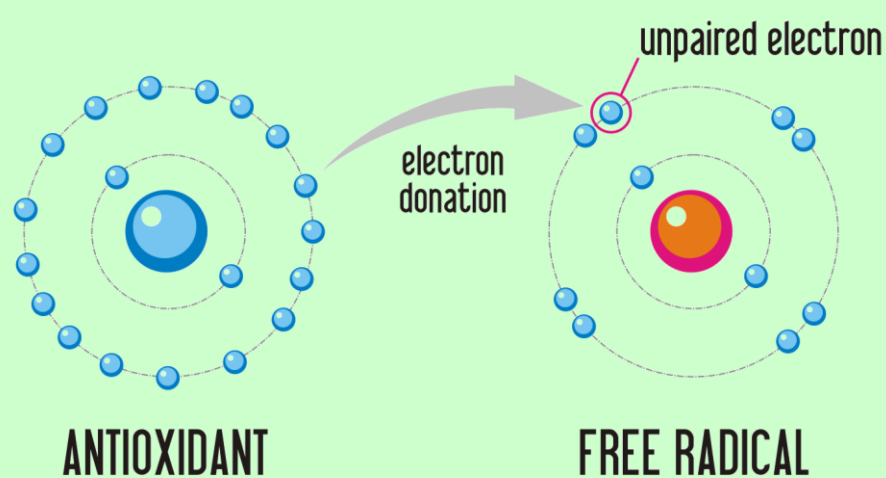


Биорадикалы и Антиоксиданты



Том 2, №2
2015



**АССОЦИАЦИЯ
РОССИЙСКИХ
ОЗОНОТЕРАПЕВТОВ**

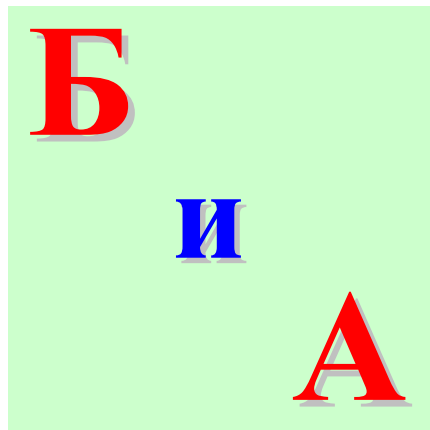
Гл. редактор – д.м.н., проф. С.П. Перетягин
Зам. гл. редактора – д.б.н. А.К. Мартусевич
Отв. секретарь – к.б.н. А.Г. Соловьева
Зав. редакцией – А.А. Мартусевич

Международный редакционный совет:

Lamberto Re (Италия)
Nabil Mawsouf (Египет)
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. Лебянов (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. (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)



**Том 2, №2
2015**

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:
8-909-144-91-82
8-910-391-79-98

e-mail: crist-mart@yandex.ru
psp_aro@mail.ru

Internet: www.ozonotherapy.ru

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

Содержание

Content

ОБЗОРЫ

Мартусевич А.К., Карузин К.А.
Окисдательный стресс и его роль в формировании дизадаптации и патологии

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Гречканев Г.О., Мотовилова Т.М., Горшунова Л.Г., Пономарева И.В., Никишов Н.Н., Иутинский Э.М., Бойченко Т.А., Тюнина А.В., Зеленская И.В.

Экспериментальное обоснование сочетанного использования озono- и бактериофаготерапии в лечении воспалительных заболеваний гениталий

Дерюгина А.В., Мартусевич А.А., Антипенко Е.А., Веселова Т.А.
Влияние хронического стресса на электрокинетические свойства и окислительный метаболизм эритроцитов

Жукова Н.Э., Мартусевич А.К.
Влияние системной озонотерапии на состояние микроциркуляторного русла пациентов с алкогольной абстиненцией

Исхаков И.Р., Исхакова Р.М., Громенко Д.С., Фархутдинов Р.Р.
Влияние сред, используемых при искусственном оплодотворении и культивировании эмбрионов, на свободнорадикальное окисление

REVIEWS

5 Martusevich A.K., Karuzin K.A.
Oxidative stress and its role in dysadaptation and pathology

ORIGINAL ARTICLES

19 Grechkanev G.O., Motovilova T.M., Gorshunova L.G., Ponomareva I.V., Nikishov N.N., Iutinskiy E.M., Boichenko T.A., Tunina A.V., Zelenskaya I.V.
Experimental study of combined use of ozone and bacteriophage therapy in treatment of inflammatory diseases of genitalias

26 Derugina A.V., Martusevich A.A., Antipenko E.A., Veselova T.A.
Influence of chronic stress on electrokinetic properties and oxidative metabolism of the erythrocytes

36 Zhukova N.E., Martusevich A.K.
Influence of systemic ozone therapy on microcirculation state in patients with alcohol abstinence

43 Iskhakov I.R., Iskhakova R.M., Gromenko D.S., Farkhutdinov R.R.
Influence of the medium, is using for reproduction and embryos cultivation, on free radical oxidation

Мартусевич А.А., Ковалева Л.К.
Исследование действия источников
активных форм кислорода на
физико-химические свойства воды

**Стручков А.А., Перетягин С.П.,
Вазина И.Р.**
Значение местного применения
активных форм кислорода для
стимуляции процессов репарации в
ожоговой ране

ИНФОРМАЦИЯ

Перетягин С.П.
Пост-релиз о заседании научного
комитета Международной
ассоциации специалистов по
озонотерапии (12-13 июня 2015 г.)

Правила оформления статей

48 Martusevich A.A., Kovaleva L.K.
Study of the action of reactive oxygen
species on physical and chemical
characteristics of water

**52 Struchkov A.A., Peretyagin S.P.,
Vazina I.R.**
Value of local use of reactive oxygen
species for stimulation of reparation
processes in burn wound

INFORMATION

61 Peretyagin S.P.
Post-release for the meeting of
scientific committee of International
Medical Ozone Federation (12-13
June 2015)

63 *Guidelines for authors*

ОБЗОРЫ**ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС И ЕГО РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ДИЗАДАПТАЦИИ И ПАТОЛОГИИ****А.К. Мартусевич¹, К.А. Карузин^{2,3}**¹*ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр»**Минздрава России, Нижний Новгород*²*ООО «Научно-исследовательский центр фармако-эпидемиологических исследований», Москва*³*ООО «Акафарм», Москва***Abstract**

In this analytical review a free radical processes and state of antioxidant systems are summarized as a common term, the oxidative metabolism. It is shown that these reactions are determined with the current level and the interconversion of the different biological radical primarily of active forms of oxygen and nitrogen. These bioradicals is engaging in interaction with each other are able to exert both positive and negative effects. Thus, oxidative stress is one of the most common pathological processes, the nature of which serves as an unbalance condition of pro- and antioxidant systems of blood, organs and tissues. This allows talking about the need for his direct pathogenetic correction, which can be made by specific and nonspecific antioxidant therapy.

Key words: oxidative stress, reactive oxygen species, oxidative metabolism, pathology

В данном аналитическом обзоре с системных позиций рассмотрены свободнорадикальные процессы и деятельность антиоксидантных систем в рамках единого целого – окислительного метаболизма. Показано, что данная совокупность реакций непосредственно определяется текущим уровнем и взаимопревращением различных биорадикалов, прежде всего активных форм кислорода и азота. Указанные биорадикалы, вступая во взаимодействие друг с другом, способны оказывать как позитивное, так и негативное действие. Таким образом, окислительный стресс является одним из наиболее общих патологических процессов, сущностью которого служит разбалансировка состояния про- и антиоксидантных систем крови, органов и тканей. Это позволяет говорить о необходимости его непосредственной патогенетической коррекции, которая может быть осуществлена средствами специфической и неспецифической антиоксидантной терапии.

Ключевые слова: окислительный стресс, активные формы кислорода, окислительный метаболизм, патология

Согласно существующим представлениям, у всех живых организмов свободнорадикальные процессы и деятельность антиоксидантных систем составляют единое целое – окислительный метаболизм, являющийся одним из базовых компонентов обмена веществ и поддерживаемый соответствующими гомеостатическими механизмами [3, 6, 7, 13, 15, 24]. Данная совокупность реакций непосредственно определяется текущим уровнем и взаимопревращением различных биорадикалов, прежде всего активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА) [3, 13, 16, 30]. Указанные биорадикалы, вступая во многочисленные взаимодействия друг с другом, способны оказывать как позитивное, так и негативное действие (рис. 1).



Рис. 1. Взаимодействие прооксидантов и антиоксидантной системы клеток и тканей *in vivo* [6, 7, с изменениями]

Характер последнего, которое может провоцировать формирование окислительного повреждения биомолекул [6, 9, 13, 24, 26], непосредственно определяется видом свободного радикала и его источником (табл. 1).

Известно, что в условиях развития большинства патологических процессов имеет место гиперсинтез АФК различной степени выраженности [4, 6, 15, 17]. При этом при целом ряде заболеваний данная тенденция сопровождается быстрым расходом резервов антиоксидантной системы [7, 14, 18, 21-32].

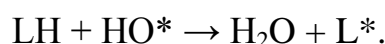
Указанное сочетание метаболических сдвигов принято называть окислительным (оксидативным) стрессом, рассматриваемым в последнее время как самостоятельный синдром [6, 9, 15]. На молекулярно-клеточном уровне он, в частности, характеризуется отчетливой активацией процессов липопероксидации с последующим изменением свойств биомембран [3] и, как следствие, их дисфункцией [2, 13, 42].

Следует отметить, что нарушение физиологического уровня (интенсивности и скорости) реакций, относящихся к перекисному окислению липидов, служит одной из основных причин клеточной дисфункции [3, 5, 15]. В норме в указанные процессы вступают присутствующие в биологических мембранах и включенные в липопротеины полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) [24, 26, 36]. Действие относительно высоких концентраций активных форм кислорода или азота обеспечивает синтез гидрофобных радикалов, способных к реакциям между собой [10, 13, 16, 31].

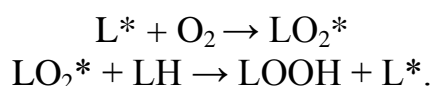
Таблица 1. Классификация биорадикалов, их источники и инициируемые реакции

<i>Биорадикал</i>	<i>Источник генерации</i>	<i>Иницируемые реакции</i>
<i>Первичные радикалы</i>		
Семихиноны	Цепи переноса электронов	$HQ\cdot + O_2 \rightarrow Q + \cdot O^{2-} + H^+$
Супероксид-анион радикал	Фагоциты	$O^{2-} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$
Оксид азота (NO)	Эндотелиальные клетки, нейроны и др.	$NO\cdot + \cdot O^{2-} \rightarrow OONO^-$ (пероксинитрит)
<i>Вторичные радикалы</i>		
Гидроксильный радикал	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + HO^-$ (реакция Фентона) $HOCl + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + Cl^- + HO\cdot$ (реакция Осипова)	Окислительная модификация нуклеиновых кислот, инициация липопероксидации
Радикалы липидов	Липопероксидация	Окислительная деструкция мембран, модификация мембранных энзимов
Радикалы антиоксидантов	Липопероксидация	Способны выступать в качестве прооксидантов
Радикалы-метаболиты ксенобиотиков	Яды, токсические соединения, некоторые лекарственные препараты	Образование вторичных радикалов
Фотоиндуцируемые биорадикалы	Хромофоры	Образование вторичных радикалов

Рассматривая химизм данного процесса, нужно подчеркнуть, что на первой стадии имеет место атака сопряженных двойных связей ПНЖК гидроксильным радикалом (HO^*) и гидропероксидным радикалом (HO_2^*) с образованием радикалов липидов [15]:

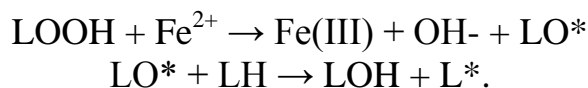


В дальнейшем данный липидный радикал способен взаимодействовать с O_2 , что приводит к формированию липопероксид-радикала, который атакует другие молекулы ПЖК [28, 37, 41], инициируя в условиях *in vivo* цепную реакцию по механизму:



Важно отметить, что скорость данных реакций лимитируется количеством субстрата и уровнем функционирования антиоксидантной системы.

Параллельно взаимопревращениями липидов и липидных радикалов происходит реакция части последних с комплексами железа, что приводит к образованию новых биорадикалов, поддерживающих процессы липопероксидации [31]:



Синтезирующиеся в этих и других реакциях радикалы липидов, как иные промежуточные продукты перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид, диеновые и триеновые конъюгаты и др.) могут индуцировать окислительную модификацию белков и нуклеиновых кислот [13]. Общим механизмом, интегрирующим указанные процессы служит формирование межмолекулярных «сшивок» с участием альдегидных функциональных групп биомолекул [37]. Подобные нарушения химического состава соединений приводят к невозможности выполнения ими биологической роли [14, 17].

Гипероксидация мембранных липидов угрожает стабильности мембранных структур в целом, отражаясь и на состоянии мембраносвязанных протеинов, в том числе белков с каталитической активностью. Это, в частности, может провоцировать ингибирование таких ферментов, как глюкозо-6-фосфатаза и Na/K-АТФаза, непосредственно обеспечивающие гомеостазирование уровня ионов в клетке [6, 15, 30]. Кроме того, индуцированное биорадикалами повреждение мембранных структур приводит к нарушению процессов возбуждения в них, дизрегуляции функционирования ионных каналов, снижает их роль в обеспечении энергопродукции [1-5]. Дополнительно инициируется комплекс изменений деятельности митохондрий, включающий как сдвиги каталитических свойств матриксных ферментов, так и модификация работы электронотранспортной цепи [17, 41].

На тканевом уровне это проявляется в форме воспалительной реакции, нейродегенеративных изменений, онкогенеза и т. д. [31]

Необходимо подчеркнуть, что повреждающее действие биорадикалов обеспечивается не только различными активными формами кислорода, но и пероксинитритом (продуктом их взаимодействия с NO), многократно стимулирующим липопероксидацию в биомембранах и сывороточных липопротеинах, детерминируя повышение атерогенного риска [27, 32].

Интересно, что основные действующие АФК являются короткоживущими соединениями, в том числе – интермедиатами, присутствие которых верифицировать затруднительно. В связи с этим большинство биохимических подходов к оценке интенсивности процессов перекисного окисления липидов – косвенные [4, 11, 17]. Так, одним из наиболее распространенных методов служит исследование уровня стабильного терминального продукта липопероксидации – малонового диальдегида (МДА) [3]. В то же время на концентрацию данного метаболита оказывает влияние и выраженность оксидации отдельных нуклеотидов и аминокислот [11].

Более точным методическим подходом служит изучение биофлуоресценции, позволяющий в режиме реального времени оценить уровень радикалов липидов при детектировании их свечения в видимой области спектра в спонтанном и Fe-индуцированном режиме [3]. Данный метод основан на использовании реакции Фентона [4, 8]. Кроме того, указанная биофизическая технология дает возможность уточнить текущую общую антиоксидантную активность биосубстрата [3].

В физиологических условиях совокупность антиоксидантных систем позволяет минимизировать и гомеостазировать клеточную концентрацию активных форм кислорода [5, 7, 15], однако при развитии и прогрессировании окислительного стресса ее резервы снижаются за счет двух основных причин [1, 15, 26]. Во-первых, наличие окислительного стресса подразумевает гиперсинтез АФК, который необходимо купировать, расходуя антиоксидантную емкость крови. Во-вторых, существенное повышение концентрации биорадикалов приводит к окислительной модификации самих компонентов антиоксидантной системы, дополнительно редуцируя ее резервы.

В динамике формирования окислительного стресса имеют место окислительные трансформации нуклеиновых кислот, липидных и протеиновых макромолекул [13]. Естественно, что в клетке предусмотрены механизмы репарации данных биомолекул от окислительного повреждения, однако в условиях окислительного стресса их интенсивность значительно меньше скорости образования, что служит мощным фактором их накопления и, следовательно, триггером оксидативного стресса [4, 6, 9, 13, 33, 39].

Несмотря на многочисленность физико-химических агентов, вызывающих окислительный стресс, на первый план в настоящее время принято выдвигать активные формы кислорода, инициирующие свободнорадикальные и самоподдерживающиеся процессы в клетках и тканях *in vitro* и *in vivo* [6, 15, 17].

В спектр основных АФК включают супероксид-анион (O_2^-), синглетный кислород (1O_2), перекись водорода (H_2O_2) и гидроксильный радикал (OH^\cdot) и др. Известно, что в организме животных и человека наибольшее значение как прооксиданту принадлежит супероксид-аниону, синтезирующемуся в процессе одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода [2, 12]. Метаболизм супероксида связан с участием супероксиддисмутазы, трансформирующей соединение в перекись водорода, в свою очередь, преобразующуюся в присутствии ионов двухвалентного железа или одновалентной меди в гидроксильный радикал неэнзимным путем. Гидроксильный радикал следует рассматривать как сильнейший оксидант, имеющий значительный редокс-потенциал (около +1,35 В), вследствие чего потенциально способный к деструкции практически всех биомолекул организма [15].

Принципиально по законам химии возможно одноэлектронное восстановление кислорода за счет окисления веществ с редокс-потенциалом ниже или равным -0,15 В [2, 3, 15]. Для этой цели были эволюционно подобраны вещества с повышенным кинетическим барьером по реакции с кислородом. Практически единственным исключением служат многие коферменты и простетические группы энзимов, функционирующие в начале и середине дыхательной цепи, например семихинон кофермента Q ($CoQH$). Последний в ряде случаев обеспечивает передачу электрона, но не собственному окислителю (цитохрому b1), а молекулярному кислороду [2].

Также нужно подчеркнуть, что АФК способны синтезироваться как при нарушении деятельности цитохрома P450, так и в результате оксидации отдельных метаболитов [28].

В качестве примера, иллюстрирующего повреждающее действие АФК, можно привести их участие в обеспечении опухолевого роста, включающее следующие пункты [17]:

- активация митоза,
- блокирование межклеточных коммуникаций, тормозящее апоптоз,
- высвобождение из молекулярного депо (ферритина) ионов железа, катализирующих синтез гидроксильных ионов,
- выделение из биомембран свободной арахидоновой кислоты и ее последующая биотрансформация цитохромом P-450 в ряд высокореактивных соединений.

В современной отечественной и зарубежной литературе присутствуют данные об активации гена *c-src* под влиянием активных форм кислорода как общем пути реализации действия кислородных биорадикалов, что обеспечивает митогенный эффект и блокирование межклеточных коммуникаций при действии активных форм кислорода реализуется через общее звено посредством активации продукта гена [6, 15].

Постоянно ведутся изыскания в области расшифровки функционального значения гена *c-src* как основы для поиска рецептора к АФК [15], однако результаты данных исследований не дают однозначной информации по указанному вопросу.

Окислительная модификация нуклеиновых кислот биорадикалами

Показано, что основным химическим агентом, обеспечивающим окислительную модификацию нуклеиновых кислот, служит гидроксильный радикал, меньший вклад в данный процесс вносит супероксид-анион радикал [13]. При этом гидроксильный радикал обладает многочисленными молекулярными мишенями, среди которых – не только пиримидиновые и пуриновые основания, но и остатки рибозы и дезоксирибозы [6].

Известно, что супероксид-анион радикал селективно реагирует с гуаниновыми основаниями с образованием широкого спектра окисленных форм, а терминальным продуктом данной цепи реакций является общее соединение - 7,8-дигидро-8-гидроксигуанозин [2].

