимости, так и в появлении на измеряемой кривой волнообразных участков (рис. 5). Обнаружено также, что указанные явления пропадают по мере лечения пациента, что можно связать с улучшением состояния пациента.

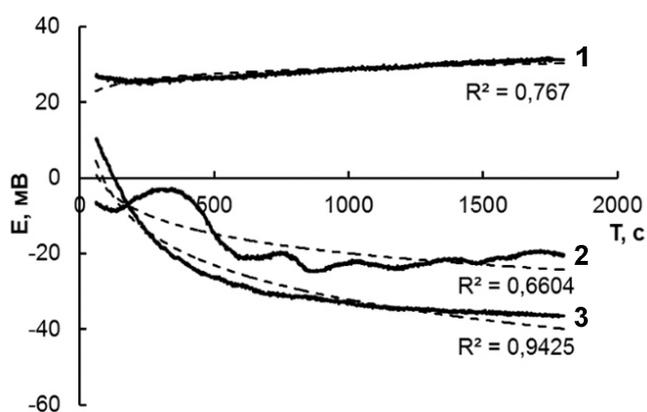


Рис. 5. Зависимость ПРЦ в сыворотке крови пациента С. от времени, сутки: 1 – 1, 2 – 15, 3 – 24. R^2 – коэф. детерминации.

потенциала электрода, которое затем компенсируется антиоксидантной системой.

Особое значение имеет исследование ПРЦ плазмы крови у пациентов после трансплантации органов. Отличительной особенностью групп пациентов после трансплантации органов является постоянное использование иммуносупрессивных препаратов для предотвращения отторжения трансплантированных органов. При исследовании влияния на величину ПРЦ плазмы крови наиболее часто применяемых иммуносупрессоров (циклоsporин, мофетил микофенолат) было обнаружено смещение величин ПРЦ в положительную область потенциалов при добавлении к плазме указанных препаратов. Возможно, данное явление может быть одной из причин сдвига диапазона величин ПРЦ в положительную область значений потенциала относительно величин ПРЦ у практически здоровых людей для групп пациентов после трансплантации печени (от -14,6 до +32,8 мВ) и почки (от -16,7 до +32,3 мВ).

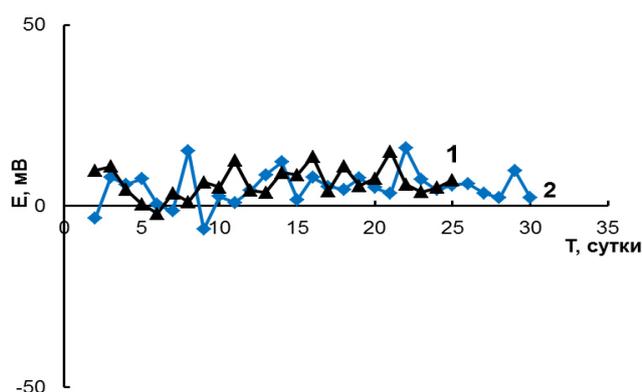


Рис. 6. Мониторинг ПРЦ в плазме крови пациента Б. (1) после трансплантации почки и пациента К. (2) после трансплантации печени. Послеоперационный период протекал без осложнений.

Чтобы найти объяснение описанному выше явлению, было сделано предположение, что данное явление связано с активацией нейтрофилов при воспалительных процессах. Продуцирование нейтрофилами во время кислородно-метаболического взрыва активных форм кислорода (O_2^- , HO^* , H_2O_2 , $OSCl^*$, NO , $ONOO^-$ и др.) является, по-видимому, причиной возрастания

Мониторинг ПРЦ плазмы крови указанных групп пациентов в раннем (до 30–35 дней) послеоперационном периоде показал, что если смещение величины ПРЦ в сутки не превышает 25 мВ, у этих групп пациентов не отмечалось осложнений (рис. 6). В то же время при наличии осложнений сдвиг величины ПРЦ за сутки или несколько суток превышает указанную величину 25 мВ (рис. 7), а в ряде случаев величина смещения может достигать 70–80 мВ.

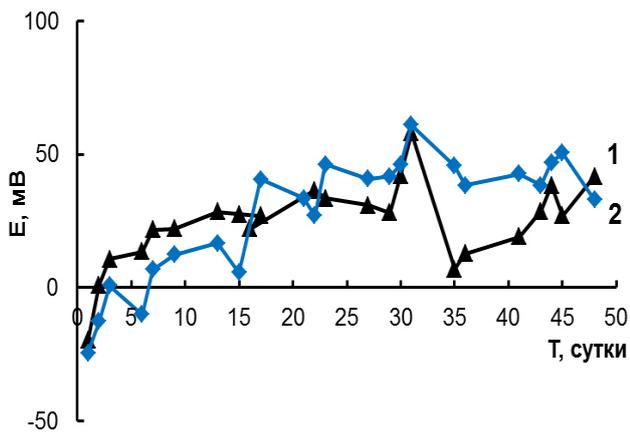


Рис. 7. Послеоперационный мониторинг ПРЦ в плазме крови пациента Т. (1) после трансплантации почки и пациента Ш. (2) после трансплантации печени. Послеоперационный период протекал с осложнениями.

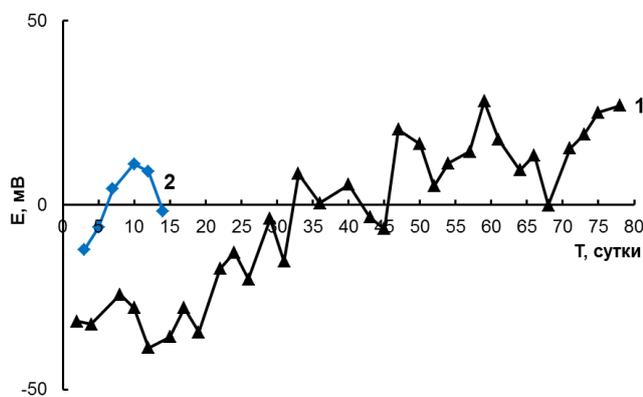


Рис. 8. Послеоперационный мониторинг ПРЦ в плазме крови при отсутствии (1, пациент Б.) и наличии осложнений (2, пациент А.) после двухсторонней трансплантации легкого.

суммарный сдвиг потенциала также значительно превышает 25 мВ.

Весьма важно, что в ряде случаев сдвиг потенциала на величину более 25 мВ был отмечен за несколько дней до подтверждения наличия осложнений на основе клинико-лабораторных данных. Таким образом, измерение ПРЦ может служить не только диагностическим, но и прогностическим критерием оценки состояния пациента.

Анализ данных величин ПРЦ пациентов с различными патологическими состояниями показал, что области величин ПРЦ плазмы крови существенно отличаются от области потенциалов, характерных для группы здоровых людей (рис. 9). Можно предположить, что величина сдвига ПРЦ является отражением степени окислительного стресса, однако стоит принимать во внимание влияние препаратов, которыми производится лечение пациентов.

Иная картина наблюдалась при мониторинге пациентов с двухсторонней пересадкой легких (рис. 8). Установлено, что величины ПРЦ в плазме крови данной категории пациентов в раннем послеоперационном периоде смещены в область более отрицательных значений по сравнению с величинами ПРЦ у пациентов с трансплантированной почкой и печенью. По мере проведения лечения величина ПРЦ смещается в область более положительных значений потенциала (рис. 8, кривая 1), соответствующую области значений ПРЦ пациентов с трансплантированной почкой и печенью. При наличии осложнений у пациентов с трансплантированными легкими, подобно пациентам с трансплантированными почкой и печенью, наблюдается резкое смещение ПРЦ в область более положительных значений потенциала (рис. 8, кривая 2),

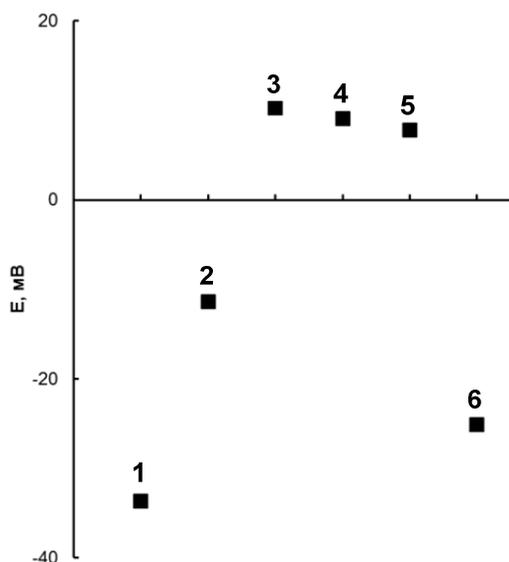


Рис. 9. Зависимость средней величины ПРЦ сыворотки крови от патологии.

