Федеральное государственное автономное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского»

На правах рукописи

МАРТУСЕВИЧ
Анастасия Анатольевна

Метаболические и гемодинамические эффекты синглетного кислорода

03.03.01 – физиология
03.01.04 - биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., доц. А.В. Дерюгина,

Научный консультант:
д.м.н., проф. С.П. Перетягин

Нижний Новгород - 2018

Содержание

		Стр.
	Список сокращений	4
	ВВЕДЕНИЕ	5
1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1	Активные формы кислорода и их роль в функционировании биосистем. Окислительный метаболизм и оксидативный стресс	10
1.2	Структура и функционирование антиоксидантной системы организма	19
1.3	Синглетный кислород как активная форма кислорода и компонент биосистем	35
2	ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ	42
2.1.	МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1.1	Общий объем исследования и его этапы	42
2.1.2	Используемые в экспериментах генераторы активных форм кислорода и их режимы работы	44
2.1.3	Методы исследования	44
2.1.3.1	Исследование свободнорадикальных процессов в биологических объектах на основании изучения их Fe-индуцированной биохемилюминесценции	44
2.1.3.2	Биохимические и физико-химические методы исследования	47
2.1.3.3	Гематологические методы исследования	48
2.1.3.4	Методы исследования кристаллогенных свойств биожидкостей	48
2.1.3.5	Методы изучения состояния микроциркуляции и вариабельности сердечного ритма	51
2.1.4	Методы статистической обработки данных	51
2.2.	РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	53
2.2.1	Исследование действия синглетного кислорода на параметры крови in vitro	53

2.2.1.1 Исследование особенностей действия синглетного кислорода на баланс про- и антиоксидантных систем и уровень малонового диальдегида крови in vitro 53
2.2.1.2 Сравнительная характеристика эффекта синглетного кислорода и озона в отношении энергетического метаболизма эритроцитов 61
2.2.1.3 Оценка дозозависимости модификации синглетным кислородом некоторых физико-химических параметров крови 65
2.2.1.4 Электрофоретическая подвижность эритроцитов и кристаллогенные свойства крови при действии активных форм кислорода in vitro 70
2.2.2 Изучение влияния синглетного кислорода на функциональное состояние организма животного 76
2.2.2.1 Интенсивность процессов липопероксидации и состояние антиоксидантных систем крови и тканей крыс при действии синглетного кислорода и озона 76
2.2.2.2 Оценка действия ингаляций активных форм кислорода на энергетический метаболизм организма животных 86
2.2.2.3 Сравнительное исследование некоторых гематологических показателей и электрофоретической подвижности эритроцитов крыс в динамике ингаляций синглетного кислорода и озона 100
2.2.2.4 Вариабельность сердечного ритма и состояние микроциркуляции у животных, получавших ингаляции различных источников активных форм кислорода 108
2.2.2.5 Оценка влияния ингаляций активных форм кислорода на кристаллогенные свойства сыворотки крови крыс 121
3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ 127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 150

Список сокращений

АФК – активные формы кислорода

СК – синглетный кислород

ФДТ – фотодинамическая терапия

ПОЛ – перекисное окисление липидов

АОА – общая антиоксидантная активность

ПРЭ – перекисная резистентность эритроцитов

ЛДГ – лактатдегидрогенеза

СОД - супероксиддисмутаза

МДА – малоновый диальдегид

ЭФПЭ – электрофоретическая подвижность эритроцитов

АлДГ - альдегиддегидрогеназа

ОВП – окислительно-восстановительный потенциал

Кр – кристаллизуемость

ИС – индекс структурности

СДФ – степень деструкции фации

Кз – выраженность краевой белковой зоны

ПМ – показатель микроциркуляции

ПШ – показатель шунтирования

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Изучению про- и антиоксидантного баланса организма человека и животных в последние десятилетия уделяется много внимания (Казимирко В.К. с соавт., 2004; Костюк В.А., Потапович А.И., 2004; Bartz R.R., Piantadosi C.A., 2010; Forman H.J., 2010). Одним из промежуточных результатов этих изысканий явилось формирование понятия «окислительный стресс» (Меньщикова Е.Б. с соавт., 2008; Uno K., Nicholls S.J., 2010), представляющего собой активацию свободнорадикального окисления, которое не может быть компенсировано собственными антиоксидантными резервами. Ассортимент средств его коррекции не слишком широк и остается представленным лишь озонотерапией (Перетягин С.П. с соавт, 2009; Масленников О.В., Конторщикова К.Н., Шахов Б.Е., 2016) и антиоксидантной терапией (Костюк В.А., Потапович А.И., 2004; Казимирко В.К. с соавт., 2004; Young I.S., Woodside J.V., 2001). В этом плане привлекает внимание синглетный кислород (СК), генерируемый биологическими системами при некоторых условиях in vivo (Заворотная Р.М., 2002; Schweitzer C., Schmidt R., 2003; Davies M.J., 2004), в том числе при фотобиологических процессах (Briviba K., Klorz l-O., Sies H., 1998; Landry M.P. et al., 2009), а также как один из редокс-мессенджеров в реализации межклеточных взаимодействий (Bartz R.R., Piantadosi C.A., 2010; Forman H.J., 2010).

Степень разработанности темы. Биологические эффекты СК, как и характер ответа организма на его экзогенное введение, раскрыты недостаточно. Имеющиеся сведения получены преимущественно в клинических условиях (Заворотная Р.М., 2002; Самосюк И.З., Фисенко Л.И., 2007; Kumar P. et al., 2014), что не позволяет судить о молекулярно-клеточных механизмах, активируемых рассматриваемым соединением. Следовательно, необходимы углубленные исследования биологического ответа на действие экзогенного СК в норме и при патологии, что позволит более четко отобразить его саногенетический потенциал.

Цель исследования: комплексная оценка биологических эффектов синглетного кислорода.

Задачи работы:

1. Исследовать характер влияния синглетного кислорода на метаболические, электрокинетические и кристаллогенные свойства крови в условиях in vitro.

2. Раскрыть особенности метаболических сдвигов крови и тканей при ингаляционном применении газового потока, исходно содержащего синглетный кислород.

3. Уточнить характер влияния ингаляций синглетного кислорода на состояние системной гемодинамики крыс

4. Изучить особенности действия газового потока от генератора синглетного кислорода на параметры микроциркуляции здоровых животных.

Научная новизна. Впервые комплексно, с использованием различных биологических моделей, установлены функционально-метаболические эффекты синглетного кислорода. Показано, что в условиях in vitro (на образцах крови) и in vivo (у здоровых крыс) эффекты газового потока от генератора синглетного кислорода в первую очередь обусловлены антиоксидантным действием и стимулирующим влиянием на энергетический обмен клеток и тканей.

В условиях in vitro особенностью действия на образцы крови газового потока, исходно содержащего синглетный кислород, служит антиоксидантный эффект, влияние на промежуточное звено энергетического метаболизма, стимуляция ферментных детоксикационных систем, стабилизирующий эффект в отношении мембран эритроцитов и прокристаллогенная активность.

Ингаляции газового потока, продуцируемого аппаратом для генерации синглетного кислорода, оптимизируют состояние окислительного и энергетического метаболизма крови и тканей, нормализации активности ферментных детоксикационных систем, стимуляции кристаллогенных

свойств сыворотки крови и электрокинетической активности эритроцитов крыс.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы позволяют получить представление о характере функционально-метаболического ответа организма на ингаляционное применение газового потока, продуцируемого аппаратом для генерации синглетного кислорода. Эта информация имеет существенное значение для разработки инновационных лечебных технологий, основанных на синглетно-кислородной терапии, которые могут быть применены при широком спектре заболеваний и патологических состояний, сопровождающихся тканевой гипоксией, окислительным стрессом и энергодефицитом.

Методология и методы исследования. Исследование имело двухэтапную структуру. На первом этапе изучали особенности действия газового потока от генератора синглетного кислорода на параметры крови in vitro. Для этого оценивали метаболические показатели крови (активность лактатдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы, супероксиддисмутазы, уровень лактата, малонового диальдегида, интенсивность перекисного окисления липидов, общая антиоксидантная активность, перекисная резистентность эритроцитов), ее кристаллогенную активность и электрокинетический потенциал эритроцитов при воздействии синглетного и триплетного кислорода и озона. На втором этапе работы сопоставляли влияние ингаляций синглетного кислорода (при 50 и 100 %) и озона на указанные выше параметры, а также состояние системной гемодинамики и микроциркуляции.

Положения, выносимые на защиту:

1. Синглетный кислород оказывает модулирующее действие в отношении биологических систем.

2. В условиях in vitro синглетный кислород дозозависимо стимулирует антиоксидантный потенциал крови, ее энергетический потенциал, повышает

электрофоретическую подвижность эритроцитов и кристаллогенную активность плазмы.

3. Основные биологические эффекты синглетного кислорода при ингаляционном применении модифицируют функционально-метаболический статус организма крыс, повышая его адаптационный потенциал.

Соответствие диссертации Паспорту научной специальности. Представленная диссертационная работа соответствует Паспорту специальности 03.03.01 – физиология и 03.01.04 - биохимия. Работа посвящена изучению биологических эффектов газового потока от генератора синглетного кислорода в условиях in vitro и in vivo. Результаты научного исследования соответствуют пунктам 1, 2 и 6 Паспорта специальности 03.03.01 – физиология и пунктам 5, 9, 10, 12, 14 и 15 Паспорта специальности 03.01.04 – биохимия.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на IX Всеросс. научно-практ. конф. с междунар. участием «Озон, активные формы кислорода, оксид азота и высокоинтенсивные физические факторы в биологии и медицине» (Нижний Новгород, 2013), XXII Съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Волгоград, 2013), восьмой Национ. научно-практ. конф. с междунар. участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 2014), Междунар. симпозиуме “Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology” (Kazan, 2014), Всеросс. научн. конф. «Механизмы устойчивости и адаптации биологических систем к природным и техногенным факторам» (Киров, 2015), X Всеросс. научно-практ. конф. с междунар. участием «Озон, активные формы кислорода, оксид азота и высокоинтенсивные физические факторы в биологии и медицине» (Нижний Новгород, 2016), IX Междунар. научн. конф. «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация и материалы будущего» (Иваново, 2016), X междунар. научн. конф. «Системный анализ в медицине (САМ-2016)» (Благовещенск, 2016), Первом российском

кристаллографическом конгрессе «От конвергенции наук к природоподным технологиям» (Москва, 2016), XII Междунар. Пироговской научной медицинской конф. студентов и молодых ученых (Москва, 2017), Междунар. конф. «Термические поражения и их последствия» (Москва, 2017).

