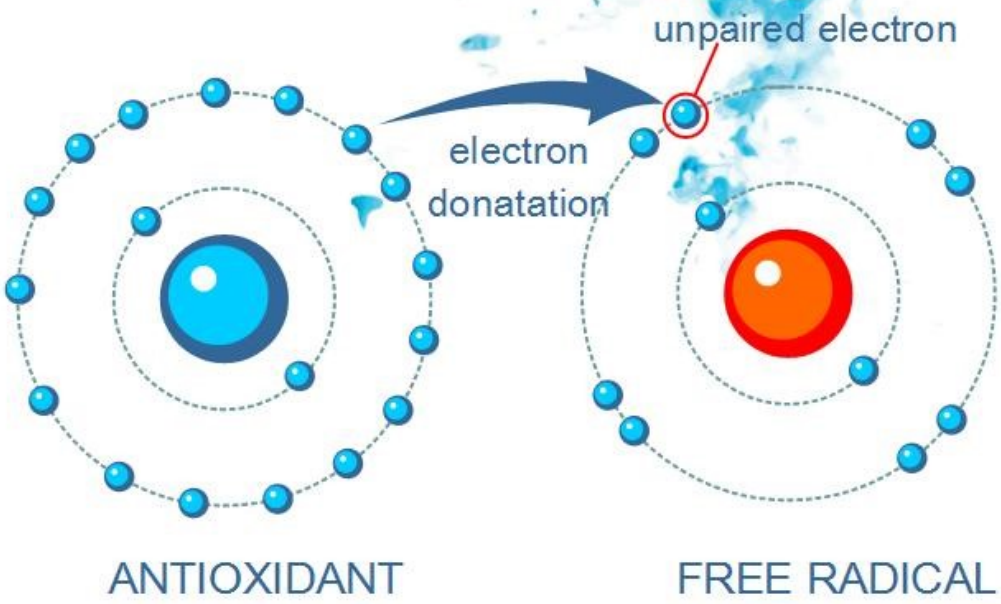
ISSN 2414-5246

Том 5

№4




АССОЦИАЦИЯ РОССИЙСКИХ ОЗОНОТЕРАПЕВТОВ

# БИОРАДИКАЛЫ и АНТИОКСИДАНТЫ

2018

АССОЦИАЦИЯ РОССИЙСКИХ ОЗОНОТЕРАПЕВТОВ

Гл. редактор – д.м.н., проф. С.П. Перетягин

Зам. гл. редактора – д.б.н. А.К. Мартусевич

Отв. секретарь – А.Г. Соловьева

Зав. ред. – А.А. Мартусевич

*Международный редакционный совет:*
Lamberto Re (Италия)
Gregorio Martinez-Sanchez (Италия)
Nurettin Luleci (Турция)
Renate Viebahn-Haensler (Германия)
С.А. Беляев (Германия)
А.Ф. Ванин (Россия)
В.В. Зинчук (Белоруссия)
А.Г. Куликов (Россия)
А.Д. Лелянов (Россия)
Е.И. Назаров (Украина)
И.Н. Попов (Германия)
В.Д. Селемир (Россия)
Р.Р. Фархутдинов (Россия)

*Редакционная коллегия:*
А.В. Алясова, д.м.н., проф. (Н.Новгород)
А.Н. Беляев, д.м.н., проф. (Саранск)
О.А. Биткина, д.м.н. (Н.Новгород)
Е.Л. Бойко, д.м.н., проф. (Иваново)
Г.А. Бояринов, д.м.н., проф. (Н.Новгород)
Н.Ю. Векслер, д.м.н. (Москва)
В.И. Гибалов, д.ф-м.н., проф. (Москва)
Г.О. Гречканев, д.м.н., проф. (Н.Новгород)
С.В. Гусакова, д.б.н., проф. (Томск)
В.Т. Долгих, д.м.н., проф. (Омск)
Е.А. Дурново, д.м.н., проф. (Н.Новгород)
В.И. Инчина, д.м.н., проф. (Саранск)
В.И. Карелин, д.ф.-м.н., проф. (Саров)
Р.Г. Каримова, д.б.н. (Казань)
К.Н. Конторщикова, д.б.н., проф. (Н.Новгород)
И.В. Кошелева, д.м.н.проф. (Москва)
В.А. Кудрявцев, к.ф.-м.н. (Киров)
П.П. Кузьмичев, д.м.н., проф. (Хабаровск)
Н.Б. Мельникова, д.х.н., проф. (Н.Новгород)
И.Я. Моисеева, д.м.н., проф. (Пенза)
И.В. Мухина, д.б.н., проф. (Н.Новгород)
А.А. Тимошин, д.б.н. (Москва)
В.Ю. Титов, д.б.н., проф. (Москва)
К.Б. Шумаев, д.б.н. (Москва)
С.В.Якимов, д.м.н., проф. (Красноярск)

# БИА

**Том 5, №4**
**2018**

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций

Свидетельство о регистрации средства массовой информации Эл № ФС77-57345 от 17 марта 2014 г.

**Учредитель** – Ассоциация российских озонотерапевтов

**Адрес редакции:**
603089, г. Н. Новгород,
ул. Б. Панина, д. 9

**Телефоны:**
8-920-297-99-89
8-910-391-79-98

**e-mail:** cryst-mart@yandex.ru
psp_aro@mail.ru

**Internet:** www.ozonetherapy.ru

Все права защищены. Любое воспроизведение опубликованных материалов без письменного согласия редакции не допускается При перепечатке ссылка на журнал обязательна

# Содержание

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**Власова К.М., Копылова С.В.**
Исследование свободнорадикальных процессов в плазме крови и в печени крыс при моделировании острой печеночной недостаточности 5

**Воробьева О.А., Малыгина Д.С., Соловьева А.Г., Беляева К.Л., Грубова Е.В., Мельникова Н.Б.**
Антиоксидантные и прооксидантные свойства производных бетулина 10

**Мартусевич А.К., Дмитроченков А.В., Ковалева Л.К., Разумовский А.В.**
Патогенетическое обоснование эффективности ингаляционного применения активных форм кислорода и оксида азота при термической травме 22

**Мартусевич А.А., Перетягин С.П., Мартусевич А.К.**
Физико-химическая модификация свойств воды активными формами кислорода 25

**Перетягин П.В., Новиков А.В., Перетягин С.П.**
Состояние микроциркуляции у пациентов с дорсалгиями и артралгиями на фоне озотенс-терапии 32

**Фомин А.М.**
Влияние продолжительной гемофильтрации на показатели перекисного окисления липидов при абдоминальном сепсисе 40

***Правила оформления статей*** 46

# Content

## ORIGINAL ARTICLES

**Vlasova K.M., Kopylova S.V.**
Study of free radical processes in the blood plasma and in the liver of rats in the simulation of acute liver failure 5

**Vorobyeva O.A., Malygina D.S., Soloveva A.G., Belyaeva K.L., Grubova E.V., Melnikova N.B.**
Antioxidant and prooxidant properties of betulin derivates 10

**Martusevich A.K., Dmitrochenkov A.V., Kovaleva L.K., Razumovskiy A.V.**
Pathogenic justification of the efficiency of inhalations of reactive oxygen species and nitric oxide in thermal trauma 22

**Martusevich A.A., Peretyagin S.P., Martusevich A.K.**
Physical and chemical modification of water properties by reactive oxygen species 25

**Peretyagin P.V., Novikov A.V., Peretyagin S.P.**
Microcirculation state in patients with dorsalgias and arthralgias under OZOTENZ-therapt course 32

**Fomin A.M.**
The influence of prolonged hemofiltration of parameters of lipid peroxidation at abdominal sepsis 40

***Guidelines for authors*** 46

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

# ИССЛЕДОВАНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

К.М. Власова, С.В. Копылова

[1] *ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород*

**Abstract**

Free radical processes is played the leading place in a pathogenesis of various diseases, and, in particular, liver diseases. In literature the large number of information concerning the matter is accumulated, however the mechanism of SRO at course of an acute liver failure is studied not enough. Research objective was studying of processes of peroxide oxidation of lipids and oxidizing modification of proteins in a blood plasma and in a liver of rats at modeling of an acute liver failure. Researches were drawn on females of healthy white rats the Wistar lines, with an average weight of 200-250 g. At the same time animals were divided into groups: "intact animals"; "experience" - modeled an acute liver failure by intraperitoneal introduction of 0.12 g/kg of injection solution of Paracetamol. By results of researches rise in level of DC, TC and OSH in plasma and homogenates of a liver of rats of the experience group concerning group "intact animals" is established. Significant increase in products of OMB is noted statistically that speaks about an intensive oxidizing stress. The developed model of an acute liver failure can be applicable for further researches of the mechanism of SRO and development of effective methods of antioxidatic protection.

*Key words:* free radical oxidation, lipid peroxidation, oxidative modification of proteins, acute liver failure

Ведущее место в патогенезе различных заболеваний, и, в частности, заболеваний печени, играют свободнорадикальные процессы. В литературе накоплено большое количество информации относительно данного вопроса, однако механизм СРО при протекании острой печеночной недостаточности изучен не достаточно. Целью исследования было изучение процессов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков в плазме крови и в печени крыс при моделировании острой печеночной недостаточности. Исследования проводились на самках здоровых белых крыс линии Wistar, средней массой 200-250 г. При этом животные были разделены на группы: «интактные животные»; «опыт» - моделировали острую печеночную недостаточность путем внутрибрюшинного введения 0,12 г/кг инъекционного раствора парацетамола. По результатам исследований установлен подъем уровня ДК, ТК и ОШ в плазме и гомогенатах печени крыс группы «опыт» относительно

группы «интактные животные». Отмечено статистически значимое увеличение продуктов ОМБ, что говорит об интенсивном окислительном стрессе. Разработанная модель острой печеночной недостаточности может быть применима для дальнейших исследований механизма СРО и разработки эффективных методов антиоксидантной защиты.

*Ключевые слова:* свободнорадикальное окисление, перекисное окисление липидов, окислительная модификация белка, острая печеночная недостаточность

**Введение**

Ведущее место в патогенезе различных заболеваний, и, в частности, заболеваний печени, играют свободнорадикальные процессы, которые характеризуются патологической активацией микросомальной системы оксидаз, избыточным образованием активных радикалов и электрофильных продуктов. Чрезмерная активность свободнорадикального оксиления (СРО) связана с нарушением баланса образования активных форм кислорода (АФК) и функционирования антиоксидантной системы организма [3]. В литературе накоплено большое количество информации о природе, механизме и значении процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ), однако механизм СРО при протекании острой печеночной недостаточности изучен не достаточно. Данные исследования могут быть применимы при диагностике различных функциональных состояний печени.

**Целью исследования** было изучение процессов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков в плазме крови и в печени крыс при моделировании острой печеночной недостаточности.

**Материалы и методы**

Исследования проводились на самках здоровых белых крыс линии Wistar, средней массой 200-250 г. Животные содержались в условиях вивария, на стандартной диете. Животных содержали в виварии, оборудованном согласно требованиям «Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» №1045-73. Исследования осуществляли в соответствии с правилами проведения работ и использования экспериментальных животных (Приложение к Приказу МЗ СССР №775 от 12.08.77), Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г. и ФЗ РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997. Животные находились в одинаковых пластиковых клетках с поилками, получали полноценный экструдированный комбикорм и достаточное количество воды.

Животные были разделены на группы: группа - интактные животные; группа «опыт» - моделировали острую печеночную недостаточность путем внутрибрюшинного введения 0,12 г/кг инъекционного раствора парацетамола. Инъекционный раствор готовили на основе 80% раствора пропиленгликоля в дистиллированной воде. Дозу парацетамола определили в соответствии с данными о токсической дозе парацетамола.

Активность процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию в плазме крови и гомогенате печени диеновых (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) и оснований Шиффа (ОШ). Степень окислительной модификации белков (ОМБ) определяли по уровню карбонильных производных. Данный метод основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4–динитрофенилгидразоном (2,4–ДНФГ) с образованием производных 2,4–динитрофенилгидразонов.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы BIOSTAT с использованием t-критерия Стьюдента с предварительной оценкой на нормальность. Статистически достоверными считали отличия, соответствующие оценке ошибки вероятности $p \leq 0,05$.

**Результаты и обсуждение**

Через 10-ть суток после начала эксперимента содержание первичных и вторичных конъюгатов в плазме крови крыс достоверно увеличилось на 31% и 34% соответственно относительно группы «интактные животные». Диеновые и триеновые конъюгаты являются токсичными метаболитами и оказывают повреждающее действие на липопротеиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты. Подъем уровня ДК и ТК говорит об инициации процессов ПОЛ.

Таблица 1. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови и гомогенатах печени крыс при моделировании острой печеночной недостаточности

| Показатель | Плазма крови | | Печень | |
|---|---|---|---|---|
| | интактные | опыт | интактные | опыт |
| ДК | 0,23±0,10 | 0,54±0,03* | 0,25±0,07 | 0,56±0,05* |
| ТК | 0,18±0,07 | 0,52±0,07* | 0,22±0,09 | 0,33±0,06* |
| ОШ | 55,49±4,60 | 90,54±5,40* | 0,14±0,04 | 0,23±0,05* |

*Примечание: * $p \leq 0,05$- достоверная разница опытной группы с интактной группой животных*

Содержание конечных продуктов ПОЛ (ОШ) в плазме крови крыс показало достоверное увеличение данного показателя относительно группы «интактные животные» на 35%. Избыточная активация АФК, и, соответственно, увеличение интенсивности процессов ПОЛ при моделировании острой печеночной недостаточности, ведут к лавинообразному каскадному процессу образования новых звеньев окислительного процесса, накоплению продуктов деструкции липидов, что способствует дестабилизации мембран и деградации клеток.

Анализ результатов показателей ПОЛ в гомогенатах печени крыс в тот же период показал достоверное увеличение как первичных, так вторичных на 31% и 11% соответственно относительно группы «интактные животные». Показатель ОШ достоверно увеличился практически в два раза. Коэффициент ОШ/ДК+ТК демонстрирует направленность процесса СРО в сторону накопления наиболее токсичных продуктов липопероксидации – ОШ, что свидетельствует о возможном разрушении мембранных структур печени и интенсификации процессов ПОЛ [5].

Установлено увеличение ОМБ на всех исследуемых длинах волн, как в плазме крови, так и в гомогенате печени крыс опытной группы по сравнению с группой интактные животные.

Таблица 2. Изменение показателя окислительной модификации белков в крови и гомогенатах печени крыс групп «интактные» и «опыт»

| нм | интактные, плазма | опыт, плазма | интактные, гомогенат | опыт, гомогенат |
|---|---|---|---|---|
| 356 | 0,16±0,04 | 0,99±0,08* | 0,16±0,02 | 0,30±0,15 |
| 363 | 0,17±0,03 | 1,15±0,23* | 0,16±0,03 | 0,25±0,09 |
| 370 | 0,16±0,04 | 1,15±0,22* | 0,16±0,04 | 0,29±0,12* |
| 430 | 0,04±0,01 | 0,50±0,10* | 0,10±0,01 | 0,79±0,46* |

*Примечание: * $p \leq 0,05$- достоверная разница опытной группы с интактной группой животных*

В соответствии с методикой, при 356 нм и 363 нм регистрируются алифатические альдегид-динитрофенилгидразоны нейтрального характера, которые определяют как ранние маркеры ОМБ, при 370 нм – алифатические кетон-динитрофенилгидразоны нейтрального характера, при 430 – алифатические альдегид- и кетондинитрофенилгидразоны основного характера, определяющиеся как поздние маркеры ОМБ [1]. Статистически значимо увеличились показатели ОМБ в плазме крови опытной группы при длине волны 356 нм (в 6 раз), 363 нм (в 6,7 раз), 370 нм (в 7 раз), 430 нм (в 12,5 раз) по сравнению с группой «интактные животные», а также значимо увеличились показатели ОМБ в гомогенате печени опытной группы при 370нм (в 2 раза), 430нм (в 8 раз) по сравнению с группой «интактные животные». Наибольшее увеличение карбонильных производных наблюдается при длине волны 430нм, что соответствует поздним маркерам ОМБ. Это свидетельствует об истощении резервно-адаптационных возможностей организма [2, 4].

## Заключение

Интенсивность перекисного окисления липидов в плазме крови и гомогенатах печени крыс при моделировании острой печеночной недостаточности была повышенной, что подтверждают полученные данные: наблюдался подъем уровня ДК, ТК и ОШ в плазме и гомогенатах печени относительно группы «интактные животные». Отмечено статистически значимое увеличение продуктов ОМБ, в частности, карбонильных производных, соответствующих поздним маркерам ОМБ, что говорит об интенсивном окислительном стрессе.

Полученные данные позволяют предположить, что разработанная модель острой печеночной недостаточности в экспериментальных исследованиях является применимой. При внутрибрюшинном введении 0,12 г/кг инъекционного раствора парацетамола происходит патологическая активация процессов свободнорадикального окисления и развитие оксидативного стресса.

## Список литературы

1. Губский Ю.И. с соавт. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) // Современные проблемы токсикологии. 2005. №3. С. 20-26.
2. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительные модификации белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопросы медицинской химии. 1995. Т. 41. № 1. С. 24–26.
3. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток / Е.Е. Дубинина. СПб. : Мед. пресса, 2006. 396 с.
4. Дубинина Е.Е., Шугалей И.В. Окислительная модификация белков // Успехи современной биологии. 1993. Т. 113, Вып.1. С. 71 - 81.
5. Овсепян Л.М., Захарян Г.В., Казарян Г.С. Исследование перекисного окисления белков и липидов при острой гипоксии // Биологический журнал Армении. 2010. Т. 62 (3). С. 42-45.

# АНТИОКСИДАНТНЫЕ И ПРООКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ БЕТУЛИНА

О.А. Воробьева, Д.С. Малыгина, А.Г. Соловьева, К.Л. Беляева,

Е.В. Грубова, Н.Б. Мельникова

*ФГБОУ ВО "Приволжский исследовательский медицинский университет"*

*Минздрава России, Нижний Новгород*

**Abstract**

In this work, the effect of triterpenoids of the lupane series — betulin, allobetulin, betulin diacetate, betulonic acid and betulin diphosphate, on the processes of lipoperoxidation and energy metabolism in in vitro blood experiments in rats was evaluated. Chemiluminescence method and MDA level estimation have shown that only betulin diphosphate at a dose of 10 μg had a direct antioxidant effect on LPO in plasma, while the other triterpenoids showed the ability to act as a prooxidant and an antioxidant that depends on the dose. The action of all triterpenoids led to a significant increase in SOD activity both in plasma and in erythrocytes. In the same time, the activity of LDH in the direct and reverse reactions increased that means the improving of energy metabolism in erythrocytes.

*Key words:* lupan triterpenoids, LPO, superoxide dismutase, malonic dialdehyde, lactate dehydrogenase, *in vitro* experiment

В работе оценены влияние тритерпеноидов лупанового ряда – бетулина, аллобетулина, бетулина диацетата, бетулоновой кислоты и дифосфата бетулина на процессы липопероксидации и энергетического метаболизма в экспериментах *in vitro* на крови крыс. Методом хемолюминесценции и по уровню МДА в плазме показано, что прямым антиоксидантным действием по отношению к ПОЛ обладает только дифосфат бетулина в дозе 10 мкг, тогда как остальные тритерпеноиды демонстрировали способность действовать как прооксиданты, так и антиоксиданты в зависимости от дозы. Действие всех тритерпеноидов приводило к существенному увеличению активности СОД как в плазме, так и в эритроцитах. Применение тритерпеноидов повышало энергетический обмен в эритроцитах: активность ЛДГ в прямой и обратной реакции увеличивалась.