1 – практически здоровые люди, 2 – пациенты с острой церебральной патологией, 3 – пациенты с септическими состояниями, 4 – пациенты с трансплантированной печенью, 5 – пациенты с трансплантированной почкой, 6 – пациенты с трансплантированными легкими.

Большой массив полученных данных (табл. 2) позволил определить операционные характеристики диагностического метода измерения ПРЦ в биологических средах – чувствительность, специфичность и точность с помощью табл. 3, которые составили 84,6%, 69,8% и 84,1% соответственно.

Таблица 3. Данные по результатам анализа ПРЦ

		Болезнь	
		присутствует	отсутствует
Результат теста	положительный	1616	19
	отрицательный	295	44

Описанные выше примеры применения метода измерения ПРЦ в биологических средах в клинической практике показывают широкие возможности данного метода. Кроме того, помимо исследования биологических сред (плазма крови, сыворотка крови) данный метод может быть востребованным и при определении ПРЦ в тканях, поскольку известно, что потенциал здоровой ткани отличается от потенциала ткани при ряде патологических состояний (например, опухоли, некрозы, язвы и др.).

Учитывая эти соображения, было сделано предположение, что метод мониторинга ПРЦ тестируемой точке ткани можно использовать для оценки состояния тканей при повреждениях стенки желудочно-кишечного тракта. Для измерений ПРЦ стенки был создан двухэлектродный датчик, содержащий платиновый и серебряный микроэлектроды диаметром 200 мкм, встроенные в гастроскоп. Электроды с помощью гастроскопа вводились в тестируемую зону и прижимались под визуальным оптическим контролем к исследуемому участку стенки пищевода или желудка.

Было обнаружено, что пораженные участки (язвы, ожоги и др.) имеют

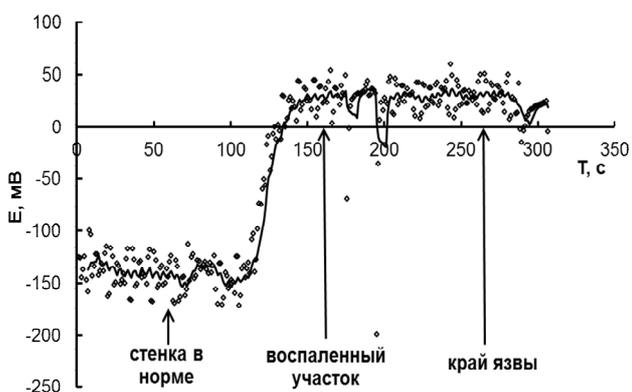


Рис. 10. Мониторинг ПРЦ стенки желудка пациент В. с рубцами и язвами стенки желудка.

значительно более положительные значения потенциала по сравнению со стенкой в норме (рис. 10). Мониторинг ПРЦ стенки желудочно-кишечного тракта показал, что по мере проведения лечения потенциал смещается в область потенциалов, соответствующей здоровым участкам стенки.

Таким образом, мониторинг величин ПРЦ в биологических средах и тканях может быть использован в качестве дополнительного критерия для диагностики и прогнозирования состояния пациента.

Глава 4 «Измерение антиоксидантной активности биологических сред» посвящена разработке электрохимических методов определения антиоксидантной активности биологических сред. Разработан как метод прямого определения с использованием электрохимического сенсора, так и метод ЦВА на платиновом электроде с использованием медиатора.

В качестве сенсоров были использованы электрохимически синтезированные пленки гексацианоферратов кобальта (CoHCF) и никеля (NiHCF), нанесенные на поверхность стеклоглерода. В качестве фонового раствора электролита, вместо наиболее часто применяемого KCl , использовали водные растворы $0,15 \text{ M NaCl}$, поскольку сенсор должен быть использован для исследований в биологических средах.

Электрохимический синтез осуществляли в потенциодинамическом режиме в диапазоне потенциалов от -400 до $+1100 \text{ мВ}$ при скорости развертки потенциала 25 мВ/с (рис. 11).

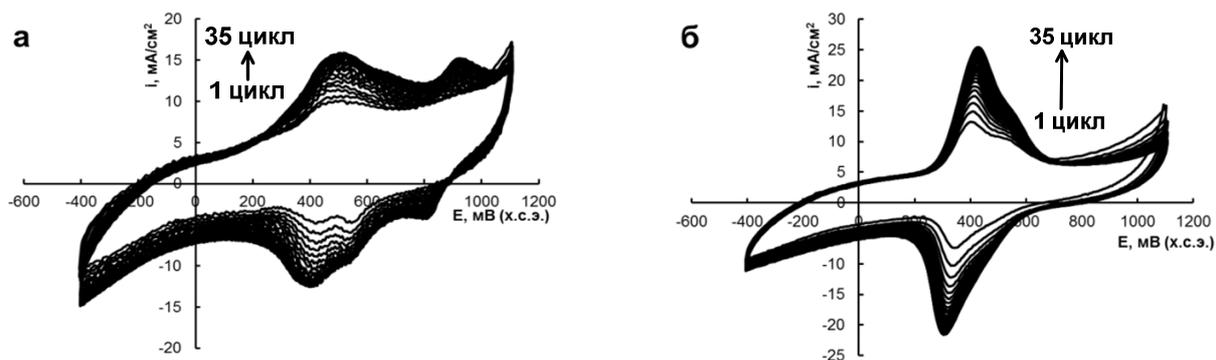


Рис. 11. ЦВА электрохимического синтеза CoHCF (а) и NiHCF (б).

Стехиометрия используемых реакций отвечала следующим уравнениям (на примере CoHCF):

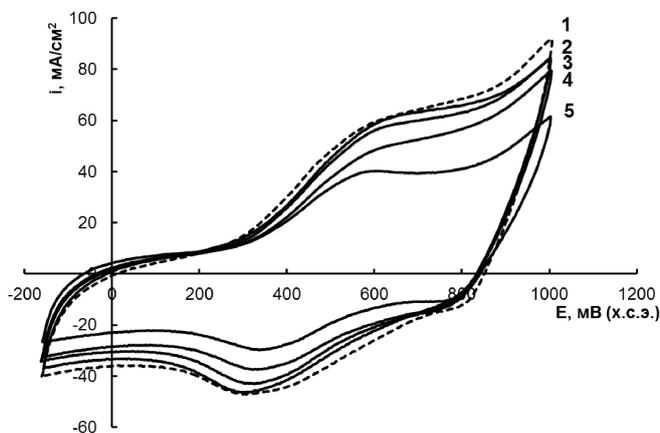
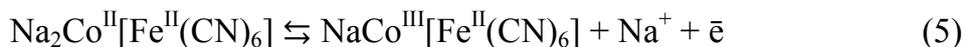


Рис. 12. ЦВА сенсора на основе CoHCF в модельных растворах антиоксидантов с концентрацией, моль/л: 1 – $1,83 \cdot 10^{-6}$; 2 – $1,83 \cdot 10^{-5}$; 3 – $1,83 \cdot 10^{-4}$; 4 – $1,83 \cdot 10^{-3}$. Пунктир – фоновый раствор 0,15 М NaCl.