Материалы диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедр Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, Кировского государственного медицинского университета, Вятской государственной сельскохозяйственной академии и Нижегородской государственной сельскохозяйственной академии.

Публикация результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 52 научных работы, в том числе 2 монографии, 31 статья в журналах, рекомендованных ВАК РФ (12 из них – в изданиях, индексируемых международными базами цитирования).

Объем и структура диссертации. Текст диссертации изложен на 167 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований, заключения и списка литературы. Список литературы включает 167 источников, в том числе 84 - отечественных и 83 - зарубежных авторов. Диссертация содержит 4 таблицы и 53 рисунка.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Активные формы кислорода и их роль в функционировании биосистем. Окислительный метаболизм и оксидативный стресс.

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. Данная совокупность реакций непосредственно определяется текущим уровнем и взаимопревращением различных биорадикалов, прежде всего активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА). Указанные биорадикалы, вступая во многочисленные взаимодействия друг с другом, способны оказывать как позитивное, так и негативное действие. Характер последнего, которое может провоцировать формирование окислительного повреждения биомолекул, 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 (Скворцов В.В., 2005). При этом при целом ряде заболеваний данная тенденция сопровождается быстрым расходованием резервов антиоксидантной системы.

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

Следует отметить, что нарушение физиологического уровня (интенсивности и скорости) реакций, относящихся к перекисному окислению липидов, служит одной из основных причин клеточной дисфункции.

Таблица 1 - Классификация биорадикалов, их источники и инициируемые реакции

Биорадикал	*Источник генерации*	*Инициируемые реакции*
Первичные радикалы		
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)
Вторичные радикалы		
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

В норме в указанные процессы вступают присутствующие в биологических мембранах и включенные в липопротеины полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК). Действие относительно

высоких концентраций активными формами кислорода или азота обеспечивает синтез гидрофобных радикалов, способных к реакциям между собой.

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:

$$LH + HO^* \rightarrow H_2O + L^*.$$

В дальнейшем данный липидный радикал способен взаимодействовать с O_2, что приводит к формироваию липопероксид-радикала, который атакует другие молекулы ПЖК, инициируя в условиях in vivo цепную реакцию по механизму:

$$L^* + O_2 \rightarrow LO_2^*$$

$$LO_2^* + LH \rightarrow LOOH + L^*.$$

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:

$$LOOH + Fe^{2+} \rightarrow Fe(III) + OH- + LO^*$$

$$LO^* + LH \rightarrow LOH + L^*.$$

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. Общим механизмом, интегрирующих указанные процессы служит формирование межмолекулярных «сшивок» с участием альдегидных функциональных

групп биомолекул. Подобные нарушения химического состава соединений приводят к невозможности выполнения ими биологической роли.

Гипероксидация мембранных липидов угрожает стабильности мебранных структур в целом, отражаясь и на состоянии мембраносвязанных протеинов, в том числе белков с каталитической активностью. Это, в частности, может провоцировать ингибирование таких энзимов, как глюкозо-6-фосфатаза и Na/K-АТФаза, непосредственно обеспечивающих гомеостазирование уровня ионов в клетке. Кроме того, индуированное биорадикалами повреждение мембранных структур приводит к нарушению процессов возбуждения в них, дизрегуляции функцирования ионных каналов, снижает их роль в обеспечении энергопродукции. Дополнительно инициируется комплекс изменений деятельности митохондрий, включающий как сдвиги каталитических свойств матриксных энзимов, так и модификация работы электронотранспортной цепи. На тканевом уровне это проявляется в форме воспалительной реакции, нейродегенеративных изменений и т. д.

Отдельно необходимо подчеркнуть, что повреждающее действие биорадикалов обеспечивается не только различными активными формами кислорода, но и пероксинитритом (продуктом их взаимодействия с оксидом азота), стимулирующим липопероксидацию в биомембранах и сывороточных липопротеинах, детерминируя повышение атерогенного риска.

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. Так, одним из наиболее распространенных методов служит исследование уровня стабильного терминального продукта липопероксидации - малонового диальдегида (МДА). В то же время на концентрацию данного метаболита оказывает влияние и выраженность оксидации отдельных нуклеотидов и аминокислот.

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

В физиологических условиях совокупность антиоксидантных систем позволяет минимизировать и гомеостазировать клеточную концентрацию активных форм кислорода, однако при развитии и прогрессировании окислительного стресса ее резервы снижаются за счет двух основных причин. 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, редуцируя ее резервы.

В динамике формирования окислительного стресса имеют место окислительные трансформации нуклеиновых кислот, липидных и протеиновых макромолекул. 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.

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.

В спектр основных АФК включают супероксид-анион ($O_2^{\cdot -}$), синглетный кислород ($^1O_2$), перекись водорода (H_2O_2) и гидроксильный

радикал (OH') и др. Известно, что в организме животных и человека наибольшее значение как прооксиданту принадлежит супероксид-аниону, синтезирующемуся в процессе одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода. 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 биомакромолекул организма.

Принципиально по законам химии возможно одноэлектронное восстановление кислорода за счет окисления веществ с редокс-потенциалом ниже или равным -0,15 В. 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.

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

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. Постоянно ведутся изыскания в области расшифровки функционального значения гена c-src как

основы для поиска рецептора к АФК, однако результаты данных исследований не дают однозначной информации по указанному вопросу.

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. 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 (табл. 2). К наиболее подверженным окислительной модификации белкам принято относить протеины, насыщенные SH-группами (например, дегидрогеназы, АТФазы).

Следует подчеркнуть, что до настоящего времени анализ окислительной модификации протеинов оставался на уровне экспериментально-теоретического осмысления проблемы. Многими авторами в его рамках данная совокупность реакций рассматривалась с позиций ингибирования каталитической активности энзимов, а также нарушения структуры белков при действии сильных оксидантов.

Интересно, что в организме принципиально возможна аутостимуляция свободнорадикальных процессов, связанная именно с окислительной модификацией протеинов. В частности, известна физиологически протекающая реакция, катализируемая ксантиндегидрогеназой и реализующаяся путем трансформации ксантина и гипоксантина в мочевую кислоту – один из биоантиоксидантов неферментного ряда. В условиях окислительного стресса под влиянием активных форм кислорода имеет месть 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.

Таблица 2 - Особенности окислительной модификации протеинов

Модифицируемая аминокислота или группа	**Биорадикал**	**Продукты модификации**	**Особенности модификации**
Цистеин	Гидроксильный радикал, гипо-хлорит-анион	сульфоновые, дисульфидные связи	S-S-связи
Метионин	OH^-, OCl^-, H_2O_2, O^-_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 фосфорилироваия тирозина
Терминальные аминогруппы протеинов	Гипохлорит-анион	образование белковых карбонилов	легко образуют поперечные сшивки

Иной механизм окислительной модификации белков обусловлен влиянием свободных радикалов на протеины, содержащие металлы с переменной валентностью. В этом случае при развитии окислительного стресса происходит пероксид-индуцированный синтез гидроксильного радикала, в свою очередь реагирующего с аминокислотами активного центра энизма, 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 фукнционирование цикла Кребса и нарушения электронотранспортной цепи.

Окислительной модификации также подвергаются карбоксильные группы протеинов, преобразующиеся под влиянием биорадикалов в карбонильные с дальнейшим реагированием с аминогруппами. Эта совокупность процессов инициирует образование оснований Шиффа и, следовательно, формированию многочисленных поперечных сшивок белковых макромолекул с изменением их активности. Кроме вышеперечисленного, аналогичные процессы (прежде всего, химическое сшивание) при прогрессировании оксидативного стресса имеют место в результате гликирования протеинов.

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

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 деградации 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.

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.

1.2. Структура и функционирование антиоксидантной системы организма

Для адекватного функционирования организма в условиях постоянно протекающих процессов липопероксидации необходимым является поддержание на физиологическом уровне активно функционирующей системы антиоксидантной защиты для своевременной нейтрализации негативного воздействия повреждающих эффектов (рис. 1). Данная система обладает детоксикационным эффектом, связанным с безопасным выведением продуктов ПОЛ из организма.

Помимо естественных, существуют и экзогенные (искусственные) антиоксиданты, к которым, в свою очередь, следует причислить и синтетические соединения-антиоксиданты. Имея в своем составе подвижный атом водорода (вследствие наличия C-H и S-H связей), данные соединения легко вступают в реакцию с радикалами, металлами переменной валентности и продуктами свободнорадикального окисления, в результате чего

образуются нетоксичные антиоксидантные радикалы и металлокомплексы. Рассмотренный путь характерен для антиоксидантов, обрывающих цепь реакций липопероксидации. Однако выделяют антиоксиданты пролонгированного действия, которые напрямую не обрывают, а лишь замедляют протекание процессов ПОЛ. Существуют группа антиоксидантов, способная к захвату и обезвреживанию свободных радикалов еще до начала процесса липопероксидации. В целом, система антиоксидантной защиты является неспецифичной, и ее функционирование направлено на деградацию любых индукторов свободнорадикального окисления.

При накоплении в организме продуктов липопероксидации, появление которых обусловлено чрезмерной интенсификацией процессов перекисного окисления липидов, происходят следующие структурные и функциональные перестройки:

- изменение структуры мембранных липопротеинов, уменьшение прочности и увеличение порозности мембран
- нарушение функционирования и деградация митохондриального компонента
- снижение эффективности работы компонентов дыхательной и электронно-транспортной цепи
- окисление SH-групп мембраносвязанных ферментов
- уменьшение интенсивности синтеза соединений-макроэргов
- дестабилизация ионных каналов с нарушением их функционирования, и, как следствием, изменение электролитного баланса
- нарушение белкового синтеза
- образование разрывов в лизосомальной оболочке с высвобождением высокореактивных гидролаз
- интенсификация процессов гемолиза, дестабилизация эритроцитарных мембран с нарушением дыхательных процессов
- загрязнение клеток промежуточными токсическими продуктами липопероксидации (лактата, мочевины, кетокислот) с нарастанием гипоксии

Структура антиоксидантной системы:

1. Ферментативные ловушки свободных радикалов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза)

2. Гидрофильные перехватчики (GSH, аскорбиновая кислота, соли мочевой кислоты, тиольные соединения)

3. Липофильные скавенджеры (билирубин, витамины А и Е, убихинон)

4. Энзимы, восстанавливающие окисленные антиоксиданты (ГР)

5. Ферменты-катализаторы восстановление эквивалентов (НАДН, ФАДН) и поддержание их концентрации на физиологическом уровне

6. Протеины – антиоксиданты (альбумины, трансферрин, ферритин).