*Ключевые слова:* тритерпеноиды лупанового ряда, ПОЛ, супероксиддисмутаза, малоновый диальдегид, лактатдегидрогеназа, эксперимент in vitro

## Введение

Тритерпеноиды лупанового ряда – бетулин и бетулиновая кислота, проявляют широкий спектр биологической активности, главным образом, по ослаблению прогрессирования и тяжести рака [4, 7, 11, 14, 15, 20, 25], сердечно-сосудистых и сопряженных с ними заболеваний – диабета, атеросклероза,

ожирения [4, 5, 7, 20], а также вирусных заболеваний [1, 8]. В ряде работ показаны противовоспалительные и ранозаживляющие свойства [8, 9, 12, 20, 21]. Интерес к этим веществам обусловлен, в первую очередь, их низкой токсичностью по отношению к здоровым клеткам и высокой селективностью воздействия на опухолевые клетки. Во-вторых, эти тритерпеноиды относительно легко выделяются из возобновляемого растительного сырья (порядка 200 наименований растений, в том числе бересты березы).

В последние годы происходит переосмысление многих предлагаемых механизмов воздействия бетулина, бетулиновой кислоты и их производных при лечении различных заболеваний [7, 15, 17].

В этом плане показательными, но противоречивыми являются данные по механизму и подтверждению антибактериальной активности бетулина и бетулиновой кислоты [23]. Работой авторов доказано, что антибактериальная активность в отношении E.coli, P.aeruginosa, St.aureus этих соединений обусловлена усилением оксидативного стресса за счет увеличения продукции супероксид-анионных радикалов и увеличения отношения $NAD^+$/NADH в бактериальных клетках, что, в конечном счете, приводит к гибели бактерий [23]. Прооксидантный эффект подтверждался повышением уровня малонового диальдегида (МДА) в бактериальных клетках, при этом соотношение восстановленного и окисленного глутатиона характеризует усиление антиоксидантной активности редокс-ферментов.

Бетулин и его производные оказывают ингибирующие эффекты по отношению к монооксиду азота и способствуют противовоспалительному и противоязвенному действию [7].

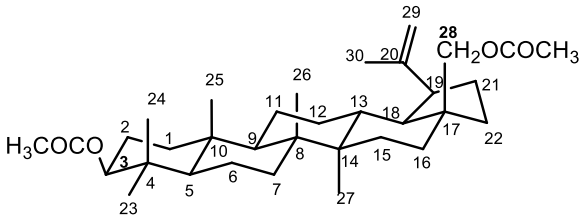
Усиление генерации активных форм кислорода после обработки бетулином (прооксидантный эффект) было отмечено в эксперименте на клеточных линиях SGC7901 рака желудка [17]. Внутриклеточные активные формы кислорода (АФК) выполняют важную функцию при внутриклеточном апоптозе, т.е. увеличивают проницаемость митохондрий и, следовательно, высвобождают митохондриальные апоптотические белки (Simon et al. 2000; Davis et al. 2001; Zorov et al. 2006). Уровни АФК значительно увеличивались в бетулин-обработанных клетках SGC7901 в зависимости от дозы и времени. В свою очередь это приводило к усилению апоптоза и ингибированию различных каспаз. Следовательно, в результате взаимодейстаия бетулина с опухолевыми клетками, он запускает внутриклеточную генерацию АФК, а затем подавляет антиапоптотические белки.

Таким образом, многочисленные данные свидетельствуют о важности изучения антиоксидантной или прооксидантной функций бетулина и бетулиновой кислоты для понятия механизма их действия при лечении различных заболеваний.

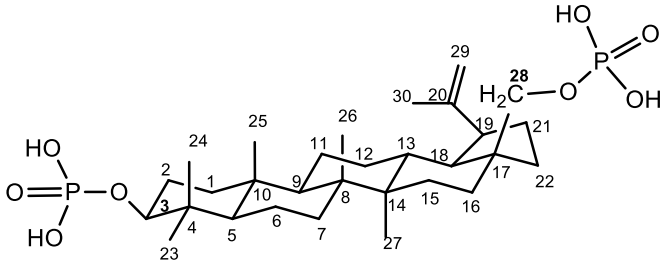
В настоящей работе нами исследованы антиоксидантные свойства производных бетулина – бетулина диацетата (ДАБ), бетулина дифосфата (ДФБ), аллобетулина (АБ) и бетулоновой кислоты (БонК), в экспериментах *in vitro* на крови крыс. Действие бетулина оценивалось методами биохемилюминесценции,

по уровню малонового диальдегида в плазме крови и на эритроцитах, по уровню лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакциях.

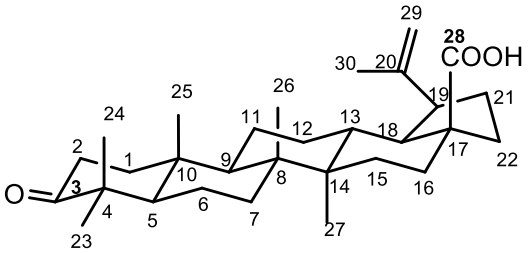
Выбранные тритерпеноиды различались по гидрофильно-липофильному соотношению, их липофильность уменьшалась в ряду: ДАБ>АБ≈Б>БонК>ДФБ.



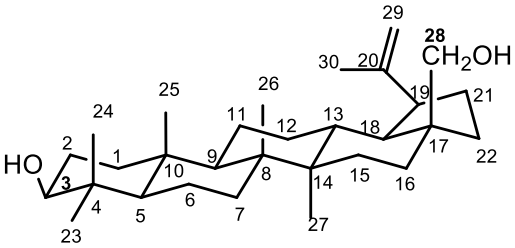

бетулина диацетата (ДАБ)



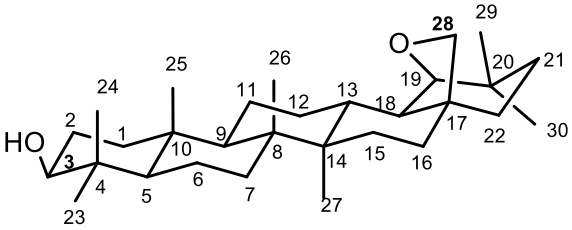

бетулина дифосфат (ДФБ)




бетулоновая кислота (БонК)




бетулин (Б)




аллобетулин (АБ)

**Материалы и методы**

Бетулин ($C_{30}H_{50}O_2$), чистота 99.5% (ВЭЖХ), получали из бересты березы повислой (бородавчатой) – *Betula Pendula Roth* в соответствии с методикой Кислицина А.Н. Производные бетулина – аллобетулин, бетулоновую кислоту, бетулина диацетат, бетулина дифосфат синтезировали по известным методикам [2, 3, 18, 19]. Физико-химические константы всех соединений соответствовали литературным данным. ИК-спектры были сняты на ИК-спектрофотометре с преобразователем Фурье «IR Prestige-21» (Shimadzu, Japan) в области 4000-400 $см^{-1}$ в виде смесей с KBr; ВЭЖ-хроматограммы были получены на ВЭЖ-хроматографе «LC-20Avp» (Shimadzu, Japan) в обращено-фазовом режиме, термостатом колонки Discovery C18 (25 cm x 4.6 mm, 5 µm, Supelco) при 40±1°C и детектированием при 210 нм. Подвижная фаза: ацетонитрил – вода (90 : 10, об.%), скорость потока – 1,0 мл/мин. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Спектры ЯМР $^{13}C$, $^{1}H$, $^{31}P$ регистрировались на ЯМР-спектрометре «Jeol JNM-ECX400» (Jeol Ltd., Japan) в DMSO-$d_6$, $CDCl_3$ и $D_2O$ на рабочей частоте 101, 400 и 202,46 МГц соответственно.

*Исследования in vitro.* Для исследований использовали кровь, стабилизированную цитратом натрия (1:9). К цельной крови добавляли растворы производных бетулина в концентрациях 2, 5, 10 мкг / 10 мл. Эритроциты двукратно отмывали в 0.9% NaCl путем центрифугирования 10 мин при 1600g. Интенсивность ПОЛ определяли по уровню содержания вторичного продукта СРО – малонового диальдегида (MDA) – в плазме и эритроцитах методом M.Uchiyama, M.Mihara. Активность СОД (SOD, EC 1.15.1.1) определяли в гемолизате отмытых эритроцитов (1:10) по ингибированию образования продукта аутоокисления адреналина по методике Т.В. Сироты. Активность лактатдегидрогеназы (LDH, EC 1.1.1.27) определяли в гемолизате отмытых эритроцитов (1:40). Каталитические свойства ЛДГ в прямой реакции ($ЛДГ_{пр}$) оценивали с использованием в качестве субстрата 50 мМ лактат натрия, в обратной реакции ($ЛДГ_{обр}$) – с использованием 23 мМ пируват натрия. Расчет удельной активности ферментов осуществляли по концентрации белка, анализируемого модифицированным методом Лоури.

Хемилюминесцентный анализ проб, индуцированных по реакции Фентона, на общую антиоксидантную активность проводили на приборе БХЛ-06 (Россия). Фиксировали величины: $I_{max}$ (mV), характеризующий максимальную вспышку хемилюминесценции; S (mV) – суммарная хемилюминесценция за 30 сек; $tg\alpha_2$, показывающий скорость нормализации процессов свободно-радикального окисления; $I_{max}/S$ – фактор антиоксидантной активности. АОА – общую антиоксидантную активность, рассчитывали как величину отношения $tg\alpha_2$образца/$tg\alpha_2$контроля (в процентах).

Статистическую обработку проводили в программе Statistica 7,0.

**Результаты работы и их обсуждение**

Уровень липопероксидации в плазме под действием бетулина и его производных – аллобетулина (АБ), бетулоновой кислоты (БонК), бетулина диацетата (ДАБ), в дозах 10 и 5 мкг возрастал (рис. 1 a,b) и практически не изменялся в дозе 2 мкг (рис. 1, c). Снижение уровня ПОЛ отмечалось только для бетулина дифосфата (ДФБ) в дозах 10 и 2 мкг. На рисунке 1 указаны данные в процентах от контроля.

Рассчитанный по данным биохемилюминесценции уровень общей антиоксидантной активности (ОАА) изучаемых тритерпеноидов в дозах 10 и 2 мкг увеличился незначительно (рис. 2 a, c). Более значимые изменения в уровне ОАА наблюдались для тритерпеноидов в дозе 5 мкг (рис. 2 b).

Влияние тритерпеноидов на уровень липопероксидации в эритроцитах незначительно, за исключением ДАБ в дозе 10 мкг, инициирующего значительный люминесцентный ответ (рис. 3).

Характер изменения относительной концентрации МДА в плазме крови под действием тритерпеноидов был дозозависимым. Значительное снижение уровня МДА в плазме наблюдалось для ДФБ до 55% в дозе 10 мкг, бетулина до 25% в дозе 2 мкг, а также для БонК до 55% в дозе 2 мкг (рис. 4).

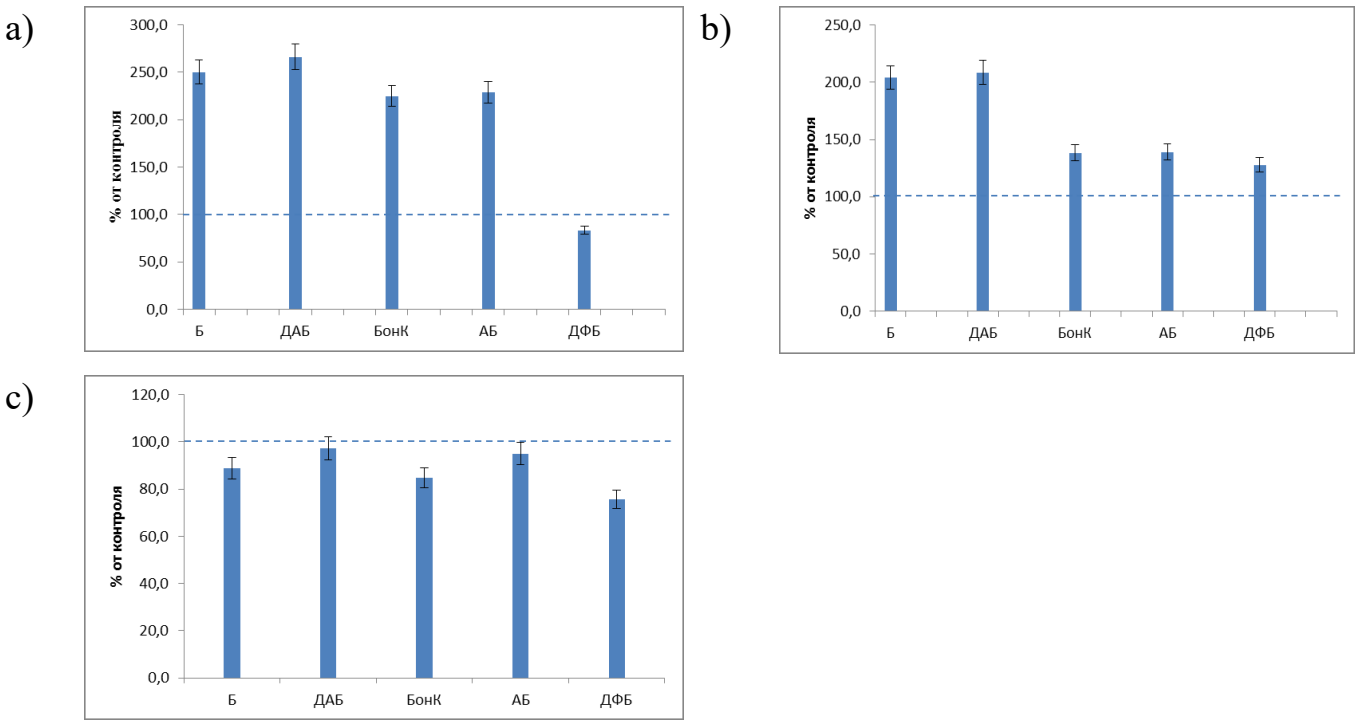



Рис. 1. Уровень липопероксидации в плазме крови при разных дозах под действием бетулина и его производных, в % от контроля: a) 10 мкг; b) 5 мкг; c) 2 мкг ($p<0,05$).

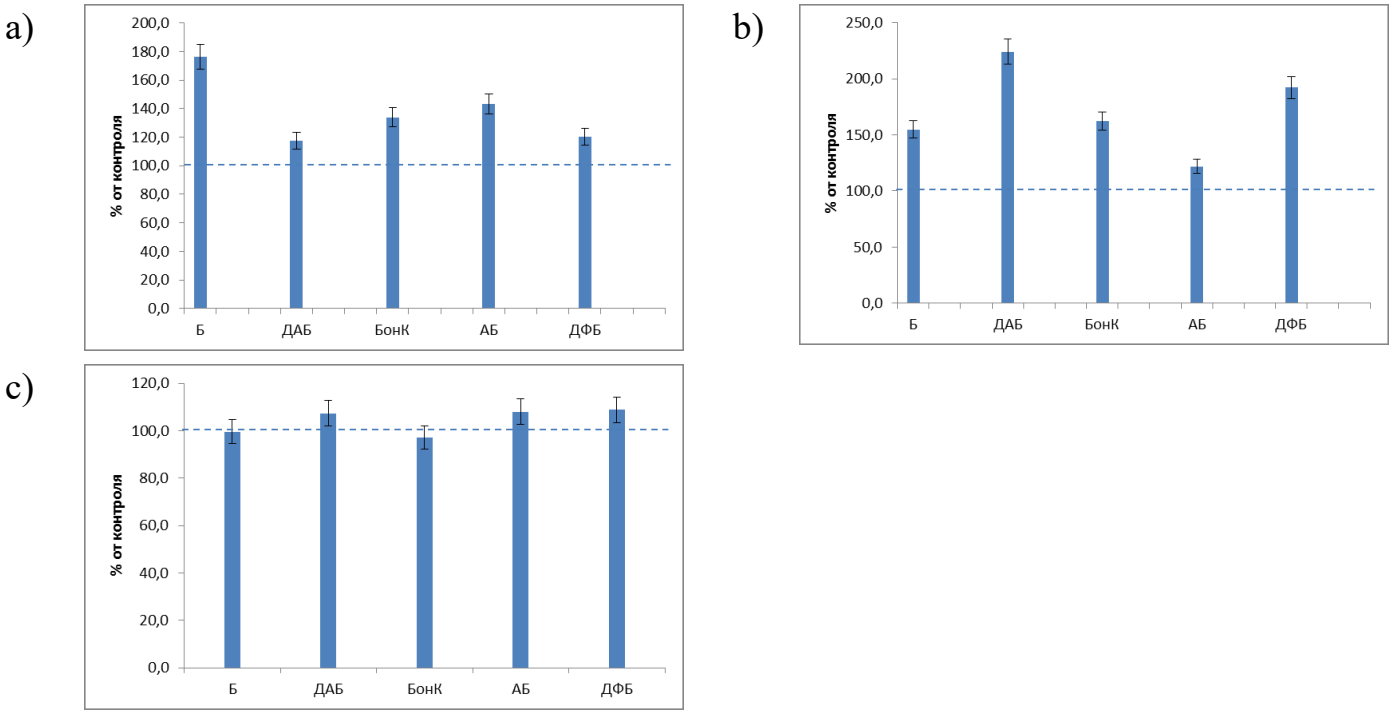



Рис. 2. Уровень общей антиоксидантной активности в плазме при разных уровнях концентраций, в % от контроля: a) 10 мкг; b) 5 мкг; c) 2 мкг ($p<0,05$)

