

## ВЛИЯНИЕ ОЗОНИРОВАНИЯ НА НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЛАЗМЫ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АЛКОГОЛЬНОЙ АБСТИНЕНЦИЕЙ: ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO

Мартусевич А.К.<sup>1,2</sup>, Ковалева Л.К.<sup>3</sup>, Диленян Л.Р.<sup>1</sup>, Тужилкин А.Н.<sup>2</sup>, Кононец В.В.<sup>4</sup>, Иванова Е.Г.<sup>1</sup>, Романова А.А.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород, e-mail: cryst-mart@yandex.ru;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар;

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО «Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева», Нижний Новгород

---

Целью исследования служил анализ тезиграфических и биохемилюминесцентных параметров плазмы крови пациентов с алкогольным абстинентным синдромом в условиях озонирования *in vitro*. Исследование было проведено на образцах крови 18 пациентов с алкогольным абстинентным синдромом. Оценивали сокристаллизацию образцов плазмы крови с озонированным изотоническим раствором хлорида натрия с насыщающей концентрацией озона 0 (контроль), 1000, 3000, 6000, 10 000, 20 000 и 40 000 мкг/л (метод биокристаллометрического претеста). Во всех образцах плазмы изучали кристаллогенные свойства (по качественным и количественным критериям оценки тезиграмм) и баланс про- и антиоксидантных систем крови (по интенсивности свободнорадикальных процессов и общей антиоксидантной активности). Установлено, что различные концентрации озона при введении в плазму крови существенно и дозозависимо трансформируют картину инициированного кристаллогенеза биожидкости и параметры ее окислительного метаболизма, причем данная зависимость носит нелинейный характер и имеет выраженный экстремум. Показано, что в образцах пациентов с алкогольным абстинентным синдромом данный экстремум соответствует насыщающей концентрации озона 10 000 мкг/л, что превышает уровень, характерный для образцов плазмы крови практически здоровых людей.

---

Ключевые слова: алкогольный абстинентный синдром, сыворотка крови, кристаллогенные свойства, озон, окислительный метаболизм.

## THE EFFECT OF OZONATION ON SOME PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH ALCOHOL WITHDRAWAL: AN IN VITRO STUDY

Martusevich A.K.<sup>1,2</sup>, Kovaleva L.K.<sup>3</sup>, Dilenyanyan L.R.<sup>1</sup>, Tuzhilkin A.N.<sup>2</sup>, Kononets V.V.<sup>4</sup>, Ivanova E.G.<sup>1</sup>, Romanova A.A.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, e-mail: cryst-mart@yandex.ru;

<sup>2</sup>Lobachevsky University, Nizhny Novgorod;

<sup>3</sup>Kuban State Medical University, Krasnodar;

<sup>4</sup>Nizhny Novgorod State Technical University named after R.E. Alexeev, Nizhny Novgorod

---

The aim of the study was to analyze the teziographic and biochemiluminescence parameters of the blood plasma of patients with alcohol withdrawal syndrome under *in vitro* ozonation conditions. The study was conducted on blood samples from 18 patients with alcohol withdrawal syndrome. The co-crystallization of blood plasma samples with an ozonated isotonic sodium chloride solution with a saturating ozone concentration of 0 was evaluated (control), 1000, 3000, 6000, 10000, 20000 and 40,000 micrograms/l (biocrystallometric pre-test method). In all plasma samples, crystallogenic properties (according to qualitative and quantitative criteria for evaluating teziograms) and the balance of pro- and antioxidant blood systems (according to the intensity of free radical processes and total antioxidant activity) were studied. It was found that different concentrations of ozone when injected into blood plasma significantly and dose-dependently transform the picture of initiated crystallogenesis of biofluid and the parameters of its oxidative metabolism, and this dependence is nonlinear and has a pronounced extreme. It has been shown that in the samples of patients with alcohol withdrawal syndrome, this extreme corresponds to a saturating ozone concentration of 10,000 micrograms/l, which exceeds the level typical for blood plasma samples of practically healthy people.