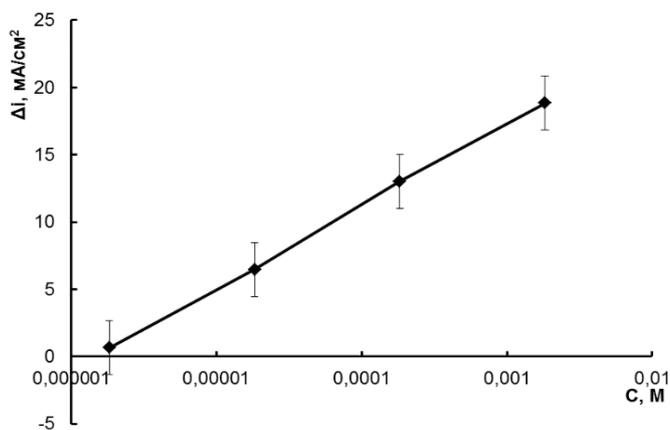


Рис. 13. Зависимость ΔI на сенсоре на основе CoHCF от концентрации антиоксидантов.

При исследовании поведения сенсора на основе CoHCF в водных растворах антиоксидантов было отмечено снижение плотности тока при увеличении концентрации антиоксидантов (рис. 12). По-видимому, обнаруженное снижение плотности тока связано с обратимым переходом электроактивных комплексов в неактивное состояние при взаимодействии с антиоксидантами (реакции 5 и 6). Было обнаружено, что потенциодинамическая обработка электрода в водном растворе 0,15 М NaCl возвращала электрод в первоначальное состояние.

Для построения калибровочной зависимости была использована разница между величиной тока в фоновом и тестируемом растворе (ΔI). Как видно из данных, представленных на рис 13, была получена линейная

зависимость во всем диапазоне исследуемых концентраций антиоксидантов.

При измерении антиоксидантной активности (то есть в данном случае суммарной концентрации антиоксидантов в растворе) как в водных растворах, так и в биологической среде (плазма крови) снижение чувствительности сенсора не превышает 5%. Таким образом, электрод, модифицированный CoHCF, показал свою эффективность в качестве сенсора для определения концентрации антиоксидантов в биологических средах.

Анализ результатов измерений антиоксидантной активности плазмы крови

практически здоровых людей ($n = 15$) показал, что большинство значений (не менее 80%) находятся в диапазоне концентраций $6 \cdot 10^{-6} \div 1 \cdot 10^{-4}$ М, что соответствует физиологическим нормам содержания аскорбиновой кислоты.

Однако разработанный метод обладал существенным недостатком, связанным со сложностью процесса изготовления модифицированного электрода. Поэтому в качестве альтернативы методу прямого определения антиоксидантной активности с помощью сенсора на основе СоНСФ был предпринята попытка создания электрохимического метода определения с помощью электрохимически активного медиатора, способного реагировать с антиоксидантами. В качестве медиатора было решено использовать п-бензохинон.

Суть метода заключается во взаимодействии раствора электрохимически активного п-бензохинона с антиоксидантами, содержащимися в биологической среде (уравнение реакции 7), после чего остаточная концентрация п-бензохинона определяется с помощью вольтамперометрической методики (уравнение реакции 8).

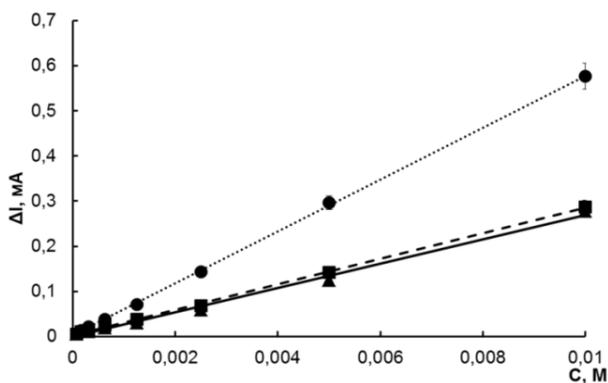
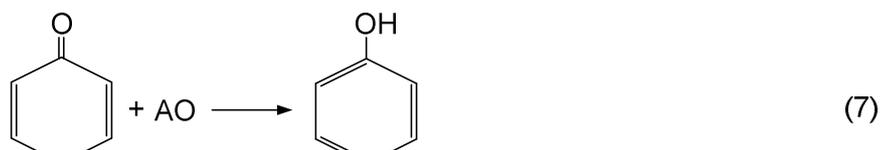


Рис. 14. Зависимость ΔI от концентрации антиоксиданта ($8 \cdot 10^{-5} \div 1 \cdot 10^{-2}$ М):
 ▲ – аскорбат натрия, ■ – Тролокс,
 ● – кверцетин дигидрат.

При исследовании водных растворов антиоксидантов (аскорбат натрия, Тролокс ((±)-6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) кверцетин дигидрат, установлено, что в диапазоне концентраций $8 \cdot 10^{-5} \div 1 \cdot 10^{-2}$ М имеет место линейная зависимость ΔI от концентрации исследуемого антиоксиданта (рис. 14). Было обнаружено, что наклон кривой соответствует активности антиоксиданта.

Так, по сравнению с Тролоксом, который в настоящее время часто используют в качестве стандарта, аскорбат натрия обладает активностью 0,92, в то время как кверцетин дигидрат 2,01 (что близко к литературным данным – 0,99 и 2,13 соответственно).

При проведении измерений в плазме крови практически здоровых людей ($n = 32$) был получен диапазон значений антиоксидантной активности в норме, который составил $0,45 \pm 0,13$ мМ в расчете на кверцетин дигидрат (или $0,89 \pm 0,26$ мМ в расчете на Тролокс).

При сравнении данных, полученных разработанным нами описанным выше методом с данными, полученными используемым в настоящее время рутинным спектрофотометрическим методом, коэффициент корреляции составил не менее 84% (рис. 15).

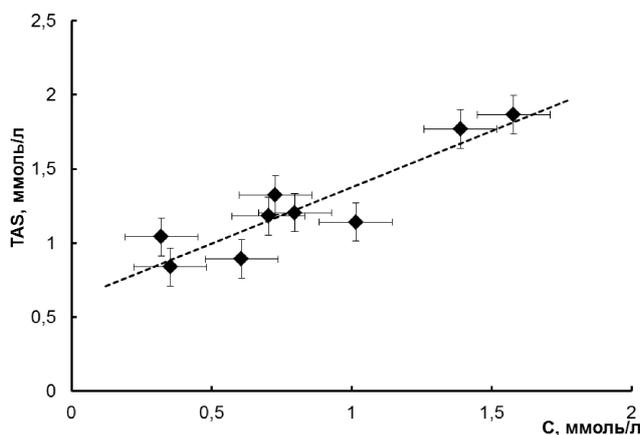


Рис. 15. – Сравнение антиоксидантной активности плазмы крови, определенной спектрофотометрическим и электрохимическим методами.

Совместный мониторинг ПРЦ и антиоксидантной активности плазмы крови пациента открывает новые возможности для диагностики, поскольку появляется возможность оценить не только состояние баланса про- и антиоксидантной систем организма, но и сопоставить с этими данными антиоксидантную активность организма, измеренную независимым методом. Таким образом, появляется возможность использовать оба фактора (величина ПРЦ и уровень антиоксидантов) для выявления составляющей, которая косвенно характеризует уровень свободных радикалов в организме. Это важно, поскольку время жизни свободных радикалов измеряется миллисекундами и нет возможности определения их уровня в пробе крови вне организма.

Совместный мониторинг величин ПРЦ и уровня антиоксидантов методом ЦВА с медиатором был проведен у пациентов с трансплантированными почкой и печенью в ранние сроки после проведения операции.