Кроме того, следует подчеркнуть, что процессы окислительной модификации нуклеиновых кислот и липопероксидации взаимосвязаны общими агентами-оксидантами [28].

На основании имеющихся в литературе данных можно заключить, что степень окислительной модификации нуклеиновых кислот внутри клетки неодинакова [15]. Так, ДНК митохондрий способна более активно окисляться, чем данное соединение, локализующееся в ядре клетки, что обусловлено, во-первых, протективной ролью гистоновых белков и, во-вторых, существенно большей действующей концентрацией АФК в первом случае. В частности, при реакции генерируемой дыхательной цепью перекиси водорода с ионами Fe^{2+} и Cu^{2+} митохондриальной мембраны формируется гидроксильный радикал, атакующий локализованную здесь нуклеиновую кислоту. Кроме того, перекись-индуцированные повреждения последней могут быть спровоцированы активностью моноаминоксидазы [6].

В свою очередь, нарушения структуры и, следовательно, функциональных свойств митохондриальной ДНК инициируют сдвиги синтеза компонентов дыхательной цепи, приводящие к нарастанию уровня супероксид-анион радикала [7]. Дополнительная стимуляция данного процесса связана с деятельностью эндонуклеаз, инициируемых увеличением внутриклеточной концентрации кальция, имеющей место при развитии оксидативного стресса [10].

Окислительная модификация нуклеиновых кислот ядра активными формами кислорода приводит к формированию различных хромосомных аббераций.

Окислительная модификация белков биорадикалами

Известно, что в условиях окислительного стресса наиболее часто подвергаются окислительной модификации такие аминокислоты, входящие в состав основных белков организма, как лизин, пролин и аргинин [13]. Важно отметить, что это происходит, несмотря на неспецифическое действие биогенных или ксеногенных радикалов на полипептидную цепь. В то же время изменения, индуцируемые активными формами кислорода в белках, затрагивают не только их первичную структуру, но и способны изменять вторичную и третичную структуру протеинов, создавая условия для агрегации последних или даже их фрагментирования [6, 12, 32]. К наиболее подверженным окислительной модификации белкам принято относить протеины, насыщенные SH-группами (например, дегидрогеназы, АТФазы и др.) [37].

Интегрированные представления об особенностях окислительной модификации белков активными формами кислорода и другими биорадикалами отображены в таблице 2 [6, 13, 15].

Следует подчеркнуть, что до настоящего времени анализ окислительной модификации протеинов оставался прерогативой экспериментально-теоретического осмысления проблемы. Многими авторами в его рамках данная совокупность реакций рассматривалась с позиций ингибирования каталитической активности энзимов, а также непосредственного нарушения структуры белков при действии сильных оксидантов [10, 13, 28, 43, 44].

С целью мониторинга выраженности рассматриваемого процесса были разработаны соответствующие лабораторные технологии, основанные на оценке спонтанного окисления протеинов [4, 8]. Наиболее распространенный метод связан с проведением 2,4-динитрофенилгидразинового теста, базирующегося на сродстве к указанному соединению терминальных продуктов свободнорадикальных реакций, образующихся *in vivo* [17]. При этом синтезируются 2,4-динитрофенилгидразоновые вещества.

Интересно, что в организме принципиально возможна аутоstimуляция свободнорадикальных процессов, связанная именно с окислительной модификацией протеинов [13]. В частности, известна физиологически протекающая реакция, катализируемая ксантиндегидрогеназой и реализующаяся путем трансформации ксантина и гипоксантина в мочевую кислоту – один из биоантиоксидантов неферментного ряда [15]. В условиях окислительного стресса под влиянием активных форм кислорода имеет место окисление тиогрупп фермента с изменением характера каталитической активности последнего. Трансформация рассматриваемого энзима в ксантиноксидазу приводит к

гиперсинтезу ею супероксид-анион радикала, инициирующего увеличение объема свободнорадикальных реакций, «подстегивающих» окислительную модификацию биомакромолекул [26].

Таблица 2. Особенности окислительной модификации протеинов биорадикалами

Модифицируемая аминокислота или функциональная группа	Биорадикал	Продукты модификации	Особенности модификации
Цистеин	Гидроксильный радикал, гипохлорит-анион	сульфоновые, дисульфидные связи	S-S-связи
Метионин	ОН ⁻ , ОС ⁻ , Н ₂ О ₂ , О ₂ ⁻	сульфоксиды	Вступают в дальнейшие реакции
Гистидин	Супероксид-анион-радикал	2-оксо-гистидин	Образуют поперечные сшивки протеинов
Пролин, аргинин	Широкий спектр АФК	образование полуальдегидов	Образуют поперечные сшивки протеинов
Триптофан	пероксинитрит, гидроксильный радикал	образование 6-нитротриптофана	образование флуоресцентных продуктов
Фенилаланин	гидроксильный радикал	—	образование битирозольных радикалов
Тирозин	Активные формы кислорода, оксид азота, гипохлорит-анион	нитрирование, хлоринирование или образование битирозиновых сшивок	ингибирование передачи клеточного сигнала через тирозинкиназу посредством блокирования фосфорилирования тирозина
Терминальные аминокислоты протеинов	Гипохлорит-анион	образование белковых карбониллов	легко образуют поперечные сшивки

Иной механизм окислительной модификации белков обусловлен влиянием свободных радикалов на протеины, содержащие металлы с переменной валентностью [7, 13, 27]. В этом случае при развитии окислительного стресса происходит перекись-зависимый синтез гидроксильного радикала, в свою очередь реагирующего с аминокислотами активного центра энзима, что может индуцировать его ингибирование вплоть до инактивации. Например, у мышей, имеющих мутации супероксиддисмутазы, развивается прогрессирующее нарушение деятельности митохондриального комплекса I, энзимов с серножелезистыми кластерами, сукцинатдегидрогеназы и др., ингибируя функционирование цикла Кребса и нарушения электротранспортной цепи [37].

Окислительной модификации также подвергаются карбоксильные группы протеинов, преобразующиеся под влиянием биорадикалов в карбонильные с дальнейшим реагированием с аминокислотными группами [15]. Эта совокупность процессов инициирует образование оснований Шиффа и, следовательно, формированию многочисленных поперечных сшивок белковой макромолекулы с изменением их активности.

Кроме вышеперечисленного, аналогичные процессы (прежде всего, химическое сшивание) при прогрессировании оксидативного стресса имеют место в результате гликирования протеинов [13].

Влияние оксидативного стресса на процессы апоптоза

На сегодняшний момент неоспоримым является факт обязательного участия активных форм кислорода с свободнорадикальных реакций в апоптозе [19, 30]. При этом, в частности, предполагается, что при реализации апоптоза выявляются клетки с чрезмерно повышенной концентрацией АФК. В то же время роль и значимость АФК остается дискуссионной, что связано с возможностью реализации данного каскада реакций в анаэробных условиях, индуцирующих генез биорадикалов [33]. На основании нефизиологичности указанных условий протекания реакций гипотеза о вторичной роли оксидативного стресса в инициации апоптоза следует считать несостоятельной [35].

Анализ имеющихся в литературе сведений однозначно свидетельствует о значимости у активных форм кислорода выраженного метаболического эффекта апоптоза, ассоциированного, в частности, с генетическими нарушениями НАДФазы [15]. Это приводит к существенной редукции апоптоза нейтрофилов, в свою очередь обуславливающих образование хронических гранулем, а также незавершенности воспалительного процесса [7, 18, 36].

В последние десятилетия подробно исследуется характер участия активных форм кислорода (синглетного кислорода, гидроксильного радикала, перекиси водорода, оксида азота и др.) в инициации и прогрессировании апоптоза [15]. Неоспоримо, что процессы синтеза АФК протекают постоянно во всех аэробных клетках, находясь под контролем антиоксидантной системы [1, 10, 30]. Установлено, в частности, что при гипоксических состояниях инициированный глюкокортикоидными гормонами апоптоз тимоцитов выраженно ингибируется [44]. Напротив, при непосредственном действии перекиси водорода, оксида азота, пероксинитрита, радиационного и ультрафиолетового излучений, а также фармакологических соединений имеет место стимуляция процессов апоптоза [26].

Следует отметить, что индукция данного процесса сопряжена с ингибированием деятельности антиоксидантных систем. На данном фоне клетки, исходно характеризующиеся недостаточностью антиоксидантных резервов, в максимальной степени подвержены апоптозу, что детерминирует отчетливое протективное действие соединений с антиоксидантной активностью на указанный процесс [18]. Несмотря на приведенные сведения, характер, особенности и патогенетическая значимость связи запрограммированной гибели клеток и модуляции уровня активных форм кислорода продолжает исследоваться [19]. Одновременно не установлена очередность событий в связке «апоптоз – оксидативный стресс».

Роль окислительного стресса в формировании патологии человека

Известно, что в патогенезе более чем 100 заболеваний организма человека и животных принимает участие окислительный стресс, трактуемый как синдром основного заболевания (рис. 2) [6, 15]. На этом основании указанные процессы, включающие инициацию липопероксидации, стимуляцию свободнорадикальных реакций, денатурацию протеинов и ДНК, принято рассматривать как свободнорадикальную патологию [7]. Базисным метаболическим сдвигом последних является резкое смещение баланса про- и антиоксидантных систем в сторону оксидантов [2, 3].



Рис. 2. Многообразие патологии, ассоциированной с развитием окислительного стресса

Как уже было указано, синтезирующиеся биорадикалы способны активировать вторичные реакции, вызывать окислительную модификацию

биомакромолекул (прежде всего – протеинов и ДНК) и стимулировать липопероксидацию, оказывая негативное влияние на функционирование клеток организма. Эти нарушения приводят к полной или частичной деградациии молекулярных мишеней АФК либо изменению их свойств, приводя к формированию относительно стабильных метаболитов, которые могут быть использованы в качестве индикаторов интенсивности окислительного стресса и, соответственно, скорости протекания свободнорадикальных реакций [13, 15]. Наиболее часто для решения данного круга задач применяют оценку уровня продуктов липопероксидации, липопротеинов плазмы крови (диеновых и триеновых конъюгатов, гидроперекисей дипидов), а также ряда альдегидов, в первую очередь – малонового (МДА) [4, 8, 17].

В экспериментальных исследованиях для оценки механизмов инициации свободнорадикальных реакций могут быть, в частности, использованы циклы «ишемия – реперфузия» [5-7, 16].

Заключение

Таким образом, окислительный (оксидативный) стресс является одним из наиболее общих патологических процессов, сущностью которого служит разбалансировка состояния про- и антиоксидантных систем крови, органов и тканей. Это позволяет говорить о необходимости его непосредственной патогенетической коррекции, которая может быть осуществлена средствами специфической и неспецифической антиоксидантной терапии.

Учитывая многообразие радикалов, которые способны модифицировать состояние биомакромолекул, а также принадлежность атакующих агентов как к кислородным, так и к иным (активные формы азота, хлора и др.), представляется логичным обобщить понятия «окислительный стресс», «нитрозативный стресс», «галогенизирующий стресс» и др. в форме интегрального понятия «*биорадикальный стресс*».

Список литературы

1. Бобырев В.Н., Почернява В.Ф., Стародубцев С.Г. с соавт. Специфичность систем антиоксидантной защиты органов и тканей - основа дифференцированной фармакотерапии антиоксидантами // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1994. Т. 57, №1. С. 47-54.
2. Богач П.Г., Курский М.Д., Кучеренко Н.Е., Рыбальченко В.К. Структура и функции биологических мембран. К.: Вища школа, 1981. 336 с.
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252с.
4. Дементьева И.И. Лабораторная диагностика и клиническая оценка нарушений гомеостаза у больных в критическом состоянии. Москва, 2007. 161 с.
5. Зборовская И.А., Банникова М.В. Антиоксидантная система организма, ее значение в метаболизме. Клинические аспекты // Вестник РАМН. 1995. №6. С. 53-60.
6. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. М.: Наука, 2001. 340 с.

7. Казимирко В.К., Мальцев В.И., Бутылин В.Ю., Горобец Н.И. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия. К.: Морион, 2004. 160 с.
8. Камышников В.С. Карманный справочник врача по лабораторной диагностике. Минск: Бел. наука, 2002. 463 с.
9. Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // Успехи современной биологии. 1993. №4. С. 456-470.
10. Клебанов Г.И., Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В. с соавт. Антиоксидантная активность сыворотки крови // Вестник РАМН. 1999. №2. С. 15-22.
11. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф. Биохимические показатели в клинике внутренних болезней. Москва: МЕДпресс, 2006. 208 с.
12. Кондрашова М.Н. Отрицательные аэроионы и активные формы кислорода // Биохимия. 1999. Т. 64, №3. С. 430-432.
13. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита // Успехи современной биологии. 1993. Т. 113, вып. 1. С. 107-122.
14. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Биологическая роль глутатиона // Успехи современной биологии. 1990. Т. 110, вып. 1(4). С. 20-33.
15. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А. с соавт. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М., 2006. 556 с.
16. Скулачев В.П. Кислород в живой клетке: Добро и зло // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. Т. 3. С. 4-10.
17. Шанин В.Ю. Патопфизиология критических состояний. СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2003. 435 с.
18. Anderson R., Lukey P.T., Theron A.J., Dippenaar U. Ascorbate and cysteine-mediated selective neutralisation of extracellular oxidants during N-formyl peptide activation of human phagocytes // Agents and Actions. 1987. Vol. 20, N1/2. P. 77.
19. Bendich A., D'Apollito P., Gabriel E., Machlin I.J. Modulation of the immune system function of guinea pigs by dietary vitamin E and C following exposure to oxygen // Fed. Proc. 1983. Vol. 42. P. 923.
20. Bendich A., Machlin I.J., Scandurra O. et al. The antioxidant role of vitamin C // Adv. in Free Radical Biology & Medicine. 1986. Vol. 2. P. 419.
21. Burton G.W., Ingold K.U. Beta-carotene: an unusual type of antioxidant // Science. 1984. Vol. 224. P. 569-573.
22. De Whalley C.V., Rankin S.M., Hoult J.R.S. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages // Biochem. Pharmacol. 1990. Vol. 39. P. 1743-1750.
23. Delorenze G.N., McCoy L., Tsai A.-L. et al. Daily intake of antioxidants in relation to survival among adult patients diagnosed with malignant glioma // BMC Cancer. 2010. Vol. 10. P. 215.
24. Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL // Free Radical Biol. Med. 1992. Vol. 13. P. 341-390.

25. Evans R.M., Currie L., Campbell A. The distribution of ascorbic acid between various cellular components of blood, in normal individuals, and its relation to the plasma concentration // *Brit. J. Nutr.* 1982. Vol. 47. P. 473.
26. Frei B. Natural antioxidants in human health and disease. Orlando, FL: Academic Press, 1993.
27. Frei B., Gaziano J.M. Content of antioxidants, preformed lipid hydroperoxides and cholesterol as predictors of the susceptibility of human LDL to metal ion-dependent and independent oxidation // *J. Lipid Res.* 1993. Vol. 34. P. 2135-2145.
28. Frei B., Stocker R., Ames B.N. (1988) Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. Vol. 85. P. 9748-9752.
29. Fukuzawa K., Inokami Y., Tokumura A. et al. Rate constants for quenching singlet oxygen and activities for inhibiting lipid peroxidation of carotenoids and α -tocopherol in liposomes // *Lipids.* 1998. Vol. 33. P. 751-756.
30. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy // *Lancet.* 1984. P. 1396-98.
31. Halliwell B.J., Gutteridge M.C. Free radicals in Biology and Medicine. Third edition. Oxford: Oxford University Press, 1999. 937 p.
32. Hardy P., Dumont I., Bhattacharya M. et al. Oxidants, nitric oxide and prostanoids in the developing ocular vasculature: a basis for ischemic retinopathy // *Cardiovasc. Res.* 2000. Vol. 47. P. 489-509.
33. Krinsky N.L. Membrane antioxidants // *Ann. NY. Acad. Sci.* 1988. Vol. 551. P. 17-33.
34. Liebster D.C. Antioxidant reactions of carotenoids // *Ann. NY. Acad. Sci.* 1993. Vol. 691. P. 20-31.
35. Lorenzo Y., Azqueta A., Luna L., et al. The carotenoid β -cryptoxanthin stimulates the repair of DNA oxidation damage in addition to acting as an antioxidant in human cells // *Carcinogenesis.* 2008. Vol. 30, №2. P. 308-314.
36. Lynch S.M., Morrow J.D., Roberts L.J. II, Frei B. (1994) Formation of non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) in plasma and low density lipoprotein exposed to oxidative stress in vitro // *J. Clin. Invest.* 1994. Vol. 93. P. 998-1004.
37. Pryor W.A. Free radicals and lipid peroxidation: what they are and how they got that way // In: Frei B. (ed.) Natural antioxidants in human health and disease. Orlando, FL: Academic Press. 1994. P. 1-24.
38. Retsky K.L., Freeman M.W., Frei B. Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 1304-1309.
39. Stahl W., Sies H. Antioxidant effects of carotenoids: implication in photoprotection in humans // In: Handbook of anti-oxidants. Eds. Cadenas E, Packer L. – N.Y.: Marcel Dekker, 2002. P. 223-233.
40. Stahl W., Sies H. Effects of carotenoids and retinoids on gap junctional communication // *Biofactors.* 2001. Vol. 15. P. 95-98.

41. Stocker R., Frei B. Endogenous antioxidant defences in human blood plasma // In: Sies H. (ed.) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. London: Academic Press. 1991. P. 213-243.

42. Stocker R., Glazer A.N., Ames B.N. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin // PNAS. 1987. Vol. 84. P. 5918-5922.

43. Theron A., Anderson R. Investigation of the protective effects of the antioxidants ascorbate, cysteine, and dapsone on the phagocyte-mediated oxidative inactivation of human 1-protease inhibitor in vitro // Am. Rev. Respir. Dis. 1985. Vol. 132. P. 1049.

44. Yilmaz T., Kogan E.G. The role of oxidants and antioxidants in adenoid hypertrophy in children // Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 2004. Vol. 68, N8. P. 1053-1058.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ СОЧЕТАННОГО
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОЗОНО- И БАКТЕРИОФАГОТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЕНИТАЛИЙ**

Г.О. Гречканев¹, Т.М. Мотовилова¹, Л.Г. Горшунова², И.В. Пономарева³,
Н.Н. Никишов⁴, Э.М. Иутинский⁵, Т.А. Бойченко⁶, А.В. Тюнина⁷,
И.В. Зеленская⁸

¹ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»
Минздрава России, Нижний Новгород

²ФГУП «НПО «Микроген» МЗ России, Нижний Новгород

³ООО «Клиника современных технологий «Садко», Нижний Новгород

⁴Медицинский институт БФУ им. И. Канта, Калининград

⁵ГБОУ ВПО Кировская ГМА МЗ РФ, г. Киров

⁶ООО Медицинский центр «ДА ВИНЧИ», Ростов-на Дону

⁷ООО Мед Центр Здоровья, Сходня, Московской обл.

⁸Перинатальный центр ГБУЗ Детская краевая больница министерства
здравоохранения Краснодарского края, Краснодар

Abstract

Article presents data about traditional and alternative approach are provided to treatment of infectious processes, the experimental assessment of advisability of application of bacteriophages and ozone is given at treatment of a genital inflammatory diseases.