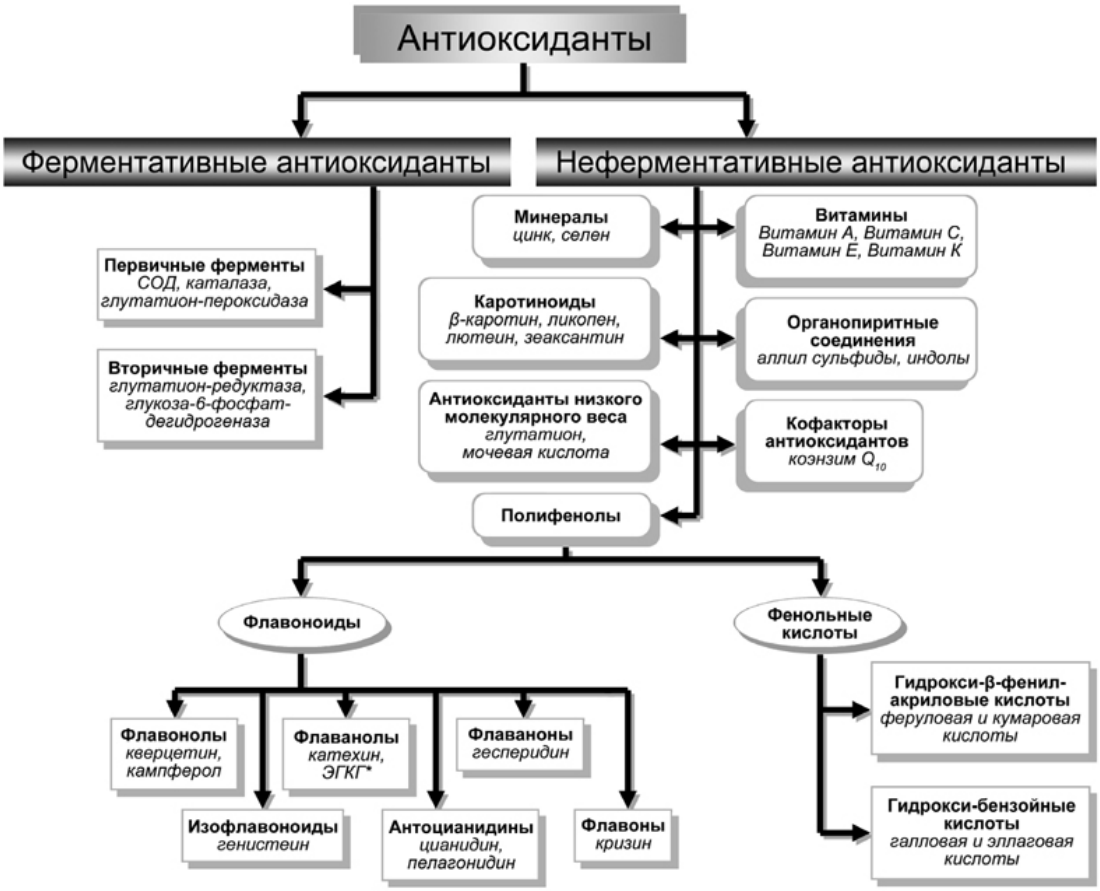

Рисунок 1 - Структура антиоксидантной системы

Ферментативное звено АОС. Принципиальное значение имеют биохимические механизмы поддержания нормального уровня обмена перекиси водорода, которая из-за своей токсичности не должна

накапливаться в клетках. Первоочередную роль здесь выполняют энзимы, выборочно катализирующие разрушение ее молекул – каталазы и пероксидазы, восстанавливающие H_2O_2 до двух молекул воды. Если ферментная защита обеспечивается каталазой, то донором электронов служит сама H_2O_2, а если функционируют пероксидазы, то для этого используются другие восстановители. Каталазы и пероксидазы объединяет одна общность структуры – они включают простетическую группу, содержащую атомы железа и близкую по своему строению к геминовой части молекулы гемоглобина. Эти атомы железа обладают парамагнитными свойствами, что позволяет оценивать каталитические свойства названных ферментов методом ЭПР. Например, в присутствии каталазы разложение H_2O_2 может осуществляться посредством двух реакций:

1. $E–Fe^{2+}–OH^- + H_2O_2 \rightarrow E–Fe^{3+}–OOH^- + H_2O$

2. $E–Fe^{3+}–OOH^- + H_2O_2 \rightarrow E–Fe^{2+}–OH^- + O_2 + H_2O$

Восстановленная каталаза — Окисленная каталаза

Содержание каталазы у человека особенно велико в эритроцитах, высокий уровень отмечен в печени, почках, в то время как ее очень мало в мозге, щитовидной железе, половых железах. Вероятно, это зависит от того, насколько те или иные клетки подвержены вредному влиянию избытка перекиси водорода. А в тех органах, в которых H_2O_2 выполняет полезную роль (например, в щитовидной железе, где H_2O_2 участвует в биосинтезе гормона), каталаза совсем отсутствует. Каталитические свойства пероксидазы проявляются даже при очень низких концентрациях H_2O_2 (Барабой В.А., 2006).

Каталаза – пероксисомный фермент, катализирующий нейтрализацию перекиси водорода до молекулярного кислорода и воды. Совместно с глутатионпероксидазой и супероксидцисмутазой каталаза защищает клетки от окислительного стресса, вызванного накоплением гидроперекисей. Считается, что каталаза имеет низкое сродство к перекиси

водорода, что является причиной ее низкой активности в цитозоле клетки. Однако, в пероксисомах, концентрация перекиси водорода гораздо выше, что приводит к быстрому протеканию реакции деактивации. Субстратами в пероксидазной реакции могут быть формальдегид, метанол, формиат, этанол или иные доноры атома водорода. Предполагается, что индукция активности каталазы является первым звеном ответной реакции клеток на окислительные стимулы внешней среды.

Каталаза широко экспрессируется в различных органах и тканях, но в наибольшей концентрации фермент определяется в эритроидных клетках, в эндотелиоцитах и дендритных клетках, в меньшей степени – в миелоидных клетках, моноцитах и лимфоцитах. Максимальная тканевая локализация каталазы сосредоточена в печени (до 60 % общей активности каталазы); высокий уровень фермента отмечается в почках, лейкоцитах и эритроцитах. Энзиматическая активность каталазы в нервных тканях, в частности, в мозге составляет лишь несколько процентов от ее уровня в печени (Зенков Н.К. с соавт., 2001).

Фермент является хромопротеидом с молекулярной массой около 240000, состоит из 4 субъединиц. Локализуется в основном в пероксисомах, частично – в микросомах и в меньшей степени – в цитозоле. Ген CAT расположен на 11p13. В гене CAT наиболее частыми являются полиморфизмы: – 21 A/T и – 262C/T. Обнаружена ассоциация гипертонической болезни с полиморфизмом – 262C/T. Полиморфные варианты гена CAT также ассоциированы с риском развития ИБС, острым панкреатитом и остеопорозом.

Каталаза обычно длительно сохраняет свою активность, почти не требует энергии активации для своей деятельности, поэтому скорость действия этого фермента лимитирована лишь скоростью диффузии субстрата к активному центру. Установлено повышение активности каталазы (до 17 раз) при гепатитах, лизисе эритроцитов, панкреатитах, и снижение – при хронических легочных заболеваниях, ревматоидном артрите и лейкозах.

Активность каталазы обычно снижается при гипоксии (вероятно, компенсаторно), что наблюдается при хронических заболеваниях легких, в то же время, острая пневмония сопровождается повышением активности фермента. Активность каталазы эритроцитов снижается при лейкозах, ревматоидном артрите и болезни Шонлейн-Геноха; в моче активность каталазы повышена при гематурии, бактерии и лейкоцитурии, в кале – при дизентерии и острых энтеритах; повышение активности каталазы в ликворе указывает на явления деструкции ткани мозга (Величковский Б.Т., 2001; Костюк В.А., Потапович А.И., 2004).

Пероксидаза представляет собой двухкомпонентный фермент, в котором гемин, представлен протопорфирином IX в комплексе с трехвалентным железом и полипептидной цепью. Полипептидный участок состоит из 203 до 308 аминокислот, и в зависимости от типа изорфермента, и компонуется в небольшую третичную структуру, состоящую из двух доменов - большого и малого. Диаметр белковой глобулы фермента равен 50 А и содержит около 43% α-спиральных участков.

Пероксидаза способна катализировать реакцию оксидазного, пероксидазного и оксигенного окисления субстратов. Фермент не имеет изначальной избирательностью в реакциях пероксидазного окисления, однако подобная избирательность появляется, когда ферменты работают в группе совместного окисления.

Супероксиддисмутаза (СОД) является одним из наиболее значимых ферментов в антиоксидантной системе организма человека. СОД катализирует реакцию дисмутации супероксиданионрадикала с образованием молекулярного кислорода и пероксида водорода.

$$2O^{2-} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Существует ряд изоэнзимных форм СОД, которые отличаются по строению активного центра. У эукариотических организмов Cu-, Zn-содержащая СОД находится в цитоплазме, цитозоле эритроцитов, ядре нервных клеток, межмембранном пространстве митохондрий. Фермент

проявляет чувствительность к цианиду, с точки зрения химической природы – металлопротеиду с молекулярной массой 32000-33000, состоящий из двух субъединиц, каждая из которых связывает по одному атому Cu и Zn.

Mn-СОД находится в митохондриях миокарда и печени эукариотов, около анионных каналов. Микробам свойственен железосодержащий и марганецсодержащий изоферменты. Mn-СОД включает четыре субъединицы, с молекулярной массой 20 000 каждая, механизм действия энзима, схож с работой Cu-, Zn-СОД. Металл, находящийся в активном центре фермента, может изменять валентность: Mn^{3+}, Mn^{2+} (Барабой В.А., 2006).

Супероксиддисмутазную активность могут демонстрировать комплексы меди с пептидами и аминокислотами и медьсодержащие белки.