---

Keywords: alcohol withdrawal syndrome, blood serum, crystallogenic properties, ozone, oxidative metabolism.

**Введение**

В последние десятилетия в России проблема алкоголизации нации является одной из наиболее актуальных [1-3]. О ее государственной значимости дополнительно свидетельствует специализированная Президентская программа, реализующаяся в последние годы [1; 4]. При этом большая часть алкогользависимых пациентов – лица трудоспособного возраста, утрачивающие в результате заболевания профессиональные способности и навыки, а также возможность реализовывать трудовой потенциал [2; 3; 5]. Более того, длительное постоянное употребление спиртных напитков приводит к формированию многочисленных осложнений со стороны практически всех органов и систем [5; 6]. В связи с этим профилактика алкоголизации населения и адекватное лечение данного контингента пациентов являются основной задачей современной наркологии.

Известно, что алкогольная абстиненция представляет собой симптомокомплекс соматических, неврологических и психопатологических расстройств у больного алкоголизмом, возникающих в результате внезапного прекращения запоя или снижения доз алкоголя [5-7]. Формирующиеся при этом выраженные и резкие метаболические и функциональные перестройки определяют целесообразность своевременной и полноценной коррекции данного патологического состояния, однако эффективность существующих лечебных алгоритмов остается недостаточно высокой [7-9]. В полной мере это касается и восстановления параметров системной и локальной гемодинамики, а также устранения метаболических сдвигов [10]. На этом основании сохраняет свою актуальность поиск и изучение клинических перспектив инновационных технологий. Одной из таковых является системная озонотерапия, включающая внутривенное введение предварительно озонированного физиологического раствора, оказывающего комплексный эффект (непосредственная окислительная деструкция токсических соединений, купирование окислительного стресса, стимуляция микроциркуляции, коррекция энергодефицита и др.) [6; 7]. С другой стороны, для достижения максимальной эффективности курса озонотерапевтического лечения принципиальную значимость имеет персонализация дозировки озона, однако методы ее осуществления практически отсутствуют, а успешность коррекции оценивается лишь по динамике отдельных лабораторных параметров по окончании лечения [8; 9]. Данная задача может быть решена путем использования разработанного авторами ранее биокристаллоного претеста, базирующегося на предварительном (до начала курса озонотерапии) изучении результата сокристаллизации плазмы крови пациента с физиологическим раствором, насыщенным различными концентрациями озона.

**Целью данного исследования** служил анализ титриметрических и биохимилюминесцентных параметров плазмы крови пациентов с алкогольным абстинентным синдромом в условиях озонирования *in vitro*.

## **Материал и методы исследования**

Исследование было проведено на образцах крови 18 пациентов с алкогольным абстинентным синдромом (F10.222 по МКБ-10) (средний возраст обследуемых лиц – 44,1±4,3 года). У всех испытуемых до начала комплексной терапии осуществляли получение образцов крови в объеме 4 мл, из них выделяли плазму методом дифференциального центрифугирования по стандартному протоколу.

Для проведения экспериментов были использованы свежеприготовленные образцы 0,9% раствора хлорида натрия (физиологического раствора), причем создавали 7 образцов, различающихся по насыщающей концентрации озона. Первый был контрольным (без обработки), второй и последующие получены после барботажа физиологического раствора озono-кислородной смесью с концентрациями озона 1000, 3000, 6000, 10 000, 20 000 и 40 000 мкг/л соответственно [11].

Генерацию озono-кислородной смеси производили с помощью озонатора «Медозонс-систем» (Нижний Новгород), скорость насыщения физиологического раствора составляла 30 мкг/л\*мин., длительность барботажа до достижения необходимой дозы соединения – 3-5 мин.