Сопоставление данных совместного мониторинга, представленных на рис. 16 позволило обнаружить общее направление изменения ПРЦ и уровня антиоксидантов в плазме крови. Действительно, как видно из кривых 1 и 2 (рис. 16 а,б) смещение величины ПРЦ в отрицательную область значений потенциала совпадает с увеличением антиоксидантной активности, в то время как снижение уровня антиоксидантной активности совпадает со сдвигом величин ПРЦ в сторону более положительных потенциалов.

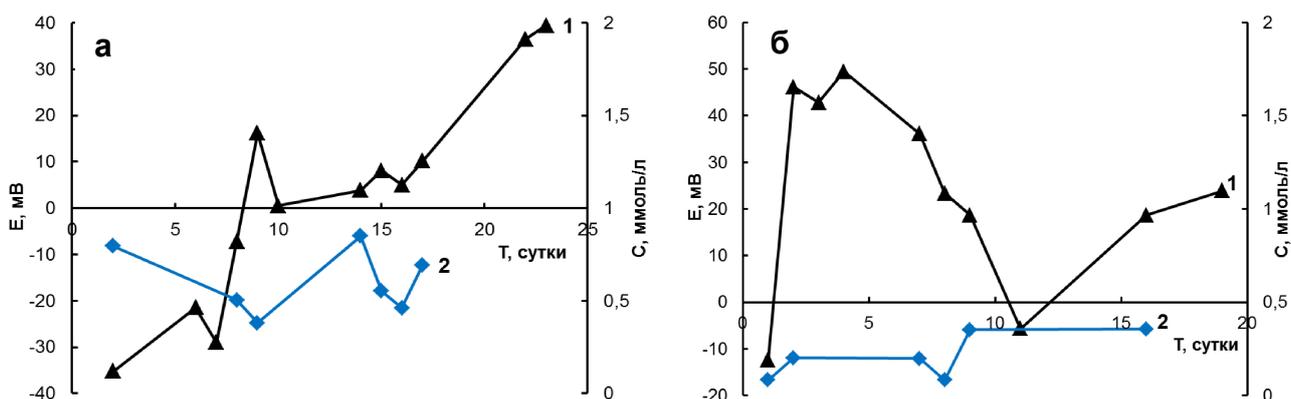


Рис. 16. Мониторинг ПРЦ (1) и АОА (2) в плазме крови пациента 3. после трансплантации почки (а) и пациента К. после трансплантации печени (б).

Одной из характерных особенностей пациентов после трансплантации печени (рис. 16, б) по сравнению с трансплантацией почки (рис. 16, а) являются низкие величины антиоксидантной активности. Можно предположить, что наблюдаемое явление связано с низкой функциональной активностью трансплантированной печени, что сказывается на накоплении в организме недоокисленных субстратов. Подобные соединения должны взаимодействовать с антиоксидантами, что приведет к убыли последних. Таким образом, сопоставляя данные об уровне антиоксидантов и величину ПРЦ в плазме крови представляется возможность корректировать тактику лечения пациента, например, введением пациенту антиоксидантов.

В главе 5 «Электросинтез растворов доноров «активного» кислорода» изложены результаты разработки электрохимического синтеза растворов, содержащих доноры кислорода в виде перекисных соединений. В качестве электролитов были выбраны сульфатно-хлоридные, карбонатные и карбонатно-хлоридные водные растворы. Рассмотрены возможности и перспективы применения электрохимически синтезированных разбавленных растворов перекисей в медицинской практике.

Было сделано предположение, что проведение электросинтеза персульфатов в водных растворах Na_2SO_4 (0,14 М) с микродобавками хлорида в виде NaCl (0,00068–0,00154 М), что порядка ниже существующих в настоящее время санитарных норм содержания хлоридов в питьевой воде, сможет позволить увеличить окислительную активность синтезированных растворов. Действительно, величина ПРЦ окисляющих растворов на основе сульфатно-хлоридных растворов составляла 1050–1140 мВ, в то время как величина ПРЦ окисляющих растворов на основе сульфата натрия составляла не более 450 мВ.

В связи с тем, что окисляющие растворы, полученные на основе нейтральных сульфатно-хлоридных растворов, требуют корректировки величины рН

(рН 1,75–1,88) до физиологических значений (рН 7,20–7,40), что в свою очередь приводит к значительному снижению окислительной активности, было предложено проводить электросинтез в щелочных сульфатно-хлоридных растворах (рН 13,00).

Снижение окислительной активности подтверждается данными измерений концентрации окислителей в окисляющем растворе (табл. 4). Действительно, при компенсации рН кислого синтезированного раствора происходит снижение концентрации окислителей практически на порядок, в тоже время, при проведении электросинтеза в щелочных растворах концентрация окислителей снижается лишь в 2,5 раза.

Таблица 4. Влияние условий получения на концентрацию окислителей в синтезированных растворах. (Исходный раствор 0,14 М Na₂SO₄ + 0,68 мМ NaCl, $i = 35 \text{ А/дм}^2$, скорость протока электролита 12,5 мл/мин)

№	Исходный рН раствора	рН раствора после электролиза	Концентрация окислителей, моль/л
1	6,93	1,75	$3,46 \cdot 10^{-4}$
2	6,93	1,75 скомпенсирован до 7,24	$2,80 \cdot 10^{-5}$
3	13,00	7,21	$1,36 \cdot 10^{-4}$

Действительно, проведение электросинтеза в щелочных растворах позволило получить окисляющие растворы не только с величиной рН, близкой к физиологическим значениям, но и с достаточно высокой окислительной активностью (не менее 770 мВ). В мировой практике принято, что для обеспечения дезинфекционных свойств раствор должен обладать величиной ПРЦ не менее 750 мВ. Таким образом, следует ожидать достаточно высокой бактерицидной активности синтезированных растворов. Было обнаружено, что увеличение концентрации NaCl (в исследованном диапазоне концентраций) в растворе приводит не только к увеличению окислительной способности синтезированных растворов, но и воспроизводимости параметров синтезированных растворов.

Одной из важнейших характеристик растворов медицинского назначения является их биосовместимость. Несмотря на достаточно высокую окислительную активность, окисляющие растворы на основе сульфатно-хлоридных растворов не оказывают существенного влияния на величину ПРЦ плазмы крови. Так, добавление раствора на основе сульфатно-хлоридного раствора к плазме крови в соотношении 1:10 приводит к сдвигу величины ПРЦ в область более положительных потенциалов на 13,7 мВ. Для сравнения, окисляющий раствор на основе сульфатного раствора

приводит к сдвигу ПРЦ в область более положительных потенциалов на 3,5 мВ, а используемый в настоящее время в медицинской практике 0,06% раствор NaClO приводит к слишком большому сдвигу в положительную сторону на 103,4 мВ, что указывает на резкое изменение баланса про- и антиоксидантов и может иметь нежелательный характер (рис. 17).

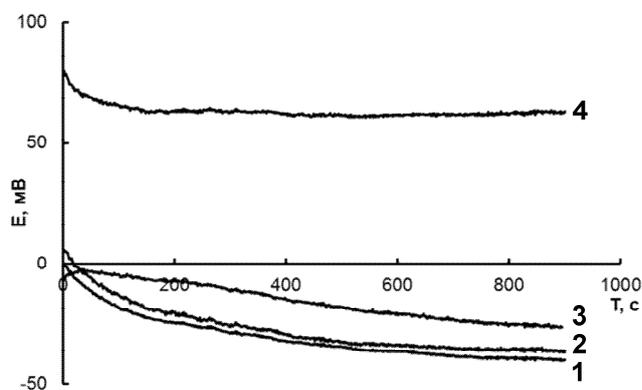


Рис. 17. Зависимость ПРЦ от времени в плазме крови при добавлении к ней растворов в соотношении 10:1:
 1 – физиологический раствор,
 2 – окисляющий раствор на основе сульфатного раствора,
 3 – окисляющий раствор на основе сульфатно-хлоридного раствора,
 4 – 0,06% раствор гипохлорита натрия.