Изоферментные формы СОД представляют собой внутриклеточные ферменты, в межклеточной жидкости (плазма крови, лимфа, синовиальная жидкость) дезактивируются в течение 5-10 минут. Существующая экстрацеллюлярная высокомолекулярная форма СОД (молекулярная масса 120000 Д), связываясь гепаринсульфатом гликокаликса, местно защищает эндотелиоциты от свободных радикалов. Экстрацеллюлярная СОД не формирует комплексы с эритроцитами и лейкоцитами, не регулирует продукцию гранулоцитами активных форм кислорода. Эта разновидность фермента обеспечивает локальную защиту эндотелиоцитов от повреждения активными радикалами кислорода (Казимирко В.К. с соавт., 2004; Улащик В.С., 2007).

СОД катализирует дисмутации супероксид анион-радикала. Но, невзирая на выраженную специфичность фермента, при конкретных условиях Cu-СОД вступает в реакцию с перексидом водорода и выполняет роль прооксиданта.

На одно из важнейших значений СОД в качестве антирадикального защитного фермента указывает схема метаболизма супероксидного радикала в норме и патологии (Журавлев А.И., 1993; Ланкин В.З. с соавт., 2001; Меньщикова Е.Б. с соавт., 2008).

Видоизменения супероксидного радикала могут проходить разными путями (рис. 2). При нормальном функционировании (на рисунке 2 процесс выделен пунктирной рамкой) перекись водорода (2), образующаяся из супероксида под влиянием СОД, используется для синтеза гипохлорита (3), или разлагается под влиянием защитных ферментов: глутатион-пероксидазы и каталазы (4). При малой активности супероксиддисмутазы существуют альтернативные (нежелательные) реакции супероксида. Супероксид, взаимодействуя с окисью азота, образует достаточно токсическое соединение – пероксинитрит (5), который может нарушать целостность клетки эндотелия, смещая нормальную регуляцию кровяного давления.

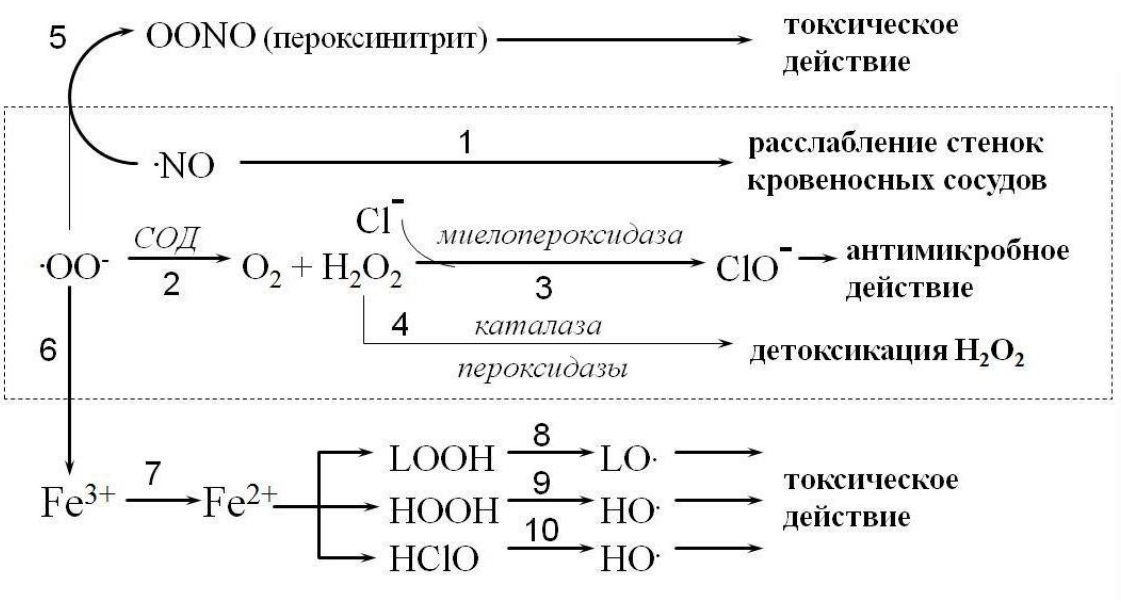

Рисунок 2 - Схема метаболизма супероксидного радикала

Восстановленное супероксидом в присутствии ионов негемового с трехвалентного до двухвалентного железо достаточно токсично, в связи со способностью катализировать разложение перекиси липидов, перекиси водорода и гипохлорита, в результате чего, образуются активные вторичные радикалы липидов и гидроксил.

Обнаружено, что содержание в среде большого количества перекиси водорода может способствовать инактивации СОД. Известно, что степень активности внутриклеточных ферментативных антиоксидантных систем

генетически определена. Депрессия участков генома, ответственных за активность внутриклеточных ферментов антиоксидантной системы может наблюдаться вследствие чрезмерного содержания перекиси водорода или супероксидного анион-радикала внутри клеток. Ген, кодирующий синтез фермента СОД, у человека локализован в 21-й хромосоме. Действенность СОД не угнетается при условии сохранности активности каталазы.

Известно, что СОД может инактивироваться в очагах патологии. В ряде работ показано, что Cu-Mn-СОД успешно инактивируется при достаточно небольшом снижении pH (до pH 5.9-6.0) [Ланкин В.З. с соавт., 2001; Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В., 2009]. Было обнаружено явление фотореактивации фермента под воздействием лазерного облучения. Научные эксперименты с использованием методов ЭПР и спектрофотометрии на СОД и медные комплексы гистидина позволили обосновать схему действия света и низких pH на СОД.

Фермент инактивируется при разрыве связи азота в имидазольном кольце с ионом цинка. При этом протонирование гистидина 61, являющегося компонентом активного центра фермента, происходит при минимальном значении pH. Освещение или повышение pH приводят к восстановлению ферментативной активности за счет депротонирования гистидинового остатка. Вероятно, вопросы инактивация фермента могут внести значительный вклад в зарекомендованное терапевтическое действие лазерного облучения ран и крови.

К *антиоксидантам неферментной природы* относят низкомолекулярные вещества, высокореактивные по отношению к активным формам кислорода и свободным радикалам. Данные соединения целесообразно подразделить на гидрофильные (глутатион, аскорбиновая кислота, эрготионеин, цистеин) и гидрофобные (каротиноиды, витамин А и Е, витамин К, убихинон). Основой действия низкомолекулярных антиоксидантов является их протективная функция для мембранных компонентов, протеинов, полисахаридов и нуклеиновых кислот при интенсификации липопероксидативных процессов.

При нарастании явлений окислительного стресса низкомолекулярные антиоксиданты могут явиться более значимыми, чем антиоксидантные ферменты, поскольку в этом случае протекторная функция выходит на первый план по сравнению с детоксикационной, характерной для энзимов-антиоксидантов, по причине того, что физиологический лимит антиокислительных ферментов быстро истощается под действием продуктов реакций ПОЛ, а на синтез новых молекул ферментов необходимо достаточно продолжительное время.

Глутатионовая антиоксидантная система. Важное место в защите от действия свободных радикалов (СР) принадлежит глутатионовой антиоксидантной системе, в которую входят три глутатионзависимых фермента: глутатионпероксидаза (ГПО), глутатионредуктаза (ГР) и глутатионтрансфераза (ГТ) [Костюк В.А., Потапович А.И., 2004; Барабой В.А., 2006].

Антиоксидантные свойства восстановленного глутатиона (GSH) определяются непосредственным взаимодействием его со СР и гидропероксидами. Этот тиол может также служить субстратом для ферментов, участвующих в детоксикации активных форм кислорода (АФК). Реакция восстановления окисленного глутатиона (GSSG) до глютатиона (GSH) катализируется ГР, использующей НАДФН как источник восстановленных эквивалентов. ГР функционирует вместе с ГП, катализирующей разложение гидроперекисей без образования СР, используя в качестве донора водорода GSH (Саакян И.Р. с соат, 1998; Кдаков К.В. с соавт., 1999).

Хиноны. Максимальной устойчивостью для данного класса соединений является их хинонная форма, в то время как в форме гидрохинона вещество крайне нестабильно и легко окисляется кислородом, находящимся в воздухе. В состав клеток убихинон обычно входит в виде восстановленного соединения. Убихроменол (цикл) является более стабильным соединением, в связи с чем не может принимать участие в работе дыхательной цепи. Именно

циклическая форма убихинона выступает в виде антиоксиданта в сложных липидах. Присутствие в составе соединения изопреновых звеньев с разной степенью насыщенности обуславливает их повышенную реакционную способность по отношению к алкильным пероксирадикалам. По данным Е.Б. Бурлаковой с соавт. (1985), убихроменолы и убихиноны обладают многократно (в 10 раз) меньшей активностью, чем витамин Е, в то же время в связи с наличием подвижных ОН-групп они высоко реакционноспособны по отношению к пероксирадикалам и алкильным группа липидов, оказывая существенное влияние на торможение реакций липопероксидации и скорость обрыва цепи. Образование семихинонов в клетках обусловлено связыванием хинонами супероксид-анион радикала, являющегося инициатором цепи перекисного окисления липидов.

Витамин А и его предшественники – каротиноиды - являются полиненасыщенными соединениями, для которых характерно чередование простых и сопряженных двойных связей. Наиболее распространенными природными формами витамина А, которые содержатся только в тканях животных организмов, являются ретинол (витамин A_1) и ретинолпальмитат. Ретинол ($C_{20}H_{30}O$) представляет собой циклический ненасыщенный одноатомный спирт с пятью двойными связями в молекуле и одним β-иононовым кольцом. Боковая цепь состоит из 9 атомов углерода с 4 сопряженными двойными связями. Ее можно рассматривать как два остатка изопрена со спиртовой группой. К природным формам витамина А относятся также ретиналь (ретинальдегид) и ретиноевая кислота, которые образуются в результате окисления спиртовой группы ретинола.

Каротиноиды и витамин A_1, будучи высоконепредельными соединениями, легко подвергаются окислению. Поэтому вполне правомерно, что под влиянием атмосферного кислорода и других окислителей возникают перекисные продукты их окисления.

Антиоксиданты участвуют в реакциях превращения различных форм витамина А. Так, они ингибируют расщепление β-каротина по

периферическим двойным связям и тем увеличивают количество его молекул, расщепляющихся по центру. Это приводит к возрастанию эффективности биосинтеза витамина А в кишечнике. Кроме того, противоокислительные вещества понижают активность ферментов, окисляющих ретиналь в ретиноевую кислоту, что увеличивает продолжительность биологического действия витамина А.