Key words: inflammatory diseases, bacteriophages, ozonotherapy.

В статье представлены сведения о традиционном и альтернативном подходе к лечению инфекционных процессов, дана экспериментальная оценка целесообразности и перспектив совместного применения бактериофагов и медицинского озона при лечении воспалительных заболеваний гениталий.

Ключевые слова: воспалительные заболевания, бактериофаги, озонотерапия

Лечение воспалительных заболеваний гениталий у женщин является одной из наиболее насущных проблем практической медицины, поскольку с одной стороны распространенность этой патологии не имеет тенденции к снижению, а с

другой — комплексная терапия далеко не всегда достигает поставленных целей. Результатом является хронизация воспаления, формирование анатомических нарушений тазовых органов, их функциональная несостоятельность, ведущие к развитию расстройств менструального цикла, бесплодия, формированию синдрома тазовых болей, резкому снижению качества жизни в целом [3,7]. В настоящее время очевиден приоритет антибиотиков в лечении воспалительных процессов любых локализаций. При этом количество потребляемых антибактериальных химиопрепаратов, особенно, широкого спектра действия, постоянно увеличивается, однако необходимо признать, что принципиально это ситуацию не улучшает, напротив, вызывает формирование антибиотикорезистентности [1, 11, 13], сопровождается целым рядом побочных эффектов [9] и приводит к удорожанию лечения. В связи с этим задача повышения эффективности терапии воспалительных процессов женской половой сферы путем использования альтернативных методов лечения, находится на острие внимания клиницистов [4, 5]. Уже не одно десятилетие в России и за рубежом исследуются возможности терапевтического применения медицинского озона, в т.ч. в лечении воспалительных заболеваний, а также ведутся разработки по применению в этой области препаратов бактериофагов [7]. С нашей точки зрения, совместное использование озонотерапии и бактериофаготерапии в комплексном лечении воспалительных процессов гениталий представляется весьма целесообразным и теоретически перспективным.

Цель исследования. Целью исследования явилась доклиническая оценка в условиях *in vitro* возможности совместного применения медицинского озона и бактериофагов, а также предварительное обоснование методики использования данных лечебных факторов в терапии инфекционно-воспалительных заболеваний женских половых органов.

Материалы и методы исследования.

1. Препарат «Пиобактериофаг комплексный жидкий» производства цеха бактериофагов Нижегородского предприятия по производству бактериальных препаратов «ИмБио» филиала ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России
2. Озонатор «Medozons VM» производства г. Арзамас Нижегородской области
3. Лабораторное оборудование цеха бактериофагов «ИмБио».

Использованный в нашем опыте пиобактериофаг представляет собой смесь стерильных фильтратов фаголизатов различных микроорганизмов. В эксперименте были использованы производственные штаммы микроорганизмов *Escherichia coli*, *Enterococcus* и *Klebsiella* цеха бактериофагов, использующиеся в контроле серийных препаратов.

В стерильном флаконе с соблюдением правил асептики смешивали пиобактериофаг и свежеприготовленный озонированный физиологический раствор в соотношении 1:1. Для этого последовательно применяли следующие насыщающие концентрации озono-кислородной смеси – 1500, 3000, 5000, 8000 и 10000 (мкг/л).

Определение активности смеси проводилось титрованием по методу Аппельмана – немедленно после смешивания, через 30 минут и через 1 час.

Степенью бактерицидной активности или «титром» бактериофага является то наибольшее разведение препарата, в котором среда становится прозрачной, т. е. рост культуры не наблюдается и произошел полный лизис микроорганизмов фаговыми частицами.

Готовили ряд последовательных десятикратных разведений серии препарата пиобактериофага и смеси «пиобактериофаг (той же серии) + физраствор» в питательной среде (бульон мясо-гидролизный) с обязательной сменой пипеток.

В первую пробирку с 4,5 мл питательной среды вносили градуированной пипеткой 0,5 мл препарата (или смеси) – разведение в 10^{-1} , затем из первой пробирки переносили 0,5 мл содержимого во вторую пробирку, из второй – в третью и т.д., то есть разведения 10^{-2} , 10^{-3} и т. д. Для контроля использовали пробирку с 4,5 мл питательной среды без фага. Для определения активности в отношении *Enterococcus* и *Escherichia coli* готовили разведения 10^{-1} - 10^{-6} , в отношении *Klebsiella* – 10^{-1} - 10^{-5} .

Затем в каждую из пробирок с разведением и в контрольную вносили 0,03 мл взвеси суточной агаровой культуры, содержащей 10^9 микробных клеток в 1 мл. Инкубировали при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Степень активности пиобактериофага и смеси его с озонированным физраствором определяли визуально по истечении времени инкубации: для клебсиелл и эшерихий – 4 часа, для энтерококков – 10 часов.

Обработку данных проводили в программе Microsoft Excel, для каждого ряда рассчитывали среднее арифметическое M , стандартную ошибку среднего арифметического - m . Достоверность различий в сравниваемых рядах проверяли с использованием критерия Стьюдента и принимали при 5% уровне значимости.

Результаты исследования и их обсуждение

Для достижения обозначенной цели исследования нами были подобраны штаммы микроорганизмов, этиологически значимые в плане развития воспалительных заболеваний гениталий, а также изучено влияние озонированного физраствора, полученного при различных насыщающих концентрациях медицинского озона, на лизирующие свойства бактериофагов. Тем самым воспроизводилась планируемая к практическому применению методика лечения – сочетанное или последовательное орошение различных отделов полового тракта озонированным физраствором и препаратами бактериофагов.

Планируя данный эксперимент, мы предполагали несколько возможных вариантов взаимодействия данных лечебных факторов:

- дозозависимое подавление литической активности бактериофагов озонированным раствором *in vitro*, которое обосновывало бы отдельное (комбинированное) использование указанных методов,
- нейтральное или стимулирующее действие озона на фаги, что позволило бы применять их одновременно (сочетанно).

В таблицах 1 и 2 представлены результаты тестирования литической активности фаговых частиц как в контроле, так и в ответ на воздействие озонированного физиологического раствора с различными насыщающими концентрациями озона.

Таблица 1. Активность фаговых частиц Пиобактериофага в эксперименте

Микроорганизм	Активность пиобактериофага	Активность смеси «пиобактериофаг + озонированный физраствор» с насыщающей концентрацией 5000-8000 мкг/л		
		Сразу после смешивания	Через 30 мин после смешивания	Через 1 час после смешивания
Enterococcus	1×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-6}
Klebsiella oxytoca	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}
Klebsiella pneumonia	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}
E. coli O ₂₆	1×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-6}
E. coli O ₃₃	1×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-6}
E. coli O ₁₂₄	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}

Таблица 2. Активность фаговых частиц Пиобактериофага в эксперименте (продолжение)

Микроорганизм	Активность пиобактериофага	Активность смеси «пиобактериофаг + озонированный физраствор» с насыщающей концентрацией 10000 мкг/л		
		Сразу после смешивания	Через 30 мин после смешивания	Через 1 час после смешивания
Enterococcus	1×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-6}
Klebsiella oxytoca	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}
Klebsiella pneumonia	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}
E. coli O ₂₆	1×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-5}
E. coli O ₃₃	1×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-6}
E. coli O ₁₂₄	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}

По данным тестирования контрольных образцов, препарат вызвал лизис энтерококков в разведении 10^{-6} , кишечных палочек в разведении 10^{-5} - 10^{-6} , клебсиелл – в разведении 10^{-5} .

Препарат той же серии после смешивания и контакта с озонированным физраствором с концентрациями озона 1500, 3000, 5000 и 8000 мкг/л не показал снижения активности ни в одном из образцов – непосредственно после смешивания, через 30 минут и через 1 час ($p > 0,05$).

Как следует из таблицы 2, при воздействии озонированного физраствора, полученного с использованием концентрации озона 10000 мкг/л озонотоксической смеси, была отмечена тенденция к снижению литической активности фаговых частиц на один порядок от первоначального титра (с 10^{-6} до 10^{-5}) в отношении штамма E. coli O₂₆.

Согласно современным требованиям, пиобактериофаг должен лизировать бактерии в разведении не менее 10^{-5} для *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *E.coli*, *Proteus* и не менее 10^{-4} для *P.aeruginosa*, *Klebsiella*. Следовательно, имевшее место незначительное уменьшение литической активности фагов в ответ на воздействие максимальной насыщающей концентрации озона не является препятствием для их совместного использования.

Как известно, бактериофаги представляют собой вирусные частицы, активные против гомологичных видов бактерий. Препараты на основе вирулентных бактериофагов — это стерильные фильтраты бактериальных фаголизатов, которые назначают для применения внутрь и местно для орошения ран, слизистых, введения в полости. Лечебно-профилактическое действие фагов обусловлено их бактерицидной активностью, а также иммуномодулирующим антигенными свойствами находящихся в фаголизатах компонентов разрушенных микробных клеток.

Бактериофаговая терапия обладает рядом важных свойств [6], она эффективна против лекарственно-устойчивых микроорганизмов и может использоваться в качестве альтернативной терапии пациентов, имеющих аллергию к антибиотикам [8, 9]. Кроме этого, бактериофаги обладают высокой специфичностью по отношению к целевым бактериям и не оказывают влияния на другие микробы [4], что важно для поддержания баланса микроэкосистемы полового тракта [7] и организма в целом [9].

Известны свойства медицинского озона как антисептика, активного в отношении бактерий, вирусов, грибов и простейших. Кроме того, озонотерапия эффективна при гипоксических и иммунодефицитных состояниях, воспалительных процессах, нарушениях периферического кровообращения. Разработано множество путей введения озона в организм человека с лечебной целью: парентеральные - внутривенный, внутриартериальный, эндолимфатический, внутримышечный, подкожный, внутрисуставный; локальные - интраназальный, интравагинальный, накожный, колоректальный и т. д.

Есть данные и о клинической эффективности совместного использования озона и бактериофагов [8, 10], однако широкое внедрение комбинации этих технологий требовало проведения эксперимента *in vitro* для выявления особенностей их взаимовлияния.

В ходе эксперимента нами не было выявлено снижения лизирующей способности фагов в отношении соответствующих культур после добавления к ним озонированного физраствора, приготовленного при использовании насыщающей концентрации вплоть до 10.000 мкг/л озона, а имевшее место ее снижение на 1 порядок по одному из штаммов *E. coli* O₂₆ не было критичным.

Рядом исследований показано, что при воздействии озона на микроорганизмы происходят сдвиги в количественном соотношении фосфолипидов и полиненасыщенных жирных кислот в их мембранах с полной дезорганизацией оболочки. Это приводит к гибели микробов, невозможности размножиться и адсорбироваться на клетках макроорганизма. Озон способен подавлять различные виды бактерий, вирусов, грибов и простейших в зависимости от его концентрации, а также качественного состава и количества микробов.

Тем не менее, установлено, что сложно организованные инкапсулированные вирусы (например, группа герпес-вирусов) и Грам(-) бактерии наиболее чувствительны к действию озона, что обусловлено высоким содержанием липидов в мембране оболочки, легко взаимодействующих с ним.

Что же касается бактериофагов, то, несмотря на свою чрезвычайную вариабельность, в целом они являются достаточно простыми по строению вирусными частицами [2]. В составе капсидов бактериофагов содержится очень незначительное количество липидных структур, что может определять их низкую взаимосвязь с озоном в диапазоне общепринятых терапевтических концентраций.

Предполагаем, что отсутствие значимого влияния озонированного физраствора на функциональные свойства фагов обусловлено их вирусной природой, поскольку лишённые липидсодержащей оболочки фаги не представляют собой мишень для озона, что позволяет планировать совместное применение озонотерапии и фагов без угрозы снижения активности последних. Использование более высоких насыщающих концентраций озона в сочетании с бактериофагами потребует проведения дополнительной серии экспериментов, однако, исходя из потребностей рутинной гинекологической практики, это вряд ли целесообразно [12].

Заключение

Сочетанное применение бактериофаго- и озонотерапии при условии использования насыщающей концентрации озона до 10000 мгк/л включительно возможно и перспективно для лечения инфекционно-воспалительных процессов женской половой сферы.

Список литературы

1. Алеев И.А. Бактерии, резистентные к антибиотикам, как реальная угроза человечеству // Status Praesens. Гинекология, акушерство, бесплодный брак. 2012. № 2[8]. С.13-15.
2. Бактериофаги: биология и практическое применение / под ред. Э. Каттер, А. Судаквелидзе. М.: Научный мир, 2012. 640 с.
3. Боголепова Н.Ю., Андреева М.В., Андреев В.А. Современные подходы к терапии воспалительных заболеваний матки // Матер. V Всероссийского конгресса «Амбулаторно-поликлиническая помощь - в эпицентре женского здоровья», 12-15 марта 2013г. - М., 2013. - С.137-138.
4. Дарбеева О.С., Майская Л.М., Парфенюк Р.Л., Дурманова З.В. Пути совершенствования лечебно-профилактических бактериофагов // Биопрепараты. 2010. №3. С.53
5. Качалина Т.С., Гречканев Г.О. Озоновые технологии в акушерстве и гинекологии. Н.Новгород: Изд-во НГМА, 2007. 292с.
6. Красильников И.В., Лыско К.А., Отрашевская Е.В., Лобастова А.К. Препараты бактериофагов: краткий обзор современного состояния и перспектив развития // Сибирский медицинский журнал (Томск). 2011. №2. С. 33-37.
7. Мотовилова Т.М., Качалина Т.С., Аникина Т.А. Оценка роли бактериофагов в этиотропной терапии инфекционно-воспалительных процессов на примере лечения хронического неспецифического эндометрита. Взгляд клинициста // Трудный пациент. 2013. №8-9. С. 20-26.

8. Никишов Н.Н., Чандра-Д'Мелло Р., Гречканев Г.О. Сочетание озono- и бактериофаготерапии в комплексном лечении хронических воспалительных заболеваний придатков матки // Российский вестник акушера-гинеколога. 2008. Т. 8, № 4. С. 66-70.
9. Урсова Н.И. Антибиотик-ассоциированная диарея: выбор пробиотика с позиций медицины, основанной на доказательствах // Трудный пациент. 2013. № 2-3. С.22-30.
10. Chandra-D'Mello R., Grechkanev G., Nikishov N., Fataliyeva G. Combined ozone & bacteriophage therapy as a component of a multi-pronged treatment of chronic inflammatory diseases of the female internal genitalia // Int. J. Gynecol. Obstet. 2009. Vol. 107. P.139.
11. Marlies E.J., Hulsher L., Richard P. et al. Antibiotic prescribing in hospitals: a social and behavioural scientific approach // The Lancet Infectious Diseases. 2010. Vol. 1 (4). P.237–247.
12. Nikishov N., Grechkanev G., Motovilova T. et al Prospects for combined treatment of chronic non specific endometritis with ozone and Bacteriophage therapy // Book of abstracts of 22nd World Congress & Exhibition, 28 June - 3 July 2015. Barcelona, Spain. P.36.
13. Tacconelli E. Antimicrobial use: risk driver of multidrug resistant microorganisms in healthcare settings // Curr Opin Infect Dis. 2009. Vol. 22. P. 352–358.

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА НА ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ЭРИТРОЦИТОВ

А.В. Дерюгина¹, А.А. Мартусевич², Е.А. Антипенко³, Т.А. Веселова¹

¹ ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород

² ФГБУ «Приволжский Федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, Нижний Новгород

³ ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России, Нижний Новгород

Abstract

The aim of this study was investigation of changes of electrophoretic motility (EPM) and oxidative metabolism of erythrocytes under chronic stress. The experimental part of the work included modeling of global and local cerebral ischemia in rats. Global cerebral ischemia was modeled by one-step irreversible bilateral occlusion of the common carotid arteries (n = 20). Local cerebral ischemia was induced by occlusion of the left branch of irreversible middle cerebral artery and a vein suitable for her simultaneous ligation of the ipsilateral carotid artery (n = 20). Clinical part of work included evaluation of 390 patients with chronic cerebral ischemia. In blood samples from animals and humans we investigated EPM and level of malonic dialdehyde, common, oxidated and restored glutathione in erythrocytes. It was stated that character of EPM changes demonstrates the inclusion of stress-releasing systems of the organism and associated with stress response. On early stages of adaptation the glutathione acts as a non-specific of antioxidant system.

Key words: stress, erythrocyte electrophoretic motility, malonic dialdehyde, glutathione

Целью работы явилось исследование закономерностей реагирования электрофоретической подвижности (ЭФПЭ) и окислительного метаболизма эритроцитов при действии хронического стресса. Экспериментальная часть работы включала моделирование глобальной и локальной ишемии головного мозга у крыс. Глобальную ишемию головного мозга моделировали путем необратимой одномоментной двусторонней окклюзии общих сонных артерий (n=20). Локальную ишемию головного мозга вызывали путем необратимой окклюзии левой ветви средней мозговой артерии и подходящей к ней вены с одновременной перевязкой ипсилатеральной сонной артерии (n=20). Клиническая часть работы включала обследование больных дисциркуляторной энцефалопатией I, II или III стадии (n=390). В крови лабораторных животных и людей исследовали ЭФПЭ,

концентрацию МДА, общего, окисленного и восстановленного глутатиона в эритроцитах. Установлено, что характер и выраженность изменений ЭФПЭ являются отражением вовлечения стресс-реализующих систем организма и сопряжены с развитием стресс-реакции, тогда как система глутатиона работает как неспецифическое звено антиоксидантной системы на начальных стадиях адаптационного синдрома.

Ключевые слова: стресс, электрофоретическая подвижность эритроцитов, малоновый диальдегид, глутатион

Реакция организма на стресс обеспечивается двухкомпонентной системой, которая, с одной стороны, специфически реагирует на конкретный тип раздражителя, а также стресс-реализующими адренергической и гипофизарно-адреналовой системами, неспецифически реагирующими в ответ на изменения в среде [7]. Однако на сегодняшний день экспериментальные данные относительно влияния длительных и, особенно, многократно действующих тяжелых стрессоров на состояние гипофизарно-адреналовой системы носят противоречивый характер. Обнаружено снижение активации адренергической и гипофизарно-адреналовой систем [12, 13], либо усиление ее ответа [9, 15], в ряде работ изменение активности гипофизарно-адреналовой системы не обнаружено [8, 10].

Ранее нами при изучении реакции организма на острый стресс было выявлено закономерное стереотипно повторяющееся изменение электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) в ответ на активацию симпатoadреналовой и гипофизарно-надпочечниковой систем [2]. При этом степень вовлечения стресс-реализующих систем определяло глубину изменения данного показателя. Кроме того, было показано, что типовые изменения ЭФПЭ, как показателя состояния мембран эритроцитов, реализуются через типовые структурные перестройки мембран эритроцитов, зависящих от состояния процессов свободнорадикального окисления [3].

Целью данной работы явилось исследование закономерностей реагирования электрофоретической подвижности и окислительного метаболизма эритроцитов при действии хронического стресса.

Материалы и методы исследования

Экспериментальная часть работы проведена на 60 нелинейных белых крысах-самках массой 200-250 г. Животные содержались в виварии при свободном доступе к пище и воде и естественной смене дня и ночи. До начала эксперимента все животные прошли карантин и акклиматизацию в условиях вивария в течение 14 суток.