Кроме того, добавление синтезированного раствора к цельной крови не приводит к травме эритроцитов. Так, при оценке степени гемолиза и морфофункциональных характеристик эритроцитов было обнаружено, что прирост концентрации свободного гемоглобина не превышал 0,1 мг/л при норме содержания свободного гемоглобина в крови 200 мг/л. Также при контакте окисляющего раствора с кровью в соотношении 1:10 не зафиксировано существенных изменений морфологических форм эритроцитов: как видно из данных микроскопического исследования витально окрашенных эритроцитов (рис. 18), контакт раствора персульфата с кровью не внес изменений в состав эритроцитов, в поле зрения видны только нормальные формы эритроцитов – дискоциты.

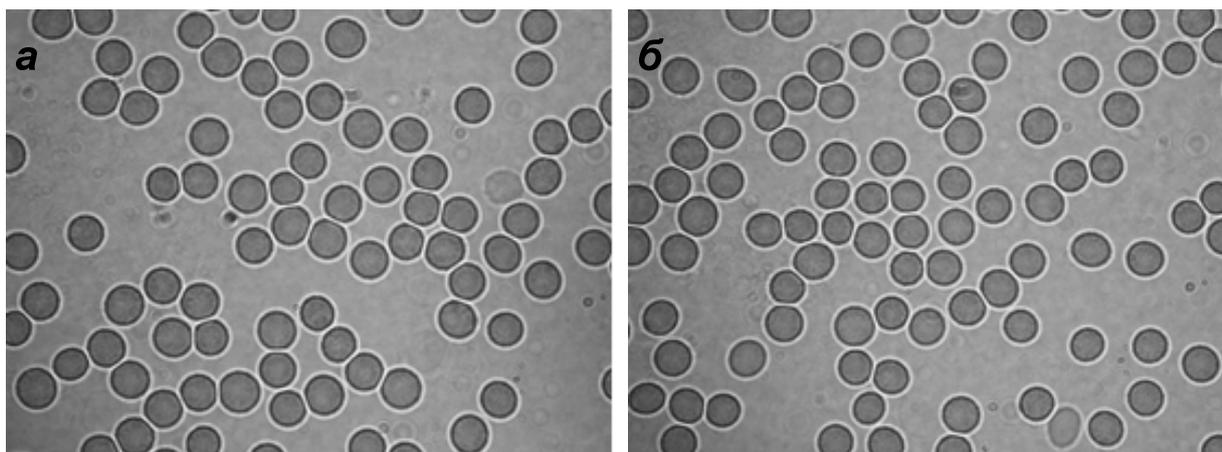


Рис. 18. Морфологическое исследование эритроцитов человека до (а) и после (б) контакта с синтезированным раствором.

Бактерицидная активность электрохимически синтезированных растворов персульфатов из сульфатных электролитов с микродобавками хлорида определялась с помощью экспериментов по взаимодействию раствора с кровью, содержащей

патогенную микрофлору. Так, при добавлении синтезированного раствора в соотношении 1:10 к крови пациентов с острыми септическими состояниями, содержащей *Staphylococcus coagulase* (-) и *Micrococcus spp.*, было обнаружено прекращение роста микрофлоры, тогда как в контрольной пробе крови имел место постоянный рост патогенной микрофлоры. Таким образом, была доказана бактерицидная активность по отношению к грамотрицательной и грамположительной микрофлоре синтезированных растворов.

Разработанный метод электросинтеза позволяет получать окисляющие растворы, обладающие не только детоксицирующими, но и бактерицидными свойствами, что существенно расширяет область применения синтезированных растворов.

В главе 6 «Электрохимический эндоваскулярный гемостаз (остановка кровотечений)» описана разработка метода электрохимической коагуляции крови с целью остановки кровотечений с применением электродов из ангиографических проводников, изготовленных из нержавеющей стали, торцевая часть которых была покрыта электролитически благородными металлами (Au, Ru, Pd, Rh).

В связи с тем, что электрохимическая коагуляция требует использования достаточно высоких анодных потенциалов (более 1,5 В), существует риск коррозии подложки из-за анодного растворения через поры покрытия и попадания в организм ионов тяжелых металлов. Чтобы избежать указанного явления, рабочая часть проводника должна быть покрыта беспористыми осадками благородными металлами.

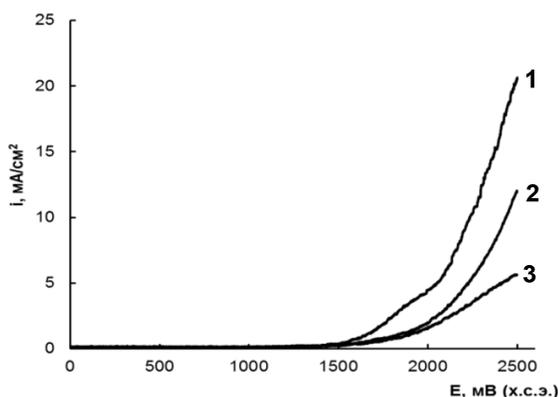


Рис. 19. Поляризационные измерения на платиновом электроде в:
1 – физиологический раствор (0,9% NaCl), 2 – плазма крови, 3 – цельная кровь.

Вначале были проведены поляризационные измерения на платиновом электроде в анодной области в физиологическом растворе, плазме крови и цельной крови. Как следует из полученных данных, представленных на (рис. 19), обнаружены существенные различия между исследованными средами: начало анодных процессов, протекающих на платине сдвигалось в область положительных потенциалов при замене физиологического раствора соответственно на плазму и на кровь.

Отметим также, что потенциал подъема анодной кривой, соответствующий началу анодного процесса в плазме и крови практически является одинаковым. Однако кинетика протекания анодного процесса в этих средах отличается - наклон поляризационной кривой значительно более крутой в плазме по сравнению с кровью.

Основными анодными процессами, протекающими в физиологическом растворе на платиновом электроде, являются реакция выделения хлора и частично кислорода. При переходе к биологическим средам, помимо этих реакций имеет место взаимодействие электрода с белками, что приводит к их денатурированию, форменными элементами крови и другими компонентами крови, что, по нашему предположению, приводит к блокировке поверхности электрода.

Действительно, было обнаружено, что как в плазме крови, так и в цельной крови на поверхности электрода происходит образование объемных структур (рис. 20), которые и могут быть причиной вышеописанного эффекта снижения тока.

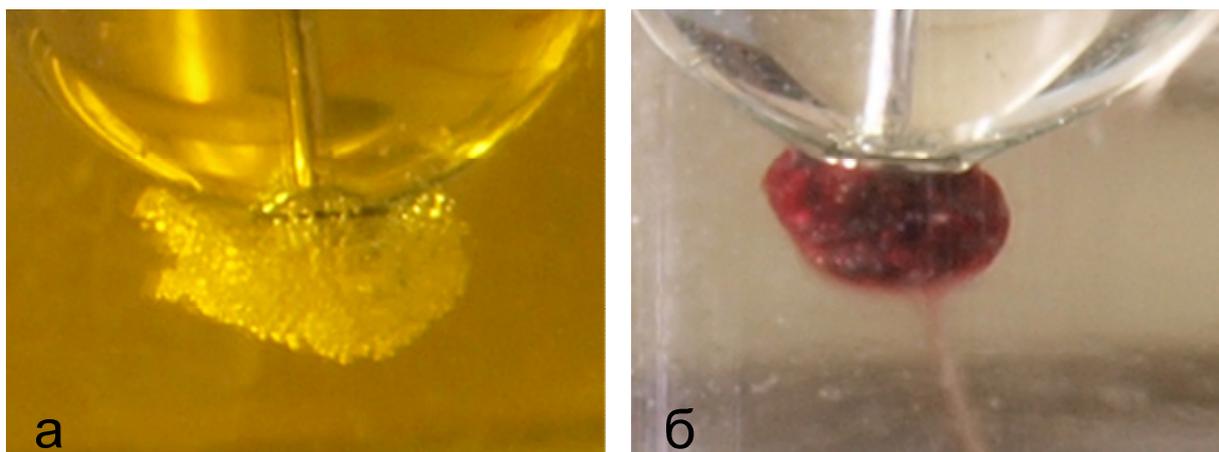


Рис. 20. Образования на поверхности электрода в гальваностатических условиях ($I = 500 \text{ мкА}$, $T = 60 \text{ с}$): а – плазма крови, б – цельная кровь.