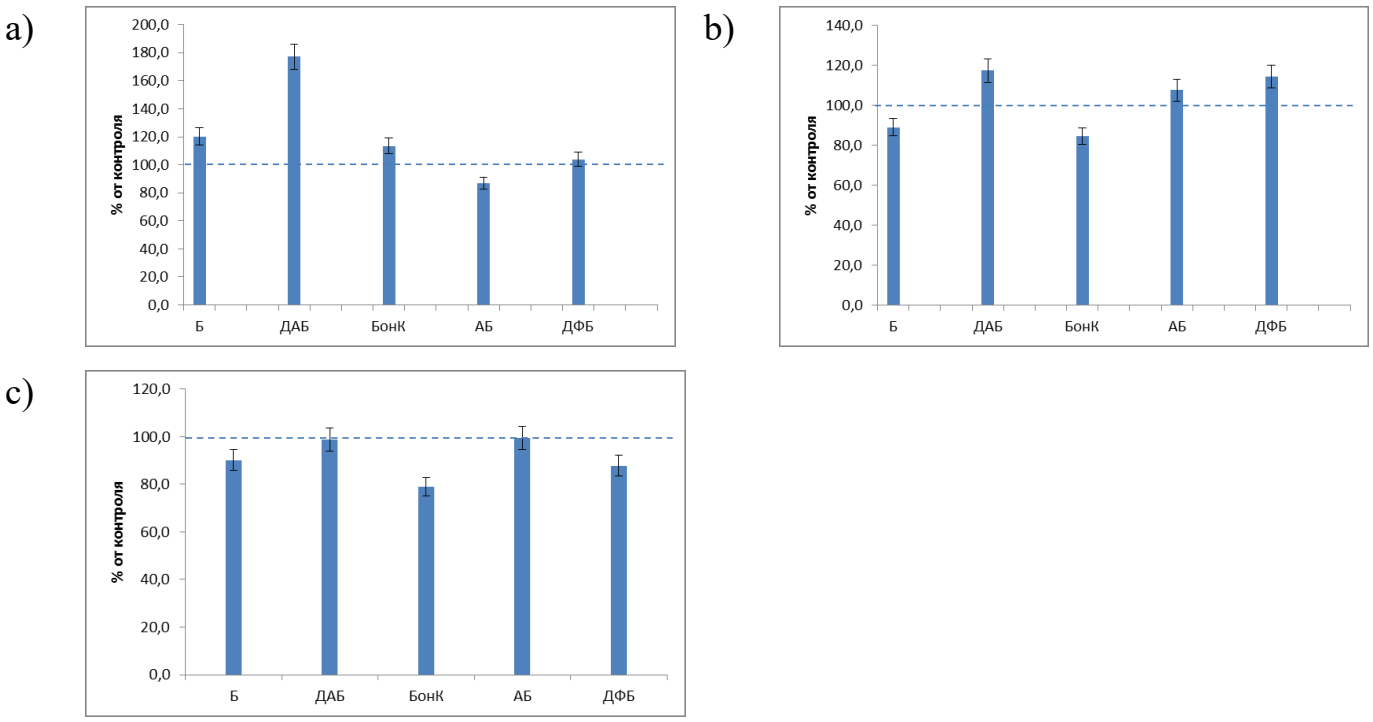



Рис. 3. Уровень липопероксидации в эритроцитах крови при разных дозах под действием бетулина и его производных, в % от контроля: a) 10 мкг; b) 5 мкг; c) 2 мкг (p<0,05)

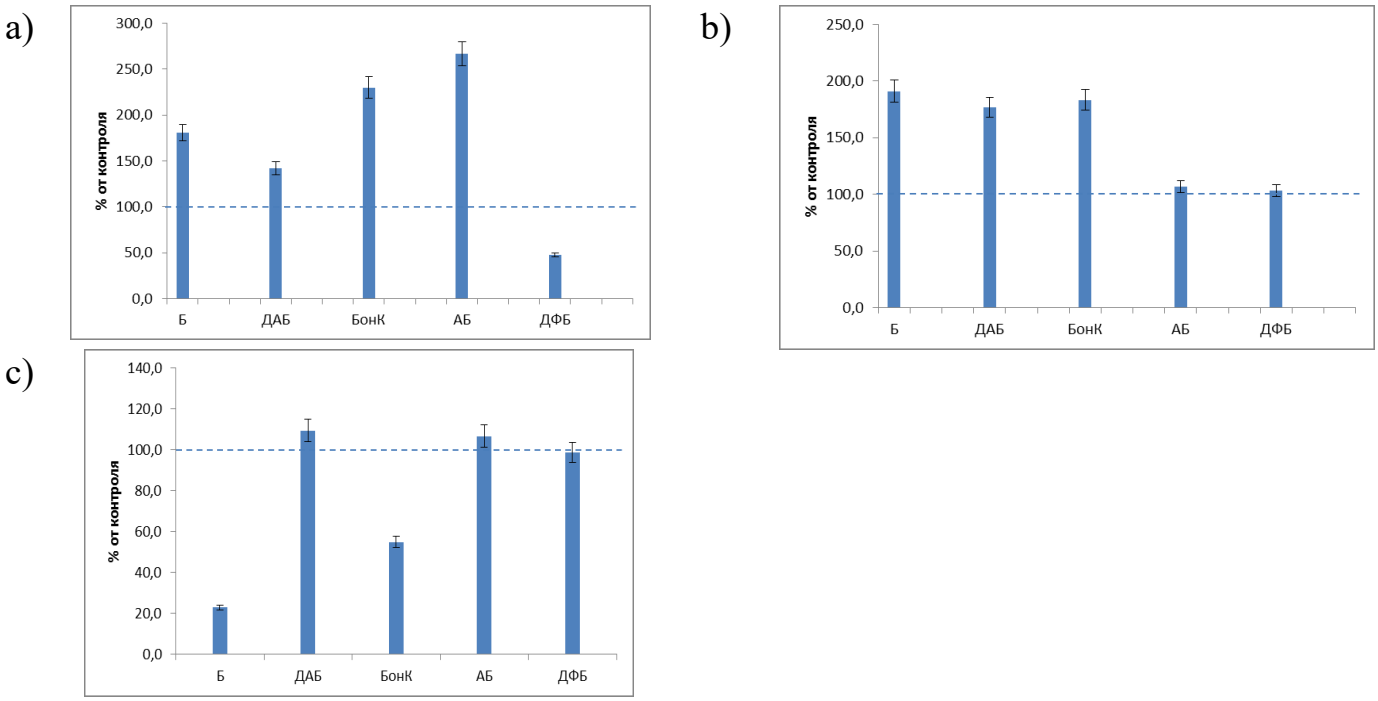



Рис. 4. Уровень малонового диальдегида в плазме крови при разных дозах под действием бетулина и его производных, в % от контроля: a) 10 мкг; b) 5 мкг; c) 2 мкг (p<0,05)

Влияние тритерпеноидов на уровень МДА в эритроцитах имело дозозависимый характер (рис. 5). В дозе 2 мкг применение всех тритерпеноидов вызывало снижение уровня МДА почти на 40-60% (рис. 5 c), а в дозе 5 мкг исключение составил ДАБ, под действием которого уровень МДА увеличился на

10%. Концентрация МДА в эритроцитах в дозе 10 мкг практически не изменялась, за исключением аллобетулина, для которого отмечалось снижение уровня МДА на 50%.

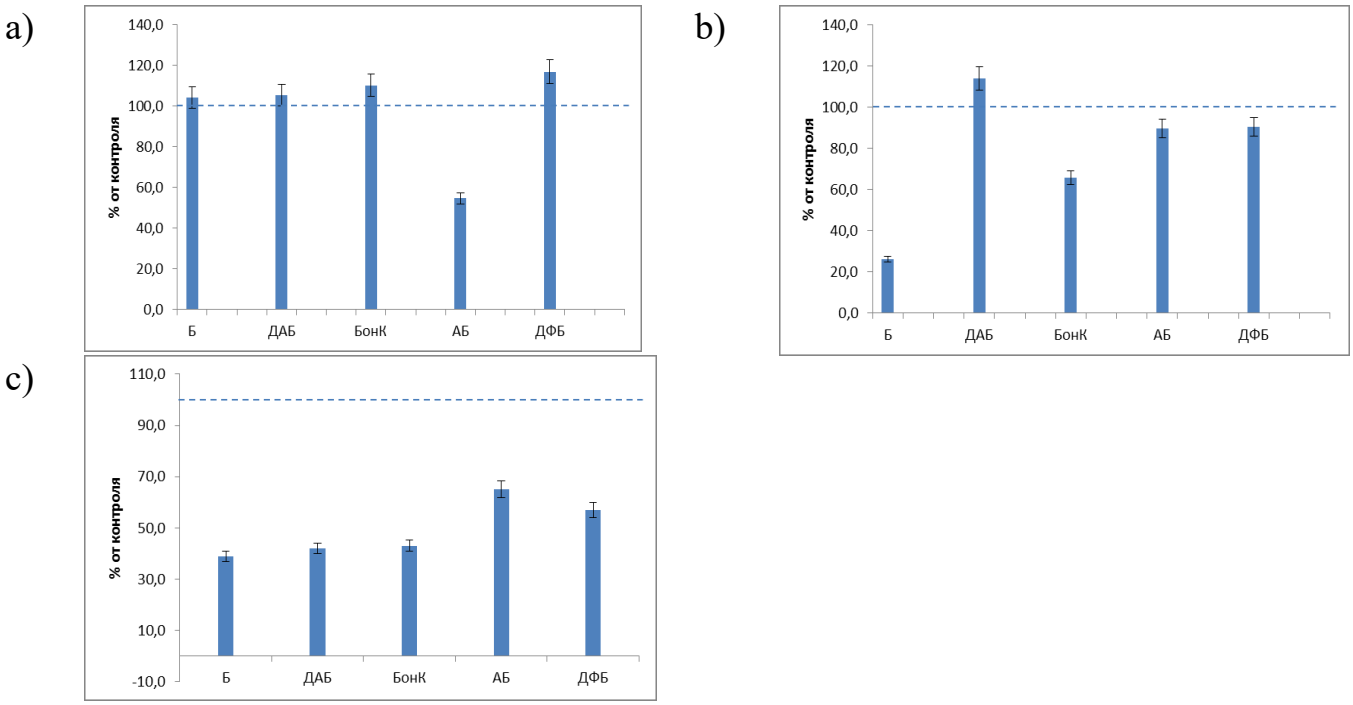



Рис. 5. Уровень малонового диальдегида в эритроцитах крови при разных дозах под действием бетулина и его производных, в % от контроля: a) 10 мкг; b) 5 мкг; c) 2 мкг($p<0,05$)

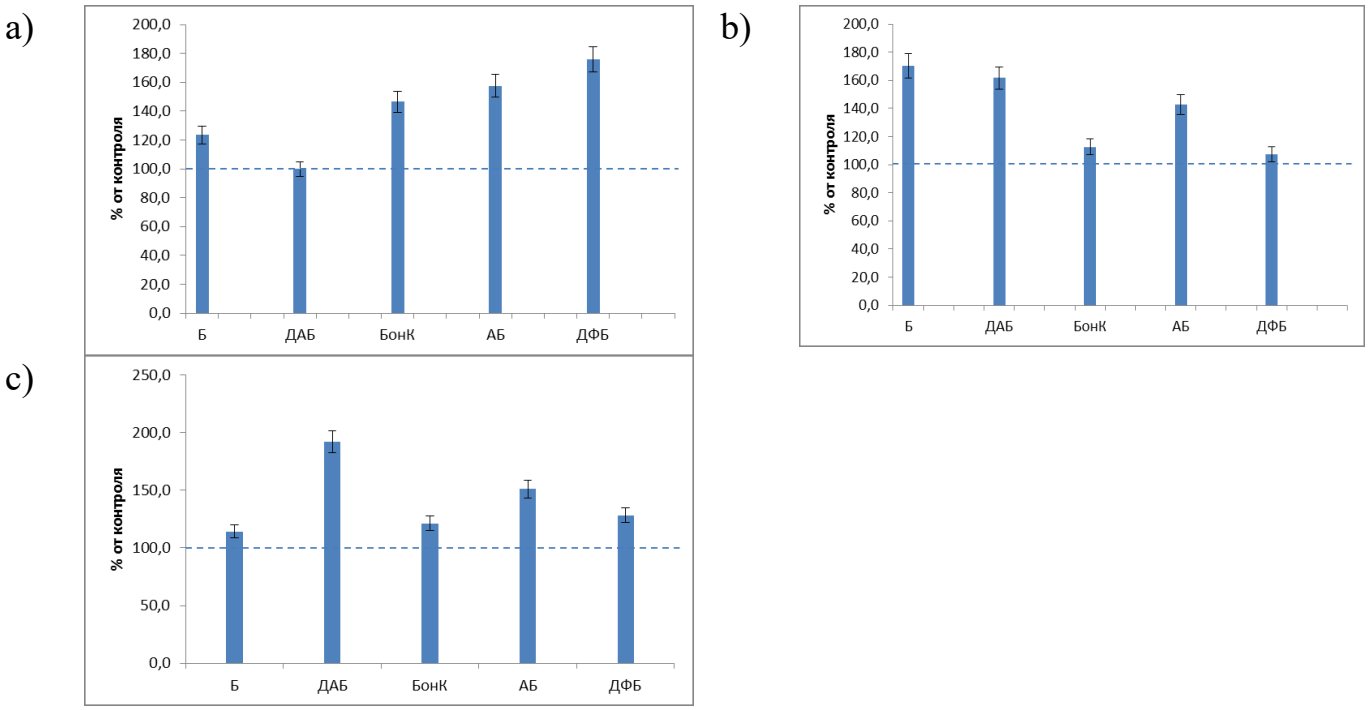



Рис. 6. Уровень супероксиддисмутазы в крови при разных дозах под действием бетулина и его производных, в % от контроля: a) 10 мкг; b) 5 мкг; c) 2 мкг ($p<0,05$)

Активность СОД возрастала под действием тритерпеноидов также дозозависимо: от 25% (Б) до 45% (БонК) и до 50-75% (АБ и ДФБ, соответственно) в дозе 10 мкг. В дозе 5 мкг активность СОД возрастала на 60-70% (бетулин и ДАБ), на 35% (АБ) и почти не изменялась для БонК и ДФБ (рис. 6). Максимальное воздействие на активность СОД оказал ДАБ в дозе 2 мкг (увеличение активности на 92%).

В целом, можно отметить, что тритерпеноиды в плазме крови проявляют прооксидантные свойства, усиливая процессы липопероксидации, что, вероятно, стимулирует антиоксидантную защиту, проявляющуюся в увеличении активности СОД. Эти результаты согласуются с данными по влиянию бетулина на оксидативный стресс в воспалительном процессе в легких в эксперименте на мышах на модели хронической обструктивной болезни легких, вызванной сигаретным дымом [9]. В процессе воспаления оксидативный стресс вызывал снижение активности СОД и каталазы, а также повышение уровня МДА. Корректирующая роль бетулина, получаемого перорально в разных дозах, заключалась в существенном снижении уровня МДА и повышении активности ферментов (воспаление + действие бетулина) по сравнению с контролем (только воспаление без действия бетулина) в сыворотке крови и в тканях легкого. Снижение оксидативного стресса под действием бетулина и его производных может привести к ингибированию противовоспалительных цитокинов, как это было показано в работе [9].

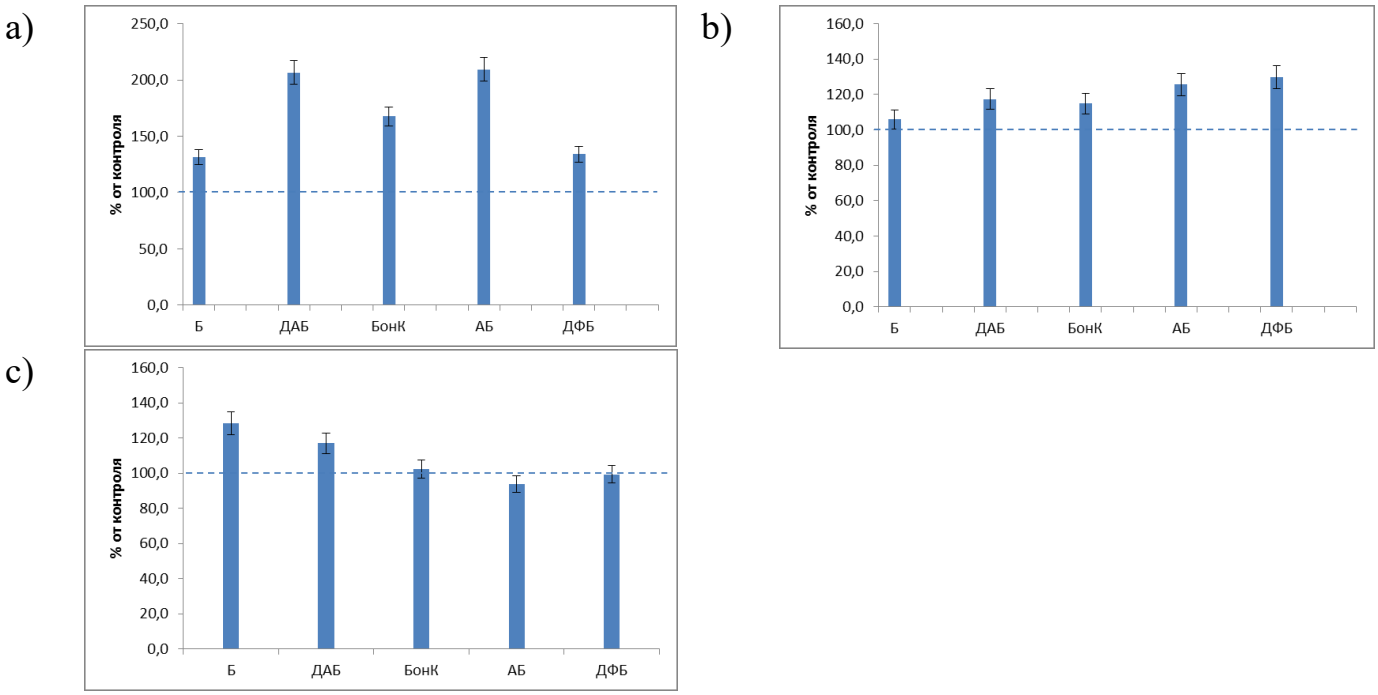



Рис. 7. Изменение уровня лактатдегидрогеназы в прямой реакции при разных дозах под действием бетулина и его производных, в % от контроля: a) 10 мкг; b) 5 мкг; c) 2 мкг ($p<0,05$)

В нашем эксперименте применение тритерпеноидов в дозе 10 мкг повысило энергетический обмен эритроцитов: активность ЛДГ в прямой реакции возросла

почти вдвое под действием ДАБ и АБ. В остальных дозах влияние тритерпеноидов на прямую реакцию незначительно (рис. 7).