У животных моделировали локальную и глобальную ишемию головного мозга. Глобальную ишемию головного мозга моделировали путем необратимой одномоментной двусторонней окклюзии общих сонных артерий (n=20). Локальную ишемию головного мозга вызывали путем необратимой окклюзии левой ветви средней мозговой артерии и подходящей к ней вены с одновременной перевязкой ипсилатеральной сонной артерии (n=20). Окклюзия достигалась путем

электрокоагуляции аппаратом электрохирургическим высокочастотным ФОТЕК E81. Работу проводили под нембуталовым наркозом (нембутал внутривенное введение 35 мг/кг). После операции рану обрабатывали сухой калийной солью пенициллина, кожу ушивали, шов обрабатывали 2% раствором йода. Контролем служили интактные крысы (n=20). У животных всех групп проводили получение образцов через 15 мин, 2, 24 часа, 10, 60 суток после воздействия.

Клиническая часть работы включала обследование больных дисциркуляторной энцефалопатией (ДЭ) на I, II, и III стадии заболевания. Возраст больных колебался от 35 до 55 лет (средний возраст $47,7 \pm 5,6$ лет). Было обследовано 128 больных с ДЭ I стадии, среди них было 90 женщин и 38 мужчин (1 группа); 132 пациента с ДЭ II стадии, среди них было 94 женщины и 38 мужчин (2 группа) и 130 пациентов ДЭ III стадии из них 76 женщин и 62 мужчины (3 группа). Диагноз формулировался в соответствии с общепринятыми клиническими критериями и подтверждался данными нейровизуализации. Группу контроля составили 50 здоровых добровольцев в возрасте от 35 до 55 лет (средний возраст $46,7 \pm 6,2$ года). Среди них было 37 женщин и 13 мужчин.

В крови лабораторных животных и людей исследовали ЭФПЭ, концентрацию МДА, общего, окисленного и восстановленного глутатиона в эритроцитах [14].

Измерение ЭФПЭ проводили методом микроэлектрофореза [4], регистрируя время прохождения эритроцитов расстояния 10 мкм в трис-НС1 буфере с рН 7,4 при силе тока 8 мА. Величину ЭФПЭ определяли по формуле:

$$U = S/TH,$$

где S – расстояние, на которое перемещались клетки, T – время перемещения клеток на расстояние S, H – градиент потенциала.

Величину градиента потенциала определяли по формуле:

$$H = I/g\chi,$$

где I – сила тока, g – поперечное сечение камеры, χ – удельная электропроводимость среды.

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

Учитывая, что гипоксия ткани головного мозга при хронической ишемии может рассматриваться как длительно действующий стрессовый фактор [11] изучение ЭФПЭ было проведено при исследовании развития хронического стресса в ходе моделирования локальной и глобальной ишемии головного мозга крыс.

В ходе исследования крови крыс было установлено, что ЭФПЭ животных в течение первых суток изменялась недостоверно с последующим понижением в течение 10 дней после альтерации организма более чем на 30% относительно значений интактных крыс (рис. 1, табл. 1).

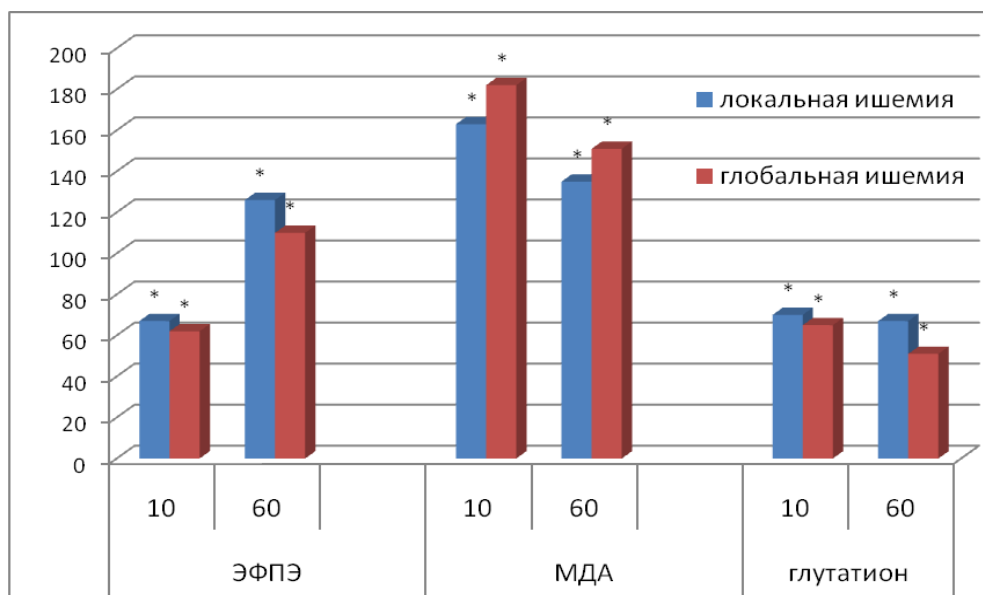


Рис. 1. Изменение ЭФПЭ, концентрации МДА и общего глутатиона при хронической ишемии головного мозга крыс

По оси ординат - % изменения уровня исследуемых показателей, к 100 % - уровня значений интактной группы животных.

По оси абсцисс – время после воздействия, сутки.

Через 60 суток после моделирования как глобальной, так и локальной ишемии головного мозга ЭФПЭ была существенно повышена по сравнению с интактными животными ($p < 0.05$). При этом наиболее выраженные изменения ЭФПЭ проявлялись при локальной ишемии крыс. Так, рост ЭФПЭ при локальной ишемии мозга составил 23%, при глобальной – 11% от уровня значений интактных животных.

Таблица 1 Электрофоретическая подвижность эритроцитов ($\mu\text{м} \cdot \text{см} / \text{В} \cdot \text{с}$) крови крыс при хронической ишемии головного мозга

Время после воздействия	Интактные животные	Модели хронической ишемии головного мозга	
		локальная	глобальная
15 мин	1,28±0,04	1,34±0,08	1,26±0,12
2 часа	1,24±0,05	1,27±0,12	1,30±0,09
24 часа	1,33±0,02	1,29±0,09	1,25±0,08
10 дней	1,37±0,02	0,92±0,04*	0,86±0,05*
60 дней	1,32±0,02	1,60±0,03*	1,46±0,04*

Примечание: *- статистически значимые различия ($p < 0,05$) с интактными животными

Исследование концентрации МДА эритроцитов выявило постепенное нарастание уровня данного показателя в ходе развития как глобальной, так и локальной ишемии головного мозга относительно уровня значений интактной

группы крыс. Максимальный рост концентрации МДА был выявлен на 10 сутки после альтерации, к 60 суткам значения данного показателя несколько снижались. Наиболее выраженные изменения регистрировались при развитии глобальной ишемии головного мозга (рис.1, табл. 2).

Таблица 2 Динамика изменения концентрации МДА в эритроцитах крыс (нмоль/мл) при хронической ишемии головного мозга

Время после воздействия	Интактные животные	Модели хронической ишемии головного мозга	
		локальная	глобальная
15 мин	3,82±0,36	4,51±0,58	4,24±0,56
2 часа	3,78±0,38	4,91±0,79	4,61±0,65
24 часа	4,10±0,33	5,78±0,52*	5,41±0,43*
10 дней	4,04±0,36	6,38±0,48*	7,35±0,52*
60 дней	3,28±0,24	4,42±0,37*	4,95±0,48*

Примечание: *- статистически значимые различия ($p < 0,05$) с интактными животными

Исследование состояния глутатиона показало, что к 2-у часу после альтерации наблюдалось увеличение как общего глутатиона, так и восстановленной его формы относительно значений контрольной группы животных (табл. 3).

Таблица 3 Динамика изменения восстановленного и окисленного глутатиона в эритроцитах крыс (мг%) при хронической ишемии головного мозга

Время после воздействия	Форма глутатиона	Интактные животные	Модели хронической ишемии головного мозга	
			Локальная	Глобальная
2 часа	GSH	524,0±20,5	574,0±28,8*	560,6±14,8*
	GSSG	24,2±9,5	29,0±8,9	31,5±9,8
	Общий	548,2±21,2	603,0±22,8*	592,1±20,8*
24 часа	GSH	504,6±18,8	409,5±22,0*	420,5±28,4*
	GSSG	21,6±8,2	45,3±8,7*	42,5±9,2*
	Общий	526,2±23,9	484,1±26,5	463,0±29,7
10 дней	GSH	479,4±21,2	271,1±22,8*	244,1±22,0*
	GSSG	26,3±5,6	82,8±9,8*	94,7±9,3*
	Общий	505,7±22,8	353,9±22,5*	338,8±21,8*
60 дней	GSH	511,9±19,4	285,5±24,4*	180,2±22,0*
	GSSG	31,1±8,2	78,3±10,7*	96,7±14,2*
	Общий	543,0±16,8	363,8±28,5*	276,9±22,3*

Примечание: *- статистически значимые различия ($p < 0,05$) с интактными животными

К 1-м суткам регистрировался рост концентрации GSSG при уменьшении содержания GSH относительно значений контроля. В дальнейшем изменения в системе глутатиона выражались снижением общего глутатиона и GSH, при увеличении концентрации GSSG относительно контроля.

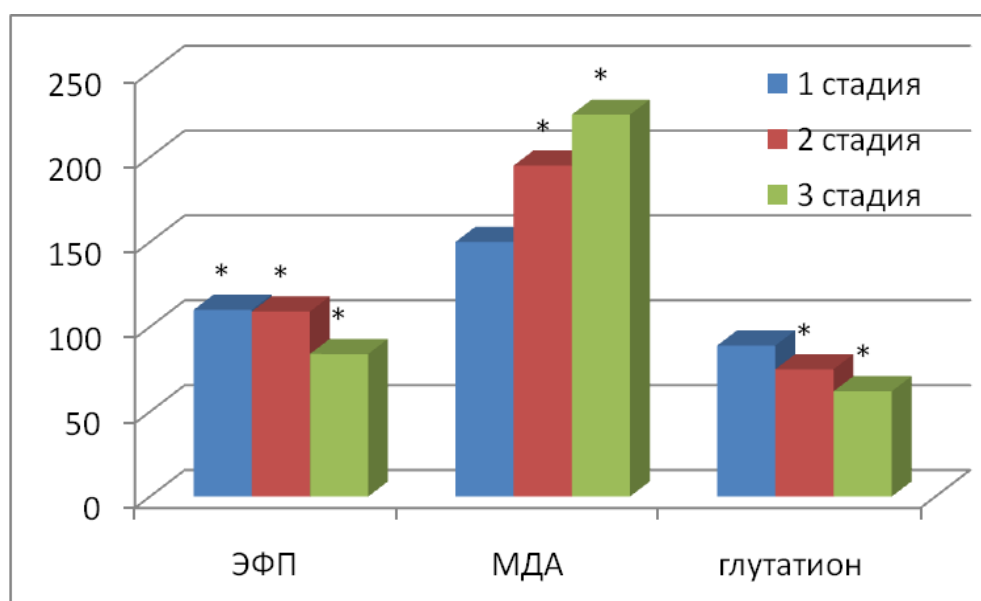


Рис. 2. Изменение электрофоретической подвижности эритроцитов, концентрации малонового диальдегида и общего глутатиона больных дисциркуляторной энцефалопатией

По оси ординат - % изменения уровня исследуемых показателей, к 100 % - уровня значений возрастной нормы.

Примечание: *- статистически значимые различия ($p < 0,05$) с возрастной нормой

Полученные результаты свидетельствуют, что при моделировании ишемии головного мозга у животных в течение первых 10 суток эксперимента наблюдается постепенное снижение ЭФПЭ сопровождающееся увеличением концентрации МДА, тогда как рост глутатиона регистрируется на начальном (до 24 часов) периоде времени. Дальнейшим нарастание ЭФПЭ (к 60 суткам альтерации организма) происходит на фоне относительного снижения концентрации МДА (при этом уровень МДА остается повышенным относительно значений интактной группы животных) и снижения содержания общего и восстановленного глутатиона при сохранении повышенного количества окисленной его формы. Вероятно, на начальном периоде развития гипоксии рост общего и восстановленного глутатиона свидетельствует о мобилизации резервов низкомолекулярных антиоксидантов, при которой развиваются метаболические перестройки, направленные как на усиление синтеза, так и восстановление окисленной формы глутатиона. Вместе с тем, внутриклеточные ресурсы системы глутатиона ограничены и, вероятно, при действии длительного стресса, емкость данной системы уменьшается и окислительный процесс, развивающийся в результате накопления продуктов ПОЛ, сдерживается за счет других антиоксидантных систем эритроцита.

Обоснованность выявленных тенденций в ответ на действие хронического стресса подтверждены исследованиями крови больных дисциркуляторной энцефалопатией (ДЭ) на разных стадиях заболевания.

Изучение хронического стресса у больных, развивающегося на фоне ДЭ показало следующую картину изменения исследуемых параметров. Исследования ЭФПЭ крови больных ДЭ выявило, что при поступлении в стационар у пациентов при первой и второй стадиях заболевания ЭФПЭ была повышена по сравнению с возрастной нормой. В отличие от этого, третья стадия заболевания характеризовалась понижением данного показателя относительно ЭФПЭ возрастной нормы (рис. 2, табл. 5). Отмечалось повышение активности перекисного окисления липидов, наиболее выраженное у пациентов с третьей стадией ДЭ.

Таблица 4 Электрофоретическая подвижность эритроцитов, концентрация малонового диальдегида, глутатиона при дисциркуляторной энцефалопатии первой, второй и третьей стадии

Показатель	Возрастная норма	Стадии дисциркуляторной энцефалопатии		
		первая	вторая	третья
ЭФПЭ, мкм*см/В*с	1,22 ± 0,02	1,34 ± 0,03*	1,33±0,02*	1,13 ± 0,12*
МДА, нМоль/л	2,0±0,8	3,0±0,6	3,9±0,7*	4,5±0,9*
Общий глутатион, мг%	147,8±7,4	131,5±8,6	111,2±9,0*	93,0±7,8*
Восстановленный глутатион, мг%	107,9±6,4	79,4±7,9*	89,8±7,2*	49,1±9,9*
Окисленный глутатион, мг%	39,9±5,4	52,1±5,9*	21,4±6,1*	43,9±7,1

Примечание: *- статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с возрастной нормой

Исходные показатели системы глутатиона были различны у пациентов на различных стадиях ДЭ (табл. 4). Однако уровень общего глутатиона был снижен относительно здорового контроля у всех пациентов с ДЭ, в наибольшей степени это было выражено в третьей стадии. Различалось и соотношение восстановленного и окисленного глутатиона у пациентов с разной степенью ДЭ: в первой стадии оно составило 1,5, во второй стадии – 4,2, в третьей – 1,1. Показатель соотношения восстановленного и окисленного глутатиона отражает функциональную состоятельность данного механизма антиоксидантной защиты. При первой стадии ДЭ происходит значительная активация глутатионового звена антиоксидантной системы, что приводит к трансформации восстановленного

глутатиона в окисленный. Во второй стадии его активность несколько снижается, но соотношение восстановленного и окисленного глутатиона, тем не менее, значительно отличается от нормального уровня. Возможно, на второй стадии большую роль играют другие пути антиоксидантной защиты. При третьей стадии происходит резкое падение уровня восстановленного глутатиона, что, в сочетании со значительным снижением общего глутатиона, указывает на истощение резервов данной антиоксидантной системы.

Анализируя полученные результаты, следует заключить, что усугубление ишемических повреждений головного мозга животных и развитие ДЭ у человека определяют сходные изменения реактивности эритроцитов. При этом ишемия головного мозга у крыс и ДЭ первой и второй стадии вызывают рост ЭФПЭ. Развитие ишемических повреждений головного мозга характеризуется снижением резистентности организма и нарастанием напряжения адаптационных механизмов, приводящих к развитию дизадаптации в ходе развития патологии, что сочетается со снижением уровня ЭФПЭ.

В свою очередь, выявленная направленность изменения ЭФПЭ сочеталась с клиническим статусом больных с ДЭ. Так, у больных ДЭ 1 стадии преобладала субъективная неврологическая симптоматика в виде цефалгического, вестибулярно-атактического, астено-невротического синдромов, легких когнитивных нарушений. В неврологическом статусе выявлялась рассеянная микроочаговая симптоматика. У пациентов 2 стадии имелось не менее двух четко очерченных невротических синдромов, умеренные когнитивные расстройства, в ряде случаев деменция легкой степени тяжести. Пациенты с ДЭ 3 стадии характеризовались наличием грубых двигательных и (или) когнитивных нарушений, приводящих к социальной и бытовой дизадаптации больных.

Обсуждение результатов

Обсуждая полученные результаты, следует отметить, что моделирование хронического стресса у животных определило сходную с острым стрессом тенденцию изменения ЭФПЭ, выявленную нами ранее, что проявлялось в первоначальном снижении ЭФПЭ с последующим ее увеличением, зависящим от активации стресс-реализующих систем организма [3]. Регистрируемое в опытах первичное уменьшение ЭФПЭ сочеталось с ростом концентраций МДА, тогда как увеличение ЭФПЭ сопровождалось уменьшением процессов ПОЛ. Механизм изменения электроотрицательности мембран эритроцитов, и как следствие изменение ЭФПЭ, может быть опосредован перераспределением заряженных групп на поверхности мембраны при модификации белок-липидного компонента в процессе ПОЛ. Кроме того, нами показано изменение активности наиболее значимого фермента, формирующего поверхностный потенциал клеток, - Na,K-АТФазы, которая является липидзависимым ферментом и может в значительной степени опосредовать изменение ЭФПЭ при стрессе [5]. Хронический стресс у больных в зависимости от стадии заболевания характеризовался ростом ЭФПЭ на 1 и 2 стадии и ее падением на 3 стадии заболевания, с увеличением концентрации МДА. Изменение в системе глутатиона при хроническом стрессе не носило выраженной фазности по сравнению с ЭФПЭ. По всей видимости, развитие хронического стресса приводит к истощению системы глутатиона, которая

вероятно эффективна в качестве антиоксидантной системы защиты клеток на начальных этапах стресса.

Таким образом, изменения ЭФПЭ свидетельствует, что при ишемии головного мозга происходит развитию стрессовой реакции с понижением уровня реактивности организма, связанным с активацией процессов ПОЛ на фоне истощения системы глутатиона. При этом характер и выраженность изменений ЭФПЭ являются отражением вовлечения стресс-реализующих систем организма и сопряжены с развитием стресс-реакции, тогда как система глутатиона работает как неспецифическое звено антиоксидантной системы на начальных стадиях адаптационного синдрома, и, по всей видимости, лишь относительно влияет на величину ЭФПЭ.