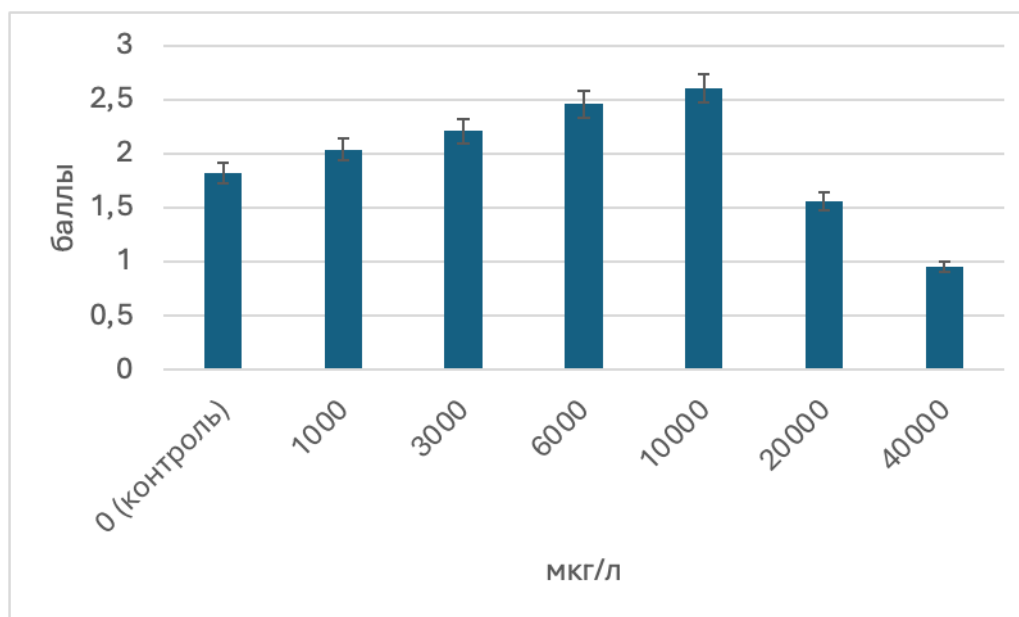
Непосредственно биокристалломный претест выполняли путем внесения аликвотного объема озонированного (или контрольного) физиологического раствора в каплю биологической жидкости на предметном стекле в соотношении 1 : 1. После завершения процесса дегидратации капли и формирования дефинитивной тезиграфической фации результат структуризации оценивали визуально (по образованным морфологическим элементам) и визуаметрически (с использованием комплекса балльных полуколичественных критериев). В качестве наиболее значимых показателей использовали основной тезиграфический коэффициент Q, а также степень деструкции фации (СДФ) [12; 13].

Вторым компонентом анализа ответа биосистемы на озонирование служила оценка состояния окислительного метаболизма плазмы крови, которую осуществляли с применением технологии Fe-индуцированной биохемиллюминесценции, реализуемой на биохемиллюминометре «БХЛ-06» (Нижний Новгород). Наиболее информативными интегральными параметрами, согласно данному методу, являлись интенсивность свободнорадикальных процессов, отражающая светосумму хемиллюминесценции, и суммарная активность антиоксидантных систем в биологической жидкости.

Статистическую обработку данных производили с помощью программы SPSS 11.0. Нормальность распределения значений параметров оценивали с использованием критерия Шапиро - Уилка. Для оценки статистической значимости различий применяли Н-критерий Краскела - Уоллиса. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