Можно сделать предположение, что данные образования состоят из нитей фибрина, пузырьков газа и форменных элементов (в случае цельной крови). При наложении анодного потенциала на поверхности электрода происходят процессы активации некоторых компонентов свертывающей системы крови, что в свою очередь приводит к образованию сгустка (рис. 21).

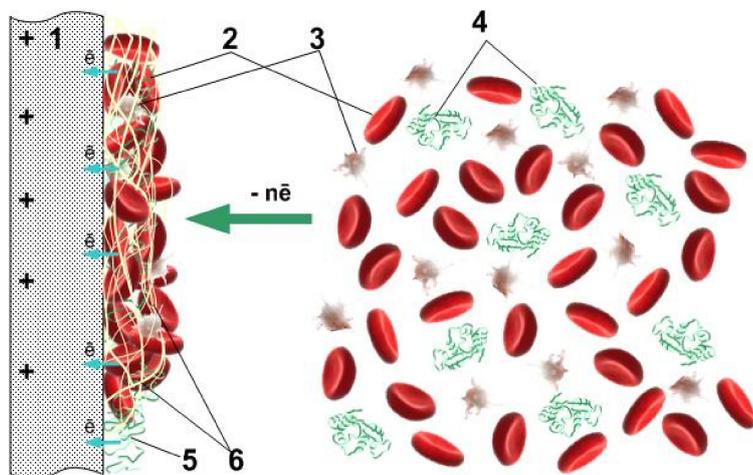


Рис. 21. Схема взаимодействие компонентов крови с заряженной поверхностью электрода.
1 – электрод, 2 – эритроцит, 3 – тромбоцит, 4 – молекула белка, 5 – денатурированный белок на поверхности электрода, 6 – нити фибрина.

В ходе анализа данных, полученных при проведении процесса электрокоагуляции в крови в диапазоне значений силы тока от 2 до 15 мА/см^2 и

времени от 15 до 120 с, с учетом допущения, что форма сгустка принята за эллипсоид и может быть описана уравнением (9), была построена диаграмма зависимости объема сгустка от параметров проведения процесса (рис. 22).

$$V_{\text{сгустка}} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot a \cdot b \cdot c \quad (9)$$

где $V_{\text{сгустка}}$ – объем сгустка, мм³,
 a, b, c – полуоси эллипсоида, мм.

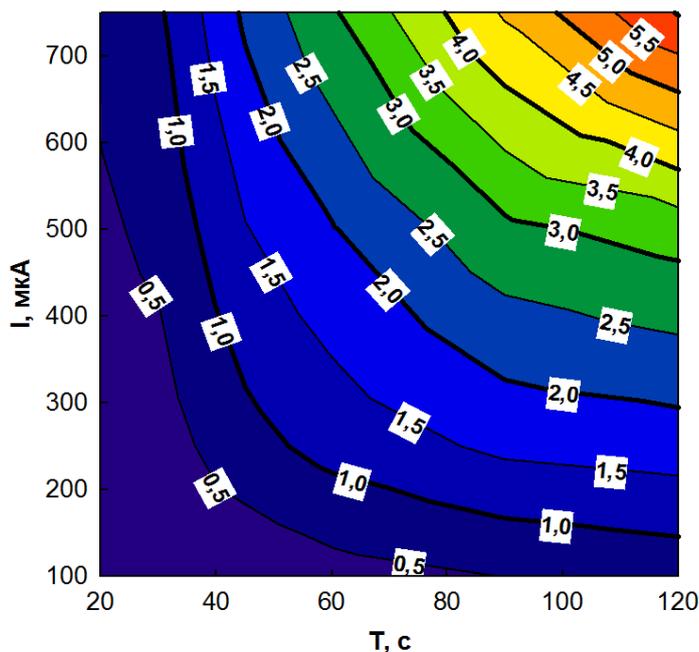


Рис. 22. Диаграмма зависимости объема сгустка (мм³) от силы тока и времени воздействия.

Использование полученной диаграммы позволяет выбрать параметры процесса электрохимической эндоваскулярной коагуляции в зависимости от размеров сосуда, который необходимо перекрыть.

В качестве рабочих электродов использовали ангиографические проводники TSCF-35-145-3 (Cook Medical Inc., США) с покрытием активной части электрода благородными металлами, что позволило повысить коррозионную стойкость электродов (табл. 5).

Таблица 5. Плотность тока коррозии покрытий благородными металлами в плазме крови

Покрытие	$i_{\text{кор}}, \text{A/дм}^2$	
	толщина покрытия, мкм	
	0,01	0,1
Au	0,00118	0,00098
Ru	0,00043	0,00029
Pd	0,00092	0,00067
Rh	0,00033	0,000019

При проведении опытов *in vitro* в цельной крови было обнаружено, что покрытия обладают различной адгезивной активностью по отношению к образующимся сгусткам крови на поверхности электрода (рис. 23).

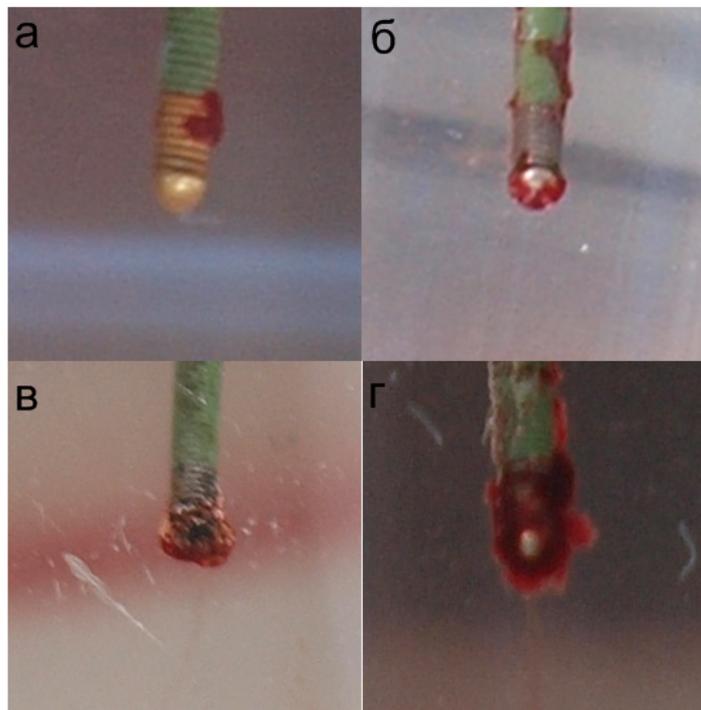


Рис. 23. Фотографии сгустков, полученных в гальваностатических условиях (500 мкА, 90 с) на электроде с покрытием: а - золото, б – палладий, в – рутений, г – родий.

Так, на золотом покрытии практически не обнаружено сгустков, что может быть связано с тем, что по достижении некоторого размера сгусток отрывается от поверхности электрода. Для рутения и палладия наблюдается схожая картина, выражающаяся в образовании сгустков в виде островков. Наиболее эффективным среди исследуемых металлов оказался родий, на поверхности которого образовывались достаточно крупные сгустки.

Таким образом, можно расположить исследуемые покрытия в ряд по степени адгезии сгустков крови:



На основании данных по поведению исследуемых покрытий в цельной крови и коррозионной стойкости для проведения экспериментов *in vivo* было выбрано родиевое покрытие.