Список литературы

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
2. Крылов В.Н., Дерюгина А.В. Изменение электрофоретической подвижности изолированных эритроцитов при действии стресс-факторов // Гематология и трансфузиология. 2011. №5. С. 18-21.
3. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Гришина А.А. Изменение электрофоретической подвижности эритроцитов и липидного спектра их мембран при различных стрессовых воздействиях // Гематология и трансфузиология. 2010. №3. С. 40-44.
4. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Захарова О.А., Антипенко Е.А. Неспецифические адаптационные реакции крови при хронической ишемии головного мозга // Клиническая лабораторная диагностика. 2010. №12. С. 28-30.
5. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Константинова А.И. Электрофоретическая подвижность и активность Na,K-АТФазы эритроцитов у крыс при стрессе // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2014. Т.100, №11. С. 1297-1302
6. Матвеев А.Г. Феномен цитотоксичности и механизмы повреждения нейронов новой коры при гипоксии и ишемии // Медицинский журнал. 2004. №2. С.18-23.
7. Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика. М.: Наука, 1981. 280 с.
8. Culman J., Kopin J., Seavedra J.M. Regulation of corticotrophin-releasing hormone and pituitary-adrenocortical response during acute and repeated stress in the rats // Endocrine Regulations. Vol. 25. №3. P. 151-158.
9. Dallman M. F., Akana S. F., Scribner K. A., Bradbury M.F., Walker C.D., Strack A.M., Cascio C. S. Stress, feedback and facilitation in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis // J. Neuroendocrinology. 1992. Vol. 4. №5. P. 517-526.
10. Kant G. J., Mougey E.H., Meyerhoff J.L. ACTH, prolactin, corticosterone and pituitary cyclic AMP responses to repeated stress // Pharmacol. Biochem. Behav. 1989. Vol. 32. №2. P. 557-561.
11. Kaiser M.M. Adaptation to stress in physical and mental illness // International society for adaptive medicine (ISAM). VIII World Congress. Moscow. 2006. P. 136.

12. Natelson B. H., Ottenweller J.E., Cook J.A., Pitman D.L., McCarty R., Tapp W.N. Effect stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response // *Physiol. Behav.* 1988. Vol. 43. №1. P. 41-46.
13. Pitman D.L., Ottenweller J.E., Netelson B.H. Plasma corticosterone levels during presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation // *Physiol. Behav.* 1988. Vol. 43. №1. P. 47-55.
14. Sedlak J., Lindsey R. Estimation of total protein bound, nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent // *Analytical Biochemistry.* 1968. №2. P. 192-205.
15. Young E.A., Akana S., Dallman M.F. Decreased sensitivity to glucocorticoid fast feedback in chronically stressed rats // *Neuroendocrinology.* 1990. Vol. 51. № 6. P. 536-541.

ВЛИЯНИЕ СИСТЕМНОЙ ОЗОНОТЕРАПИИ НА СОСТОЯНИЕ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА ПАЦИЕНТОВ С АЛКОГОЛЬНОЙ АБСТИНЕНЦИЕЙ

Н.Э. Жукова¹, А.К. Мартусевич²

¹Клиника «Госпитальер», Саратов

²ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр»

Минздрава России, Нижний Новгород

Abstract

The aim of this paper is estimation of the microcirculation state in patients with alcohol abstinent syndrome (AAS) during systemic ozone therapy. Main group included patient with AAS (n=45) treated with intravenous infusions of sodium chloride (ozone dose – 4000 mcg/; 10 procedures). Patients of the control group (n=45) were treated with standard scheme. Parameters of microcirculation were studied with lazer Doppler flowmetry with “LAKK-02” device. It was stated that administration of systemic ozone therapy improved the microcirculation and its regulatory mechanisms in patients with AAS. Mechanism of this optimization may include influence on endothelial NO-dependent pathways.

Key words: alcohol abstinent syndrome, microcirculation, ozone therapy

Целью данной работы служило уточнение особенностей состояния микроциркуляторного русла у пациентов с алкогольным абстинентным синдромом (ААС) на фоне системной озонотерапии. В основную группу вошли пациенты с ААС (n=45) в динамике его купирования с использованием системной озонотерапии (внутривенное введение озонированного физиологического раствора с насыщающей концентрацией озона 4000 мкг/л, 10 ежедневных процедур). В группу сравнения включены больные с ААС (n=45), получавшие стандартный вариант схемы лечения алкогольной абстиненции. Состояние микроциркуляции оценивали методом лазерной доплеровской флуометрии на аппарате «ЛАКК-02». Установлено, что включение в состав комплексного лечения пациентов с алкогольным абстинентным синдромом системной озонотерапии обеспечивает условия для оптимизации состояния и регуляторных механизмов микроциркуляции, что преимущественно реализуется путем нормализации уровня эндотелий-релаксирующего фактора – NO.

Ключевые слова: алкогольный абстинентный синдром, микроциркуляция, озонотерапия

Известно, что система микроциркуляции чутко реагирует на изменения функционального состояния организма и, в частности, на сдвиги системной

гемодинамики, поскольку их деятельность регулируется общими механизмами [7, 19, 20]. Ранее было показано, что у пациентов, имеющих хроническую алкогольную зависимость, присутствуют выраженные нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы, в том числе проявляющиеся в форме централизации кровообращения, вегетативной дисфункции, нарастания уровня аритмогенного риска и др. [2, 3, 8, 13]. Эти патологические процессы наиболее отчетливо обнаруживаются в период реализации алкогольного абстинентного синдрома [4, 9, 11, 15], т. к. в их патогенезе одну из превалирующих ролей играет экзогенная интоксикация [5, 6, 15, 16, 18]. Следовательно, данные трансформации функционирования кардиоваскулярной системы должны находить отражения и в особенностях деятельности микроциркуляторного русла в период алкогольной абстиненции, однако подобные работы в доступной литературе отсутствуют.

С учетом того, что для озона описано позитивное влияние на микроциркуляцию [1, 14], логично было предположить, что включение системной озонотерапии в схему лечения могло способствовать более быстрому устранению дисфункции микрокровотока.

В связи со всем вышеперечисленным, целью данной работы служило уточнение особенностей состояния микроциркуляторного русла у пациентов с алкогольным абстинентным синдромом (ААС) на фоне системной озонотерапии.

Материалы и методы исследования

Проведено открытое исследование функционального состояния здоровых людей и пациентов с зависимостью от алкоголя (в фазе абстинентного синдрома). Группа пациентов наркологического профиля была разделена на две подгруппы. В основную группу вошли пациенты с ААС (n=45) в динамике его купирования с использованием системной озонотерапии (внутривенное введение озонированного физиологического раствора с насыщающей концентрацией озона 4000 мкг/л, 10 ежедневных процедур). В группу сравнения включены больные с ААС (n=45), получавшие стандартный вариант схемы лечения алкогольной абстиненции [4, 6, 11, 17].

Критериями исключения из исследования являлись: наличие гемодинамически значимой соматической патологии, наличие артериальной гипертензии; наличие клинических признаков сердечной недостаточности; наличие сахарного диабета. Всем испытуемым в момент включения в исследование проведено клинико-инструментальное обследование.

Состояние микроциркуляции оценивали методом лазерной доплеровской флуометрии на аппарате «ЛАКК-02» со специализированным программным обеспечением «LDF 2.20» [7]. Исследование микроциркуляции осуществляли в одной классической точке: на внутренней поверхности предплечья. Контрольными точками обследования пациентов являлись 1-е, 3-е, 7-е и 14-е сутки с момента полного прекращения приема алкоголя. Представителям группы сравнения исследование было проведено однократно. Перед измерением обследуемые лица находились в покое в положении сидя в течение не менее 5 минут.

Анализ состояния микроциркуляции производили на основании оценки показателя микроциркуляции (ПМ), выражаемого в перфузионных единицах

(перф. ед.) и его вариабельности, а также расчетных критериев, указывающих на степень активации регуляторных механизмов (по результатам амплитудно-частотного анализа интенсивности кровотока по микрососудам), и показателя шунтирования [7].

Результаты обрабатывали с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты

В проведенном сравнительном исследовании обнаружено, что по основному интегративному параметру состояния микроциркуляторного русла (ПМ) наблюдали существенные различия его динамики у представителей основной группы и группы сравнения (рис. 1).

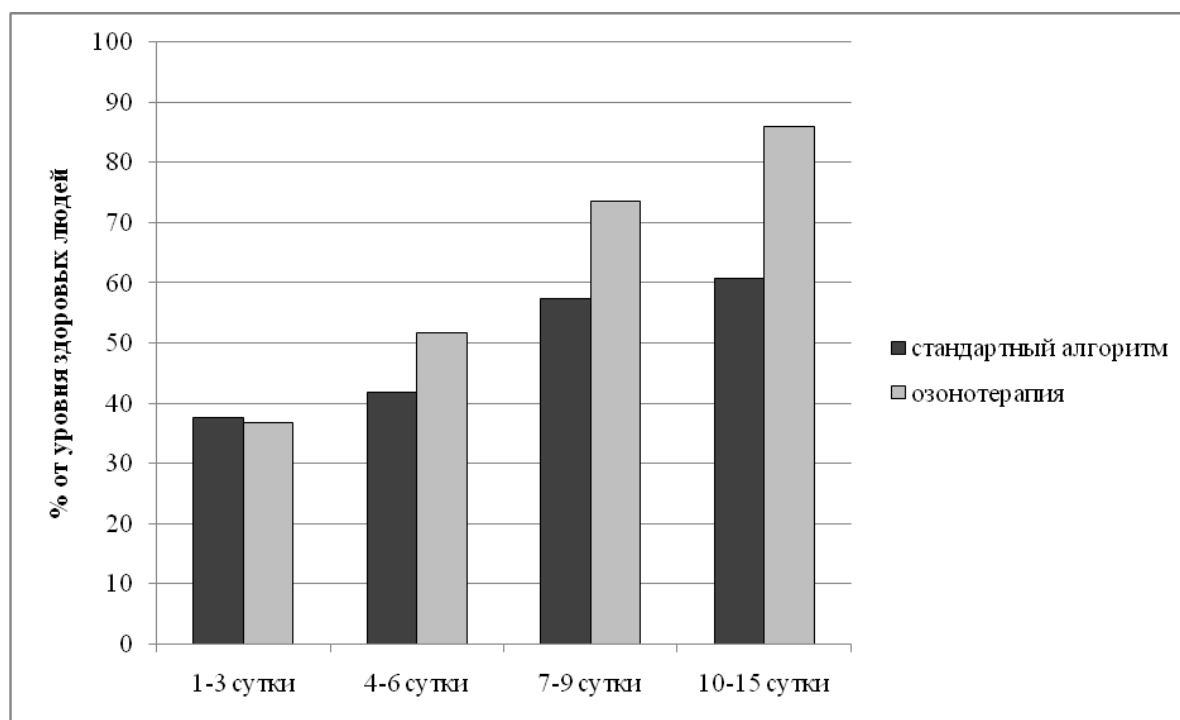


Рис. 1. Уровень показателя микроциркуляции у пациентов с алкогольной абстиненцией в зависимости от применения системной озонотерапии

В соответствии с полученными результатами установлено, что в первой контрольной точке (на 1-3 сутки после прекращения приема алкоголя) у представителей обеих сформированных групп микроциркуляция была угнетена примерно в равной степени, находясь на уровне 35-40% от физиологических значений (рис. 1). Это свидетельствует об относительной однородности и аналогичности групп пациентов, так как данное обследование предшествовало назначению лечения, выполняясь по обращению больного в клинику. В дальнейшем по показателю микроциркуляции наблюдали девиацию групп: начиная с 4-6 суток абстинентного периода, у лиц, получавших и не получавших озонотерапию, по результатам лазерной доплеровской флоуметрии регистрировали активацию кровотока, однако ее темпы были принципиально различны. Так, при назначении стандартного лечения увеличение значения критерия происходит очень плавно: к 4-6 суткам показатель возростал лишь на 5-

7% и даже к завершению терапии (на 10-15 сутки) составлял только 62% от нормы.

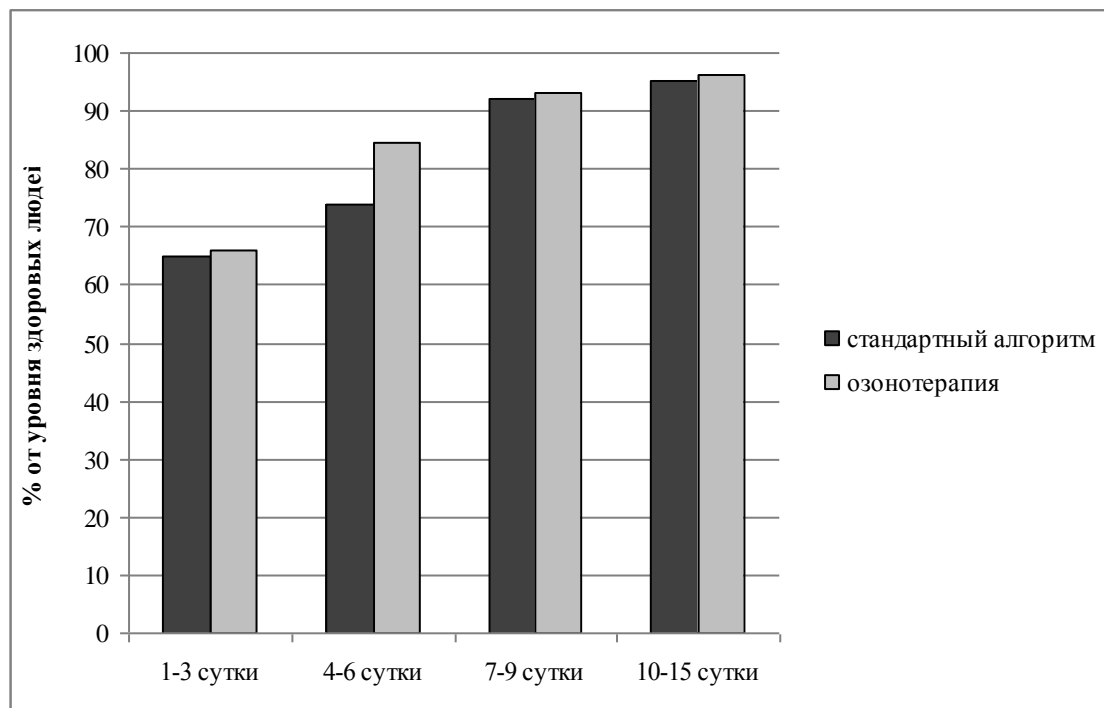


Рис. 2. Показатель шунтирования у пациентов с алкогольным абстинентным синдромом в зависимости от включения в схему лечения системной озонотерапии

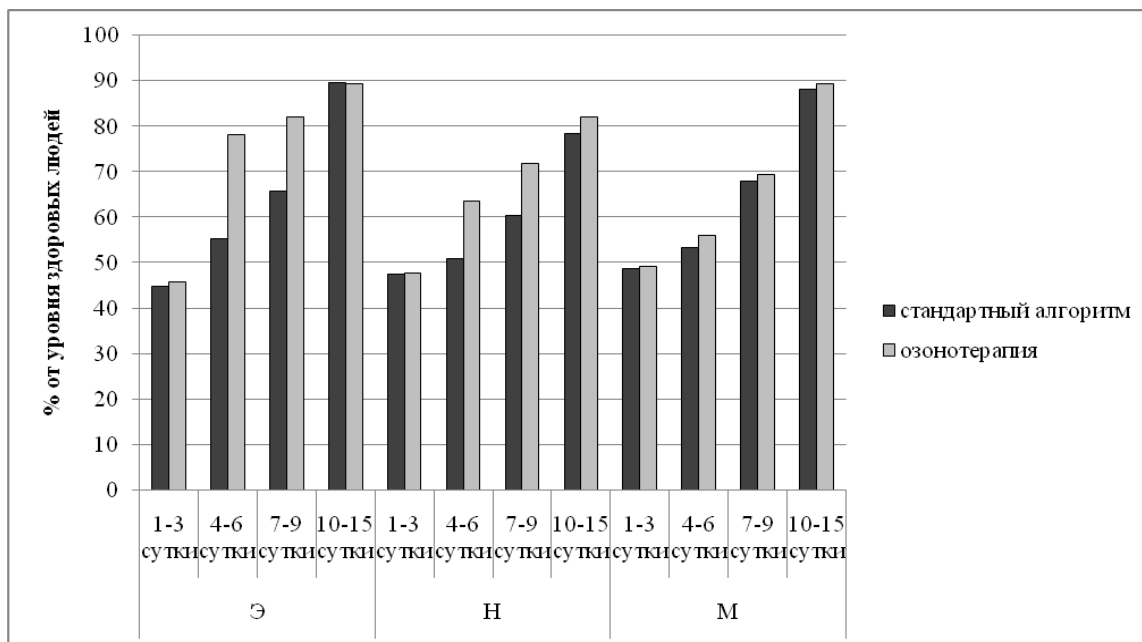


Рис. 3. Активность «внутренних» регуляторных механизмов микроциркуляции в динамике лечения пациентов с алкогольной абстиненцией

Напротив, при дополнении комплексного лечения системной озонотерапией, обладающей вазотропным действием [12, 14], уже ко второй точке наблюдения прирост показателя микроциркуляции составляет более 15%, к 7-9 суткам после прекращения приема алкоголя значение параметра достигает 73,7% от

физиологического уровня, а по завершении курса введения озона – 86,4%. Таким образом, по основному критерию – показателю микроциркуляции – включение в традиционный алгоритм ведения рассматриваемого контингента больных системной озонотерапией представляется целесообразным.

Также проведен анализ задействованности шунтирующих механизмов в обеспечении кровоснабжения тканей (рис. 2). Обнаружено, что применение системной озонотерапии в общей схеме лечения пациентов в раннем периоде после прекращения приема алкоголя способствует более оптимальной активации шунтирующих путей кровотока по сравнению с традиционным алгоритмом купирования ААС. Наиболее значимые различия были зарегистрированы на 4-6 сутки, в период, который при классическом течении алкогольной абстиненции сопряжен с повышенным риском развития сердечно-сосудистых катастроф у данного контингента больных.

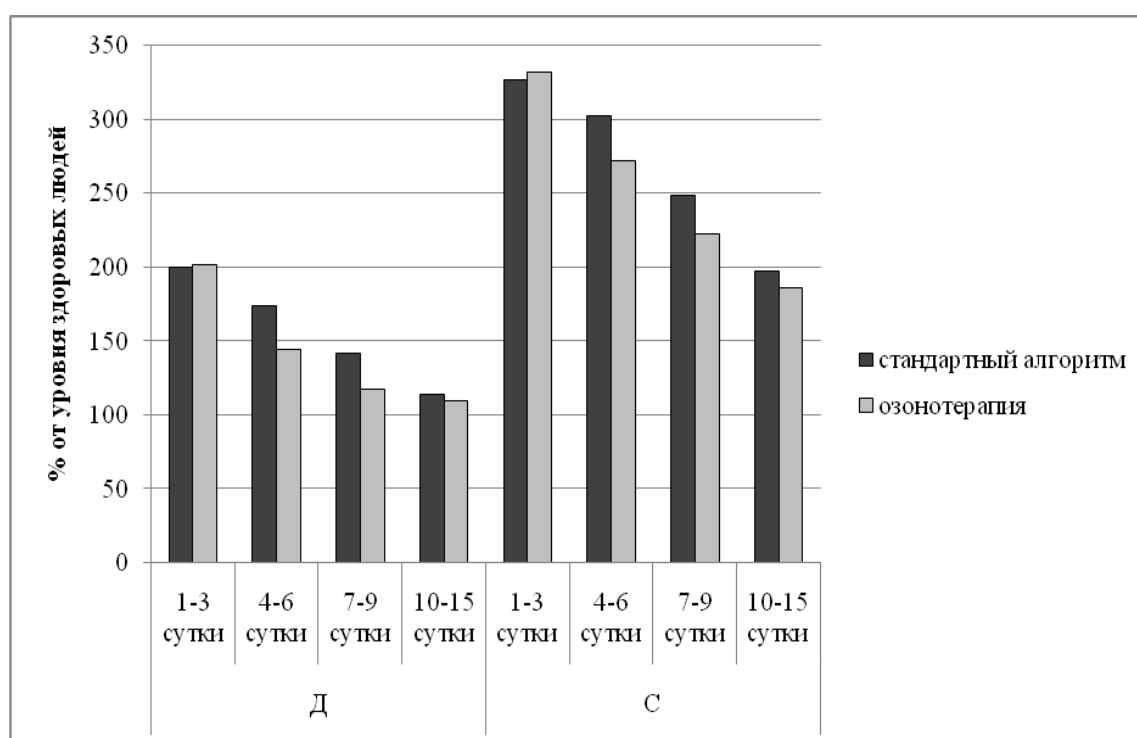


Рис. 4. Активность «внешних» регуляторных механизмов микроциркуляции в динамике лечения пациентов с алкогольной абстиненцией

Более детально установить причины подобных различий представляется возможным при анализе соотношения регуляторных механизмов состояния микроциркуляторного русла при использовании стандартного и альтернативного вариантов лечения (рис. 3 и 4).