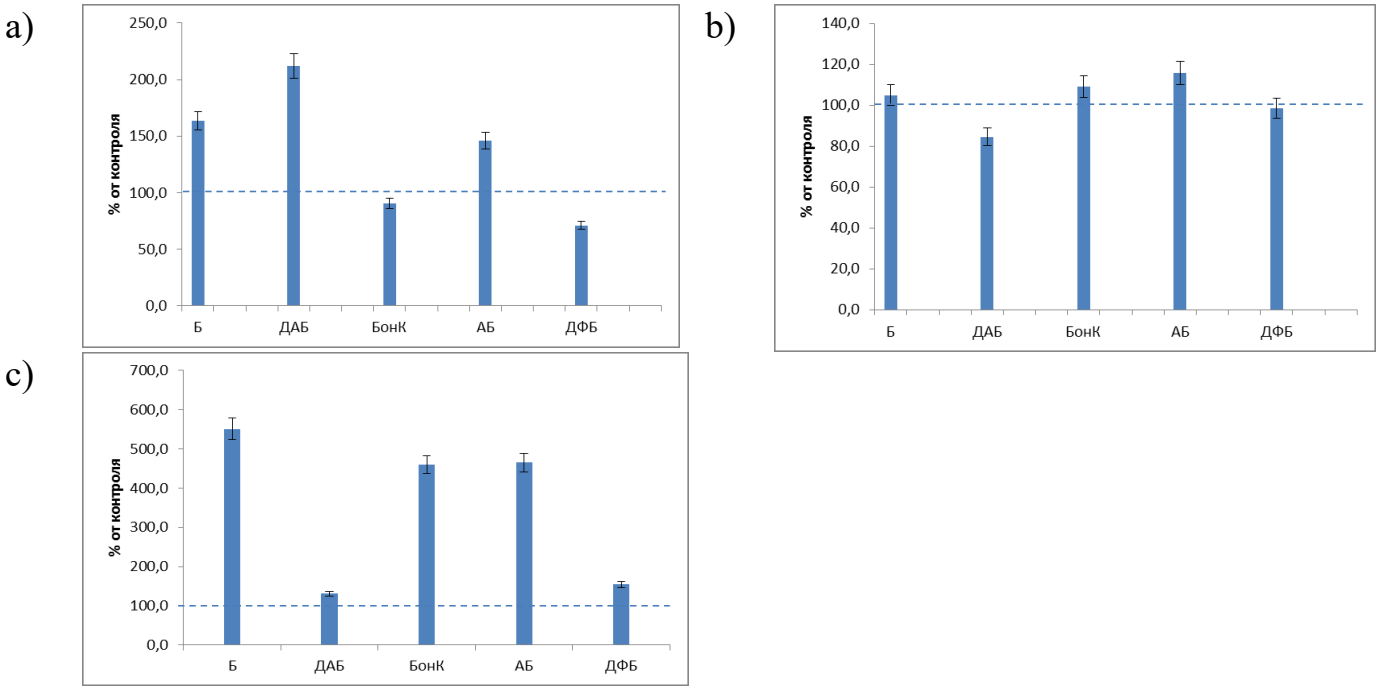



Рис. 8. Изменение уровня лактатдегидрогеназы в обратной реакции при разных дозах под действием бетулина и его производных, в % от контроля: a) 10 мкг; b) 5 мкг; c) 2 мкг ($p<0,05$)

Активность $ЛДГ_{обр}$ увеличилась под воздействием тритерпеноидов в дозе 2 мкг на 450% для бетулина, на 350% для БонК и АБ по сравнению с активностью $ЛДГ_{обр}$ интактных крыс, что способствует увеличению содержания молочной кислоты, которая образуется преимущественно М-формой ЛДГ ($ЛДГ_{обр}$) и свидетельствует о преобладании анаэробных процессов в эритроцитах.

Полученные нами данные по энергетическому метаболизму с участием ЛДГ общепринято объяснять, привлекая либо эффект Пастера, объединяющий процессы гликолиза и дыхания, либо эффект Варбурга [6, 10, 13, 22, 24]. Эффект Пастера особенно значим для опухолевых клеток. Так, в соответствии с представлениями Пастера прекращение образования лактата в аэробных условиях происходит по глицерофосфатному челночному механизму в процессах гликолиза и дыхания в раковых клетках [6, 16]. Гликолитические ферменты и митохондриальные системы раковых клеток ничем не отличаются от нормальных, однако, способы объединения процессов гликолиза и дыхания в нормальных и раковых клетках, по-видимому различаются. Это выражается в том, что в процессе дыхания большинство раковых клеток, в отличие от нормальных клеток, накапливают значительное количество лактата, даже в условиях полного обеспечения кислородом и высокой скорости дыхания. Было показано, что причиной этого является недостаток цитоплазматической глицерофосфат-дегидрогеназы, а глицерофосфатный челночный механизм не может эффективно функционировать. Не имея возможности окислять NADH митохондриальным путем, раковые клетки реокисляют NADH за счет пирувата

при помощи ЛДГ; при этом в аэробных условиях накапливается лактат, хотя цикл трикарбоновых кислот и цепь переноса электронов функционируют в раковых клетках с нормальными скоростями, характерными для аэробных условий. Соответственно, для опухолевых клеток сдвиг в сторону обратной реакции является благоприятным.

Эффект Варбурга предполагает активный гликолиз в раковых клетках с последующим образованием молочной кислоты, а не медленный гликолиз и окисление пирувата в митохондриях с использованием кислорода как в большинстве нормальных клеток. Исследование *in vitro* на здоровых неопухолевых эритроцитах не дает возможность выявить эффект Варбурга. Однако, повышение активности $ЛДГ_{обр}$ в опухолевых клетках в экспериментах *in vivo* на мышах, может приводить к повышению содержания молочной кислоты, то есть к проявлению эффекта Варбурга. В настоящее время установлено, что энергетический метаболизм опухолевых клеток определяется балансом между гликолизом и окислительным фосфорилированием, тогда как проявление «чистого гликолиза по Варбургу» в опухолевых клетках опровергнуто [6, 24].

Способность препаратов активировать энергетический метаболизм в нормальных клетках как по пути гликолиза, так и окислительного фосфорилирования (увеличение активности $ЛДГ_{пр}$ и $ЛДГ_{обр}$) (рис. 7 и 8) может являться предпосылкой для эффективного действия изучаемых тритерпеноидов на опухолевые клетки. Мы полагаем, что метаболическая пластичность под действием может влиять на физиологию опухоли *in vivo* и являться элементом метаболической терапии для лечения опухолей.

**Заключение**

Таким образом, учитывая способность изучаемых тритерпеноидов активно выступать в роли как антиоксиданта, так и прооксиданта, активизировать ферментную активность СОД и ЛДГ, способствующую нормализации энергетического метаболизма, как по пути гликолиза, так и окислительного фосфорилирования, можно предположить эффективность действия этих соединений как компонентов фармакотерапии при лечении онкологических заболеваний.

## Список литературы

1. Абышев А.З., Абышев Р.А., Нгуен В.Х., Морозова В.А. Производные бетуленола как перспективные анти-ВИЧ агенты // Медицинский академический журнал. 2013. Том 13, №2. С. 15-32.

2. Кислицын А.Н., Трофимов А.Н. Способ получения аллобетулина Пат. 2174126 Российская Федерация. 2001.

3. Пегова Р.А., Гуленова М.В., Жильцова О.Е., Клабукова И.Н., Мельникова Н.Б. Препаративный синтез диацетата и сукцинатов бетулина – потенциальных фармацевтических субстанций гиполипидемического действия // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015. №10. С. 304-310.

4. Толстиков Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э., Балтина Л.А., Толстиков А.Г. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность // Химия в интересах устойчивого развития. 2005. №13. С. 1-30.

5. Alqahtani A., Hamid K., Kam A., Wong K.H., Abdelhak Z., Razmovski-Naumovski V., Chan K., Li K.M., Groundwater P.W., Li G.Q. The Pentacyclic Triterpenoids in Herbal Medicines and Their Pharmacological Activities in Diabetes and Diabetic Complications // Curr. Med. Chem. 2013. Vol. 20, №7. P. 908-931.

6. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. Metabolic flexibility and cell hierarchy in metastatic cancer// Mitochondrion. 2010. Vol.10, №6. P. 584–588.

7. Boparai A., Niazi J., Bajwa N., et al. Betulin a pentacyclic tri–terpenoid: an hour to rethink the compound // J. Trans. Med. Res. 2017. №1. P. 53-59.

8. Brezáni V., Leláková V., Hassan She T. S., Berchová-Bímová K., Nový P., Klouˇcek P., Maršík P., Dall'Acqua S., Hošek J. and Šmejkal K. Anti-Infectivity against Herpes Simplex Virus and Selected Microbes and Anti-Inflammatory Activities of Compounds Isolated from Eucalyptus globules Labill // Viruses. 2018. №10. P. 360.

9. Chunhua M., Hongyan L., Weina Z., Zheng L., Jie R., Yajie Z., Yarui W . Betulin inhibited cigarette smoke-induced COPD in mice // Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017. №85. P. 679–686.

10. Diaz-Ruiz R., Rigoulet M., Devin A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression // Biochim. Biophys. Acta. 2011. P. 568–576.

11. Drąg‑Zalesińska M., Drąg M., Poręba M., Borska S., Kulbacka J. and Saczko J. Anticancer properties of ester derivatives of betulin in human metastatic melanoma cells (Me‑45) // Cancer. Cell. Int. 2017. Vol. 17. №4. P. 1-7.

12. Ekuadzi E., Biney R.P., Benneh C.K., Amankwaa B.O., Jato J. Antiinflammatory properties of betulinic acid and xylopic acid in the carrageenan - induced pleurisy model of lung inflammation in mice // Phytotherapy Research. – 2017. Vol. 32, №3. P. 480-487.

13. Fantin V.R., St-Pierre J., Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance // Cancer Cell. 2006. №9. P. 425-434.

14. Hordyjewska A., Ostapiuk A., Horecka A. Betulin and betulinic acid in cancer research // Journal of Pre-Clinical and Clinical Research. 2018. №2. P. 72-75.

15. Król S.K., Kiełbus M., Rivero-Müller A., Stepulak A. Comprehensive review on betulin as a potent anticancer agent // Biomed. Res. Int. 2015. P. 1-11.

16. Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. Principles of Biochemistry. 2nd ed. New York (NY): Worth Publishers, 1993. Vol. 2. P. 542–549.

17. Li Y., Liu X., Jiang D., Lin Y., Wang Y., Li Q., Liu L., Hua Y. Betulin induces reactive oxygen species-dependent apoptosis in human gastric cancer SGC7901 cells Jin // Arch. Pharm. Res. 2016. №39. P.1257-1265.

18. Melnikova N.B., Malygina D.S., Klabukova I.N., Belov D.V., Vasin V.A., Petrov P.S., Knyazev A.V., Markin A.V. Betulin-3,28-diphosphate. Physico-Chemical Properties and In Vitro Biological Activity Experiments // Molecules. 2018. №23. P. 1-14.

19. Melnikova N., Pegova R., Zhiltsova O., Kiseleva T., Klabukova I., Gulenova M., Vasin V., Tanaseychuk B. Potential Effective Lipid-Lowering Medicine – Betulonic Acid Mild Selective Synthesis and Pharmacological Activity // International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2015. Vol. 34, №2. P. 256-264.

20. Meng Q., Zhou X., Liu L., Fu S. Research Progress in the Promissing Natural Product-Betulin // Biomed. J. Sci. & Tech. Res. 2018, Vol. 8, №2. P. 1-6.

21. Mesaik A.M., Poh H.W., Bin O.Y., Elawad I., Alsayed B. In Vivo Anti-Inflammatory, Anti-Bacterial and Anti-Diarrhoeal Activity of Ziziphus Jujuba Fruit Extract // Macedonian Journal of Medical Sciences. 2018. №6. P. 757-766.

22. Moreno-Sa´nchez R., Rodrı´guez-Enrı´quez S., Marı´n-Herna´ndez A., Saavedra E., Energy metabolism in tumor cells // FEBS J. 2007. №274. P. 1393-1418.

23. Oloyede H.O.B., Ajiboye H.O., Salawu M.O., Ajiboye T.O. Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic acid and ursolic acid // Microb Pathog. 201 . №111. P. 338-344.

24. Zheng J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review) // Oncol Lett. 2012. №4. P. 1151–1157.

25. Xu T., Pang Q., Wang Y., Xiufeng Y. Betulinic acid induces apoptosis by regulating PI3K/Akt signaling and mitochondrial pathways in human cervical cancer cells // International journal of molecular medicine. 2017. №40. P. 1669-1678.

# ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНГАЛЯЦИОННОГО ПРИМЕНЕНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ОКСИДА АЗОТА ПРИ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

А.К. Мартусевич[1], А.В. Дмитроченков[1], Л.К. Ковалева[2],

А.В. Разумовский[1]

[1]*ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород*

[2]*ФГБОУ ВО «Кубанский ГМУ» Минздрава России, Краснодар*

**Abstract**

Specialties of crystallogenic properties of rats' blood serum were estimated during correction of experimental thermal trauma with inhalations of reactive oxygen species and nitric oxide. It was stated that inhalation of singlet oxygen caused maximal activation of blood serum crystallogenic activity, and nitric oxide had a lower effect on this parameter.

**Key words:** thermal trauma, metabolic rehabilitation, singlet oxygen, NO

Изучены особенности кристаллогенных свойств сыворотки крови при коррекции экспериментальной термической травмы с использованием ингаляций активных форм кислорода и NO. Установлено, что ингаляции синглетного кислорода способствуют максимальному повышению кристаллогенной активности биосреды по сравнению с другими факторами метаболической реабилитации, а применение оксида азота менее существенно усиливает данный параметр.

**Ключевые слова:** термическая травма, метаболическая реабилитация, синглетный кислород, оксид азота

В настоящее время активно развиваются медицинские технологии, основанные на применении биорадикалов (активных форм кислорода, оксида азота и др.) [1, 4, 5]. Имеются сведения об их эффективности при купировании различной патологии в эксперименте и клинике. В частности, нами показано благоприятное влияние указанных физических факторов на параметры энергетического и окислительного метаболизма крови и тканей при экспериментальной термической травме [3]. Продемонстрирована возможность использования этих методов в клинических условиях [1], однако механизмы реализации эффекта данных лечебных воздействий изучены недостаточно полно. Кроме того, можно предположить наличие особенностей модуляции функционально-метаболического статуса организма при действии различных активных форм кислорода и монооксида азота, на что, в частности, указывает формирование различного ответа на применение разных форм NO.

Следовательно, целесообразно проведение сравнительного анализа влияния рассматриваемых биорадикалов на метаболические параметры крови и тканей. В связи с этим **целью настоящей работы** явилось установление особенностей модификации кристаллогенных свойств сыворотки крови при коррекции экспериментальной термической травмы с использованием ингаляций активных форм кислорода и оксида азота.

## Материал и методы исследования

Эксперимент выполнен на 50 половозрелых крысах-самцах линии Вистар, разделенных на 5 равных групп. Животным первой (интактной) группы не проводили никаких манипуляций, кроме однократного взятия образцов крови. Крысам второй (контрольной) и третьей-пятой (основных) групп наносили комбинированную термическую травму с использованием собственной модели, включавшей контактный термический ожог спины на площади 20% поверхности тела и термоингаляционное поражение [3].

С первых суток после моделирования травмы животные получали стандартное местное лечение. Со вторых суток крысам основных групп дополнительно проводили курс ежедневных ингаляций: в третьей группе – озоно-кислородной смеси (концентрация озона – 60 мкг/л; 10 мин.), в четвертой – воздушной смеси, содержащей синглетный кислород (СК; 100% мощность генератора), а в пятой – воздушной смеси, содержащей монооксид азота (концентрация NO – 20 ppm)

У всех животных основных групп по завершении курса получали образцы крови, из которой выделяли сыворотку. сыворотку крови в объеме 100 мкл. наносили на предметное стекло и приготавливали микропрепараты высушенной биожидкости в соответствии с методом кристаллоскопии, позволяющим оценивать собственную кристаллогенную активность биосреды [2]. Высушенные микропрепараты оценивали морфологически и визуаметрически [2]. Основными показателями, оцениваемыми в балльной шкале, служили кристаллизуемость (Кр; отражает плотность кристаллических элементов в фации), индекс структурности (ИС; характеризует сложность структуропостроения), степень деструкции фации (СДФ; представляет собой индикатор правильности образования структур) и выраженность краевой зоны микропрепарата (Кз).

Полученные данные были обработаны статистически в программном пакете Statistica 6.1 for Windows.

## Результаты

Выявлено, что по всем основным параметрам, характеризующим кристаллогенную активность сыворотки крови крыс имеет место вариабельность в зависимости от применяемого варианта экспериментальной терапии термической травмы (рис. 1). У крыс контрольной группы, которым проводили только местно лечение ожога, наблюдали существенное угнетение кристаллогенной активности биосубстрата, о чем свидетельствует резкое снижение кристаллизуемости и индекса структурности, указывающих на количественную сторону структуризации и сложность формируемых элементов, а также сужение краевой зоны.

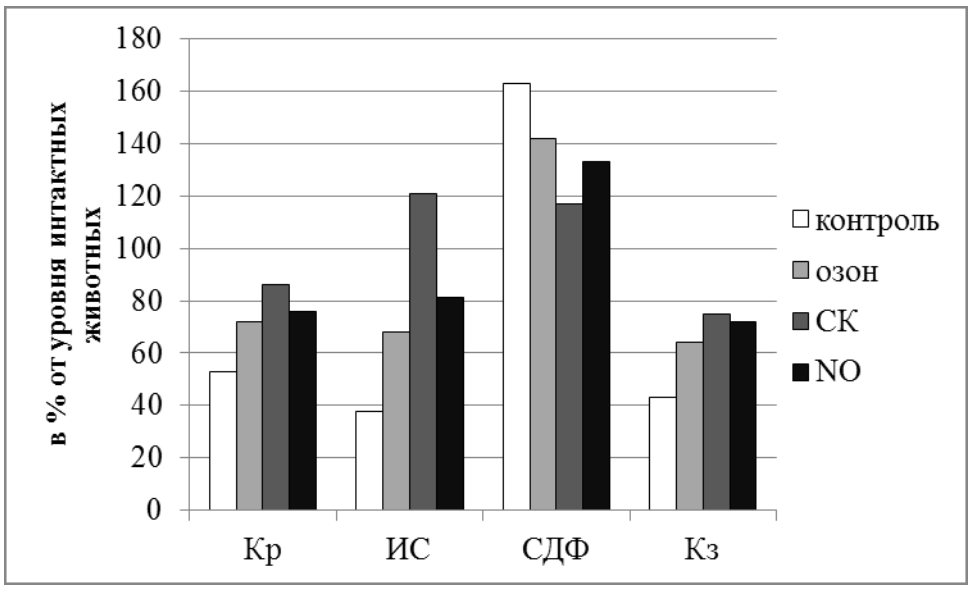



Рис. 1. Уровень оценочных параметров кристаллизации сыворотки крови животных (за 100% принят уровень, характерный для интактных крыс)

Дополнение местного лечения курсом ингаляций биорадикалов приводило к частичной нормализации кристаллоскопической картины сыворотки крови. Так, по кристаллизуемости и индексу структурности минимальные отклонения от интактных животных обнаружены при проведении ингаляций СК. Менее выраженная нормализация уровня данных показателей установлена в случае использования ингаляций оксида азота.

Аналогичная динамика зарегистрирована и по состоянию краевой белковой зоны, в которой концентрируется при дегидратации белковый компонент биологической жидкости. Степень деструкции фации, существенно возрастающая у крыс контрольной группы, умеренно снижается при назначении курса ингаляций озона и оксида азота (на 21 и 30% соответственно; $p<0,05$ для обоих параметров) и значительно – при проведении ингаляций СК (на 46%; $p<0,05$). Все вышеперечисленное свидетельствует о неодинаковом реабилитационном потенциале ихзучаемых биорадикалов.

## Заключение

Таким образом, проведенное исследование однозначно свидетельствует о присутствии особенностей влияния изучаемых биорадикалов на кристаллогенные свойства сыворотки крови крыс с термической травмой. При этом ингаляции СК способствуют максимальному повышению кристаллогенной активности биосреды по сравнению с другими факторами метаболической реабилитации, а применение оксида азота менее существенно усиливает данный параметр. По влиянию на протеиновый компонент биологической жидкости наблюдали обратную тенденцию.

## Список литературы

1. Перетягин С. П., Стручков А. А., Мартусевич А. К. с соавт. Применение озона как средства детоксикации в раннем периоде ожоговой болезни. Скорая медицинская помощь. 2011. Т. 12, №3. С. 39-43.

2. Мартусевич А.К., Перетягин С.П. Модификация дегидратационной структуризации сыворотки крови при ее обработке оксидом азота // Биофизика. 2013. Т. 58, №6. С. 1038-1042.

3. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Давыдюк А.В. Влияние динитрозильных комплексов железа на метаболические параметры крови животных с экспериментальной термической травмой // Биофизика. 2014. Т. 59, Вып. 6. С. 1173-1179.

4. Kincella J.P. Early inhaled nitric oxide therapy in premature newborns with respiratory failure // New England Journal. 2006. Vol. 355. P. 354-364.

5. Kumar P. et al. Use of inhaled nitric oxide in preterm infants // Pediatrics. 2014. Т. 133, №1. С. 164-170.

# ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ СВОЙСТВ ВОДЫ АКТИВНЫМИ ФОРМАМИ КИСЛОРОДА

А.А. Мартусевич[1], С.П. Перетягин[1], А.К. Мартусевич[2]

[1] *Ассоциация российских озонотерапевтов, Нижний Новгород*

[2] *ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород*

**Abstract**

We tested dynamics of some physical and chemical parameters (pH, oxidative and reductive potential, soluted oxygen level) of distilled water at its barbotage by sources of reactive oxygen species (molecular oxygen; ozone and oxygen mixture; singlet oxygen). Barbotage period for all factor was 3 min. We used different ozone concentrations (1000, 5000 and 10000 mcg/l). Solution pH level and its oxidative and reductive potential were estimated by pH-meter «HI-8314». Temperature gradient and soluted oxygen level were tested on «Oxygenmeter ATT-3010» apparatus. It was found that the treatment of distilled water by sources of reactive oxygen species leads to a significant change in the physical and chemical properties of water, the direction and severity of which are directly determined by the nature of the acting agent. Thus, oxygenation and ozonation of distilled water provide its acidification, and its degree increases proportionally with increasing ozone concentration, while the treatment of liquid with singlet oxygen leads to its alkalinization, which is clearly manifested only when using the 100% power of the generator. It was found that all the studied factors contribute to the increase in the oxidation-reduction potential of water, which is most realized under the action of ozone in the concentration of 10000 µg/l, and in the lowest – under the influence of half the power of the singlet oxygen generator. The content of oxygen dissolved in water shows a similar trend, which is minimally expressed only under the action of a singlet-oxygen gas mixture in both modes of operation of the generator.

**Key words:** molecular oxygen, ozone, singlet oxygen, pH, oxidative and reductive potential, water

Оценена динамика физико-химических параметров (pH, окислительно-восстановительного потенциала, содержания растворенного кислорода) дистиллированной воды при ее барботировании источниками активных форм кислорода (кислородом; озоно-кислородной смесью; синглетным кислородом). Продолжительность барботирования для всех воздействий составляла 3 минуты. Использованные концентрации озона – 1000, 5000 и 10000 мкг/л. Уровень pH и окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) растворов определяли с помощью портативного pH-метра «HI-8314» (Румыния). Температурный градиент и содержание растворенного кислорода оценивали с применением оксигенометра «Oxygenmeter ATT-3010» (Тайвань). Установлено, что обработка дистиллированной воды источниками активных форм кислорода приводит к

существенному изменению физико-химических свойств воды, направленность и выраженность которых непосредственно определяются природой воздействующего агента. Так, оксигенирование и озонирование дистиллированной воды обеспечивают ее закисление, причем его степень пропорционально возрастает с увеличением используемой концентрации озона, тогда как обработка жидкости синглетным кислородом приводит ее защелачиванию, отчетливо проявляющемуся лишь при применении полной мощности генератора. Выявлено, что все изучаемые факторы способствуют нарастанию окислительно-восстановительного потенциала воды, в наибольшей степени реализующемуся при действии озона в концентрации 10000 мкг/л, а в наименьшей – под влиянием половинной мощности генератора синглетного кислорода. Содержание растворенного в воде кислорода демонстрирует аналогичную тенденцию, которая минимально выражена лишь при действии синглетно-кислородной газовой смеси в обоих режимах работы генератора.

**Ключевые слова:** кислород, озон, синглетный кислород, pH, окислительно-восстановительный потенциал, вода

В настоящее время наблюдается неуклонный рост исследований, посвященных изучению эффекта действия регуляторов радикальных процессов на биологические системы различного уровня организации [1, 3-6, 8, 10, 12, 13]. Следует отметить, что акцент этих изысканий отчетливо смещен в сторону оценки организменного эффекта данных лечебных физико-химических факторов [1, 5, 6, 8-10]. Так, большинство работ в этой области посвящены рассмотрению эффективности озона [1, 6, 8], синглетного кислорода [3, 10, 11] и оксида азота [5, 7, 12-15] при экспериментальной патологии и в условиях клинической апробации.

Отдельным направлением использования источников активных форм кислорода (АФК) и азота способно выступать системное применение физиологического раствора, модифицированного путем барботирования последнего потоком воздуха, содержащего АФК [1, 5, 8]. В связи с этим, принципиальную значимость имеет исследование характера сдвигов физико-химических параметров указанной инфузионной среды при ее обработке источниками АФК. На основании этих сведений можно предполагать направленность физико-химических перестроек, которые будут происходить при действии модифицированного физиологического раствора на биологические жидкости (прежде всего, на кровь и ее компоненты) в условиях in vitro и in vivo. Кроме того, подобный подход позволяет выбрать максимально щадящие режимы воздействия, не смещающие гомеостаз основных параметров биосред.

**Цель исследования:** оценить особенности действия активных форм кислорода на физико-химические параметры дистиллированной воды.

**Материалы и методы**

Нами проведен комплекс исследований некоторых физико-химических параметров (pH, окислительно-восстановительного потенциала, содержания растворенного кислорода) дистиллированной воды до и сразу по окончании барботирования различными газообразными источниками активных форм

кислорода. В спектр воздействующих факторов были включены: молекулярный (триплетный) кислород; озоно-кислородная смесь; синглетный кислород.

Скорость барботирования при пропускании через дистиллированную воду кислорода, синглетно-кислородной и озоно-кислородной смеси составляла 1 л/мин. Время воздействия составляло 3 минуты. Озоно-кислородную смесь получали с использованием озонатора «Медозонс БМ-03» (Россия). На выходе из аппарата создавали концентрацию озона 1000, 5000 и 10000 мкг/л. Синглетно-кислородную смесь производили с помощью генератора «Airnergy Professional Plus» (Германия). Для каждого воздействия выполняли 5 повторностей эксперимента.

Уровень pH и окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) растворов определяли портативным pH-метром «HI-8314» (Румыния). Температурный градиент и содержание растворенного кислорода оценивали с применением оксигенометра «Oxygenmeter ATT-3010» (Тайвань).

Полученные данные были обработаны в программном пакете Statistica 6.0. Нормальность распределения значений параметров оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом характера распределения признака для оценки статистической значимости различий применяли H-критерий Краскала-Уоллеса.

**Результаты исследования**

Установлено, что все оцениваемые показатели имели четкую тенденцию к изменению под влиянием изучаемых источников биорадикалов.

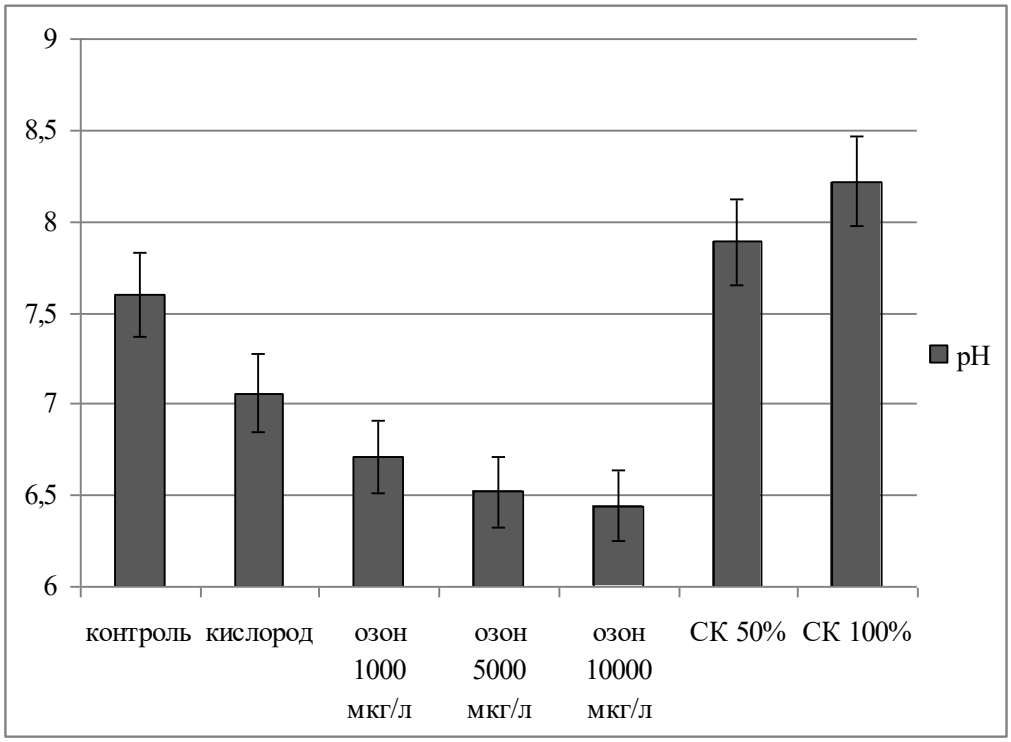



Рис. 1. Уровень pH среды при действии изучаемых источников активных форм кислорода (СК 50% и СК 100% – поток от генератора «Airnergy» при мощностях 50 и 100% соответственно)

Так, pH дистиллированной воды при 10-минутной оксигенации регистрировали умеренное закисление жидкости (ΔpH=-0,54 соответственно; p<0,05 по сравнению с контрольным образцом), тогда как при продолжительной обработке жидкости синглетным кислородом при максимальной мощности аппарата (100%), напротив, фиксировали минимальное ее защелачивание (ΔpH=+0,62; p<0,05; рис. 1). Применение половинной мощности генератора практически не изменяло pH дистиллированной воды. В то же время обработка рассматриваемой жидкости кислородно-озоновой газовой смесью демонстрировала влияние, аналогичное оксигенации, но более выраженное по сравнению с ней. Следует отметить, что дополнительно имел место эффект дозозависимости: при введении озона в концентрациях 1000, 5000 и 10000 мкг/л регистрировали снижение pH на 0,89; 1,08 и 1,16 ед. соответственно (p<0,05 для всех случаев). Таким образом, изучаемые активные формы кислорода оказывают неодинаковое действие на pH дистиллированной воды.

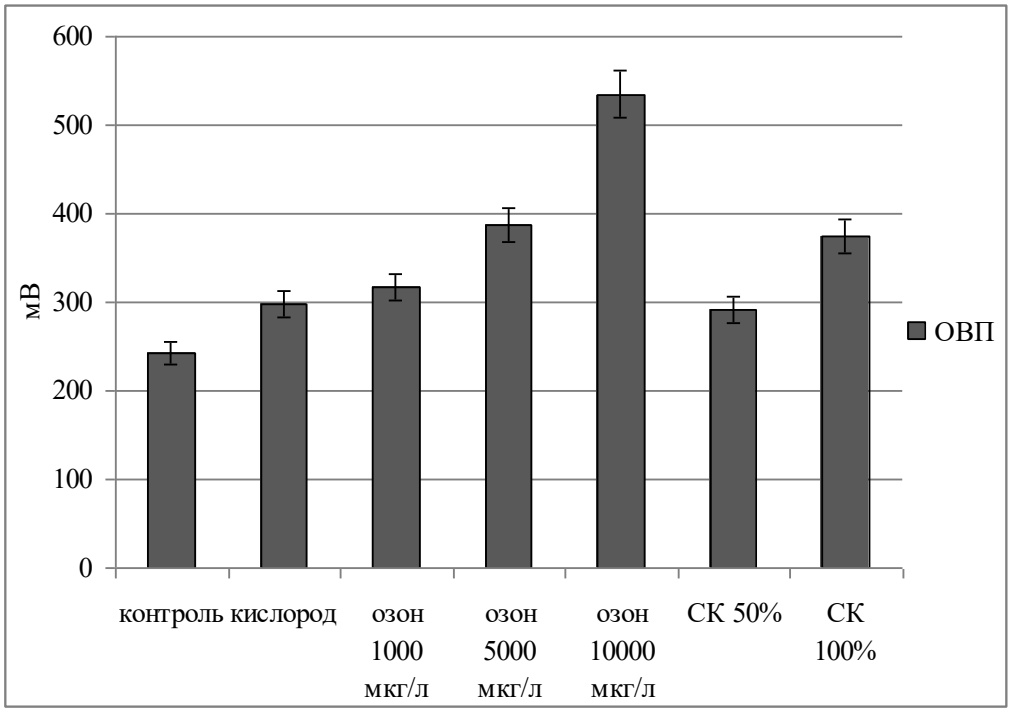



Рис. 2. Окислительно-восстановительный потенциал жидкости при действии изучаемых источников активных форм кислорода

В отношении окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) наблюдали закономерную тенденцию к нарастанию значения данного показателя в ряду «контроль – кислород – низкие дозы озона и синглетный кислород – высокие дозы озона» (рис. 2). Установлено, что оксигенация дистиллированной воды приводит к минимальному, но значимому сдвигу параметра (на 22,6% относительно контроля; p<0,05) При этом ОВП воды, обработанной синглетным кислородом, зависела, как и для градиента pH, от применяемой мощности аппарата и превышала контрольные цифры на 20,2 и 53,9% для режимов «50%» и «100%» соответственно (p<0,05 для обоих воздействий). Следовательно, только использование полной мощности генератора синглетного кислорода позволяет

достичь более выраженного смещения ОВП по сравнению с введением кислорода. Озонирование модельной жидкости приводит к дозозависимому нарастанию показателя, значимому при всех использованных концентрациях озона ($p<0,05$ для концентраций 1000, 5000 и 10000 мкг/л). При этом минимальная доза озона (1000 мкг/л) неотличима от влияния кислорода, промежуточная (5000 мкг/л)– сопоставима с действием синглетно-кислородной газовой смеси, а максимальная вызывает наиболее существенный сдвиг ОВП по сравнению со всеми другими агентами ($p<0,05$).

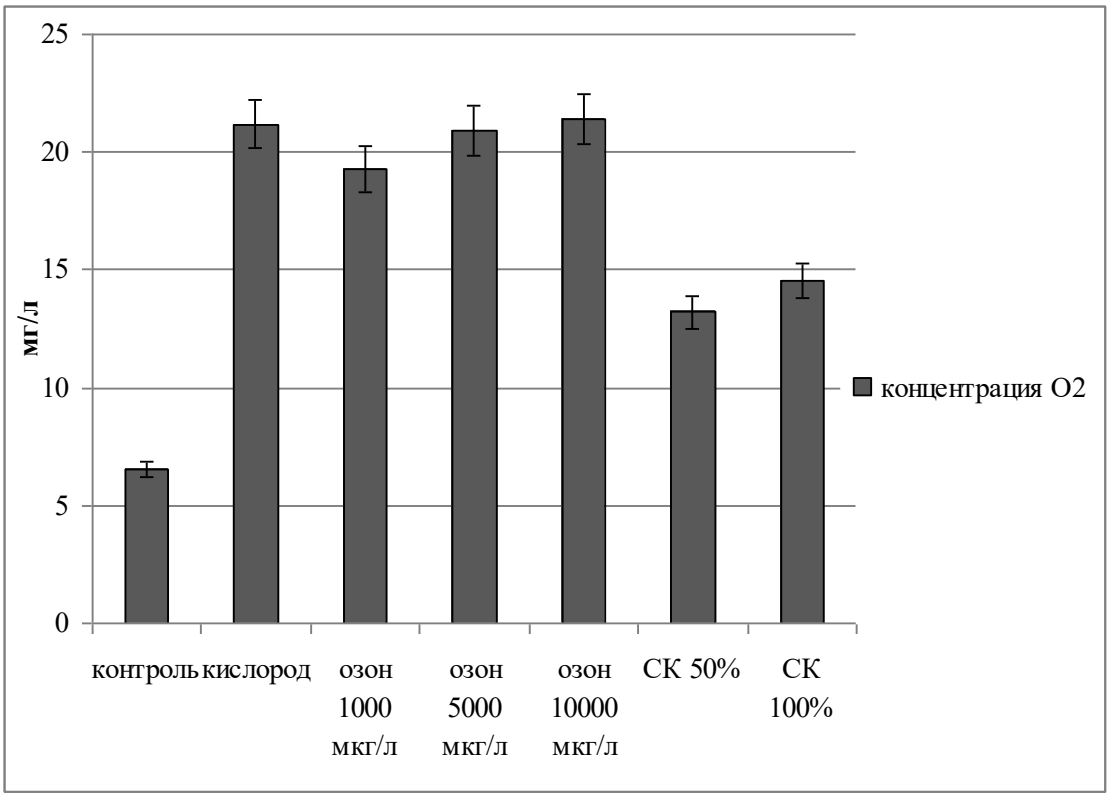



Рис. 3. Содержание растворенного кислорода в воде, обработанной источниками активных форм кислорода

Особую динамику регистрировали по содержанию растворенного кислорода (рис. 3). Так, барботаж дистиллированной воды кислородом значимо увеличивал указанный параметр (в 3,25 раза соответственно; $p<0,05$ к контролю), а ее озонирование способствовало аналогичному изменению концентрации кислорода независимо от дозы озона. В то время как обработка жидкости синглетным кислородом менее существенно увеличивала содержание в ней растворенного кислорода (+123%; $p<0,05$), что может быть обусловлено коротким периодом жизни соединения в воде и его химической реакцией с молекулами воды (Красновский А.А., 1997). Следует отметить, что по данному показателю различия между мощностями генератора отсутствовали, что может быть связано с практически идентичной долей кислорода в синглетно-кислородной смеси, которой обрабатывали жидкость.

**Заключение**

Установлено, что обработка дистиллированной воды источниками активных форм кислорода приводит к существенному изменению физико-химических свойств воды, направленность и выраженность которых непосредственно определяются природой воздействующего агента. Так, оксигенирование и озонирование дистиллированной воды обеспечивают ее закисление, причем его степень пропорционально возрастает с увеличением используемой концентрации озона, тогда как обработка жидкости синглетным кислородом приводит ее защелачиванию, отчетливо проявляющемуся лишь при применении полной мощности генератора. Выявлено, что все изучаемые факторы способствуют нарастанию окислительно-восстановительного потенциала воды, в наибольшей степени реализующемуся при действии озона в концентрации 10000 мкг/л, а в наименьшей – под влиянием половинной мощности генератора синглетного кислорода. Содержание растворенного в воде кислорода демонстрирует аналогичную тенденцию, которая минимально выражена лишь при действии синглетно-кислородной газовой смеси в обоих режимах работы генератора. Полученные данные дополнительно обосновывают различные физико-химические эффекты, демонстрируемые для рассматриваемых факторов в исследованиях in vitro и in vivo.