Следует оценить также роль витамина А в обмене сероорганических соединений. Оказалось, что он необходим для образования активного сульфата, который используется в синтезе ряда серосодержащих биомолекул (гепарина, сульфацереброзидов и др.), а также для связывания и обезвреживания некоторых эндогенных веществ и ксенобиотиков.

Витамин Е. В настоящее время под общим названием витамин Е объединена группа токоферолов – маслянистых веществ, хорошо растворимых в жирах и органических растворителях, но не растворимых в воде. Они медленно окисляются кислородом воздуха, чувствительны к ультрафиолетовому свету. Токоферолы широко распространены и содержатся в тканях растений и животных, однако у последних не синтезируются. Основой структуры является углеродное соединение под названием токол, который включает двухциклическое ядро хромана (бензодегидропирана) и изопреновую углеводородную боковую цепь, состоящую из 16 атомов углерода. Очень специфично для токоферолов присутствие одной гидроксильной и одной-трех метильных групп, соединенных с углеродными атомами хромана. выделяют 8 типов токоферолов (α, β, γ и др.) различающихся по расположению и количеству метильных групп, из которых α-токоферол (5,7,8 – три-метил-токол) демонстрирует самую большую биологическую активность.

Имеется большое число доказательств стабилизирующего действия витамина Е на мембранные структуры, в которых выражены процессы перекисного окисления липидов. Но только восстановленные (фенольные) формы, имеющие свободную гидроксильную группу, рассматриваются как

ингибиторы свободнорадикальных процессов. Их окисление начинается с отрыва от молекулы водорода с образованием феноксильного радикала, что было доказано методом электронного парамагнитного резонанса.

При накоплении перекисей в биологических системах снижается уровень токоферола вплоть до его полного исчезновения. Особенно активно уменьшают содержание витамина Е в клетках жиры, богатые полиненасыщенными жирными кислотами. И если уровень линолевой кислоты в рационе животных превышает 2%, то начинает обостряться Е-витаминная недостаточность. Когда же этот показатель превышает 7%, то у животных нарушается функция оплодотворения и происходят другие нежелательные сдвиги, а дополнительное введение препаратов витамина Е в организм предупреждает эти явления. Противоокислительная роль токоферола сказывается на всех уровнях биологической организации – от субклеточных частиц и мембранных образований до организма в целом. На митохондриальные реакции окислительного фосфорилирования влияет концентрация липидных перекисей, таким образом, противоокислительное значение токоферола еще более возрастает. Многократно было показано корригирующее действие токоферола на нарушенные вследствие липопероксидации окислительно-восстановительные процессы в клетках.

Витамин С один из важнейших компонентов биологической антиоксидантной системы, который тесно взаимосвязан с глутатионовой системой и токоферолом. Так, превращение аскорбиновой кислоты (АК) и глутатиона (G–SH) обеспечивает поток атомов водорода от восстановленных пиридиннуклеотидов (НАДФ*Н и НАД*Н) через токоферол (ТФ) на «гашение» свободных радикалов липидов. При этом АК служит донором водорода для фермента АК-пероксидазы, разрушающей перекиси.

Необходимо отметить важную роль витамина С в биотрансформации (особенно в микросомальном окислении) ряда эндогенных и чужеродных веществ в организме человека, что связано с функционированием цикла цитохрома Р-450.

В настоящее время бесспорным является стимулирующее действие витамина С на активность цитохромного цикла и вообще на процессы гидроксилирования. Двоякое действие витамина С может быть привлечено и к объяснению его парадоксального эффекта на фагоцитоз. Установлено, что степень обеспеченности организма витамином С оказывает влияние на процессы фагоцитоза – важного компонента неспецифического иммунитета.

Билирубин. Желчный пигмент билирубин (БР) образуется в организме главным образом при деструкции гемоглобина, выходящего в плазму крови из разрушающихся эритроцитов. В отличие от белка и «свободного» железа, также являющихся продуктами деструкции гемоглобина, БР не утилизируется организмом и, более того, может оказывать на организм токсическое действие. Поэтому удаление БР из организма является важным физиологическим процессом. Процесс этот, однако, в значительной степени осложнен нерастворимостью БР в водных средах, вследствие чего транспорт БР в организме осуществляется путем связывания БР в водорастворимые комплексы и образования водорастворимых производных. В частности, в кровяном русле БР циркулирует в комплексе с сывороточным альбумином (СА) и при участии клеток печени выводится в желчные протоки в основном в виде сложных эфиров с одной или двумя молекулами глюкуроновой кислоты. При нарушении системы удаления БР из организма может возникнуть патологическое состояние – гипербилирубинемия; это состояние сопровождается отложением БР в колее, вследствие чего кожа приобретает желтый оттенок.

SH-группа белков. У человека потребность в сере удовлетворяется за счет трех основных аминокислот: цистеина, цистина и метионина, из которых, затем, при их превращении, образуются разнообразные серосодержащие вещества, необходимые для нормального развития и жизнедеятельности организма. Из всех серосодержащих аминокислот наибольшее значение имеет метионин, который относится к числу незаменимых факторов в механизме потовыделения. Важным свойством

метионина выступает его преобразование в цистеин и цистин, которые в свою очередь участвуют в образовании белков, ферментов, гормонов (окситоцин, инсулин и др.), а также являются предшественниками коэнзима А, глутатиона и иных биологически активных сероорганических молекул. Эти соединения, благодаря SH-группам, обеспечивают нормальную работу одного из основных механизмов антиоксидантной защиты.

Почти универсальное распространение имеет глутатион – пептид, состоящий из трех аминокислот: цистеина, глутаминовой кислоты и глицина. Глутатион присутствует в организме как в окисленной (G–SS–G), так и в восстановленной (G–SH) форме и является основным клеточным фондом мобильных сульфгидрильных групп, в то время как его окисленная форма, в виде глутатиондисульфида, составляет только 1-3% от общего количества.

Антиоксидантное действие глутатиона катализируется специальными ферментами, в их числе глутатионпероксидаза (ГП), глутатионредуктаза (ГР), глутатион-S-трансфераза. Первая из них функционирует, главным образом, в цитозоле клетки и участвует в окислении как самого глутатиона, так и перекиси водорода и органических перекисей. Именно ГП, по-видимому, играет основную роль в инактивации липидных гидроперекисей. Любопытно, что молекула ГП содержит атомы селена, антиоксидантные свойства которого мы рассмотрим отдельно. Второй фермент локализован в основном там же и имеет главным назначением поддержание достаточного уровня активного глутатиона посредством восстановления его дисульфидной формы. При этом глутатионредуктаза функционирует при наличии в биофазе доноров водорода. Таким ее субстратом является кофермент НАДФН, с участием которого катализируется восстановление глутатиона. Третий из названных ферментов функционирует в основном в гепатоцитах; он предназначен для детоксикации ряда соединений посредством переноса на них атомов серы с последующим образованием меркаптидов – соединений серы с металлами, меркаптуровых кислот, а также глутатионых производных инородных веществ.

Таким образом, разложение перекиси происходит с одновременным окислением глутатиона. В данной связи надо отметить, что восстановленный глутатион при участии ГП осуществляет защиту эритроцитов от гемолитического распада, происходящего под влиянием перекиси водорода и липидных перекисей. При этом инактивация и разрушение последних обеспечивают стабилизацию мембран эритроцитарных клеток.

Церулоплазмин. Являясь высокомолекулярным протеином, состоящим из одной полипептидной цепи, имеет множество изоформ и участвует в обмене меди и железа (вступает в реакцию практически со 100% меди сыворотки крови). Cu-транспортную функцию белок реализует в результате высокого сродства к мембраносвязанным рецепторам при помощи сиаловых кислот экзоцеллюлярных рецепторов и маннозных остатков молекулы ЦП.

Пул церулоплазмина включает 3 его формы: секретируемые сывороточный и высокомолекулярный и несекретируемый низкомолекулярный церулоплазмин-подобный протеин.

Являясь основным антиоксидантным сывороточным протеином, ЦП обладает исключительной стабильностью по отношению к активным формам кислорода, которая способствует сохранению активности белка и стабильной его генерации даже в условиях окислительного стресса.

Окисляя атомы железа без образования в качестве побочного продукта супероксид-анион радикала, ЦП способствует их связыванию с трансферрином и доставку в печень в качестве компонента синтеза ретикулоцитов. Антиоксидантная активность ЦП также обусловлена его способностью восстанавливать супероксидный радикал до молекул воды стехиометрическим путем. Особенно активно эта функция ЦП проявляется для защиты хиломикронов и липопротеинов. Показано протективное действие церулоплазмина в отношении гипохлорита.

К экзогенным (внеклеточным) антиоксидантам следует отнести металлопротеины. Связанный в составе трансферрина, ферритина и лактоферрина атом железа не катализирует реакции липопероксидации.

Одним из гидрофильных антиоксидантов является также мочевина, образующаяся при обмене пуринов.

Наряду с первичной (протективной) антиоксидантной системой выделяют т.н. «репаративную» систему, которая включается в процесс защиты в условиях произошедшего липопероксидативного повреждения в условиях необходимости восстановления нарушенного липидного обмена. К компонентам репаративной АОС относят липолитические ферменты (фосфолипазы A_1, A_2, C), репаразы, протеиназы, лигазы, нуклеазы. При действии данных ферментов происходит восстановление липид-белкового взаимодействия в клеточной и плазматической мембранах.

1.3. Синглетный кислород как активная форма кислорода и компонент биосистем

Одной из форм АФК является синглетный кислород (СК), который впервые был получен в 1924 г. Первый аппарат синглетно-кислородной терапии «VALKION» («Polyvalк AB», Швеция) появился на рынках медицинской аппаратуры в 1996 г. как альтернативный метод стимуляции антиоксидантной защиты, основанный на синглетно–триплетном дипольном переходе. Физико-химическая концепция синглетно-кислородной терапии базируется на фотохимической сенсибилизации воздуха и воды с созданием в активационной камере медицинского аппарата синглетного кислорода – высоко реактивного вещества с очень коротким периодом полураспада (Шинкаренко Н.В., Алесковский В.Б., 1982; Landry M.P. et al., 2009). Вследствие трансформации СК образуются вторичные долгоживущие физиологически активные синглетно-кислородные факторы, вызывающие цепь биохимических и биофизических реакций внутри клеток (Заворотная Р.М., 2002; Самосюк И.З. с соавт., 2007; Van der Valk T., 2001).