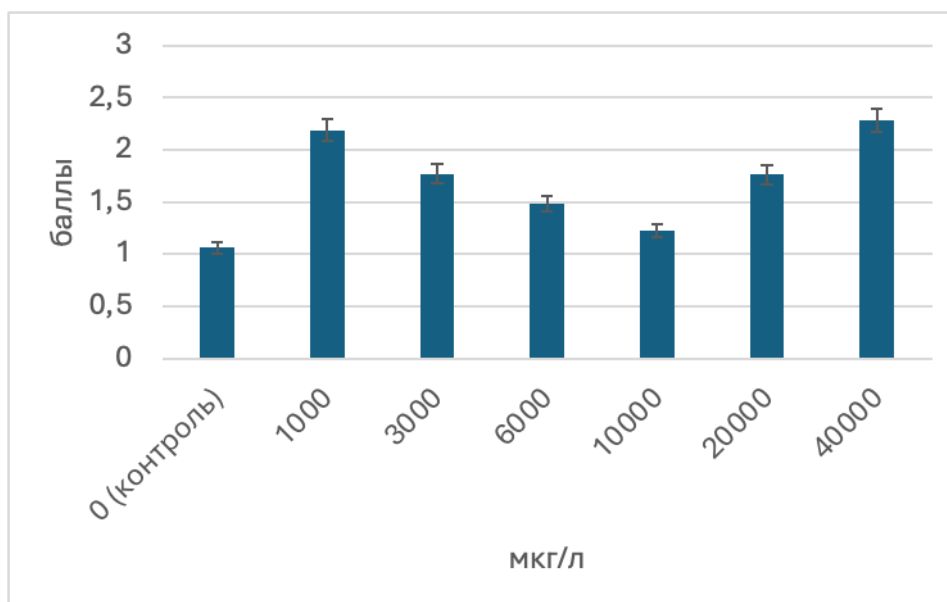
## **Результаты исследования и их обсуждение**

Выполненное морфологическое и визуаметрическое исследование тезиграмм сформированных систем «плазма крови – озонированный физиологический раствор» позволило подтвердить стереотипный и немонотонный характер реагирования биообъектов на воздействие активных форм кислорода. В частности, анализ графиков изменения основного тезиграфического коэффициента  $Q$  (рис. 1) и степени деструкции фации (рис. 2) свидетельствует о наличии двухфазной зависимости, имеющей единый экстремум. Данная точка перегиба для обследуемых пациентов с алкогольной абстиненцией соответствует насыщающей концентрации озона 10 000 мкг/л.



*Рис. 1. Инициаторный потенциал плазмы крови при обработке разными насыщающими концентрациями озона (по коэффициенту  $Q$ )*

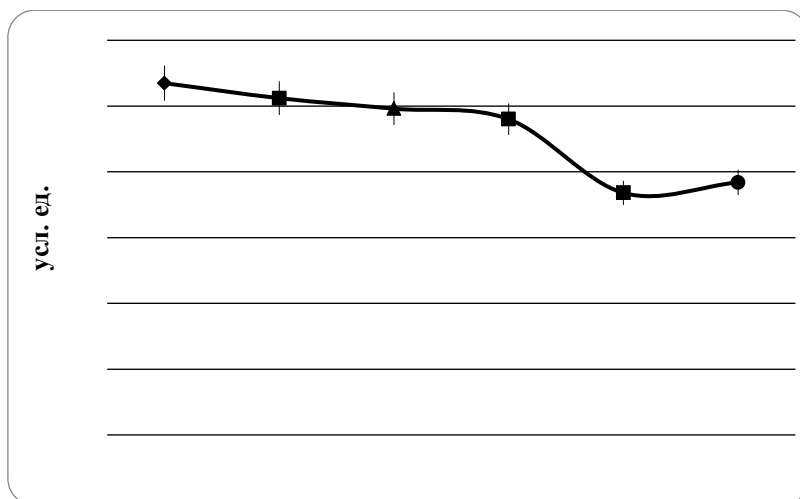
Ранее авторами были выполнены эксперименты с аналогичным дизайном на образцах крови практически здоровых людей, позволившие определить, что экстремум тезиграфических показателей в этом случае находится в области более низких значений – в районе 4000-5000 мкг/л [13]. Для биологической жидкости пациентов с алкогольным абстинентным синдромом фиксировали плавное нарастание уровня параметра  $Q$  при увеличении насыщающей концентрации озона с 1000 до 10 000 мкг/л (рис. 1), что указывает на усиление детоксикационного эффекта воздействия в данном диапазоне доз соединения. Важно отметить, что дальнейший прирост количества активных форм кислорода приводит к резкому снижению коэффициента  $Q$ , который уже в следующей использованной концентрации (20 000 мкг/л) опускается ниже контрольного уровня ( $p < 0,05$ ). Это косвенно свидетельствует об образовании избыточного количества свободных радикалов, потенцирующих окислительный стресс в биосреде.