## Список литературы

1. Алехина С.П., Щербатюк Т.Г. Озонотерапия. Клинические и экспериментальные аспекты. Н. Новгород, 2003. 239 с.
2. Граник В.Г., Григорьев Н.Б. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств. М.: Вузовская книга, 2004. 360 с.
3. Заворотная Р.М. Синглетный кислород при лечении ряда патологических процессов: физико-химические аспекты // Украинский ревматологический журнал. 2002. №1. С. 35-37.
4. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Минск: БГУ, 2004. 174 с.
5. Липатов К.В. с соавт. Применение газового потока, содержащего оксид азота (NO-терапия) в комплексном лечении гнойных ран // Хирургия. 2002. №2. С. 41-43.
6. Масленников О.В., Конторщикова К.Н. Озонотерапия: Руководство для врачей. Н.Новгород, 2008. 342 с.
7. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови // Клиническая лабораторная диагностика. 2005. №6. С. 15-18.
8. Перетягин С.П., Стручков А.А., Мартусевич А.К., Костина О.В., Лузан А.С. Применение озона как средства детоксикации в раннем периоде ожоговой болезни // Скорая медицинская помощь. 2011. Т. 12, №3. С. 39-43.
9. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука, 1998.
10. Синглетно-кислородная терапия / Под ред. И.З. Самосюк, Л.И. Фисенко. Киев, 2007. 228 с.

11. Узденский А.Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии. М.: Наука, 2010. 321 с.

12. Remizova M.I. et al. Effect of dinitrozyl iron complexes with glutathione on hemorrhagic shock followed by saline treatment // Eur. J. Pharmacol. 2011. Vol. 662. P. 40-46.

13. Shekhter A.B. et al. Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds // Nitric oxide. 2005. Vol. 12. P. 210-219.

14. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology // Nitric Oxide. 2009. Vol. 21. P. 1-13.

15. Vanin A.F., Chazov E.I. Prospects of designing medicines with diverse therapeutic activity on the basis of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands // Biophysics. 2011. Vol. 56, N2. P. 268-275.

# СОСТОЯНИЕ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С ДОРСАЛГИЯМИ И АРТРАЛГИЯМИ НА ФОНЕ ОЗОТЕНС-ТЕРАПИИ

П.В. Перетягин[1], А.В. Новиков[1], С.П. Перетягин[2]

[1]*ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород*

[2]*Ассоциация российских озонотерапевтов, Нижний Новгород*

**Abstract**

The paper presents the results of research on the combined effects of externally applied ozone-containing cream and low-frequency electropulse currents in the pathology of the joints and spine, accompanied by pain syndrome and their effect on microcirculation.

**Key words:** ozotenz-therapy, microcirculation, dorsalgia, arthralgia

В работе представлены результаты научных исследований по сочетанному воздействию наружно применяемого озонсодержащего крема и низкочастотных электроимпульсных токов при патологии суставов и позвоночника, сопровождаемой болевым синдромом и их влиянию на микроциркуляцию.

**Ключевые слова:** озотенс-терапия, микроциркуляция, дорсалгии, артралгии

Недостаточно высокая эффективность существующих подходов в лечении поясничных дорсопатий и артрапатий обусловливает актуальность разработки новых немедикаментозных алгоритмов лечения (Агасаров Л.Г., 2010; Горбунов Ф.Е., Сичинава Н.В., 2009, 2012; Пономаренко Г.Н., 2011). Предложенные методы, основанные на комплексном воздействии различных лечебных факторов, применимы большей степенью в условиях лечебно-профилактических и санаторно-курортных учреждений. В то же время концепция восстановительной медицины ориентирована на активное участие пациентов в осуществлении лечебно-профилактических и реабилитационных мероприятий. Особое значение эта ориентация приобретает в отношении больных, страдающих хроническими болевыми синдромами, которые нуждаются в регулярном получении соответствующей помощи. Поэтому актуальна разработка методик и аппаратуры, пригодных также для самостоятельного применения пациентами (Рявкин С.Ю., 2012). В этой связи перспективны исследования возможностей сочетанного применения физических факторов и лекарственной терапии.

Одним из важнейших патогенетических факторов при дорсопатиях и артропатиях является снижение уровня кислородного дыхания тканей на фоне которого нарушение окислительных процессов связанных с прекращением доступа крови (основного переносчика кислорода к тканям) приводит к возникновению боли (Судаков К.В., Адрианов В.В., Вагин Ю.Е., Киселёв И.И.,2009). Поэтому формирование рефлекторной дуги боли по нервной

системе при подобной патологии предполагает возможность проведения этиотропного патогенетического назначения лечебных средств в виде сочетанного применения электроимпульсной стимуляции мышечно-нервного суставного сегмента для усиления транспорта к повреждённой зоне с электрофоретическим введением активных форм кислорода на очаг патологического возбуждения с учётом корригирующего воздействия на главные факторы возникновения боли.

Целью работы явилась оценка функционального состояния микроциркуляции на фоне противоболевой терапии дорсалгий и артралгий, включающей применение физиотерапевтического метода электромиостимуляции сочетающегося с электрофоретическим введением кремов, содержащих активные формы кислорода.

## Материал и методы

В исследование включены 43 пациента с диагнозом «Дорсопатия поясничного отдела позвоночника» и «Артропатия коленных суставов» в возрасте от 62 до 73 лет. Критерием включения было наличие болевого синдрома в виде люмбалгии или люмбоишиалгии, артралгии коленных суставов. Протокол лечения пациентов группы контроля (n=20) был ограничен использованием в качестве обезболивающего лечения только НПВС (мелоксикам или мовалис). В качестве дополнительного лечения назначалась сосудистая, антиоксидантная, витаминотерапия (цитофлавин, детралекс, витамины группы В). Из физиотерапевтических средств применялись процедуры ЭМС-ТЕНЗ-стимуляции параартикулярных зон позвоночника в грудной и поясничной области и параартикулярных зон коленных суставов (группа контроля).

1) Режим переменной работы III, частота - 100 Гц, глубина модуляции - 75%, длительность посылок 2-3 с., - 5 мин.

2) Режим работы IV, частота 70 Гц, глубина модуляции 75%, длительность посылок – 3 с., - 5 мин.

В основной группе пациентов (n=23) физиотерапевтические процедуры электроимпульсной низкочастотной стимуляции параартикулярных зон сопровождались сочетанным электрофоретическим введением активных форм кислорода, с помощью озон-содержащего крема для ОЗОТЕНС® – терапии, выполняемые на низкочастотном электроимпульсном массажёре «МН8002 КОМБО». Обезболивающие препараты (миорелаксанты, стероиды, мочегонные) не применялись.

Оценка сенсорной составляющей болевого ощущения осуществлялась с помощью визуальной аналоговой шкалы (ВАШ) в 1, 3, 7, 10 дни лечения.

Микроциркуляция оценивалась до- и после курса лечения с помощью метода лазерной допплеровской флоуметрии (ЛАКК-01) в коже поясничной области, бедра (параартикулярная зона коленного сустава) и тыльной поверхности предплечья.

## Результаты

Обследовано 43 пациентов с болевым синдромом при дорсопатиях позвоночного столба, клинические проявления у которых сопровождались артралгиями крупных суставов, обусловленных остеохондрозом.

Перед началом восстановительного лечения преобладающими у больных были жалобы на быструю утомляемость, слабость в нижних конечностях (91,6%), боли ноющего характера в нижних конечностях при ходьбе или в покое, локализованные в области коленных суставов, голеней и подошвенной части стоп (85,8%), ощущение зябкости в ногах (77,5%). Интенсивность боли перед лечением оценивалась как умеренная (показатель ВАШ составил - 6,7).

В результате проведенного лечения значительное улучшение отмечалось у 88,6% (19) пациентов основной группы. Оно наступало обычно на второй – третьей процедуре ОЗОТЕНС*терапии и характеризовалось существенным снижением болей и их исчезновением в конце курса лечения в нижней части спины при физической нагрузке, полным восстановлением объема движений в пояснично-крестцовом отделе позвоночника. Улучшение состояния, характеризовавшееся восстановлением активных движений и незначительными болями в спине при физической нагрузке, диагностировано у 11,1% пациентов и возникало, как правило, после пяти процедур. Ухудшения состояния у больных основной группы и осложнений не отмечалось. В контрольной группе значительное улучшение состояния отмечено у 75,0% пациентов и улучшение – у 25,0% пациентов. Анализ динамики степени интенсивности боли и функциональных проб в виде флексии и латерофлексии позвоночника в поясничном отделе достоверно указывали на значительно более выраженный эффект при применении ОЗОТЕНС-терапии.

Проведение процедур ОЗОТЕНС-терапии позволило патогенетически воздействовать на механизм формирования корешкового болевого синдрома.

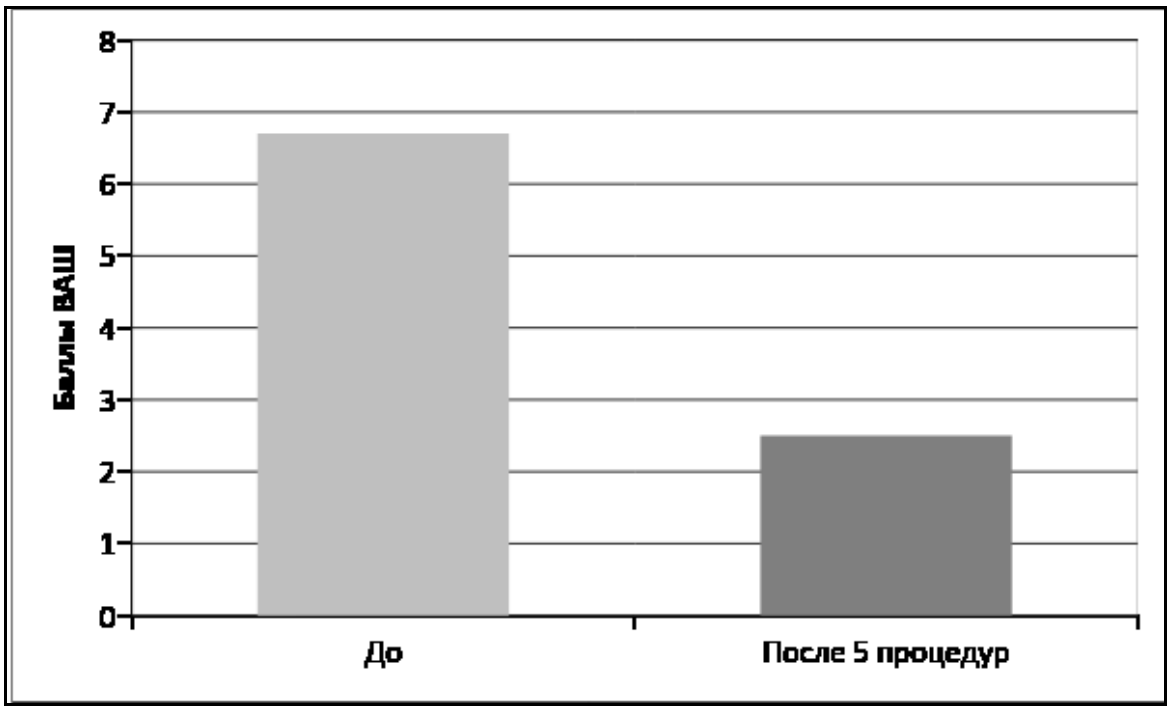



Рис. 1. Интенсивность болевого синдрома по визуально аналоговой шкале (ВАШ) до и после курса ОЗОТЕНС-терапии

При динамической оценке выраженности радикулярного болевого синдрома отмечен достоверный регресс интенсивности болевого синдрома после проведения 3-5 ОЗОТЕНЗ-процедур. Интенсивность боли снизилась у исследуемых пациентов с 6,7 ± 0,2 до 2,4 ± 0,3 балла ($p<0,05$) по ВАШ (рис. 1).

К концу курса терапии выявлено значительное снижение болевого синдрома в обеих группах по сравнению с исходным состоянием ($p<0,001$), при этом в динамике регресс болевого синдрома был преимущественным в группе пациентов, получавших ОЗОТЕНЗ-терапию (рис. 2).

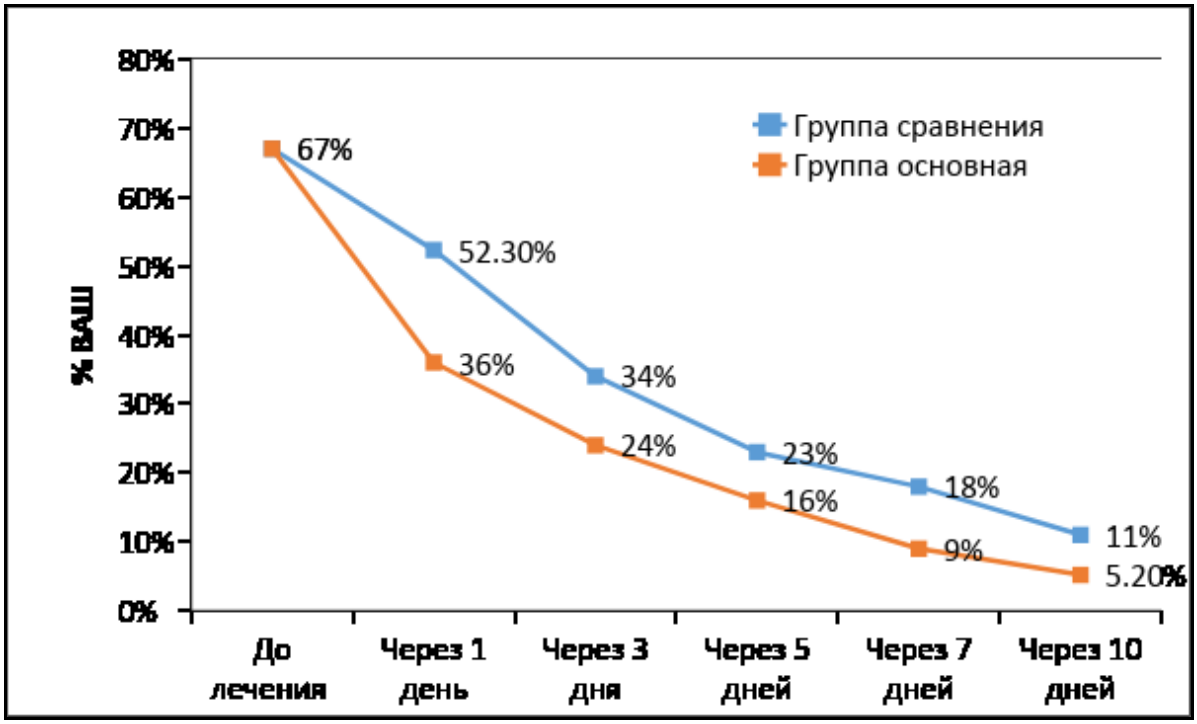



Рис. 2. Динамика болевого синдрома на фоне проведения сочетанной медикаментозной терапии и ОЗОТЕНС-терапии (средний балл по шкале ВАШ)

Об эффективности и преимуществах комплексного лечения ОЗОТЕНС-терапии свидетельствует регресс болевого синдрома в нижних конечностях в 93,3% случаев, причем у трети пациентов снижение болей отмечено уже к 3 процедуре, у 87% обследуемых исчезла утомляемость и слабость в нижних конечностях, чувство холода в ногах перестали ощущать 73,3% больных.

После курса ЭМС боли регрессировали лишь к окончанию лечения (10-12 день) у 73,2% пациентов, утомляемость и слабость в ногах уменьшилась в 70% случаев, зябкость стоп перестала беспокоить 64% больных. В группе, получавшей обычную ЭМС-терапию, боль в нижних конечностях уменьшилась в 79,8% случаев, причем у 5 человек болевой синдром купировался к 6-7 процедуре, утомляемость и слабость в ногах исчезла у 63,3% пациентов, зябкость стоп перестала беспокоить 61%больных. В контрольной группе лишь у 3 человек (10%) отмечена лишь тенденция к уменьшению боли в нижних конечностях.

Табл. 1. Показатели микроциркуляции у пациентов с дорсалгиями и артралгиями после курса из 10 процедур ОЗОТЕНЗ-терапии (Электроды: паравертебрально + параартикулярно на коленный сустав)

| Этап и зоны исследования | **ПМ** | **Э** | **Н** | **М** | **Д** | **С** | **ПШ** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Исходно (n=23) | | | | | | | |
| Предплеч. | 6,2±0,5 | 11,8±1,0 | 12,6±1,1 | 8,7±0,7 | 6,6±0,6 | 4,6±0,4 | 1,4±0,12 |
| Бедро | 3,4±0,3 | 16,3±1,5 | 22,2±2,0 | 19,0±1,7 | 7,7±0,7 | 5,4±0,5 | 1,2±-,1 |
| Поясница | 1,9±0,2 | 20,0±1,8 | 20,0±1,8 | 18,0±1,6 | 20,0±1,8 | 6,0±0,5 | 1,2±0,1 |
| Конец курса - Контроль (n=10) | | | | | | | |
| Предпл. | 7.2±0,6* | 14,8±1,3 | 16,4±1,5 | 10,2±0,9 | 6,4±0,5 | 4,9±0,4 | 1,8±0,16 |
| Бедро | 4.4±0,4 | 15,2±1,4 | 12,8±1,2 | 18,8±1,7 | 9,6±0,8 | 7,4±0,7 | 1,0±0,09 |
| Поясница | 3,2±0,2 | 18,4±1,7 | 15,1±1,4* | 9,2±0,8* | 14,4±1,3* | 13,6±1,2* | 1,3±0,1 |
| Конец курса - ЭМС+30%Оз (n=13) | | | | | | | |
| Предпл. | 9,7±0,8# | 26,4±2,4* | 26,3±2,4# | 12,4±1,03* | 8,1±0,7* | 5,1±0,46 | 2,1 ±0,2* |
| Бедро | 6,0±0,5* | 14,4±1,3 | 13,9±1,2# | 19,6±1,7 | 13,4±1,2* | 9,5±0,8 | 0,7±0,06 |
| Поясница | 6,2±0,5* | 20,1±1,8 | 15,9±1,4 | 10,2±0,9# | 16,1±1,5 | 15,6±1,4 | 1,5±0,14 |

Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с исходными значениями ($p<0,05$); # - различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$)

Как следует из представленных данных, исходно у пациентов с клиническими проявлениями дорсалгий и артралгий была выявлена существенная разница функционального состояния микрокровотока в коже между условно индифферентной зоной (предплечье) и областями с клиническими проявлениями патологического процесса. Изменения в показателях микроциркуляции этих зон существенно отличались друг от друга. Так, ПМ паравертебральной зоны поясничной области составлял 31% по сравнению с областью предплечья ($p<0,05$), а в параартикулярной области коленных суставов ПМ был аналогично снижен до 55% ($p<0,05$). При этом активные и пассивные факторы регуляции микрокровотока в этих зонах были достоверно значимо повышены. В 1-й (контрольной) группе пациентов после проведённого курса стандартной консервативной терапии с ЭМСстимуляцией

отмечено заметное повышение периферического объёмного микрокровотока: в параартикулярных областях коленных суставов на 29% (p<0,05), поясничной паравертебральной зоне – на 68% (p<0,05)., и в индифферентной зоне (предплечье) - на 17% (p<0,05). Значимость участия в поддержании микрокровотока факторов активной регуляции (эндотелиальный, нейрогенный и миогенный) в зонах клинических болевых проявлений уменьшилась. Компенсаторно увеличенными для этих зон оставались факторы пассивной регуляции микроциркуляции. Для индифферентных областей кожных покровов (предплечье), не сопровождаемых алгетической симптоматикой в поддержании повышенного микрокровотока (ПМ=116%, p<0,05 от исходного) играли регуляторную роль как активные, так и пассивные факторы регуляции кровообращения.