Так, эти данные позволяют связать описанные выше реакции активации кровотока на 4-6 сутки абстинентного периода с преимущественной стимуляцией эндотелиального и нейрогенного компонентов регуляции у пациентов, получавших инфузии озонированного физиологического раствора (рис. 3). Следовательно, увеличение показателей микроциркуляции и шунтирования обеспечивается стимуляцией продукции монооксида азота, обеспечивающим вазодилатационный эффект на периферии.

На основании этого можно предположить, что запускаемые озонотерапией процессы генерации активных форм кислорода способствуют и активации синтеза и/или высвобождения NO из клеточных или молекулярных (динитрозильные комплексы железа, S-нитрозотиолы) депо. Эти сведения подтверждают недавно высказанную гипотезу о единстве молекулярных механизмов эффекта физико-химических факторов через общий мессенджер – NO [10].

На фоне выраженной активации «внутренних» адаптивных регуляторных резервов степень участия «внешних» модулирующих влияний (кардиоритм, дыхательные волны) у пациентов, получающих системную озонотерапию, сопряжено снижается, в период с 4 по 9 сутки находясь на значимо более низком уровне, чем у больных, включенных в группу сравнения ($p < 0,05$; рис. 4). Эта тенденция рассматривается нами как компенсаторная и отражающая возможность более оперативной регуляции активности кровотока по микрососудам и их просвета. Следует заметить, что данные вариации полностью сглаживаются к завершению курса лечения (на 10-15 сутки после прекращения приема спиртных напитков).

Заключение

Таким образом, включение в состав комплексного лечения пациентов с алкогольным абстинентным синдромом системной озонотерапии обеспечивает условия для оптимизации состояния и регуляторных механизмов микроциркуляции, что преимущественно реализуется путем нормализации уровня эндотелий-релаксирующего фактора – NO.

Список литературы

1. Алехина С.П., Щербатюк Т.Г. Озонотерапия: клинические и экспериментальные аспекты. Саров: ФГУП РФЯЦ-ВНИИЭФ, 2004, 244 с.
2. Аркавый И.В., Ибрагимова М.В., Карамышева Л.Г. Прогностическое значение и особенности ранней диагностики поражений сердечно-сосудистой системы у подростков под действием психоактивных веществ // Наркология. 2003. №10. С. 53-67.
3. Артемчук А.Ф. Распространенность сердечно-сосудистой патологии у больных алкоголизмом // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2000. Том 100. №9. С. 21-25.
4. Валентик Ю.В., Сирота Н.А. Руководство по реабилитации больных с зависимостью от психоактивных веществ. М.: Литера, 2002. 256 с.
5. Горюшкин И.И. Механизмы алкоголизма: регуляционно-структурные отношения (патогенез, диагностика, лечение). М.: Спутник+, 2008. 151 с.
6. Горюшкин И.И. Алкоголизм: что есть патогенетическое лечение? Системный подход // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2006. №4. С. 90-94.
7. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови. Руководство для врачей / Под ред. А.И. Крупаткина, В.В.Сидорова. - М.: Медицина, 2005. 125 с.
8. Мамонтова Н.С. Клинико-функциональная характеристика поражения сердца и активность катализы в сыворотке крови у больных хроническим алкоголизмом: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Томск, 1994. 26 с.

9. Мартусевич А.К., Жукова Н.Э. Вариабельность сердечного ритма в динамике купирования алкогольного абстинентного синдрома // Вопросы наркологии. 2011. №4. С. 11-16.

10. Мартусевич А.К., Перетягин С.П. Молекулярная стереотипия в реализации эффекта некоторых лечебных физико-химических факторов: роль NO // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2012. №2, Ч.3. С. 205-210.

11. Мясников Н.К. Патогенетическая фармакотерапия острой фазы абстинентного синдрома (при опийной наркомании) // Журнал невропатологии и психиатрии. 2001. №3. С. 48-50.

12. 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.

13. Татаркина Н.Д., Шорин В.В., Негода В.А., Сабыныч В.А. Хронический алкоголизм. Печеночная и системная гемодинамика. Владивосток: Изд-во Дальневосточного Университета, 2000. 64 с.

14. Шихрагимов В.А. Патогенетическое обоснование озонотерапии нейроциркуляторной дистонии. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Саранск, 2009. 24 с.

15. Barter T., Goberman L.L. Rapid opioid detoxification // Amer. J. Drug. Alcohol Abuse. 1999. Vol. 46, №11. P. 1579-1582.

16. Carr G.D. Alcoholism: a modern look at an ancient illness // Prim. Care. 2011. Vol. 38, №1. P. 9-21.

17. Friedman L.S. Fleming N.F., Roberts D.H., Hyman S.E. (eds.). Source book of substance abuse and addiction. N. Y.: Williams, Wilkins, 1996. 348 p.

18. Manzo-Avalos S., Saavedra-Molina A. Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption // Int. J. Environ Res. Public Health. 2010. Vol. 7, №12. P. 4281-4304.

19. Meager E.A. et al. Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans // J. Clin. Invest. 1999. Vol. 104. P. 805-813.

20. Regan T.J. Alcohol and the cardiovascular system // JAMA. 1990. Vol. 264. P. 377-381.

ВЛИЯНИЕ СРЕД, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРИ ИСКУССТВЕННОМ ОПЛОДОТВОРЕНИИ И КУЛЬТИВИРОВАНИИ ЭМБРИОНОВ, НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ

И.Р. Исхаков¹, Р.М. Исхакова², Д.С. Громенко², Р.Р. Фархутдинов¹

¹ *Башкирский государственный медицинский университет, Уфа*

² *Медицинский центр «Семья», Уфа*

Abstract

We investigated the influence of media used for fertilization and embryo culture on the processes of free radical oxidation. At first stage original media were studied: their influence on the intensity of chemiluminescence in model systems that generate reactive oxygen species, and in which occur lipid peroxidation reactions. At second stage of study we evaluate the influence on chemiluminescence of these same model systems when adding media after fertilization and embryo culture. We define the level of total antioxidant activity and malonic dialdehyde level.

Key words: in vitro fertilization, fertilization rate, culture medium

Проведено исследование влияния сред, используемых для оплодотворения и культивирования эмбрионов, на процессы свободнорадикального окисления. На 1 этапе изучались исходные среды: их влияние на интенсивность хемилюминесценции в модельных системах, генерирующих активные формы кислорода, и в которых протекают реакции перекисного окисления липидов. На 2 этапе исследования оценивали влияние на хемилюминесценцию этих же модельных систем при добавлении сред, после проведения в них оплодотворения и культивирования эмбрионов. Определяли уровень общей антиоксидантной активности и уровень малонового диальдегида.

Ключевые слова: экстракорпоральное оплодотворение, частота оплодотворения, культуральная среда

Культуральные среды широко используются в эмбриологии и репродуктивной медицине для оплодотворения и культивирования эмбрионов. Известно, что в процессе жизнедеятельности образуются свободные радикалы: активные формы кислорода (АФК), перекисные радикалы и другие высокореакционные соединения [5]. Свободные радикалы и продукты окисления участвуют во многих жизненно важных процессах. Изменение их содержания вызывает оксидативный стресс, влияет на скорость клеточного деления и рост эмбрионов, способно вызывать повреждение, как целых клеток, так и внутриклеточных структур, приводить к их гибели [2]. До настоящего времени остается неизученным влияние культуральных сред, используемых

при искусственном оплодотворении и культивировании эмбрионов, на процессы свободнорадикального окисления (СРО) [3].

Цель исследования: изучить влияние сред, используемых при искусственном оплодотворении, на СРО в модельных системах, изменение СРО в средах после развития эмбриона.

Материалы и методы

Было обследовано 114 пар с диагнозом бесплодие, проходивших диагностику и лечение на базе медицинского центра «Семья» (г. Уфа). Женщинам проводили общеклиническое и гинекологическое обследование, УЗИ органов малого таза, эндоскопическое исследование по показаниям, определяли половые гормоны крови. Мужчины проходили общеклиническое и урологическое обследование, анализировалась спермограмма, проверяли уровень половых гормонов. Индукцию суперовуляции в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) осуществляли по стандартным протоколам [4].

Оплодотворение проводили в среде Fertilization medium (Fm) (SAGE) и оставляли на 18-20 часов в условиях инкубатора. На следующий день пересаживали в Cleavage medium (Cm) (SAGE) и оценивали качество эмбриона. На 3 день пересаживали в Blastocyst medium (Bm) (SAGE) и оценивали качество эмбриона. Пересадив эмбрион из чашки, среду забирали на исследование СРО.

Показатели свободнорадикальной активности измерялись методом регистрации хемилюминесценции (ХЛ) – свечения, возникающего при взаимодействии свободных радикалов, на хемилюминометре ХЛ-003 (Россия) [1]. В модельные системы, в которых инициировали образование свободных радикалов (АФК и перекисных радикалов липидов), добавляли 0,1 мл исследуемой среды.

По характеру изменения ХЛ судили о влиянии сред на СРО. Уровень продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в средах после культивирования эмбрионов определяли по содержанию малонового диальдегида (МДА) набором фирмы «Агат». Общую антиоксидантную активность (ОАА) в этих же пробах определяли набором фирмы «Randox». Математическая обработка полученных результатов производилась с помощью программы Microsoft Excel 2000.

Результаты и обсуждение

Хемилюминесценция модельных систем, в которых вызывалось образование АФК и протекали реакции ПОЛ характеризуются следующими параметрами: спонтанным свечением, быстрой вспышкой в момент введения инициатора, латентным периодом, переходящим в медленную вспышку.

Вначале изучали влияние на СРО исходных сред (ИС), взятых до оплодотворения и культивирования эмбрионов. На рис. Представлено влияние сред на интенсивность ХЛ модельных систем. Исходные значения приняты за 100%. Добавление сред вызывает незначительное увеличение интенсивности ХЛ, связанной с образованием АФК. В то же время уровень ХЛ модельной системы, в которой протекают реакции ПОЛ, практически не меняется (рис.1).

Далее изучали изменение СРО в средах после оплодотворения и культивирования эмбрионов после 5 дней развития в программах ЭКО и интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ).

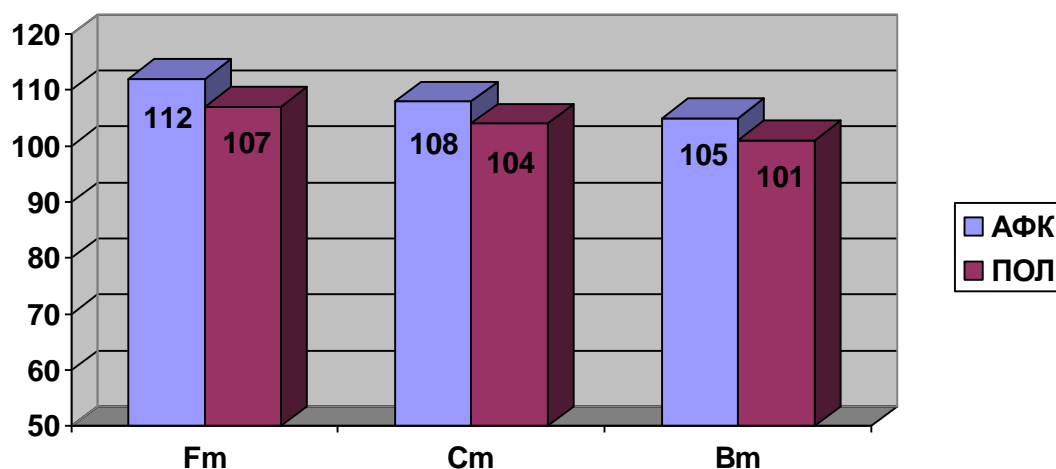


Рис.1 Соотношение светосуммы ИС в модельных системах, генерирующей АФК, и с протеканием ПОЛ (за 100% принята светосумма модельных систем)

Таблица 1. Показатели СРО в исследуемых средах до и после ЭКО и ИКСИ

Среды	ХЛ (100% - светосумма модельной системы)				ОАА			МДА		
	АФК		ПОЛ		ИС	ЭКО*	ИКСИ*	ИС	ЭКО*	ИКСИ*
	ЭКО*	ИКСИ	ЭКО	ИКСИ						
Fm	136	112	106	108	3,4± 0,09	2,4± 0,07	3,2± 0,05	0,09± 0,05	0,19± 0,04	0,13± 0,02
Cm	123	110	104	104	2,9± 0,06	2,1± 0,03	2,8± 0,07	0,11± 0,03	0,21± 0,03	0,18± 0,03
Bm	115	111	102	101	2,6± 0,06	1,9± 0,06	2,5± 0,08	0,12± 0,05	0,23± 0,04	0,24± 0,07

Статистически достоверные различия ($p < 0.05$) отмечены *.

Из таблицы 1 видно, что после добавления сред к модельной системе, генерирующей АФК, светосумма увеличилась, максимально в среде Fm, и практически не изменилась в модельной системе, в которой протекают реакции ПОЛ. Уровень ОАА после искусственного оплодотворения был максимальным в среде для оплодотворения и минимальным в среде для развития бластоцист (табл. 1). Уровень МДА после искусственного оплодотворения был минимальным в среде для оплодотворения и максимальным в среде для развития бластоцист.

Разница между ЭКО и ИКСИ на клеточном уровне в том, что в случае ЭКО в чашке находится ооцит-кумулюсный комплекс, к которому добавляется несколько десятков тысяч сперматозоидов. В случае же ИКСИ кумулюсные

клетки удаляются путем денудирования, и в чашке находится ооцит, в который делают микроинъекцию одного сперматозоида.

Таким образом, выявлено, что среды, используемые при искусственном оплодотворении и культивировании, вызывают повышение интенсивности ХЛ в модельной системе, генерирующей АФК, и не влияют на реакции ПОЛ в модельной системе. После проведения искусственного оплодотворения все исследуемые среды увеличили интенсивность ХЛ в модельной системе, генерирующей АФК, максимально в среде Fm. Исследуемые среды не вызвали значимого изменения интенсивности ХЛ в модельной системе, в которой происходят реакции ПОЛ. После проведения искусственного оплодотворения влияние исследуемых сред на интенсивность ХЛ этой модельной системы практически не изменилось.

Уровень ОАА после оплодотворения в среде Fm оставался практически неизменным, а в остальных средах понижался. Уровень МДА после оплодотворения в средах для культивирования эмбрионов становился выше.

Выводы

Среды, используемые для оплодотворения и культивирования эмбрионов, при добавлении в модельные системы повышают интенсивность ХЛ, связанную с генерацией АФК, и не влияют на ХЛ, сопровождающую ПОЛ.

1. В процессе оплодотворения и культивирования эмбрионов повышается влияние исследуемых сред на ХЛ модельной системы, генерирующей АФК, и не меняется интенсивность ХЛ, сопровождающая ПОЛ.

2. В исследуемых средах после искусственного оплодотворения снижается уровень ОАА и повышается содержание МДА.

Список литературы

1. Фархутдинов Р.Р., Громенко Д.С. Воздействие биофлавоноидов прополиса на процессы липопероксидации в гонадах крыс при интоксикации полихлорированными бифенилами // Вопросы питания. 2008. №6. С. 9-14.

2. Al-Gubory K.H., Fowler P.A., Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2010. Vol. 42. P. 1634-1650.

3. Elder K., Dale B. In vitro fertilization. M., 2008.

4. Maheshwari A., Griffiths S., Bhattacharya S. Global variations in the uptake of single embryo transfer // Human reproduction update. 2011. №1. P. 107-120.

5. Tamura H., Takasaki A. et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate // J. Pineal Res. 2008. Vol. 44. P. 280-287.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ИСТОЧНИКОВ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОДЫ

А.А. Мартусевич¹, Л.К. Ковалева²

¹ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр»

Минздрава России, Нижний Новгород

²ГБОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия» Минздрава

России, Киров

Abstract

The aim of this work is investigation of reactive oxygen species (ROS) action on some physical and chemical parameters of distilled water. We studied pH, oxidative and restoring potential and dissolved oxygen level of distilled water before and after sparging by different gaseous ROS (oxygen; darsonvalized oxygen, singlet oxygen). It was stated, that water processing by ROS leads to radicals generation and changes investigated parameters.

Key words: reactive oxygen species, darsonvalization, physical and chemical parameters

Целью данной работы явилось изучение воздействия активными формами кислорода на физико-химические параметры дистиллированной воды. Нами были изучены такие показатели, как pH, окислительно-восстановительный потенциал и уровень растворенного кислорода в дистиллированной воде после воздействия на нее различными газообразными формами активного кислорода (чистым кислородом, кислородом, модифицированным д'арсонвализацией, синглатным кислородом). Было показано, что обработка дистиллированной воды источниками АФК приводит к появлению в ней биорадикалов, уровень, соотношение и химический состав которых зависят от характера действующего агента.

Ключевые слова: активные формы кислорода, Д'арсонвализация, физико-химические параметры

В настоящее время установлено, что активные формы кислорода (АФК) обладают высоким саногенетическим потенциалом при различной патологии человека и животных [1]. В то же время важно подчеркнуть, что основной объем экспериментально-клинических данных касается медицинского озона [1-3], тогда как возможности использования других АФК, в частности синглетного кислорода, в лечебных целях раскрыты минимально [3, 4]. Имеющиеся в этой области сведения достаточно скудны, а научные данные преимущественно получены эмпирически, без исследования молекулярно-клеточных механизмов действия указанной АФК [4].

В связи с этим, целью исследования служило уточнение влияния источников активных форм кислорода на некоторые физико-химические параметры дистиллированной воды.

Материал и методы исследования

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

В спектр воздействующих факторов были включены: кислород; кислород, предварительно обработанный электромагнитным излучением (дарсонвализация), и синглетный кислород.

Скорость барботирования при пропускании через ДВ нативного и модифицированного дарсонвализацией кислорода, а также синглетного кислорода составляла 1 л/мин.

Продолжительность обработки жидкости составляла 10 минут. Для каждого воздействия выполняли 5 повторностей эксперимента.

Генерацию электромагнитного поля осуществляли с помощью аппарата для дарсонвализации «Карат Д-212» (Россия). Синглетный кислород синтезировали с помощью аппарата «Airnergy» (Германия).

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

Полученные данные были обработаны в программном пакете Statistica 6.0 согласно стандартным алгоритмам вариационной статистики.