*Рис. 2. Степень деструкции фации плазмы крови при обработке разными насыщающими концентрациями озона (по коэффициенту Q)*

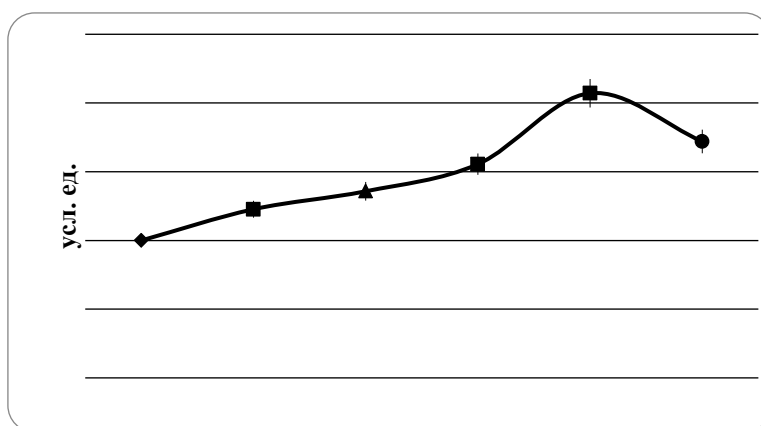
Сходная картина ответа на озонирование раскрывается и на основании анализа степени «разрушенности» и сформированности отдельных элементов тезиграмм плазмы крови рассматриваемого контингента пациентов (рис. 2). Установлено, что экстремум соответствующего графика также соответствует насыщающей концентрации 10 000 мкг/л. В данной точке уровень показателя не отличается от контрольных значений, а для остальных использованных в эксперименте концентраций соединения – статистически значимо превышает его ( $p < 0,05$ ). Интересно, что как при минимальной дозе озона (1000 мкг/л), слабо модифицирующей субстраты интоксикации, так и при максимальной насыщающей концентрации (40 000 мкг/л), выраженно пополняющей пул свободных радикалов в биосреде, была зафиксирована выраженная деструкция структурных элементов тезиграфической фации. Сопряженность приведенной динамики тезиграфических параметров дополнительно подтверждается обнаружением выраженной корреляционной зависимости между ними ( $r = -0,80 \pm 0,07$ ;  $p < 0,01$ ).

Авторы предполагают, что установленный двухфазный характер ответа биосреды на воздействие озона обусловлен влиянием изменяющегося уровня свободных радикалов на протеом плазмы крови, причем умеренное пополнение пула радикальных молекул обеспечивает стабилизацию белкового компонента биосреды, а гиперпродукция может приводить к стимуляции процессов агрегации и потере нативной конфигурации, что создает условия для ингибирования кристаллогенеза [14; 15]. Именно на эти тенденции указывает обнаруженная динамика основного тезиграфического коэффициента и степени деструкции фации.



*Рис. 3. Интенсивность свободнорадикальных процессов плазмы крови при обработке разными насыщающими концентрациями озона*

Также в рамках настоящего эксперимента выполнена оценка влияния, включающая как мониторинг интенсивности свободнорадикальных процессов (рис. 3), так и общую антиоксидантную активность (рис. 4).



*Рис. 4. Общая антиоксидантная активность плазмы крови при обработке разными насыщающими концентрациями озона*

Выявлено, что все использованные концентрации озона обеспечивают снижение интенсивности липопероксидации, и данная зависимость, в отличие от представленных на рисунках 1 и 2, носит монотонный характер. В то же время экстремум также обнаруживался при насыщающей концентрации озона 10 000 мкг/л, которой соответствовало минимальное значение интенсивности индуцированной биохимиллюминесценции и, следовательно, максимальное ингибирование свободнорадикальных процессов. Дальнейшее повышение количества вводимых активных форм кислорода, напротив, способствовало более высокой интенсивности перекисного окисления липидов в биожидкости.