В 1998 году научно-методический центр «Мединтех» (Украина) выполнил разработку, а с 2000 года приступил к серийному производству аппаратов для синглетно-кислородной терапии (Самосюк И.З. с соавт., 2007).

В качестве источника излучения для образования СК в аппарате используется генератор жесткого ультрафиолетового излучения. Для увеличения эффективности образования СК в аппаратах применен принцип двойной магнитной обработки пароводяной смеси. На первом этапе пароводяная смесь проходит турбовихревое омагничивание. На втором этапе активация пароводяной смеси выполняется жестким ультрафиолетовым излучением в магнитном поле. Предложенный принцип обработки пароводяной смеси способствует возникновению спиновой поляризации электронных облаков, энергетической устойчивости и увеличению эффективности терапевтического действия синглетно-кислородной смеси.

Оказалось также, что обработка пароводяной смеси жестким ультрафиолетовым и квазилазерным излучением в магнитном поле ведет к образованию не только СК, но и оксида азота (NO) [Vanin A.F., 2009]. Известно, что оксид азота является универсальным регулятором физиологических и метаболических процессов как в отдельной клетке, так и в организме в целом (Ванин А.Ф., 2000, 2009). Этому мессенджеру, продуцирующемуся в организме эндотелием сосудов придается особое значение в регуляции тонуса сосудов, воспаления и иммунного ответа (Murad F. et al., 1994). Установлено, что данное соединение обладает сосудорасширяющим, иммуномодулирующим и противовоспалительным действием, а также оказывает антиатерогенный эффект (Григорьев А.И., Граник В.Г., 2004).

Физико-химия синглетного кислорода

Синглетный кислород — общее название для двух метастабильных состояний молекулярного кислорода с более высокой энергией, чем в основном, триплетном состоянии (рис. 3).

Энергетическая разница между самой низкой энергией O_2 в синглетном состоянии и наименьшей энергией триплетного состояния составляет около 11400 К или 0,98 эВ и соответствует переходу в близком к ИК-диапазоне (около 1270 нм). В изолированной молекуле переход запрещен по правилам

отбора, поэтому прямое возбуждение кислорода в основном состоянии светом для образования СК крайне маловероятно, хотя и возможно. Как следствие, СК в газовой фазе экстремально долгоживущий (период полураспада состояния при нормальных условиях — 72 минуты) Взаимодействие с растворителями уменьшает время жизни до микросекунд или даже до наносекунд.

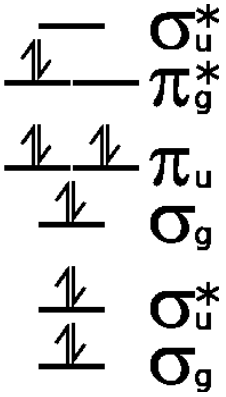

Рисунок 3 - Диаграмма молекулярных орбиталей для синглетного кислорода

Химия СК отличается от химии кислорода в основном состоянии. СК может принимать участие в реакциях Дильса-Альдера. Он может быть сгенерирован в фотовозбуждаемых процессах переноса энергии от окрашенных молекул, таких как метиловый синий или порфирины, при спонтанном разложении триоксида водорода в воде или в реакции пероксида водорода с гипохлоритом. Прямое определение СК возможно по его очень слабой фосфоресценции при 1270 нм, которое не видимо глазом. Однако при высоких концентрациях СК может наблюдаться флюоресценция так называемых димолей синглетного кислорода (одновременная эмиссия двух молекул СК при столкновениях) как красное свечение при 634 нм.

Биологические эффекты синглетного кислорода

В биологии млекопитающих СК рассматривают как одну из особых АФК. В частности, это соединение связывают с окислением холестерина и развитием сердечно-сосудистых заболеваний. Антиоксиданты на основе полифенолов могут снижать концентрацию АФК и предотвращать данные эффекты. Предполагается, что молекулы СК могут оказаться важнейшими

регуляторами клеточной жизнедеятельности, определяющими механизм инициации апоптоза. У большинства живых клеток в темноте основным источником генерации СК служит спонтанная дисмутация супероксидных анионов. Вероятно, любая биологическая система, в которой образуется супероксид-анион радикал, может быть активным источником СК. Однако последний возникает и в темновых ферментативных реакциях в отсутствие супероксид-анион радикала. Фотодинамический эффект обнаружен у всех живых организмов. У прокариот в результате фотодинамического действия индуцируются повреждения многих типов: утрата способности формировать колонии, повреждение ДНК, белков, клеточной мембраны. Причина указанных нарушений - фотоокисление некоторых аминокислот (метионина, гистидина, триптофана и др.), нуклеозидов, липидов, полисахаридов и других клеточных компонентов. Перехватчиками СК являются различные биологически активные соединения: липиды, аминокислоты, нуклеотиды, токоферолы и др.

То парадоксальное обстоятельство, что СК - высокоактивная электрофильная частица - оказывает антиоксидантное действие, можно объяснить инактивацией НАДФН-оксидазы. Следует отметить, что указанный эффект наблюдается лишь в узком диапазоне доз, тогда как высокие дозы цитотоксичны.

Известно, что видимый и ультрафиолетовый свет малой интенсивности вызывает в клетках определенные фотобиологические процессы. Существует определенная связь между действием СК и фотодинамической терапией (ФДТ), предлагаемой для лечения артериосклероза, рестеноза после ангиопластики, а также злокачественных новообразований. При ФДТ происходит образование СК, что отчасти обуславливает ее деструктивное влияние на биосистемы. Конкретные механизмы остаются невыясненными, однако ключевую роль играет образование цитотоксичных оксидантов, в частности, СК.

Молекулярные механизмы действия синглетного кислорода

Мембраноповреждающее действие высоких доз СК как АФК опосредуется следующими механизмами: в случае, когда окислительной деградации подвергается значительная часть мембранных фосфолипидов, липидная фаза мембраны становится более ригидной, что ограничивает конформационную подвижность полипептидной цепи, вследствие чего снижается функциональная активность ферментов, рецепторов и каналообразующих белков, встроенных в мембраны. Этому способствует образование межлипидных, межбелковых и липид-белковых поперечных сшивок за счет взаимодействия со вторичными продуктами перекисного окисления липидов. Подобный ход событий сопровождается подавлением активности Ca^{2+}–АТФазы саркоплазматического ретикулума и приводит к нарушению удаления Ca^{2+} из саркоплазмы. Увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} способствует увеличению темпов его проникновения в клетку из внеклеточной среды. Это связано с тем, что при перекисном окислении липидов в гидрофобной части жирной кислоты появляется гидрофильная перекисная группа. Если в каждом из монослоев мембраны комплексы подобных окисленных фосфолипидов оказываются расположенными друг против друга, то в мембране образуются каналы повышенной проницаемости (кластеры), проходимые, в частности, для катионов Ca^{2+}. Чрезмерное расширение таких кластеров может стать основой фрагментации и разрушения мембран сарколеммы и саркоплазматического ретикулума. Появление в гидрофобной области липидного бислоя мембран гидрофильных перекисных групп делает белковые компоненты более доступными для протеолитических ферментов, что способствует деструкции биомембран. В результате прямого окисления сульфгидрильных групп в активных центрах ферментов (в том числе локализованных в мембранах), происходит инактивация последних и увеличение проницаемости мембран, разрушение соединений, обладающих антиоксидантной активностью (витаминов, стероидов, убихинона).

Низкие дозы синглетного кислорода, напротив, оказывают мембранопротекторное действие, обусловленное увеличением проницаемости мембраны для Ca^{2+} при одновременной активации Ca^{2+}–АТФазы, ответственной за удаление Ca^{2+} из цитоплазмы и расслабление мышц. Показано, что данное изменение активности фермента, способствующее улучшению сократительной функции мышцы, происходит именно за счет накопления гидроперекисей фосфолипидов (прежде всего, первичных молекулярных продуктов ПОЛ).

Кроме того, воздействие низких доз СК может оказывать активирующее действие на циклооксигеназу, играя важную роль в кинетике ферментативного каскада реакций, способствующих образованию простагландинов.

Экспериментально-клиническая оценка эффекта синглетного кислорода

Экспериментальное подтверждение участия СК в процессе перекисного окисления липидов получено рядом авторов. Так, СК вызывает окислительное повреждение белков, например, коллагена эпителия кожи, каталазы, супероксиддисмутазы, а также ДНК в результате модификации гуанилового основания. В то же время показано, что мутагенное действие такого мощного потенциального источника СК, как фотовозбужденный рибофлавин или люмифлавин, связано с супероксид-анион радикалом, но не с синглетным кислородом. СК играет ключевую роль при развитии ряда патологических процессов, таких как катаракта, протопорфирии, синдром ишемии-реперфузии, сахарный диабет и др. Экспериментально доказано его участие в процессах фагоцитоза. В организме СК образуется в неферментативных процессах, протекающих с участием фотосенсибилизаторов, или с помощью ферментов, например, миелопероксидазы. В последнем случае количество соединения, генерируемого фагоцитами, может составлять до 19% от всего поглощенного кислорода.

С учетом того, что кислород является составной частью и обязательным компонентом фотодинамической реакции, существуют две основные теории, объясняющие механизм противоопухолевого действия ФДТ. Первая из них объясняет основное повреждающее действие ФДТ внутриклеточными изменениями вследствие взаимодействия с АФК, основной из которых является СК. М.А. Малковым с соавт. (2008) показано, что один из вариантов ФДТ – применение лазера с копропорфириновым фотосенсибилизатором – в экспериментах на собаках, имеющих опухоли различной локализации, опосредует эффект через образование в тканях СК. Показано, что обработка человеческих моноцитов ЭСК снижает продукцию ими АФК с участием НАДФН-оксидазы. Это может иметь существенное значение для объяснения положительного эффекта ФДТ при рестенозе после ангиопластики.

Таким образом, исследования механизмов действия и образования СК, в том числе продуцируемого при ФДТ, носят поисковый характер, поэтому для обоснования эффективного клинического применения рассматриваемых технологий необходимы дальнейшие изыскания в данной области.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа была выполнена на базе кафедры физиологии и анатомии ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

2.1.1. Общий объем исследования и его этапы

Проведенное исследование было двухэтапным и включало следующие фрагменты:

I этап. Оценка влияния активных форм кислорода на параметры крови in vitro. В данной части исследования (in vitro) проводили сравнительную оценку действия синглетного кислорода, молекулярного кислорода и озоно-кислородной смеси (концентрация озона – 500 мкг/л) на образцы крови здоровых людей (n=50). Стабилизированную цитратом натрия кровь (объем образца - 5 мл), барботировали указанными агентами в газовой фазе в течение 5 минут.