Результаты исследования

Установлено, что все оцениваемые показатели имели четкую тенденцию к изменению под влиянием изучаемых источников биорадикалов. Так, рН дистиллированной воды при 10-минутной оксигенации и ее сочетании с дарсонвализацией регистрировали умеренное закисление жидкости ($\Delta\text{pH} = -0,54$ и $-0,4$ соответственно; $p < 0,05$ для ДВ), тогда как при продолжительной обработке ДВ синглетным кислородом, напротив, фиксировали минимальное защелачивание изучаемой среды ($\Delta\text{pH} = +0,62$; $p < 0,05$; рис. 1).

В отношении окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) наблюдали закономерную тенденцию к нарастанию значения данного показателя в ряду «контроль – кислород – кислород+Дарсонваль – синглетный кислород» (рис. 2).

При этом ОВП воды, обработанной синглетным кислородом, превышала контрольные цифры на 95,1% ($p < 0,05$).

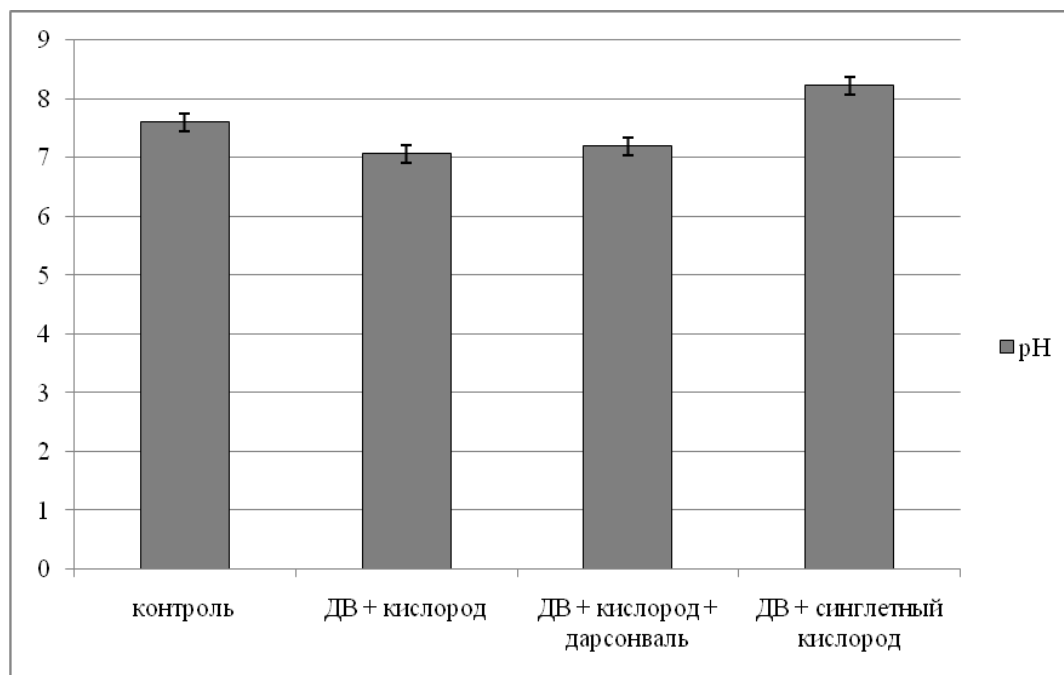


Рис. 1. Уровень pH среды при действии изучаемых источников активных форм кислорода

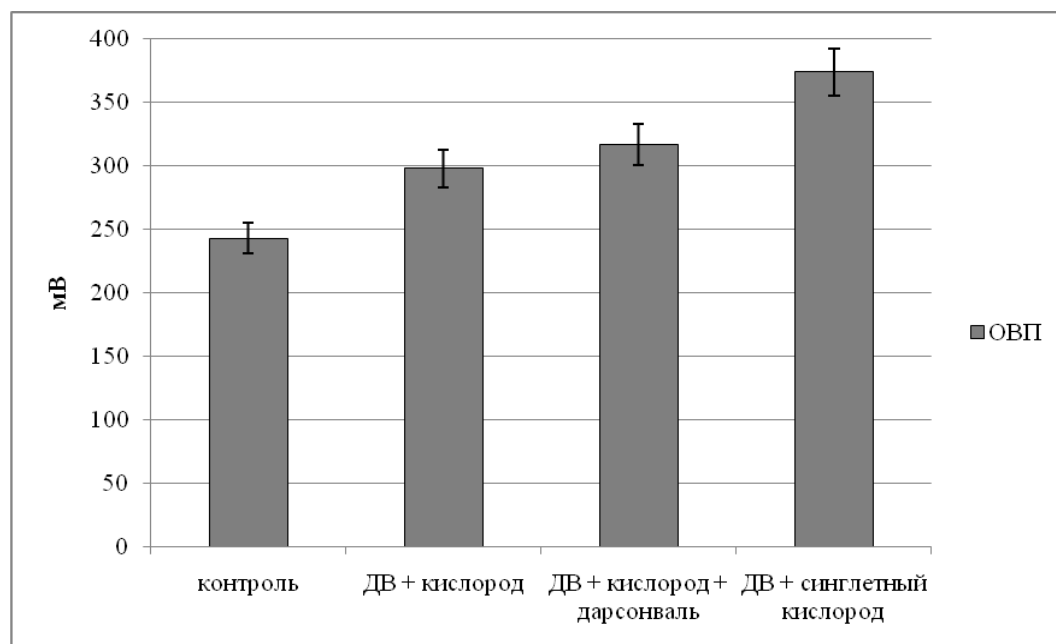


Рис. 2. Окислительно-восстановительный потенциал жидкости при действии изучаемых источников активных форм кислорода

Особую динамику регистрировали ДВ по содержанию растворенного кислорода (рис. 3). Так, барботаж ДВ чистым и модифицированным дарсонвализацией кислородом значимо и практически идентично увеличивал указанный параметр (в 3,25 и 3,46 раза соответственно; $p < 0,05$ к контролю для обоих случаев), 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.

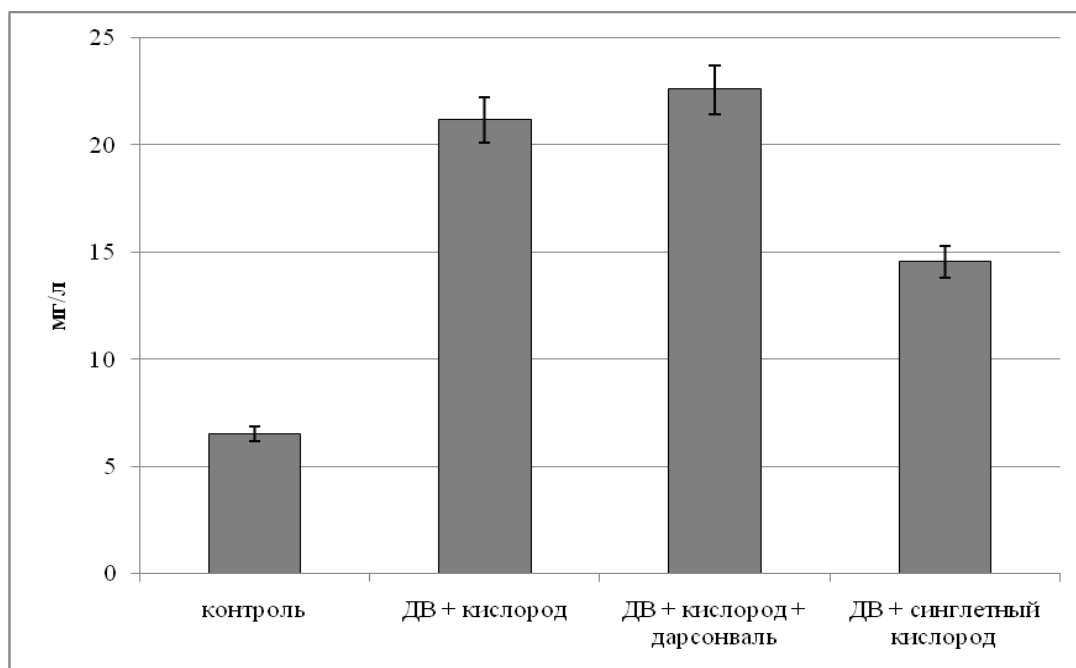


Рис. 3. Содержание растворенного кислорода в воде, обработанной источниками активных форм кислорода

Таким образом, обработка дистиллированной воды источниками АФК приводит к появлению в ней биорадикалов, уровень, соотношение и химический состав которых зависят от характера воздействующего физико-химического агента.

Список литературы

1. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Минск, 2004.
2. Мартусевич А.А., Перетягин С.П., Мартусевич А.К. Молекулярные и клеточные механизмы действия синглетного кислорода на биосистемы // Современные технологии в медицине. 2012. №2. С. 128-134.
3. Мартусевич А.К., Перетягин С.П., Иванникова Е.В. Физико-химические свойства физиологического раствора при действии активных форм кислорода и азота // Фундаментальные исследования. 2012. №11. Ч. 1, С. 197-201.
4. Синглетно-кислородная терапия. Научно-методическое пособие / Под ред. И. З. Самосюк, Л. И. Фисенко. Киев, 2007.

ЗНАЧЕНИЕ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ РЕПАРАЦИИ В ОЖГОВОЙ РАНЕ

А.А. Стручков, С.П. Перетягин, И.Р. Вазина

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр»

Минздрава России, Нижний Новгород

Abstract

The work is aimed to estimation of different variants of local ozone therapy application on an experimental burn wound. We conducted the experiments on 45 white Vistar rats being randomized for 3 groups. Every rat got contact thermal trauma (ШАВ-IV degree; 20 bsp) of dorsal body surface on the area 20 %. Rats of the first group got a levomecol treatment of wound, animals of the second group were locally treated by ozonized oil, and the third group rats got a combination of ozone and oxygen gas mixture intracutaneously and the wounds were treated with levomecol locally. The character and particularities of posttraumatic regeneration were studied by histological investigation. Local treatment with reactive oxygen species at early period after burning is revealed to lead to more pronounced manifestation of reparative processes in burn wound (production of granulation tissue, epidermis regeneration) than when applying Levomecol ointment and that is accompanied by more pronounced initial manifestation of scab rejection. Applying of the reactive oxygen species in ointment compositions at these stages of treatment with the conjuncture of infected wounds does not contribute marked initiation of reparative processes and can even force the inflammation processes.

Key words: reactive oxygen species, ozone therapy, burn wound, regeneration, levomecol

Целью работы служила оценка эффекта различных вариантов локальной озонотерапии в отношении экспериментальной ожоговой раны. Эксперименты были проведены на 45 белых крысах линии Вистар, рандомизированных на 3 группы. Под эфирным наркозом всем животным была нанесен контактный термический ожог ШАВ-IV степени задней поверхности тела на площади 20% п.т. Животным первой группы раны ежедневно обрабатывали левомеколем, во второй группе - озонированным маслом, в третьей группе в края ран подкожно вводили озono-кислородную газовую смесь и обрабатывали раны левомеколем. Характер и особенности посттравматической регенерации кожи изучали с помощью гистологического исследования. Установлено, что локальное воздействие активными формами кислорода в ранние сроки после ожога приводит к более выраженной манифестации репаративных процессов в ожоговой ране (образование грануляционной ткани, регенерация эпидермиса), чем при применении мази «Левомеколь», что сопровождается более выраженными начальными проявлениями отторжения струпа. Применение активных форм

кислорода в составе мазевых основ, на этих этапах лечения в условиях инфицированных ран не способствует выраженной инициацией репаративных процессов, и даже может усиливать процессы воспаления.

Ключевые слова: активные формы кислорода, озонотерапия, ожоговая рана, регенерация, левомеколь

Несмотря на значительные достижения в области регенеративной медицины, клеточных технологий и тканевой инженерии, проблема адекватного восстановления полноценного кожного покрова в комбустиологии сохраняет актуальность [1, 2, 5-8]. Поэтому целесообразны поиск и оценка эффективности новых способов стимуляции репаративной регенерации кожи после ожога [2, 4]. В то же время многочисленность технологий местного лечения обожженных существенно отодвигает на второй план устранение основной причины формирования и прогрессирования ожоговой болезни – самой ожоговой раны [1, 2, 4-6]. С учетом того, что одним из наиболее значимых механизмов посттравматического повреждения тканей является окислительный стресс [2, 3], логичным компонентом комплексного лечения обожженных должен быть регулятор состояния про- и антиоксидантных систем, в качестве которого могут выступать активные формы кислорода. В связи с этим, целью работы служило изучение эффекта действия различных вариантов локальной озонотерапии в отношении экспериментальной ожоговой раны.

Материал и методы исследования

Эксперименты были проведены на 45 белых линейных крысах линии Вистар массой 160-180 г, рандомизированных на 3 группы. Под эфирным наркозом всем животным была нанесена термическая травма - контактный термический ожог III АБ - IV степени задней поверхности тела на площади 20% [3].

Животным первой группы (контрольной) ожоговые раны ежедневно обрабатывали левомеколем, во второй группе - озонированным маслом (ООМ), в третьей группе в края ран подкожно вводили озono-кислородную газовую смесь и обрабатывали раны левомеколем.

Характер и особенности посттравматической регенерации кожи изучали с помощью гистологического исследования. Препараты преимущественно окрашивали гематоксилином и эозином. Для морфологического исследования использовали световые микроскопы с суммарным увеличением x50-x200.

Результаты исследования

Визуальное наблюдение за животными показало, что крысы первой (контрольной) группы были более вялыми, чем в опытных группах. Струп у животных II группы после обработки ООМ был более светлым и эластичным. У животных III группы, которым проводилось подкожное обкалывание газовой смесью, количество раневого отделяемого было значительно меньше, чем у животных I и II групп. В опытных группах уже к 7 суткам после травмы отмечены признаки заживления ран (начали приподниматься края струпа, появились очаги краевой эпителизации). В контрольной группе подобные признаки появились

только к 10-ым суткам. У животных II группы на трое суток раньше контроля началось активное отторжение струпа.

По результатам гистологического исследования установлено, что первые сутки после травмы гистологическая картина в краях ран у животных всех трех групп не имела отличий (рис. 1). Во всех препаратах наблюдается поражение эпидермиса (некроз и некробиоз), дермы (сосочкового и сетчатого слоев), проявляющееся потерей обычной волокнистой структуры соединительной ткани дермы и превращением коллагеновых волокон в сплошную гомогенную массу, а также отеком и кровоизлияниями в рыхлой соединительной ткани и жировой клетчатке, расположенной над слоем собственной мышцы кожи.

Проходящие здесь кровеносные сосуды нередко тоже некротизированы, в них содержатся красные тромбы. Мышечные волокна собственной мышцы кожи в состоянии дистрофии: набухшие, часто вакуолизированы. В отдельных волокнах отсутствуют ядра. В рыхлой соединительной ткани, расположенной под мышечным слоем, отмечается полнокровие, отечность, а также увеличенное количество клеток, среди которых преобладают лейкоциты и макрофаги.

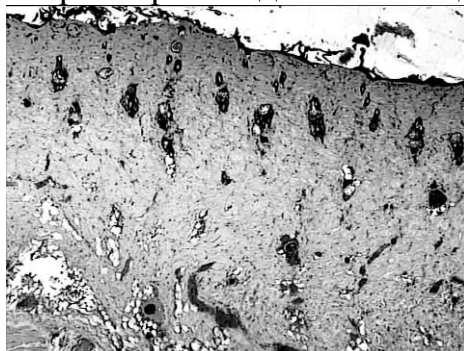


Рис 1. Гистологическая картина раны на первые сутки после ожога. Глубокий ожог с некрозом эпидермиса, сосочкового и сетчатого слоев дермы, а также некробиозом мышечных волокон собственной мышцы кожи. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. x 50.

Через 7 суток после травмы у животных в ранах контрольной группы (обработка левомеколем) - картина воспаления с начальными признаками заживления (рис. 2). Рана покрыта струпом, который состоит из некротизированных тканей (эпидермиса, дермы), а в центре раны, где ожог был наиболее глубок, в него включается и собственная мышца кожи. На периферии, ближе к краям раны, примерно на середине толщины дермы обнаруживается выраженный лейкоцитарный демаркационный вал, который делит дерму на две части – верхнюю, некротизированную, и нижнюю с проявлениями регенерации в виде пролиферации эпителиальных клеток по ходу предсуществовавших волосяных фолликулов и начальных проявлений краевой эпителизации раны, очагов пролиферации фибробластов в дерме с появлением новообразованных коллагеновых волокон и тонкостенных кровеносных сосудов, а в мышечной ткани на фоне дистрофически измененных и даже некротизированных мышечных волокон с явлениями распада саркоплазмы местами встречаются проявления регенерации в виде мышечных почек. По периферии значительной части жизнеспособных мышечных волокон отмечается пролиферация ядер миоцитов.

Кроме того, между мышечными волокнами пролиферируют фибробласты. В рыхлой соединительной ткани под собственной мышцей кожи на этих участках имеется пролиферация клеток соединительной ткани.



Рис 2. Морфологические изменения в ране через 7 суток после нанесения ожога и последующего лечения мазью «Левомеколь». Начальные проявления краевой эпителизации. 1 – струп; 2 – регенерирующий эпидермис с признаками регенерации (начало краевой эпителизации). Окраска гематоксилином и эозином. x50.

Через 7 суток после травмы в группе животных, раны которых обрабатывали озонированным маслом, преобладающим является гнойное воспаление, которое отмечается в виде гнойного экссудата по поверхности раны среди некротизированного эпидермиса и под ним, а также в виде очаговых гнойных инфильтратов в некротизированной дерме (рис. 3).

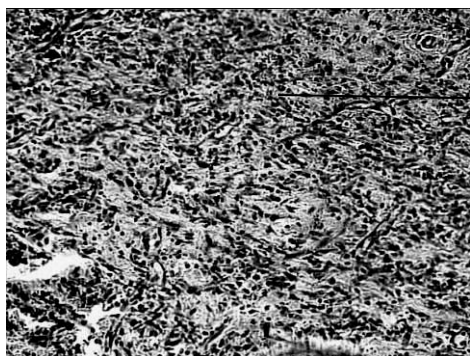


Рис 3. Гистологическая картина раны через 7 суток после нанесения ожога при лечении озонированным маслом. Струп местами инфильтрирован сегментоядерными лейкоцитами, в нем видны скопления микробных колоний. Под струпом определяется гнойный экссудат. В некротизированной дерме - микроабсцессы.

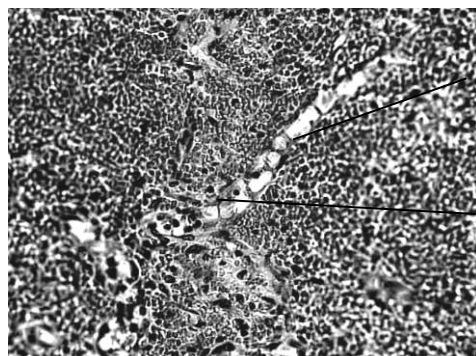
1 - струп. 2 - гнойный экссудат. Окраска гематоксилином и эозином. x200.

Сплошного демаркационного вала не образуется, но, его размещение в дерме обозначено расположенными дискретно, но на небольшом расстоянии друг от друга, лейкоцитарными инфильтратами. Лейкоцитарные инфильтраты встречаются на разной глубине дермы вплоть до собственной мышцы кожи. На этом фоне отмечаются начальные явления краевой эпителизации кожи. Языки

пролиферирующего с краев раны эпидермиса внедряются под струп, отделяя его от остальной массы дермы. Под собственной мышцей кожи тоже идет выраженная пролиферация клеток с крупными ядрами и базофильной цитоплазмой. Преобладающая часть их имеет веретенообразную форму (фибробласты). Встречаются новообразованные тонкостенные сосуды, содержащие эритроциты. В мышечной ткани встречаются единичные мышечные почки.