Динамика суммарной антиоксидантной активности плазмы крови пациентов с алкогольной абстиненцией закономерно оказалась обратной относительно интенсивности свободнорадикальных процессов в биологической жидкости (рис. 4). Установлено, что

максимальный (оптимальный) уровень общей антиоксидантной активности, как и по остальным рассмотренным основным показателям, выявлен при использовании физиологического раствора с насыщающей концентрацией озона 10 000 мкг/л. В этом случае антиоксидантный потенциал возрастает в 2,08 раза относительно контрольного уровня ( $p < 0,01$ ), что позволяет наиболее полно купировать формирующийся при алкогольной интоксикации окислительный стресс. Иные примененные насыщающие концентрации озона обеспечивали существенно менее выраженный антиоксидантный эффект в образцах плазмы крови обследуемых людей.

### **Заключение**

Установлено, что различные концентрации озона при введении в плазму крови существенно и дозозависимо трансформируют картину инициированного кристаллогенеза биологической жидкости и параметры ее окислительного метаболизма, причем данная зависимость носит нелинейный характер и имеет выраженный экстремум. Показано, что в образцах пациентов с алкогольным абстинентным синдромом данный экстремум соответствует насыщающей концентрации 10 000 мкг/л, что превышает уровень, характерный для образцов плазмы крови практически здоровых людей.

### **Список литературы**

1. Ерпылов А.А. Проблема алкоголизма как угроза национальной безопасности России // Теория и практика сервиса: экономика, социальная сфера, технологии. 2015. № 1. С. 26-28.
2. Шматова Ю.Е. Экономическая и статистическая оценка проблемы алкогольной зависимости в России (региональный аспект) // Society and Security Insights. 2019. Т. 2, № 3. С. 64-79.
3. Белова Ю.Ю. Модели социальной превенции алкоголизации населения в регионах России с различными климатическими условиями // Регионология. 2018. № 2. С. 314-337.
4. Гиль А.Ю. Экономическая доступность, потребление алкогольных напитков и алкогелезависимая смертность в России в период с 1998 по 2009 годы // Проблемы стандартизации в здравоохранении. 2017. № 7-8. С. 23-37.
5. Разводовский Ю.Е., Зотов П.Б. Алкогольные отравления и эпидемиологические параметры алкоголизма в России // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. 2016. № 2. С. 64-72.
6. Артемьева М.С., Майдан А.В. Сравнительная оценка современных концепций лечения алкоголизма // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». 2017. Т. 19. № 9. С. 19-21.

7. Сиволап Ю.П. Злоупотребление алкоголем и фармакотерапия алкоголизма // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2014. № 3. С. 4-9.
8. Сквиря И.М. Противорецидивная фармакотерапия алкогольной зависимости (обзор литературы) // Проблемы здоровья и экологии. 2014. № 2. С. 7-11.
9. Нашкенова А.М., Малярова О. Актуальные вопросы активной противоалкогольной фармакотерапии // Вестник Казахского Национального медицинского университета. 2015. № 2. С. 196-201.
10. Martusevich A., Zhukova N., Dilenyana L., Bocharin I., Mamonova S. Heart rate variability in patients with alcohol withdrawal syndrome // Iranian Heart Journal. 2020. Vol. 21. № 4. P. 111-117.
11. 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.
12. Мартусевич А.К., Камакин Н.Ф. Унифицированный алгоритм исследования свободного и иницированного кристаллогенеза биологических жидкостей // Клиническая лабораторная диагностика. 2007. № 6. С. 21-24.
13. Мартусевич А.К., Камакин Н.Ф., Иванникова Е.В., Жукова Н.Э. Характер действия физико-химических факторов на особенности структуризации сыворотки крови человека *in vitro* // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2012. Вып. 43. С. 112-115.
14. Дерябина Н.И., Залесский М.Г. Содержание белковых компонентов в капле сыворотки крови при ее высыхании // Вестник новых медицинских технологий. 2005. Т. XII. № 1. С. 85-87.
15. Яхно Т.А., Казаков В.В., Санин А.Г. с соавт. Динамика фазовых переходов в высыхающих каплях растворов белков сыворотки крови человека // Журнал технической физики. 2007. Т. 77. № 4. С. 123-127.