II этап. *Оценка функционального состояния организма здоровых крыс при ингаляционном применении активных форм кислорода*. Эксперимент выполнен на 60 крысах-самцах линии Вистар (масса тела 200-250 г). Было сформировано 4 группы животных равной численности: интактная группа (n=15), включающая животных, которым не выполняли никаких манипуляций; 3 экспериментальные группы (n=15 в каждой), животные из которых получали ингаляции синглетного кислорода (при мощности генератора 50 и 100%) или кислородно-озоновой смеси (концентрация озона – 60 мкг/л). Для проведения ингаляций животных (по одному) помещали в эксикатор, в котором осуществляли подачу и отведение газовых смесей. Курс ингаляций включал 10 сеансов продолжительностью 10 минут каждый, проводимых ежедневно.

Таблица 3 – Объем и этапы выполненных исследований

Изучаемые факторы	**Методы оценки**	**Количество экспериментов / исследований**	**Оцениваемые параметры**
I этап. Оценка влияния активных форм кислорода на параметры крови in vitro			
Кислород, озоно-кислородная смесь ([O_3] = 500 мкг/л), СК при мощности 50 и 100%	Биофизические (Fe-индуцированная биохемилюминес-ценция)	10 / 150	Интенсивность перекисного окисления липидов и антиоксидантная активность плазмы крови, перекисная резистентность эритроцитов
	Биохимические (спектрометрические)	10 / 300	Уровень малонового диальдегида в эритроцитах и плазме, активность лактатде-гидрогеназы в прямой и обратной реакциях, активность супероксиддисмутазы и альдегиддегидрогеназы
	Биохимические	10 / 100	Уровень лактата в плазме и эритроцитах
	Биофизические (микроэлектрофорез)	10 / 50	Электрофоретическая подвижность эритроцитов
	Биофизические (кристаллоскопия)	10 / 50	Индекс структурности, кристаллизуемость, степень деструкции фации, выраженность краевой зоны фаций
II этап. Оценка функционального состояния организма здоровых крыс при ингаляционном применении активных форм кислорода			
Озоно-кислородная смесь ([O_3] = 60 мг/л), СК при мощности 50 и 100%	Биофизические, биохимические (**аналогично I этапу**)	4 группы по 15 крыс линии Вистар / 1560	Аналогично I этапу (в крови и тканях животных)
	Гематологические	4 группы по 15 крыс линии Вистар / 60	Содержание форменных элементов в крови
	Функциональные (лазерная допплеров-ская флуметрия)	4 группы по 15 крыс линии Вистар / 60	Показатель микроциркуляции, показатель шунтирования, ам-плитуды факторов регуляции
	Функциональные (оценка вариабельности сердечного ритма)	4 группы по 15 крыс линии Вистар / 60	Стандартные параметры вариабельности сердечного ритма
ИТОГО		70 экспериментов / 2390 исследований	

Примечание: СК – синглетный кислород

Выведение животных из эксперимента производили путем декапитации под наркозом на следующий день после завершения полного курса ингаляций. Производили забор крови и органов для дальнейшего изучения.

Перед выведением животных у них оценивали состояние микроциркуляции и вариабельность сердечного ритма.

Структура всех проведенных исследований изложена в таблице 3.

2.1.2. Используемые в экспериментах генераторы активных форм кислорода и их режимы работы

Генератор синглетного кислорода «Airnergy Professional plus»

Синглетно-кислородную газовую смесь получали с помощью генератора синглетного кислорода «Airnergy Professional plus» (Германия). Данный прибор имеет два основных режима работы, соответствующие мощности 50 и 100%.

Согласно конструкции прибора, образование синглетного кислорода происходит в процессе прохождения воздушного потока через слой дистиллированной воды, облучаемой одновременно четырьмя источниками ультрафиолетового излучения (суммарное напряжение – 12 В). Скорость потока воздуха – 4 л/мин.

Медицинский озонатор

Кислородно-озоновую смесь генерировали на озонаторе «Медозонс ВМ» (Россия). Для экспериментов использовали концентрации 500 мкг/л (для фрагментов in vitro) и 60 мкг/л (для проведения ингаляций здоровым крысам). Для получения кислородно-озоновой смеси и исследования эффектов кислорода применяли очищенный медицинский кислород.

2.1.3. Методы исследования

2.1.3.1. Исследование свободнорадикальных процессов в биологических объектах на основании изучения их Fe-индуцированной биохемилюминесценции

Биохемилюминометр БХЛ-06 является устройством, предназначенным для анализа кинетических кривых био- и хемилюминесценции: измерения АТФ, ФМН, НАД-Н - зависимых дегидрогеназ (биолюминесценция) и

свободнорадикальных процессов, перекисного окисления липидов (хемилюминесценция). Принцип действия основан на измерении излучения света (биохемилюминесценции), сопровождающем свободнорадикальные и ферментативные процессы в живых организмах.

БХЛ-06 работает в составе комплекса с внешним персональным компьютером, причем биохемилюминометр выполняет функцию выделения светового сигнала, а программное обеспечение производит обработку полученных данных, позволяет наблюдать кинетику процесса, рассчитывать параметры сигнала, документировать данные опыта, накапливать базу данных. Программное обеспечение позволяет измерять и интерпретировать ряд показателей биохемилюминесценции - светосумму, максимальную интенсивность, кинетические константы световой реакции и др.

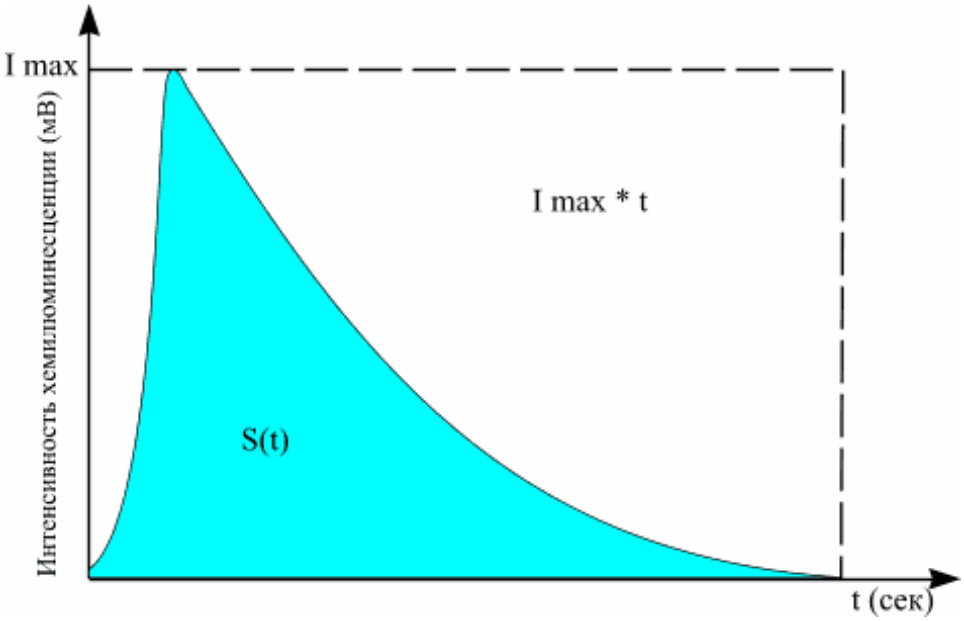

Рисунок 4 - Схематичное изображение кривой биохемилюминесценции

Известные спектрофотометрические методы оценки антиоксидантной активности (АОА) плазмы обладают рядом недостатков, одним из которых является длительная предварительная подготовка пробы для анализа, необходимость дорогостоящей аппаратуры и реагентов. Наиболее простым и объективным является экспресс-метод оценки АОА, основанный на методике регистрации индуцированной хемилюминесценции с помощью

биохемилюминометра. Методика позволяет оценить общую мощность антиоксидантной системы плазмы крови, мочи, слюны, определяемую многими сывороточными белками (альбумином, церулоплазмином, гаптоглобином и др.), среднемолекулярными пептидами, органическими кислотами, ферментами, витаминами и лекарственными соединениями.

Описание метода. Метод индуцирования хемилюминесценции (ХЛ) перекисью водорода с сульфатом железа основан на каталитическом разложении перекиси ионами металлов с переменной валентностью. Образующиеся при этом свободные радикалы выступают инициаторами свободнорадикального окисления (СРО). В результате реакции рекомбинации перекисных радикалов, образуются молекулярные продукты и выделяется квант света, который и определяет наблюдаемую хемилюминесценцию. Процесс СРО вызывает вспышку интенсивности ХЛ, которая в течение 30-60 секунд затухает в результате действия системы антиоксидантов, присутствующих в пробе. На интенсивность процесса ХЛ оказывает влияние комплекс соединений, обладающих и прооксидантым и антиоксидантным действием. Типичная кинетика такого хемилюминесцентного сигнала приведена на рисунке 4.

Для оценки СРО в пробе наиболее значимыми являются параметры, приведенные ниже. Они отражают потенциальную способность биологического объекта к ПОЛ, скорость спада процессов СРО и характеризуют антиоксидантный процесс. В биохемилюминометре БХЛ-06 эти параметры рассчитываются автоматически:

- S-площадь под кривой интенсивности, или полная светосумма (показатель интенсивности процессов СРО в плазме крови или эритроцитах);

- tg2α - тангенс угла максимального наклона кривой к оси времени (показатель уровня антиоксидантной активности биосубстрата – АОА)

- Imax-значение максимальной интенсивности за время опыта, мВ;

2.1.3.2. Биохимические и физико-химические методы исследования

Оценка показателей окислительного метаболизма крови и гомогенатов тканей. Активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали по Т.В. Сироте (1999). Уровень малонового диальдегида (МДА) в плазме крови и эритроцитах определяли по В.Г. Сидоркину, И.А. Чулошниковой (1993) с помощью тест-набора (ЗАО «АГАТ», Россия).

Гомогенаты приготавливали с использованием гомогенизатора IKA Ultra Turrax (Германия).