А. Интенсивная пролиферация клеток соединительной ткани в жировой клетчатке, окружающей собственную мышцу кожи, образование новых сосудов капиллярного типа (1 - новообразованные микрососуды). x200.

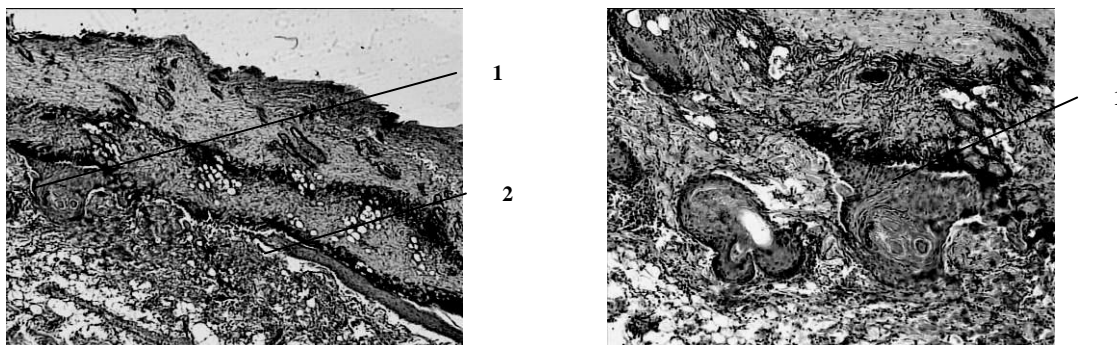


Б Интенсивная пролиферация клеток соединительной ткани в жировой клетчатке, окружающей собственную мышцу кожи, образование новых сосудов капиллярного типа (1 - скопления эритроцитов, 2 - новообразованные микрососуды). x400.

Рис 4. Морфологическая картина раны через 7 суток после ожога при применении озонкислородной газовой смеси. Окраска гематоксилином и эозином.

Через 7 суток после ожога у животных, которым ежедневно проводили обкалывание раны газовой смесью с озоном, струп частично отделяется от поверхности раны в результате проникновения под него растущего пласта эпидермиса (рис. 4). Это краевая эпителизация раны, в которой принимает участие также и пролиферирующий эпителий глубоких отделов волосяных фолликулов, сохранившихся в нижних слоях дермы. Отделение струпа идет по линии отчетливо выраженного сплошного лейкоцитарного демаркационного вала. В центре дна раны - некроз собственной мышцы кожи на всю толщину и инфильтрация мышечных волокон лейкоцитами. В мышечном слое отмечаются явления регенерации мышечных волокон в виде пролиферации ядер миоцитов и новообразование тонких мышечных волокон с базофильной цитоплазмой. Под слоем собственной мышцы кожи виден участок кровоизлияния, содержащего негемолизированные эритроциты, а по периферии - пролиферация фибробластов и проявления неангиогенеза. Отдельные новообразованные сосуды капиллярного типа врастают в зону кровоизлияния. Отмечается выраженная пролиферация эпителия в волосяных фолликулах в глубоких слоях дермы. При обкалывании ран озонсодержащей смесью отмечаются более выраженные репаративные процессы в виде более интенсивной краевой эпителизации, образования грануляционной

ткани и появления не только мышечных почек, но и новообразованных мышечных волокон в поврежденном собственном мышечном слое кожи (рис. 5).



А. : 1 - пролиферация эпителия сохранившихся луковиц волосяных фолликулов. 2 - регенерирующий эпидермис. x50.

Б.: 1 - пролиферация эпителия сохранившихся частей луковиц волосяных фолликулов. x100.

Рис 5. Результаты гистологического исследования раны через 7 суток после нанесения ожога при подкожном введении озono-кислородной газовой смеси.

Окраска гематоксилином и эозином.

Через 14 суток после ожога в ранах животных контрольной группы (обработка раны мазью Левомеколь) на фоне воспаления обнаружены отчетливые признаки регенерации (рис. 6). Так, под эпидермисом, а также на неэпителизированной поверхности раны расположен значительной толщины слой молодой рубцовой ткани, содержащей фибробласты, количество которых уменьшается при приближении к краю раны, а сами клетки постепенно дифференцируются в фиброциты. Среди клеток содержатся тонкостенные новообразованные сосуды капиллярного типа. Клетки и сосуды располагаются параллельно поверхности раны. Среди коллагеновых волокон сохранившейся части нижележащей дермы отмечаются отдельные очаги пролиферации фибробластов, а также образование здесь единичных сосудов капиллярного типа, располагающихся перпендикулярно к поверхности. Фибробластической пролиферации в зоне между дермой и подлежащим слоем собственной мышцы кожи, среди мышечных волокон практически нет. Мышечный слой на небольшом участке, соответствующем центру раны, частично теряет свою непрерывность, очевидно, вследствие гибели находившихся здесь мышечных волокон. На их месте пролиферируют фибробласты и происходит новообразование коллагеновых волокон. Сохранившиеся мышечные волокна имеют признаки регенерации: отмечается пролиферация ядер миоцитов, а также образование мышечных почек и даже отдельных тонких мышечных волокон. Итак, при обработке раны мазью «Левомеколь» через 14 суток после ожога отмечается отделение струпа от поверхности раны, где обнаруживается сформированный рубец, покрытый регенерировавшим эпидермисом.

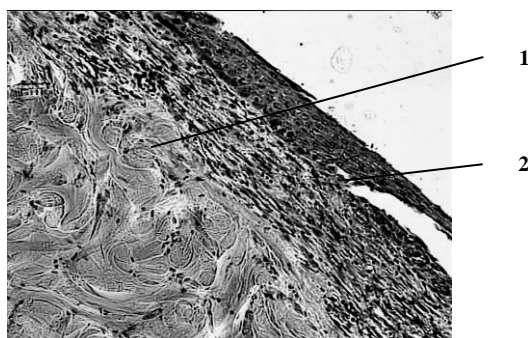
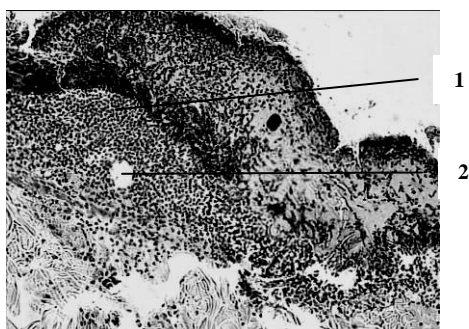


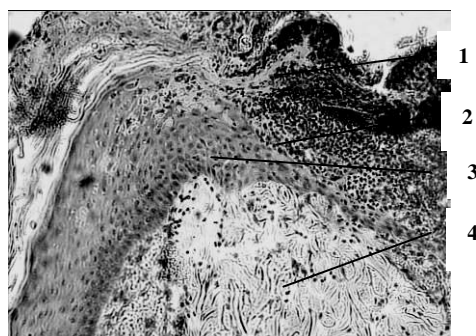
Рис. 6. Морфологическая картина кожи через 14 суток после ожога в случае обработки раны мазью Левомеколь.

Струп отделен на значительном протяжении, под ним расположена молодая рубцовая ткань, на поверхность которой напоздает пласт регенерирующего эпидермиса. 1- молодая рубцовая ткань; 2- новообразованный эпидермис. Окраска гематоксилином и эозином. x100.

Через 14 суток после ожога в группе животных, которым проводили обработку раны озонированным маслом, струп на большей части поверхности ран не отделен от нее (рис. 7). Под струпом обнаруживается гнойный экссудат. На открытой (свободной от струпа) поверхности раны также имеется гнойное отделяемое и фрагменты некротизированных тканей.



Струп инфильтрирован лейкоцитами и незначительно отделен от поверхности раны. Под струпом скапливается гнойный экссудат (1- струп, инфильтрированный лейкоцитами; 2- гнойный экссудат)

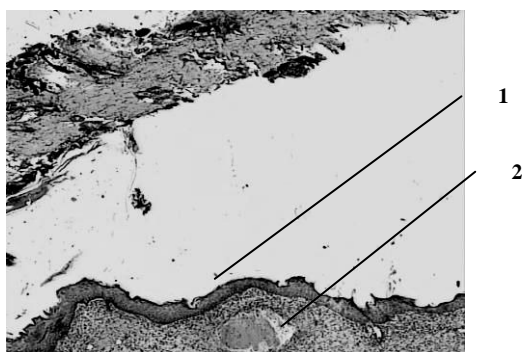


Слабо выраженная краевая эпителизация раны (1 - струп с лейкоцитарной инфильтрацией; 2 - гнойный экссудат; 3 - напоздающий пласт регенерирующего эпидермиса; краевая эпителизация; 4 - отежная подлежащая ткань)

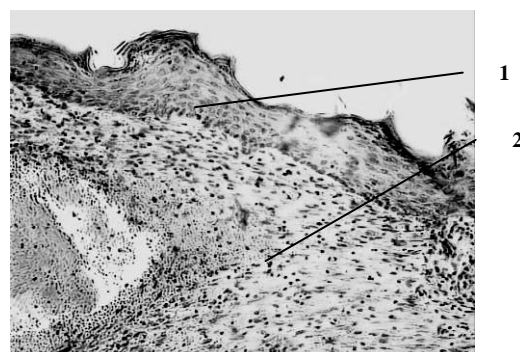
Рис 7. Морфологическая картина обожжённой кожи через 14 суток после нанесения ожога при обработке раны озонированным маслом. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. x50.

Демаркационный вал в части препарата (центр ожоговой раны) проходит непосредственно над слоем собственной мышцы кожи, мышечные волокна которого находятся в состоянии некроза, некробиоза или дистрофических изменений. Часть проходящих здесь над мышечным слоем сосудов

некротизирована. По периферии от этой зоны в нижних отделах сохранившейся дермы, в слое собственной мышцы кожи и под ним отмечается выраженная клеточная реакция в виде скопления лейкоцитов (лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов), макрофагов, пролиферирующих фибробластов, которые на отдельных участках формируют молодую соединительную (грануляционную) ткань с единичными новообразованными сосудами. Мышечный слой вблизи зоны некроза находится в состоянии разрежения вследствие гибели мышечных волокон и разрастания клеток соединительной ткани и с новообразованием коллагеновых волокон, но вместе с этим, определяются мышечные волокна с признаками регенерации (размножение ядер, образование мышечных почек). Рубцевание раны не выражено, ее эпителизация в начальном состоянии. Итак, применение озонированного масла для лечения ожоговой раны сопровождается гнойным воспалением, которое не ограничивается формированием демаркационного лейкоцитарного вала, но распространяется и на подлежащие ткани. Процессы рубцевания раны и ее эпителизации ослаблены.



А Струп отделен от раны на большей части поверхности. Рана покрыта пластом регенерировавшего эпидермиса. Под эпидермисом видна молодая рубцовая ткань. 1- регенерировавший эпидермис; 2- молодая рубцовая ткань. х50.



Б Молодая рубцовая ткань под эпидермисом.
1- регенерировавший эпидермис;
2- молодая рубцовая ткань. х200.

Рис. 8. Особенности гистологической картины кожи крыс через 14 суток после нанесения ожога при обкалывании раны озон-кислородной газовой смесью. Окраска гематоксилином и эозином.

Через 14 суток после ожога в группе животных, которым проводили обкалывание раны газовой смесью, содержащей озон, определяется картина заживления ран (рис. 8). Струп отделен от поверхности раны. В части препаратов отмечается полная эпителизация поверхности раны как за счет краевой эпителизации, так и за счет пролиферации эпителия сохранившихся жизнеспособными в глубоких отделах дермы волосяных фолликулов. Под эпидермисом располагается слой молодой рубцовой ткани с горизонтальным (параллельным поверхности кожи) расположением клеток и относительно небольшим количеством новообразованных сосудов. В подлежащей дерме отмечается несколько увеличенное количество клеток соединительной ткани. Над

мышечным слоем имеется слой жировой клетчатки. Толщина рубцового слоя различна: от максимальной, занимающей почти всю толщу бывшей дермы в центре раны, до узкого субэпидермального слоя по краям раны. Слой собственной мышцы кожи ближе к центру раны представлен тонкими, иногда волнистыми новообразованными мышечными волокнами с базофильной цитоплазмой и большим количеством сочных ядер, иногда располагающихся цепочкой. Однако в центре раны мышечный слой прерывается. Одновременно с новообразованными мышечными волокнами имеются и волокна, находящиеся в состоянии дистрофии – набухшие, теряющие свои тинкториальные свойства, иногда находящиеся в состоянии дисковидного расщепления и локального лизиса.

Итак, местное применение активных форм кислорода в виде обкалывания раны озон-кислородной смесью сопровождается через 14 суток после ожога картиной выраженных репаративных процессов в виде полного рубцевания и эпителизации.

Заключение

Проведенный эксперимент с целью сравнения эффективности местного лечения ожоговых ран стандартным средством – Левомеколь и активными формами кислорода в виде нанесения озонированного растительного масла или обкалывания ран озонкислородной смесью показал преимущество местного (по краевой зоне раны) подкожного применения озон-кислородной смеси. Локальное воздействие активными формами кислорода в ранние сроки после ожога приводит к более выраженной манифестации репаративных процессов в ожоговой ране (образованию грануляционной ткани, регенерации эпидермиса), чем при применении мази Левомеколь, что сопровождается более выраженными начальными проявлениями отторжения струпа. Применение активных форм кислорода в составе мазевых основ на этих этапах лечения, в условиях инфицированных ран не способствует выраженной инициации репаративных процессов, и даже может усиливать процессы воспаления.

Список литературы:

1. Алексеев А.А. с соавт. Использование мази сульфаргин для лечения ожоговых ран // Комбустиология: электронный журнал. 2011. №44.
2. Алексеев А.А., Бобровников А.Э. Местное применение стимуляторов регенерации для лечения ожоговых ран // Комбустиология: электронный журнал. 2010. №41.
3. Воробьев А.В., Мартусевич А.К., Соловьева А.Г. с соавт. Некоторые физико-биохимические свойства биологических жидкостей крыс при модельной термической травме // Бюллетень экспериментальной медицины и биологии. 2009. Т. 147, №4. С. 404-406.
4. Глубокова И.Б. с соавт. Эффективность мазевых композиций и коллагенбутоловых покрытий при лечении инфицированных ран // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. 2005. №1. С. 27-33.
5. Колсанов А.В. с соавт. Экспериментально-клиническое обоснование применения клеточных культур фибробластов в лечении ран и рубцовых деформаций кожи // Морфологические ведомости. 2009. №3. С. 199-200.

6. Крутова Т. В., Ефимов Е. А., Карман Д. Б. Влияние линимента дибунола на посттравматическую регенерацию кожи у мышей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1984. Т. 98, №10. С. 471-473.

7. Парамонов Б.А., Порембский Я.О., Яблонский В.Г. Ожоги. Руководство для врачей. СПб.: СпецЛит, 2000. 480 с.

8. Шаповалов С.Г. Современные раневые покрытия в комбустиологии // ФАРМиндекс-Практик. 2005. Вып. 8. С. 38-46.

ИНФОРМАЦИЯ

ПОСТ-РЕЛИЗ О ЗАСЕДАНИИ НАУЧНОГО КОМИТЕТА МЕЖДУНАРОДНОЙ АССОЦИАЦИИ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО ОЗОНОТЕРАПИИ (12-13 июня 2015 г.)

С.П. Перетягин

*ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр»
Минздрава России, Нижний Новгород*

12-13 июня 2015 г. в г. Мадрид (Испания) прошло заседание научного комитета международной ассоциации специалистов по озонотерапии (IMEOF), в котором приняли участие представители Ассоциации российских озонотерапевтов. Данная международная встреча проходила в стенах старейшего испанского медицинского заведения - Королевской Национальной академии медицины в Мадриде. Совещание было посвящено перевыборам нового состава научного комитета на 2015-2020 гг. и обсуждению обновлённого варианта «Мадридской декларации по озонотерапии», впервые принятой в 2010 году.



«Мадридская декларация по озонотерапии» является основополагающим рабочим документом ISCO3 (Международного научного комитета озонотерапии-www.ISCO3.org) и Международной федерации специалистов по озонотерапии (www.IMEOF.org), регламентирующим применение озонотерапии в медицине. В обязанность этого Комитета входит периодическое обновление текста декларации в соответствии с научными исследованиями и достижениями в области, полученными в различных странах за последнее время.

В новый состав научного комитета вошел 21 специалист разных стран, среди которых трое ученых из России – профессора Г.О. Гречканёв (акушерство и гинекология, Нижний Новгород), О.А. Биткина (дерматокосметология, Нижний Новгород) и С.П. Перетягин (травматология; патофизиология, Нижний Новгород). В рабочем порядке прошло обсуждение плана работы на предстоящие пять лет, причем значительное место отведено новым, перспективным технологиям применения активного кислорода в медицине, разработке новых юридически значимых документов для клинической медицины по практическому использованию в ней методов озонотерапии.

Важно подчеркнуть, что «Мадридская декларация по озонотерапии» является первым консенсусным документом в истории мировой озонотерапии. Она была принята в 2010 г. на I конгрессе Международной ассоциации специалистов по озонотерапии в Мадриде в целях унификации её теоретических основ и практических технологий, критериев её эффективности, развития образовательных программ, создания протоколов озонотерапии. В настоящее время «Мадридскую декларацию» подписали 39 национальных ассоциаций по озонотерапии, она переведена на 12 языков.

Важной вехой в обновлённом издании Мадридской декларации 2015 года явилось признание и внесение в неё отечественных технологий озонотерапии – системного применения озонированного физиологического раствора и экстракорпоральной обработки кислородно-озоновой смесью больших объёмов крови пациента (совместно с Украиной), увеличивающих возможности практического использования активного кислорода в практической медицине. Этому предшествовали утверждение в России новых медицинских технологий «Применение кислородно-озоновой смеси в травматологии» № ФС – 2007/029-У (разработчики: Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии (сейчас – Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр), Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им Н.И. Приорова, Московский городской научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В.Склифосовского, Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии), «Применение кислородно-озоновой смеси в дерматологии и косметологии» (№ ФС – 2005/058) и «Применение медицинского озона в акушерстве, гинекологии и неонатологии» (№ ФС – 2007/014-У), а также более чем 30-летний опыт экспериментально-клинической работы Нижегородской ЦНИЛ, кафедр госпитальной хирургии, анестезиологии и реаниматологии НижГМА, областного кардиохирургического центра. Этот факт явился свидетельством внедрения отечественных медицинских научных достижений на международном уровне.

Во второй день международной встречи состоялось заслушивание 16 сообщений специалистов разных стран о новых достижениях в области озонотерапии. От России прозвучали доклады «First experience of laboratory control of ozonids contained cosmetic gels action» (Bitkina O. et al.) и «The experimental and clinical feasibility of the method of ozonized saline use and its efficiency» (Peretyagin S. et al.).

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-Chief – M.D. Andrew K. Martusevich (*cryst-mart@yandex.ru*)

Articles should be sent to Editor-in-Chief or Vice-Editor-in-Chief.

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 recommended)*

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.