Эффективность применения проводника с родиевым покрытием была доказана в ходе экспериментов по проведению электрохимической коагуляции *in vivo* 14 экспериментально поврежденных вен у двух собак, в результате чего во всех случаях была зафиксирована полная остановка экспериментально вызванного кровотечения.

Таким образом, применение проводника с родиевым покрытием имеет перспективы внедрения в клиническую практику, поскольку обеспечивает остановку кровотечений в короткие сроки, что является важным в экстренных ситуациях.

ВЫВОДЫ

1. Разработана электрохимическая методика стандартизации состояния поверхности платинового электрода для измерения величины ПРЦ в плазме и сыворотке крови.

2. С помощью измерения величин ПРЦ платинового электрода в сыворотке крови практически здоровых добровольцев установлено, что статистически достоверный диапазон этих величин составляет от -60 до -20 мВ относительно хлорсеребряного электрода сравнения.

3. Статистический анализ величин ПРЦ сыворотки крови 232 пациентов (1974 измерения) показал, что предложенная электрохимическая методика обладает чувствительностью 84,6%, специфичностью 69,8% и точностью 84,1%.

4. Обнаружено, что волнообразные участки на зависимости ПРЦ платинового электрода в плазме крови от времени совпадают с клиническими данными наличия воспалительных процессов в организме.

5. Обнаружено, что величину смещения ПРЦ платинового электрода в сыворотке или плазме крови при ежедневном мониторинге можно использовать в качестве диагностического и прогностического критериев состояния пациента. Получены клинические доказательства применимости указанных критериев.

6. Разработан метод прямого определения антиоксидантной активности биологических сред с помощью ЦВА на стеклоуглеродном электроде, электрохимически модифицированном гексацианоферратом кобальта.

7. Разработан вольтамперометрический экспресс-метод определения антиоксидантной активности биологических сред на платиновом электроде с использованием п-бензохинона в качестве медиатора. Коэффициент корреляции результатов анализа с известным спектрофотометрическим методом TAS Randox[®], составил 0,84.

8. Показано, что результаты одновременного мониторинга величин ПРЦ платинового электрода в плазме крови и ее антиоксидантной активности могут служить дополнительным критерием оценки состояния пациента, что важно для своевременной коррекции лечения.

9. Разработан процесс электросинтеза гемосовместимых окисляющих растворов с физиологическим значением рН (7,2–7,4) в разбавленных сульфатно-хлоридных электролитах с содержанием хлорид-иона в электролите менее 1,5 мМ.

10. Доказана бактерицидная активность синтезированных нами окисляющих растворов по отношению к биологическим средам, содержащим грамотрицательную и грамположительную патогенную микрофлору.

11. Разработан метод «холодного» электрохимического эндovasкулярного гемостаза электродами из нержавеющей стали, покрытыми родием толщиной 0,01 мкм.

12. Предложен метод оптимизации процесса внутрисосудистой электрохимической коагуляции в зависимости от диаметра сосуда.

13. Эффективность использования метода электрохимического эндovasкулярного гемостаза с помощью проводников с родиевым покрытием доказана в экспериментах на животных *in vivo*.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

Журналы, включенные в перечень ВАК:

1. **Евсеев А.К.**, Лужников Е.А., Гольдфарб Ю.С., Колдаев А.А., Волков А.Г., Царькова Т.Г. Электросинтез и биологические свойства детоксицирующих окисляющих растворов в виде персульфатов // Токсикологический вестник. 2007. № 2. С. 34–42.

2. **Евсеев А.К.**, Хубутя М.Ш., Гольдин М.М., Волков А.Г., Колдаев А.А. Электрохимическое получение пероксодисульфатов из разбавленных растворов сульфатов для детоксикации биологических сред // Электрохимия. 2008. Т. 44, № 8. С. 972–980.

3. **Евсеев А.К.**, Колесников В.А., Хубутя М.Ш., Гольдин М.М., Колдаев А.А., Шибаев А.Н. Электросинтез водных растворов оксидантов для детоксикации организма и дезинфекции ран // Химическая промышленность сегодня. 2008. № 2. С. 29–37.

4. Лужников Е.А., Колесников В.А., Гольдин М.М., **Евсеев А.К.**, Петров С.И., Колдаев А.А., Попова Т.С., Царькова Т.Г., Курилкин Ю.А., Абакумов М.М. Окислительная активность электрохимически синтезированных растворов персульфата натрия по отношению к некоторым психотропным препаратам // Анестезиология и реаниматология. 2008. № 6. С. 19–22.

5. Хубутя М.Ш., **Евсеев А.К.**, Колесников В.А., Гольдин М.М., Давыдов А.Д., Волков А.Г., Степанов А.А. Измерения потенциала платинового электрода в крови, плазме и сыворотке крови // Электрохимия. 2010. Т. 46, № 5. С. 569–573.

6. Гольдин М.М., Ромасенко М.В., **Евсеев А.К.**, Левина О.А., Петриков С.С., Алещенко Е.И., Крылов В.В. Оценка эффективности использования гипербарической оксигенации при острой церебральной патологии с помощью

электрохимической методики // Нейрохирургия. 2010. № 4. С. 33–39.

7. Колесников В.А., Гараева Г.Р., Степанов А.А., Царькова Т.Г., Гольдин М.М., **Евсеев А.К.** Электрохимические свойства терморасширенного графита, покрытого полипирролом // Химическая промышленность сегодня. 2011. № 8. С. 23–26.

8. **Евсеев А.К.**, Хубутия М.Ш., Гольдин М.М., Гольдин Мих.М., Колесников В.А., Ваграмян Т.А., Вахрушин Е.В. Измерение редокс потенциала водных растворов и биологических сред на оксидных электродах // Химическая промышленность сегодня. 2011. № 11. С. 19–24.

9. Хубутия М.Ш., Ваграмян Т.А., **Евсеев А.К.**, Андреев В.Н., Лебедев М.П., Колесников В.А., Гольдин М.М. Оценка окислительной активности растворов персульфата натрия и биотрансформации лекарственных веществ с помощью измерения редокс потенциалов и метода хроматомассспектрометрии // Химическая промышленность сегодня. 2012. № 6. С. 23–31.

10. Ваграмян Т.А., **Евсеев А.К.**, Александрова И.В., Чугунов А.О., Царькова Т.Г., Гольдин М.М., Салиенко А.А. Потенциал платинового электрода при разомкнутой цепи в сыворотке крови для оценки эффективности лечения пациентов после трансплантации печени // Химическая промышленность сегодня. 2012. № 10. С. 35–41.

11. Андреев В.Н., **Евсеев А.К.**, Гараева Г.Р., Гольдин М.М. Сопоставление редокс-потенциала и антиоксидантной активности сыворотки крови // Молекулярная медицина. 2013. № 4. С. 37–40.

12. **Евсеев А.К.**, Михайлов И.П., Попова Т.С., Смирнов К.Н., Кругликов С.С., Гольдин М.М. Применение электроосажденного родия в качестве нерастворимого анода для эндоваскулярной эмболизации // Гальванотехника и обработка поверхности. 2014. Т. XXII, № 1. С. 45–50.

13. **Евсеев А.К.**, Пинчук А.В., Андреев В.Н., Гольдин М.М. Анализ зависимостей потенциала платинового электрода при разомкнутой цепи от времени в сыворотке крови // Физикохимия поверхности и защита материалов. 2014. Т. 50, № 4. С. 445 – 448.

Журналы, включенные в базы данных Scopus и Web of Science:

14. Goldin Mikhail M., Kolesnikov V.A., Khubutiya M.Sh., Volkov A.G., Blanchard G.J., **Evseev A.K.**, Goldin Mark M. Open circuit potential shifts of activated carbon in aqueous solutions during chemical and adsorption interactions // Journal of Applied Electrochemistry. 2008. Vol. 38. P. 1369–1374.