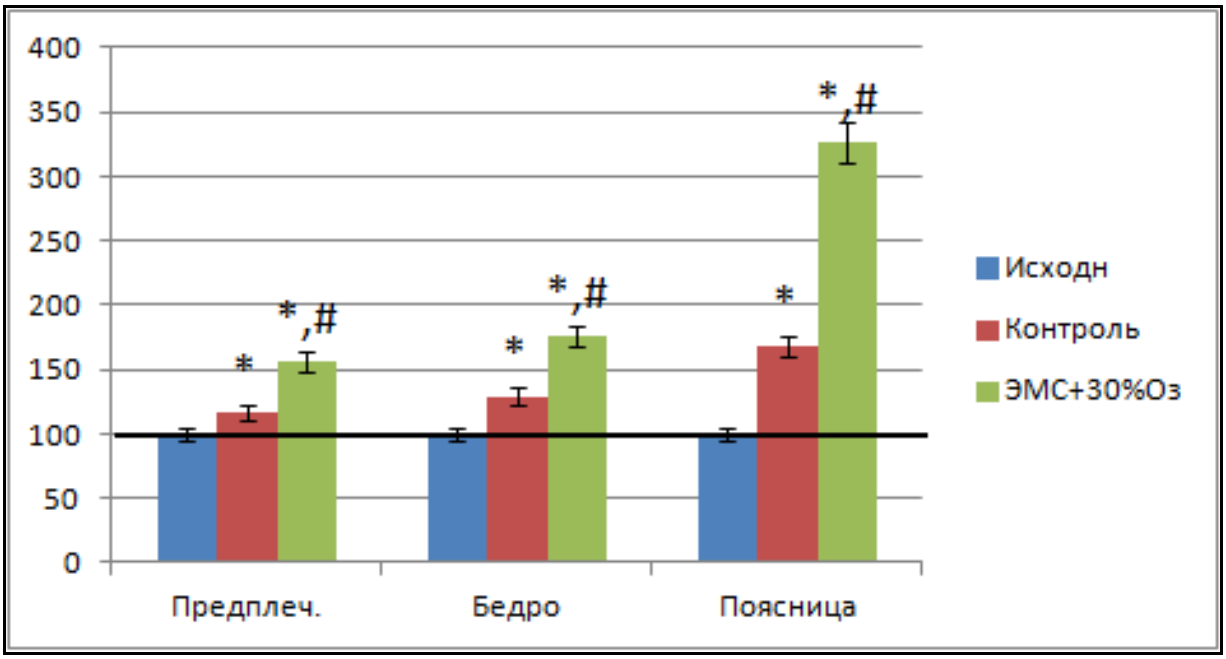



Рис. 3. Показатель микроциркуляции у пациентов с дорсопатиями и артропатиями после курса процедур ОЗОТЕНЗ-терапии (Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с исходными значениями (p<0,05); # - различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой (p<0,05))

Во второй (основной) группе пациентов с включением в консервативное лечение ОЗОТЕНЗ-терапии отмечено более значимое повышение объёмного микрокровотока в периферическом русле во всех зонах исследования. Так ПМ паравертебральных точек измерений в поясничной области оказался увеличенным в 3,3 раза по сравнению с исходными данными (p<0,05); в параартикулярной области коленных суставов отмечено увеличение в 1,8 раз (p<0,05), а в индифферентной зоне (предплечье) – в 1,6 раза(p<0,05), что достоверно превышало аналогичные параметры, установленные в группе контроля на 35%, 36% и 94% соответственно при p<0,05. Важной особенностью этого исследования явился установленный факт значимого повышения микрокровотока после проведённой ОЗОТЕНС-терапии на организменном

уровне с таким же достоверным увеличением активности регуляторных систем как активного характера (эндотелиальный, нейрогенный, миогенный факторы), так и пассивного характера (дыхательный и сердечный факторы). По всей видимости, такая компенсаторная реакция увеличения местного и системного микрокровотока была следствием чрескожной контаминации активных форм кислорода из крема их содержащего за счёт электрофоретического продвижения в организм этих соединений при процедурах ЭМС-ТЕНЗ-стимуляции параартикулярных областей позвоночника и крупных суставов. Главным действующим механизмом, способствующим такой усиленной контаминации (трансдермального переноса) активных форм кислорода из крема является, по-видимому, электропорация, сопровождающая низкочастотные импульсные воздействия постоянным током на биологическую ткань (Безуглый А.П., 2008.). Кроме того, немаловажное значение играет воздействие электрического импульсного поля на эндотелиальные зоны аорты при паравертебральном наложении электродов в грудном и поясничном отделах. Увеличение функциональной эндотелиальной активности этих зон может сопровождаться более интенсивной мобилизацией эндотелиального вазодилятирующего фактора (Дедов И.И., Шестакова М.В., Кочемасова Т.В. с соавт., 2001; Крупаткин А.И., Сидоров В.В., 2005.)

## Заключение

Таким образом, применение для купирования болевого синдрома при дорсалгической и артралгической патологии физиотерапевтического воздействия, сочетающего в себе элетромиостимуляцию с чрезкожной доставкой во время стимулирующего воздействия на суставы активных форм кислорода из электродного крема, содержащего их, может способствовать регрессу алгических проявлений за счёт усиления транспортной функции крови по сосудам мышц, окружающих суставы и одновременной доставки в патологический очаг активного кислорода, устраняющего явления ишемии и способствующего активации процессов тканевой реабилитации.

## Список литературы

1. Агасаров Л.Г., Давьян О.С., Тарасова Л.Ю. Электрофизиологические корреляты результативности локальной озонотерапии при вертеброгенной патологии // Лечащий врач. 2017. №10. С. 58-60.

2. Горбунов Ф.Е. Сичинава Н.В. Физиотерапевтическое лечение // В кн. «Неврология. Национальное руководство». ГЭОТАР-Медиа, Москва, 2009. 350 с.

3. Горбунов Ф.Е. с соавт. Комплексные программы реабилитации больных с болевыми синдромами пояснично-крестцовой дорсопатии // Мат. V Междунар. конгр. «Новые технологии клинической и спортивной реабилитации. М. 2011. С. 159-161.

4. Пономаренко Г.Н. Актуальные вопросы физиотерапии. Избранные лекции СПб., 2010. 238 с.

5. Рявкин С.Ю., Пономаренко Г.Н., Дробыппев В.А., Шашуков Д.А., Власов А.А.,тВасиленко А.М. Эффективность применения чрескожной

электронейростимуляции при дискогенных дорсопатиях поясничной локализации // Вестник восстановительной медицины. 2012. № 5. С. 2-10.

6. Судаков К.В., Адрианов В.В., Вагин Ю.Е., Киселёв И.И. Физиология человека. Атлас динамических схем. М., 2009. 416 с.

7. Безуглый А.П. Аквафорез – возможности неинвазивной мезотерапии // Нувель эстертик. 2008. №6. С. 170-179.

8. Дедов И.И., Шестакова М.В. Кочемасова Т.В. и др. Дисфункция эндотелия в развитии сосудистых осложнений сахарного диабета // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. 2001. №8. С. 1073-1084.

9. Крупаткин А.И., Сидоров В.В., 2005. Лазерная допплеровская флоуметрия микроциркуляции крови. М., 2005. 254 с.

# ВЛИЯНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОЙ ГЕМОФИЛЬТРАЦИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ АБДОМИНАЛЬНОМ СЕПСИСЕ

А.М.Фомин

*ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва*

**Abstract**

Continius hemofiltration was used in multiple-modality treatment of 27 patients with abdominal sepsis who developed polyorgan failure and septic shok. Lipid peroxidation parameters and lipidograms were under study. Lipid peroxidation was activated and supply with α-tocopherol drastically decreased. Continius hemofiltration helped improve the antioxidant defense.

*Key words:* abdominal sepsis, hemoffltration, lipid peroxidation, α-tocopherol

У больных абдоминальным сепсисом и септическим шоком применяются методы очищения крови, в том числе продолжительная гемофильтрация. Продолжительная гемофильтрация была проведена у 27 больных абдоминальным сепсисом, у которых были исследованы показатели перекисного окисления липидов. Установлены активация перекисного окисления липидов и снижение уровня α-токоферола. Продолжительная гемофильтрация улучшала показатели антиоксидантной защиты

*Ключевые слова:* абдоминальный сепсис, гемофильтрация, перекисное окисление липидов, α-токоферол

Активация физиологического процесса свободнорадикального пути окисления (СРО) липидов, или перекисного окисления липидов (ПОЛ), наблюдается при различных острых и хронических заболеваниях человека. При тяжелых гипоксических поражениях органов и тканей наблюдается избыточная активация ПОЛ [2, 3, 6]. Чрезмерная активация ПОЛ была выявлена у больных с гнойно-септическими осложнениями при заболеваниях органов брюшной полости [1, 7]. Вместе с тем, существуют естественные механизмы антиоксидантной защиты, которые постепенно истощаются. Данных о влиянии продолжительной (постоянной) гемофильтрации (ГФ) на процессы ПОЛ и механизмы антиоксидантной защиты у больных абдоминальным сепсисом в доступной литературе нам не встретилось.

## Материал и методы

Продолжительная гемофильтрация применена в комплексном лечении 27 больных, переведенных в АРО МОНИКИ из лечебных учреждений Московской области в связи с прогрессирующим течением перитонита и абдоминального сепсиса. Мужчин было 18, женщин - 9. Преобладали лица молодого и зрелого возраста, больные моложе 50 лет составили 66,7%. Структура заболеваний, осложненных перитонитом, представлена в таблице 1.

Таблица 1. Структура заболеваний, осложненных абдоминальным сепсисом

| *Заболевание* | *Число больных* | |
|---|---|---|
| | *Абс.* | *%* |
| Острый аппендицит | 11 | 40,7 |
| Осложнения акушерско-гинекологических заболеваний | 4 | 14,8 |
| Травма органов брюшной полости | 3 | 11,1 |
| Осложнения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки | 4 | 14,8 |
| Осложнения плановых операций | 3 | 11,1 |
| Острая спаечная тонкокишечная непроходимость | 1 | 3,7 |
| Острый панкреонекроз | 1 | 3,7 |
| Всего | 27 | 100 |

Острый аппендицит остается наиболее частой причиной перитонита. Второе и третье место по частоте осложнения заболевания перитонитом и развитием синдрома полиорганной недостаточности (СПН) занимают острые гинекологические заболевания, осложнения акушерских и гинекологических заболеваний, осложнения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки.

У всех больных выявлены клинико-лабораторные признаки полиорганной недостаточности. Токсические энцефалопатия и нефропатия наблюдались у всех больных, причем у (25,9%) больных развилась олигоанурия. Токсическая гепатопатия была у 11 (40,7 %) больных, респираторный дистресс-синдром взрослых (РДСВ) - у 5 (18,5%) больных. Токсическая депрессия миокарда зарегистрирована у 6 (22,2%) больных перитонитом. Поражение нескольких органов и систем в значительной степени усугубляло тяжесть состояния больных. У всех больных диагностирован сепсис в соответствии с критериями «Сепсис-3» [8], септический шок был у 6 (22,2%) больных.

При поступлении все больные подвергнуты релапаротомии, тщательной санации брюшной полости и назоинтестиналыюй интубации. В дальнейшем применяли программный лаваж брюшной полости, этиотропную антибиотикотерапию, иммунотерапию, энтеральное зондовое питание.

В первые сутки после операции применяли продолжительную гемофильтрацию (ГФ). ГФ проводили на аппарате «Окто Нова» «Asahi Kasei Medical» (Япония), используя гемофильтры «Rexeed-21A» той же фирмы. Всего проведено 67 гемофильтраций, средняя продолжительность ГФ 23 часа 15 ± 49,8 мин, средний объем ГФ – 67,2 ± 5,3 литра из расчета 35 мл/кг веса/сутки. Во всех случаях ГФ использовали вено-венозный сосудистый доступ, наиболее часто применяли трехпросветный катетер, который устанавливали в центральную вену (яремную или бедренную). При необходимости, особенно при РДСВ осуществляли дегидратацию в пределах 3 л. При всех ГФ использовали метод постдилюции. Для замещения использовали полиэлектролитный двухкомпонентный бикарбонатный диализный раствор «Аккусол 4+» фирмы «Nikkiso» в мешках по 5 литров.

У 22 больных натощак перед ГФ и после ее окончания осуществляли взятие крови для исследования показателей ПОЛ, а-токоферола и липидов. Кровь забирали в пробирки с ЭДТА, центрифугировали, отделяли плазму от эритроцитарной массы. Эритроцитарную массу дважды промывали физиологическим раствором. В плазме и эритроцитах определяли гидроперекиси липидов по методу В. В. Гавриловой, М. И. Мишкорудной [5], малоновый диалвдегид определяли спектрофлюорометрическим микрометодом по K. Yagi, α-токоферол — методом G.Storer [9]. Общие липиды определяли унифицированными методами.

**Результаты исследования и их обсуждение**

Как видно из данных, представленных в таблице 2, у больных абдоминальным сепсисом установлена активация начального звена ПОЛ в крови — повышение уровня гидроперекисей липидов как в сыворотке крови, так и в эритроцитах. Причем повышение уровня гидроперекисей липидов более выражено, если результаты перевести на 1 г липидов сыворотки (здоровые — 0,26; больные до ГФ 0,46, после ГФ 0,44) или на 1 мг эритроцитов (здоровые — 1,63; больные до ГФ 2,35, после ГФ 2,19). Поскольку эритроцитарная мембрана отражает функциональное состояние клеточных мембран организма, можно полагать, что и в других органах происходит активация этого звена ПОЛ. ГФ существенно не влияет на данный процесс.

Оценивая следующий этап ПОЛ — накопление одного из токсичных продуктов малонового диальдегида (МДА), можно отметить отсутствие избыточного накопления его как в эритроцитах, так и в плазме. Установленное снижение уровня МДА в эритроцитах после ГФ сочетается со снижением коэффициента МДА/холестерин (здоровые -1,63; больные до ГФ 1,71, после ГФ — 1,38).

Отсутствие заметного накопления МДА у больных перитонитом при СПН обусловлено значительным использованием одного из мощных антиоксидантов а-токоферола, показатели которого резко снижены у больных как в плазме, так и в эритроцитах. ГФ сопровождается повышением уровня а-токоферола в плазме, что свидетельствует о перераспределении а-токоферола в организме. Поскольку об обеспеченности организма витамином Е принято судить на основании содержания α-токоферола в эритроцитах и на основании коэффициента соотношения α-токоферол/суммарные липиды (индекс Хорвитта), полученные результаты позволяют заключить, что ГФ способствует улучшению тканевой обеспеченности организма витамином Е и тем самым нормализации обмена в мембранах клетки.

Вместе с тем представляет интерес оценить вклад а-токоферола в поддержание гомеостаза ПОЛ у больных перитонитом при СПН и влияние ГФ на эти взаимоотношения. С этой целью нами как для плазмы, так и для эритроцитов вычислены следующие индексы.

Индекс потребности в α-токофероле оказался резко повышенным как в сыворотке, так и в эритроцитах больных. После ГФ данный индекс более резко снизился в плазме и незначительно — в эритроцитах.

Таблица 2. Влияние продолжительной гемофильтрации на показатели перекисного окисления липидов (M±m)

| *Показатель* | *Физиологическая норма* | *Больные* | |
|---|---|---|---|
| | | *до ГФ* | *после ГФ* |
| Общие липиды, г/л | 5,98±0,19 | 5,17±0,33* | 5,18±0,33* |
| Холестерин общий, мМ/л | 4,9±0,1 | 2,54±0,12* | 3,11±0,1** |
| Холестерин в эритроцитах, мг/мл эритроцитарной взвеси | 0,99±0,034 | 0,98±0,059 | 0,96±0,043 |
| Гидроперекиси сыворотки, ед. опт. пл. | 1,56±0,11 | 2,40±0,18 | 2,27±0,15 |
| Гидроперекиси в эритроцитах, ед. опт. пл. в 1 мл "упак." эритроцитов | 1,61±0,11 | 2,30±0,25* | 2,13±0,15 |
| МДА сыворотки, нМ/л | 3,28±0,10 | 4,18±0,24 | 3,70±0,17 |
| МДА в эритроцитах, нМ/л | 1,62±0,17 | 1,68±0,16 | 1,32±0,09* |
| α-Токоферол сыворотки, мкМ/л | 21,3±0,5 | 14,9±1,3* | 19,7±1,2** |
| α-Токоферол в эритроцитах, мкМ/л | 4,15±0,18 | 2,37±0,21* | 2,6±0,3* |
| α -Токоферол/суммарные липиды | 3,56 | 2,88* | 3,8 |
| Индекс потребности в α-токофероле в плазме | 100% | 130% | 165% |
| Индекс потребности в α-токофероле в эритроцитах | 100% | 249% | 210% |
| Индекс обеспеченности α-токоферолом в плазме | 100% | 55% | 82% |
| Индекс обеспеченности α-токоферолом в эритроцитах | 100% | 25% | 31% |
| Индекс недостаточности α-токоферола в плазме | 0 | 45% | 18% |
| Индекс недостаточности α-токоферола в эритроцитах | 0 | 75% | 69% |

Примечание. * — достоверность различий ($p < 0,05$) между здоровыми и больными; ** — между показателями до и после ГФ

Индекс обеспеченности α-токоферолом оказался более низким в эритроцитах. После ГФ он заметно повысился в плазме и очень незначительно увеличился в эритроцитах. Отсюда индекс недостаточности в α-токофероле до ГФ был почти вдвое выше в эритроцитах и практически не изменился в них после ГФ, тогда как заметно поднялся после ГФ в плазме. Последнее свидетельствует о перераспределении α-токоферола после ГФ, но не обеспечивает потребность организма в нем. Эти результаты дают основание для рекомендации о введении а-токоферола больным перитонитом с СПН как до ГФ, так и после нес.

О глубоком нарушении метаболизма холестерина свидетельствуют данные о резком снижении уровня общего холестерина в сыворотке. Вероятно,

понижение уровня а-холестерина в плазме объясняет стабильное содержание холестерина в эритроцитах.

На наш взгляд, динамика показателей ПОЛ у больных перитонитом при СПН после ГФ в основном объясняется тем, что в процессе ГФ происходит удаление конечных продуктов ПОЛ. Удаление продуктов ПОЛ при ГФ временно повышает антиоксидантную защиту организма. Вместе с тем после ГФ показатели ПОЛ и антиоксидантной защиты не приходят в соответствие с физиологической нормой, что обосновывает патогенетическую необходимость назначения антиоксидантов.

В проведенных нами исследованиях [4] установлено, что в процессе ГФ происходит улучшение показателей общей и системной гемодинамики, в том числе улучшение кровоснабжения печени. По нашему мнению, улучшением метаболических процессов в печени объясняется факт увеличения содержания общего холестерина в крови у больных перитонитом после ГФ.

Следует обратить внимание, что, несмотря на антиоксидантную недостаточность, применение оптимизированной методики ГФ в лечении больных перитонитом позволило снизить летальность до 37,8%.