15. Kuznetsov V.V., Shmakova O.A., Kolesnikov V.A., **Evseev A.K.**, Volkov

A.G., Goldin M.M. Electrochemical Behavior of Manganese–Molybdenum Oxide Anodes in Chloride–Sulfate Aqueous Solutions // Journal of The Electrochemical Society. 2008. Vol. 155, N 10. P. D671–D674.

16. Goldin M.M., Khubutiya M.Sh., Kolesnikov V.A., Abakumov M.M., **Evseev A.K.**, Volkov A.G. Indirect electrochemical synthesis of active oxygen in dilute sulfate solutions // Journal of Applied Electrochemistry. 2009. Vol. 39, N 2. P. 185–189.

Статьи в других изданиях:

17. Goldin Mark M., Volkov A.G., Khubutiya M.Sh., Kolesnikov V.A., Blanchard G.J., **Evseev A.K.**, Goldin Mikhail M., Teselkin Yu.O., Davydov B.V. Redox Potential Measurement in Aqueous Solutions and Biological Media // ECS Transactions. 2008. Vol. 11, N 21. P. 39–49.

18. Khubutiya M.Sh., Kolesnikov V.A., **Evseev A.K.**, Volkov A.G., Abakumov M.M., Shibaev A.N., Goldin M.M. Electrochemical Synthesis of Oxidants in Dilute Sulfate Solutions and Active Oxygen Donor Determination // ECS Transactions. 2008. Vol. 11, N 21. P. 51 – 58.

19. Goldin Mikhail M., Blanchard G.J., Volkov A.G., Khubutiya M.Sh., Kolesnikov V.A., **Evseev A.K.**, Goldin Mark M. Activated Carbon Open Circuit Potential Shifts in Aqueous Solutions // ECS Transactions. 2008. Vol. 11, N 21. P. 19–28.

20. Хубутия М.Ш., Гольдин М.М., Крылов В.В., Ромасенко М.В., **Евсеев А.К.**, Левина О.А., Петриков С.С., Алещенко Е.И. Редокс потенциалы сыворотки крови больных с острой церебральной патологией при лечении методом гипербарической оксигенации // Гипербарическая физиология и медицина. 2009. № 4. С. 1–12.

21. Khubutiya M.Sh., Goldin M.M., Romasenko M.V., Volkov A.G., Hall P.J., **Evseev A.K.**, Levina O.A., Aleschenko E.I., Krylov V.V. Redox Potentials of Blood Serum in Patients with Acute Cerebral Pathology // ECS Transactions. 2010. Vol. 25, N 19. P. 63–71.

22. Хубутия М.Ш., Пинчук А.В., Александрова И.В., Гольдин М.М., **Евсеев А.К.**, Сорокин Б.А. Оценка состояния и качества лечения пациентов после трансплантации почки с помощью мониторинга редокс потенциала сыворотки крови // Трансплантология. 2011. № 2-3. С. 29–33.

23. Khubutiya M.Sh., Goldin M.M., **Evseev A.K.**, Zhao A.V., Salienko A.A. Development of Diagnostic Criteria of Rejection Crises in Liver Transplantation by Redox Potential Measurements // ECS Transactions. 2011. Vol. 35, N 35. P. 45–50.

24. Хубутия М.Ш., **Евсеев А.К.**, Чжао А.В., Александрова И.В., Гольдин М.М., Салиенко А.А. Мониторинг редокс потенциала сыворотки крови для

диагностики осложнений при лечении пациентов с трансплантированной печенью // Трансплантология. 2012. № 1-2. С. 60–64.

25. Андреев В.Н., **Евсеев А.К.**, Гараева Г.Р., Гольдин М.М., Клычникова Е.В., Сорокин Б.А. Определение антиоксидантной активности биологических жидкостей на электрохимически модифицированном платиновом электроде // Медицинский алфавит. Современная лаборатория №1. 2013. № 3. С. 68–71.

Патенты:

1. Способ измерения редокс-потенциала биологических сред : пат. 2497107 Рос. Федерация. № 2012102137/28 ; заявл. 24.01.2012 ; опубл. 27.10.2013, Бюл. № 30. 9 с.

2. Способ измерения антиоксидантной активности биологических жидкостей : пат. 2523564 Рос. Федерация. № 2012151574/15 ; заявл. 03.12.2012, опубл. 20.07.2014, Бюл. № 20. 7 с.

Были опубликованы тезисы докладов на следующих конференциях:

1. 7th European Symposium on Electrochemical Engineering. Toulouse, 3-5 October 2005. 1 тезисы доклада, 1 страница.

2. 8th International Frumkin Symposium “Kinetics of electrode processes”. Moscow, 18-22 October 2005. 2 тезисов доклада, общий объем 2 страницы.

3. 14-ая Конференции Московского городского общества гемафереза «Трансфузионная и дезинтоксикационная терапия при неотложных состояниях». Москва, 23-24 мая 2006. 1 тезисы доклада, 1 страница.

4. II Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2006». Москва, 25-27 октября 2006. 1 тезисы доклада, 5 страниц.

5. 212th ECS Meeting. Washington, 7-12 October 2007. 2 тезисов доклада, общий объем 2 страницы.

6. Научно-практической конференции «Актуальные вопросы экстракорпоральной терапии». Москва, 23-24 мая 2007. 2 тезисов доклада, общий объем 4 страницы.

7. Конференции «Актуальные вопросы гемафереза, хирургической гемокоррекции и диализа». Москва, 13-15 мая 2009. 1 тезисы доклада, 1 страница.

8. 20th ISTC-Korea Workshop. Seoul, 15-17 September 2009. 1 тезисы доклада, 6 страниц.

9. 216th ECS Meeting. Vienna, 4-9 October 2009. 1 тезисы доклада, 1 страница.

10. V Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической

- технологии «МКХТ-2009». Москва, 10-15 ноября 2009. 1 тезисы доклада, 5 страниц.
11. 9th International Frumkin Symposium “Electrochemical technologies and materials for 21th century”. Moscow, 24-29 October 2010. 2 тезисов доклада, общий объем 2 страницы.
 12. 61st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry. Nice, 26 September – 01 October 2010. 1 тезисы доклада, 1 страница.
 13. VI Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2010». Москва, 9 - 14 ноября 2010. 1 тезисы доклада, 5 страниц.
 14. 219th ECS Meeting. Montreal, 1-6 May 2011. 1 тезисы доклада, 1 страница.
 15. 220th ECS Meeting. Boston, 9-14 October 2011. 1 тезисы доклада, 1 страница.
 16. VII Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2011». Москва, 8-13 ноября 2011. 1 тезисы доклада, 5 страниц.
 17. Electrochem 2012: Electrochemical Horizons. Dublin, 2-4 September 2012. 1 тезисы доклада, 1 страница.
 18. XIII съезде федерации анестезиологов и реаниматологов. Санкт-Петербург, 22-25 сентября 2012. 1 тезисы доклада, 1 страница.
 19. VI Всероссийском съезде трансплантологов. Москва, 24-27 сентября 2012. 2 тезисов доклада, общий объем 3 страницы.
 20. VIII Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2012». Москва, 6-11 ноября 2012. 2 тезисов доклада, общий объем 9 страниц.
 21. 223th ECS Meeting. Toronto, May 12 – 16 2013. 2 тезисов доклада, общий объем 2 страницы.
 22. IX Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2013». Москва, 29 октября – 1 ноября 2013. 1 тезисы доклада, 6 страниц.
 23. 11-ой международной конференции «Покрытия и обработка поверхности. Последние достижения в технологиях, экологии и оборудовании». Москва, 18-20 февраля 2014. 1 тезисы доклада, 1 страница.
 24. 225th ECS Meeting. Orlando, May 11 – 15 2014. 1 тезисы доклада, 1 страница.
 26. 65st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry. Lausanne, 31 August – 5 September 2014. 1 тезисы доклада, 1 страница.