**Выводы**

1. Продолжительная гемофильтрация (ГФ) является эффективным методом экстракорпоральной детоксикации у абдоминальным сепсисом.
2. У больных абдоминальным сепсисом наблюдаются активация первого этапа ПОЛ и резкое снижение обеспеченности организма α-токоферолом. Применение продолжительной ГФ в комплексном лечении больных абдоминальным сепсисом позволяет повысить антиоксидантную защиту, но не ликвидировать ее недостаточность.
3. Динамика взаимоотношений между показателями общего холестерина, показателями ПОЛ и α-токоферола свидетельствует о патогенетической обоснованности применения ГФ у больных абдоминальным сепсисом и раскрывает один из механизмов ее эффективности.
4. Больные перитонитом при СПН нуждаются в коррекции антиоксидантной задолженности.

## Список литературы

1. Абакумов М.М., Александрова И.В., Рей С.И., Дорфман А.Г., Никитина О.В., Давыдов Б.В., Матвеев С.Б., Васина И.В. Ранее применение плазмафереза в комплексной терапии медиастенита // Хирургия. 2008. №2. С.4-9.

2. Андреев А.А., Картавенко В.И., Голиков П.П., Давыдов Б.В., Николаева Н.Ю. Динамика компонентов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы у больных с тяжелой сочетанной травмой // Вопросы медицинской химии. 1998. Т.44. №5. С.485-493.

3. Бердников Г.А., Александрова И.В., Иванов П.А., Гришин А.В., Маткевич В.А., Давыдов Б.В., Матвеев С.Б., Федорова Н.В., Федорова И.Н. Кишечный лаваж как метод детоксикации в комплексной терапии деструктивного панкреатита // Вестник новых медицинских технологий. 2007. Т.14. №4. С.45-47. 5.

4. Ватазин А.В., Фомин А.М., Круглов Е.Е., Зулькарнаев А.Б. Послеоперационный перитонит. Хирургические концепции и методы экстракорпоральной гемокоррекции. М.: Бином, 2014. 416 с.

5. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лабораторное дело. 1983. №3. С.33-36.

6. Матвеев С.Б., Лужников Е.А., Клычникова Е.В., Панченко Л.Ф., Давыдов Б.В., Годков М.А. Влияние гипохлорида натрия на эндогенную интоксикацию при алкогольном абстинентном синдроме // Наркология. 2014. Т.13. №4. С. 43-46.

7. Матвеев С.Б., Александрова И.В., Рей С.И., Федорова Н.В., Федотова И.Н., Давыдов Б.В., Абакумов М.М. Интегральная оценка эндогенной интоксикации у больных гнойным медистенитом // Клиническая лабораторная диагностика. 2008. №8. С.12-13.

8. True S.M., Deutschman C.S., Seymour C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)// JAMA. 2016. Vol. 315, №8. P. 801-810.

9. Yagi R., Suzuki O., Noguchi E. A simple fluorometric assay for type B monoamine oxidase activity in rat tissues // Journal of biochemistry. 1976. Vol.79., №6. P. 1297.

# Правила оформления статей

***Электронный журнал «Биорадикалы и антиоксиданты» – междисциплинарное научное издание, задачей которого служит объединение и активный диалог исследователей и практиков различных специальностей (медиков, биологов, ветеринаров, биофизиков, химиков, техников, математиков и др.), работающих в области свободнорадикальной биологии и медицины.***

***Журнал открыт для расширения и уточнения тематики публикаций, включает полнотекстовые статьи, находящиеся в открытом доступе. Приветствуются обзоры по наиболее значимым «точкам роста» биомедицины, связанным с изучением и использованием роли радикалов и антиоксидантов в биологических системах различного уровня организации.***

**Тематика публикаций:**

1. Свободнорадикальные процессы в биологических системах. Про- и антиоксидатные системы.
2. Озон, его получение, физико-химические свойства и биологическая активность, Экспериментальные и клинические аспекты озонотерапии.
3. Активные формы кислорода: генерация, деградация, физиологическая роль, участие в патогенезе заболеваний человека и животных, клиническое применение.
4. Оксид азота и активные формы азота в биологических системах. NO-метаболизм. Получение и изучение лечебных свойств различных форм оксида азота. Физико-химия и биология естественных депо NO.
5. Природные и синтетические антиоксиданты: получение, исследование свойств, экспериментальные и клинические аспекты.
6. Высокоэнергетические физические факторы и биорадикалы.
7. Аппаратура и оборудование для генерации биорадикалов и NO.
8. Образовательные аспекты и внедрение в учебный процесс представлений об активных формах кислорода, биорадикалах и антиоксидантах.

**Разделы журнала:**

1. Передовая статья (до 15 стр.)
2. Оригинальные исследования (до 15 стр.)
3. Обзоры (до 20 стр.)
4. Краткое сообщение (до 5-7 стр.)
5. Новая аппаратура и оборудование (до 7 стр.)
6. Информация о профильных конференциях и конгрессах (до 5-7 стр.)
7. Рекламный блок

**Технические правила по оформлению рукописей:**

**Статьи следует направлять по электронной почте:**
***cryst-mart@yandex.ru (Мартусевич Андрей Кимович)***
***или psp-aro@mail.ru (Перетягин Сергей Петрович).***

Статья должна быть представлена на русском или английском языке (шрифт Times New Roman, кегль 14, через 1 интервал с шириной полей 2 см.).

Первая страница рукописи должна содержать:

1) название статьи;

2)инициалы и фамилию автора (-ов);

3) полное название учреждения, в котором выполнена работа, город, страну. Фамилии иностранных авторов следует писать в оригинальной транскрипции.

Кроме того, согласно новым требованиям ВАК, просьба представлять на отдельном листе сведения о каждом авторе: 1) фамилию, имя и отчество; 2) должность, ученую степень, ученое звание; 3) полный почтовый служебный адрес (с шестизначным почтовым индексом) и e-mail; 4) номер служебного телефона и факса. Также следует отметить автора (-ов), ответственного за переписку с редакцией.

Название статьи должно быть сформулировано по возможности информативно, но кратко и без сокращений.

Необходимо придерживаться следующего плана написания статьи с выделением каждого пункта в раздел (за исключением обзоров, лекций, кратких сообщений):

- краткое введение с указанием цели данного исследования;
- раздел «Материалы и методы» должен содержать сведения о методах исследования, достаточные для их воспроизведения, однако не следует подробно описывать известные методы, опубликованные ранее. В этом случае достаточно дать ссылку на соответствующий источник литературы. Однако модификации известных методик, разработанные автором (-ами), нужно описать подробно;
- раздел «Результаты и обсуждение» должен быть написан логично с представлением статистической обработки результатов данного исследования;
- выводы и/или заключение, резюмирующие результаты исследования;
- список литературы в алфавитном порядке;
- резюме на русском и английском языках (до 0,5 стр.) с указанием названия статьи, фамилий всех авторов, ключевые слова (не более 10) на русском и английском языках.

Таблицы помещаются в тексте. Каждая таблица должна иметь название и соответствующую ссылку на нее в тексте. В графах таблиц не должно быть пустот или не поясненных прочерков. Таблицы должны быть компактными, их шапка должна соответствовать содержанию граф. Все цифры в таблицах должны соответствовать цифрам в тексте, обязательна их статистическая обработка и объяснение в тексте с указанием принадлежности информации к конкретной таблице. При использовании в таблице сокращений, не упомянутых в статье, или символов (*, ** и т.п.) смысл их объясняется в примечании под таблицей.

Все математические формулы должны быть тщательно выверены.

Все сокращения, принятые в статье, должны быть расшифрованы при первом их упоминании в тексте.

Оформление списка литературы осуществляется в соответствии с требованиями «Ванкуверского стиля». Названия журналов должны быть сокращены в соответствии со стилем, принятым в Index Medicus. Библиографические ссылки в тексте статьи должны даваться номерами в квадратных скобках в соответствии со списком литературы, который формируется в алфавитном порядке: фамилия и инициалы автора (-ов) (сначала отечественные, затем зарубежные авторы, в транскрипции оригинала).

**Образцы оформления литературы**

***Статья в журнале***

Парфенов Е.В., Дьяконова Е.Г., Масенко В.П. Содержание в крови гормонов, нейромедиаторов и гипертрофия левого желудочка у больных гипертонической болезнью // Кардиология. 1995. №7. С. 18–23.

Vega K.Y., Pina I., Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease // Ann. Intern. Med. 1996. Vol. 124, №11. P. 980–983.

***Книга***

Мухарлямов Н.М., Беленков Ю.Н. Ультразвуковая диагностика в кардиологии. М: Медицина, 1981. 320 с.

Ringsven M.K., Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers, 1996. 540 p.

***Глава в книге, статья в сборнике***

Сидоров М.А., Тезяев В.В. Экстренные полостные эндоскопические исследования и операции // В кн.: Хирургия: наука и труд. - Н. Новгород: Изд-во НГМА, 1999. С. 48–50.

Phillips S.Y., Whisnant Y.P. Hypertension and stroke // In: Laragh Y.H., Brenner B.M. (eds.). Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 2nd ed. New York: Raven Press, 1995. P. 465–478.

***Редакторы, составители в качестве авторов***

Эпидемиология и факторы риска ишемической болезни сердца / Под ред. А.Н. Климова. Ленинград: Медицина, 1989. 176 с.

Norman I.Y., Redfern S.Y. (Eds.). Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone, 1996. 325 p.

***Доклад на конференции***

Гринберг А.А., Нестеренко Ю.Л., Лахтина В.Т. Неотложная хирургия дуоденальной язвы // Мат. 8-го Всерос. съезда хирургов. Краснодар. 1995. С. 63–65.

Bengtsson S., Solheim B.G. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics // In: Lun K.C., Degoulet P., editors. MEDINFO 92. Proc. of the 7th World congress on medical informatics; Geneva Switzerland. Amsterdam: North-Holland, 1992. P. 1561–1565.

***Диссертация***

Лопатин Ю.М. Состояние нейрогуморальной регуляции кровообращения у больных с хронической сердечной недостаточностью при лечении различными группами лекарственных препаратов. Автореф дис. ... докт. мед. наук. Москва, 1995. 46 с.

Kaplan S.Y. Post-hospital home health care: the elderly’s acces and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ., 1995.

***Патент, авторское свидетельство***

Ежов Ю.И., Фирсов АЛ. Способ лечения коксартроза при деформациях суставных поверхностей. А.с. 1706591 СССР. 1990.

В оригинальных статьях цитируется не более 30, в передовых статьях и обзорах литературы — не более 60 источников. В список литературы не включаются неопубликованные работы и учебники. Ответственность за правильность данных, приведенных в списке литературы, несет автор.

К статье может быть приложено минимальное, но достаточное количество рисунков (не более 7 для оригинальных статей) с подрисуночными подписями (сюда относятся также диаграммы и графики), необходимых для понимания текста. В тексте статьи должна быть ссылка на каждый рисунок. Рисунки должны быть четкими. Количество обозначений на рисунке должно быть сведено к минимуму, все объяснения следует давать в подрисуночной подписи. Рисунки нумеруются отдельно от таблиц.

Рисунки (графики, диаграммы), представленные в электронном виде, должны быть в файлах с расширением TIFF, BMP, JPEG, PPT. При этом может использоваться любая программа, поддерживающая эти форматы.

Статья должна быть тщательно выверена и отредактирована автором (-ами).

Направление в редакцию работ, уже опубликованных или отправленных в другие журналы, не допускается.

Редакция оставляет за собой право сокращать и редактировать присланные статьи. Корректуры автору (-ам) не высылаются, вся работа с ними проводится по авторскому

оригиналу. Редакция имеет право направить статью экспертам в области, обсуждаемой в статье темы, для независимой (анонимной) научной экспертизы (рецензирования).

Автор (-ы), направляя статью в редакцию, поручает (-ют) редакции обнародовать произведение посредством его опубликования в печати и электронном издании. Редакция при использовании статьи вправе снабжать ее любым иллюстрированным материалом, рекламой и разрешать это делать третьим лицам.

Автор (-ы), направляя статью в редакцию, соглашается (-ются) с тем, что к редакции и издательству журнала переходят исключительные имущественные права на использование статьи (переданного в редакцию журнала материала, в т.ч. такие охраняемые объекты авторского права, как фотографии автора, рисунки, схемы, таблицы и т.п.), в т.ч. на воспроизведение в печати и в сети Интернет; на распространение и тиражирование; на перевод на любые языки народов мира; экспорта и импорта экземпляров журнала со статьей автора (-ов) в целях распространения, на доведение до всеобщего сведения. Указанные выше права автор (-ы) передает (-ют) редакции и издательству без ограничения срока их действия, на территории всех стран мира без ограничения, в т.ч. на территории Российской Федерации. Права на рукопись считаются переданными автором (-ами) редакции и издательству с момента принятия в печать.

За автором (-ами) сохраняется право использования опубликованного материала, его фрагментов и частей в научных и преподавательских целях.

Перепечатка материалов, опубликованных в журнале, другими физическими и юридическими лицами возможна только с письменного разрешения издательства, с обязательным указанием названия журнала, номера и года публикации.

Статьи, оформленные с нарушением вышеизложенных правил, публиковаться не будут.

# Guidelines for Authors

***Journal «Bioradicals and Antioxidants» is a peer-reviewed, open access journal that publishes original research articles as well as review articles in all areas of free radical processes in different biological systems. The general purpose of the journal is integration of specialists (doctors, biologists, veterinary doctors, scientists in physics and chemistry, engineers etc.), working in area of free radical processes in biomedical systems and its practical applications***

**Editor-in-Chief – Prof. Sergey P. Peretyagin (*psp_aro@mail.ru*)**
**Vice-Editor-in-Chef – M.D. Andrew K. Martusevich (*cryst-mart@yandex.ru*)**

**Articles should be sent to Editor-if-Chef or Vice-Editor-in-Chef.**

## MAIN TOPICS:

***1. Free radical processes in biological systems. Pro- and antioxidant systems.***

***2. Reactive oxygen species: generation, physical and chemical aspects, decomposition, physiological effects, role in pathogenesis of different human and animals diseases, clinical use***

***3. Ozone: generation, physical and chemical properties, biological activity. Experimental and clinical aspects of ozone therapy.***

***4. Nitric oxide and reactive nitrogen species in biological systems. Generation, biological and sanogenic effects of NO. Bound forms of nitric oxide, including dinitrosyl iron complexes.***

***5. Natural and synthetic antioxidants: synthesis, investigation of properties, experimental and clinical aspects.***

***6. High-energy physical exposures and bioradicals.***

***7. Devices and equipment for generation of bioradicals and NO.***

***8. Functional and laboratory methods for investigation of free radical processes.***

***9. Educational aspects in area of bioradicals, nitric oxide and reactive oxygen species.***

## JOURNAL SECTIONS:

- Perspectives (up to 15 pages.)
- Original article (up to 15 pages)
- Reviews and mini-reviews (up to 20-25 pages)
- Short communications (up to 7 pages)
- New devices and equipment (up to 7 pages)
- Conferences and Congresses (up to 5 pages)

## MANUSCRIPT PREPARATION

Manuscripts should be in Word Document (Microsoft Word 97, 2003, 2007) in English or Russian and should follow the style of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, a copy of which can be found at www.icmje.org.

## FONTS

Use the font Times New Roman size 14 for the body, size 14 bold for subheadings and headings and size 16 bold for the title, Line spacing=1.

## TITLE PAGE

The title page should state:

• **Title:** title should be without abbreviations.

• **Author(s):** full name of all authors should be mentioned.

• **Affiliation:** Author's affiliation containing: Department, University, City, Country.

• **Corresponding author:** one of the authors should be chosen. Address, telephone and fax number and E-mail should be written.

## ABSTRACT AND KEYWORDS

**[required for perspectives, research articles, review articles]**

• Abstract of research articles and brief reports should be structured as below:

Background, Objectives, Materials/Patients and Methods, Results and Conclusions. A list of 3-10 keywords must be provided for indexing purposes. All keywords should be provided according to MeSH terms at: http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html.

## ARTICLE BODY

Generally includes the: Background, Objectives, Materials/Patients and Methods, Results, Discussion and References.

• **Background:** This should summarize the rationale for the study.

• **Objectives:** State the aims of the study.

• **Materials/Patients and Methods:** This should include exact method or observation or experiment. If an apparatus is used, its manufacturer's name and address should be given in parentheses. If a drug is used, its generic name, dose and route of administration must be given. Statistical method must be mentioned and specify any general computer program used.

• **Results:** Must be presented in the form of text, tables and illustrations.

The contents of the tables should not be all repeated in the text. Instead, a reference to the table number may be given. Long articles may need sub-headings within some sections (especially the Results and Discussion).

• **Discussion:** This should emphasize the present findings and their differences or similarities with other work done in the field by other workers. Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions.

• **Acknowledgments:** All contributors who do not meet the criteria for authorship should be covered in the acknowledgment section. Persons who provided technical help, writing assistance and should also be acknowledged.

• **Tables:** All tables must be included at the end of the manuscript.

Tables in the word file should be separated by page break (each table on a separate page).

The style of table should be simple.

Each cell contains only one paragraph or one line.

• **Figures:** Figures must be included in article body. Resolution should be 300 dpi for a 3*2 inch figure.

• **Units, symbols, and abbreviations:** Internationally accepted units (International System of Units), symbols, and abbreviations must be used. Abbreviations should be used sparingly and must be introduced in parentheses upon the first mention.

• **Drug names:** Generic drug names must be used.

## REFERENCES

This Journal accepts references according to Vancouver style (with some minor changes) rules established by the International Committee of Medical Journal Editors. In the Vancouver system, the only indication required in the text of a paper is a number, allocated in ascending sequence, and presented in the text either in brackets, or in superscript. For example:

"Recent randomized controlled trials in primary care showed benefits for patients with depression from increased telephone support, better cooperation between primary care and mental health professionals, and more systematic follow up (7)."

If the same source is cited again later in the text, the same number is used once more. If multiple references are cited, use a hyphen to join an inclusive range of numbers thus: (2-5). Use commas without spaces to separate non-inclusive numbers in a multiple citation thus: (2-5, 7, 10).

Optimal number of references for perspectives and reviews is up to 60, and for original articles and mini0reviews – up to 30.

***• Books and Other Monographs***

The details needed to construct a book reference are presented below.

Each author's surname followed by the initials (in the same order as they appear on the title page), a comma should separate each author's name. Title of the book. Edition of the book if there has been more than one. Place of publication or town of origin followed by a colon, Publisher's name, followed by a semi-colon, Year of publication. e.g.

*Ringsven M.K., Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers, 1996. 540 p.*

If only a part is cited, add the page numbers, and volume number in the case of multi-volume works, at the end of the reference.

*Meltzer P.S., Kallioniemi A., Trent J.M. Chromosome alterations in human solid tumors // The genetic basis of human cancer. Vogelstein B., Kinzler K.W. (Eds.). New York: McGraw-Hill, 2002. P. 93-113.*

***• Standard journal article***

List the first three authors followed by et al., paper title, journal title abbreviation, year of publishing, volume number, issue number in parentheses, page range. e. g.

*Vega K.Y., Pina I., Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease // Ann. Intern. Med. 1996. Vol. 124, №11. P. 980–983.*

***• Dissertations (not recomended)***

Kaplan S.Y. Post-hospital home health care: the elderly's acces and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ., 1995.

## REVIEW PROCESS

All submitted manuscripts are subject to peer review and editorial approval. Articles will be sent to at least 2 reviewers. Authors are usually notified within 1-2 months about the acceptability of their manuscript.