Оценка параметров энергетического метаболизма эритроцитов и гомогенатов тканей. В качестве маркера интенсивности энергетического метаболизма эритроцитов и гомогенатов тканей использовали активность ЛДГ, а о его направленности судили по соотношению последней в прямой (ЛДГпр) и обратной (ЛДГобр) реакциях. Активность ЛДГ определяли в гемолизате эритроцитов в дистиллированной воде (1 : 40 по объему) по методу Г.А. Кочетова (1980). Содержание белка устанавливали по методу Лоури. Уровень глюкозы и лактата в плазме и эритроцитах оценивали с помощью автоматического анализатора SuperGL Ambulance. Для оценки направленности сдвигов энергетического метаболизма крови при действии выбранных физико-химических факторов рассчитывали коэффициент баланса энергетических реакций (КБЭР) [Соловьева А.Г., Зимин Ю.В., 2011].

Исследование иных биохимических показателей. В донорской крови спектрофотометрически определяли активность альдегиддегидрогеназы (АлДГ) – по методу Б.М. Кершенгольца, Е.В. Серкиной (1981).

Определение физико-химических показателей плазмы крови. В плазме крови определяли pH, парциальное давление газов, концентрацию основных ионов плазмы и параметры кислотно-щелочного равновесия с помощью автоматического анализатора ABL-77.

2.1.3.3. Гематологические методы исследования

Гематологические исследования. Для оценки общих сдвигов состояния форменных элементов системы крови при рассматриваемых воздействиях изучали динамику содержания эритроцитов и лейкоцитов в биологической жидкости, а также уровень гематокрита и концентрацию гемоглобина. Все указанные показатели регистрировали на гематологическом анализаторе «ABBOTT Cell-Dyn 3700» (Великобритания).

Изучение электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) методом микроэлектрофореза. Для проведения исследования из образцов цельной крови выделяли эритроциты трехкратным отмыванием 0,85% раствором хлористого натрия с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об/мин. Измерение ЭФПЭ проводили методом микроэлектрофореза в собственной модификации (Крылов В.Н., Дерюгина А.В., 2011; Симутис И.С. Дерюгина А.В., Бояринов Г.А. с соавт., 2013). Суспензию эритроцитов (0,1%) помещали в 10 мМ трис-HCl буфер (pH 7,4) и фиксировали перемещение клеток при силе тока 8 мА. Величину ЭФПЭ определяли по формуле: U=S/TH, где S – расстояние, на которое перемещались клетки (мкм); T – время перемещения клеток на расстояние S (с); H – градиент потенциала (В).

2.1.3.4. Методы исследования кристаллогенных свойств биожидкостей

Анализируемые жидкости на предметное стекло целесообразно наносить при помощи шприца, причем диаметр иглы для базисных веществ и для биосреды должен быть единым, благодаря чему достигается одинаковость объемов наносимых капель. Каждое базисное вещество, как и биосреда, должны наноситься отдельным шприцом во избежание смешивания кристаллообразующих соединений, изменения их концентрации или загрязнения биосредой. Капли на стекло наносят на горизонтальной

поверхности, исключая их смешивание. Капли также могут быть нанесены с помощью дозатора пипеточного типа соответствующего объема.

На сухое, чистое, предварительно обезжиренное предметное стекло наносят: каплю анализируемой биосреды, затем последовательно капли биосреды, поверх которых наносят по 1 капле соответствующего базисного вещества, под каждой системой «биосреда – базисное вещество» наносят каплю соответствующего базисного вещества. Дегидратацию проводят при комнатной температуре, в потоке теплого воздуха либо в термостате (температура 60^0С). После полного высыхания фации анализируют при помощи светового или электронного микроскопа, используя соответствующие способы анализа. Проводили фотографирование фаций при помощи цифрового фотоаппарата или видеокамеры с последующим занесением изображений в компьютер (создание фотобанка фаций), а затем осуществляли анализ полученных изображений.

Для описания результатов собственного кристаллогенеза биосред использовали алгоритм, предложенные А.К. Мартусевичем (2011), включающий совокупность параметров:

1. Индекс структурности (ИС) отражает состав элементов образца, наличие и соотношение фигур аморфного и кристаллического строения.

Оценивается по 4-балльной системе:

0 баллов – присутствие в микропрепарате только аморфных тел;

1 балл – дискретная часть образца представлена аморфными телами и единичными кристаллами;

2 балла – наличие в фации, кроме аморфных тел, дендритов;

3 балла – большая часть или все поле зрения образовано крупными дендритными структурами, аморфные тела и кристаллы немногочисленны.

2. Кристаллизуемость (Кр) – индикатор активности процесса кристаллогенеза. Является основным количественным маркером способности биологического субстрата к формированию кристаллов.

Определяется по 4-баллой шкале:

0 баллов – нет центров кристаллизации;

1 балл – единичные мелкие кристаллы преимущественно одиночного ряда (не более 10 в поле зрения при суммарном увеличении микроскопа х56);

2 балла – значительное количество центров кристаллизации (более 10 в поле зрения при суммарном увеличении микроскопа х56);

3 балла – все поле зрения покрыто кристаллами одиночно-кристаллического или дендритного ряда.

3. Степень деструкции фации (СДФ) – интегральный показатель, отражающий правильность протекания кристаллогенеза. Выражается в четырех степенях:

0 степень – все элементы фации правильной конфигурации, не разрушены как в целом, так и на отдельных участках; признаки разрушения текстуры фации отсутствуют;

I степень – элементы фации имеют начальные признаки разрушения, деструктивные изменения текстуры не наблюдаются;

II степень – визуализируются многочисленные разрушенные или измененные структуры; есть локальные нарушения целостности текстуры;

III степень – все элементы фации разрушены, невозможно различить отдельные части фации и структуры.

4. Выраженность краевой белковой зоны (Кз) указывает на относительное содержание нативных белков в биологической среде. Данный показатель оценивается по 4-балльной шкале:

0 баллов – полное отсутствие краевой зоны, невозможно выделение краевой зоны под «малым» (х56-х60) увеличением микроскопа;

1 балл – краевая зона присутствует нечетко и/или по всей фации;

2 балла – при микроскопии по всему периметру микропрепарата отмечается наличие выраженной краевой зоны, но соотношение «ширина краевой зоны **:** радиус фации» не превышает 1 : 3;

4 балла – краевая зона визуализируется даже без микроскопа, соотношение «ширина краевой зоны **:** радиус фации» превышает 1 : 3.

2.3.4. Методы изучения состояния микроциркуляции и вариабельности сердечного ритма

Исследование вариабельности сердечного ритма и микроциркуляции проводили под комбинированным наркозом («золетил» + «ксила»).

Вариабельность сердечного ритма регистрировали в течение 5 минут с использованием программно-аппаратного комплекса «Полиспектр» (ветеринарный вариант; фирма «Нейрософт», Иваново). В качестве основных параметров использовали частоту сердечных сокращений, статистические (амплитуда моды и индекс напряжения) и спектральные показатели (соотношение мощностей спектра в диапазонах низких и высоких частот) активности симпатической и парасимпатической стимуляции кардиоритма, а также общую мощность спектра.

Состояние микроциркуляции оценивали методом лазерной допплеровской флуометрии на аппарате «ЛАКК-М» («Лазма», Москва). Продолжительность записи ЛДФ-граммы составляла 3 мин. Интенсивность кровотока по микрососудам мониторировали по показателю микроциркуляции (ПМ), активность регуляторных механизмов – по уровню соответствующих им компонентов (эндотелиального – Э, нейрогенного – Н, миогенного – М, сердечного – С и дыхательного - Д). Кроме того, определяли характер включения шунтирующих путей кровотока по значению показателя шунтирования (ПШ).

2.1.4. Методы статистической обработки данных

Фактический материал, полученный при проведении исследований у всех изученных групп людей, был обработан методом вариационной статистики (Тюрин Ю.Н., Макаров А.А., 1998; Наследов А.Д., 2004). Вычисляли средние величины (M), их стандартную ошибку (m) и среднеквадратическое отклонение (σ). Показатели считались достоверными при значениях $p<0,05$ (по t-критерию Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни). Зависимость между признаками оценивали при помощи коэффициента парной корреляции (r), его ошибки (m_r) и уровня значимости

различий (по t-критерию Стьюдента). Зависимость считалась сильной при $|r| > 0,7$, средней в случае, если модуль значения парной корреляции лежит в пределах 0,3-0,7. При нахождении величины корреляции, меньшей по модальному значению 0,3, она принималась за слабую. Производилось также вычисление достоверности найденной парной корреляции (p).

Расчеты выполнялись в электронных таблицах Microsoft Excel 2007, а также с помощью программ Primer of biostatistics 4.03 и SPSS 11.0.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Исследование действия синглетного кислорода на параметры крови in vitro

2.2.1.1. Исследование особенностей действия синглетного кислорода на баланс про- и антиоксидантных систем и уровень малонового диальдегида крови in vitro

Известно, что все активные форм кислорода, присутствуя в биологических субстратах, в первую очередь способны оказывать модулирующее действие на состояние их окислительного метаболизма., изменяя баланс активности про- и антиоксидантных систем. В то же время далеко не для всех биорадикалов раскрыты и изучены подобные эффекты. Так, в отношении низких концентраций озона показано дозозависимое действие на окислительный метаболизм, включающее сонаправленную активацию обоих его компонентов с преобладанием стимуляции антиоксидантного потенциала биологических объектов. Для синглетного кислорода и инициируемых им активных форм кислорода указанные эффекты не изучены, в связи с чем этому был посвящен следующий фрагмент работы.

В данной части исследования (in vitro) проводили сравнительную оценку действия синглетного кислорода, молекулярного кислорода и озона на состояние окислительного метаболизма крови здоровых людей (n=10).

Установлено, что рассматриваемые факторы оказывают неодинаковое действие на изучаемые параметры окислительного метаболизма, что сопоставляется с результатами оценки их влияния на физико-химические показатели абиогенных жидкостей. Так, оксигенация и озонирование путем воздействия на образцы крови низких концентраций озона (500 мкг/л) приводят к значимому нарастанию интенсивности процессов перекисного окисления липидов в плазме крови (на 22,1 и 25,7% относительно контрольного уровня; $p<0,05$ для обоих случаев). В то же время обработка биологической жидкости газовым потоком, исходно содержащим

синглетный кислород, не вызывает существенных сдвигов светосуммы хемилюминесценции, причем эта особенность его действия не зависит от мощности генератора (рис. 13). На данном основании можно заключить, что синглетно-кислородная газовая смесь либо не обладает существенным прооксидантным эффектом, либо его умеренная выраженность компенсируется значительным антиоксидантным потенциалом рассматриваемого агента.

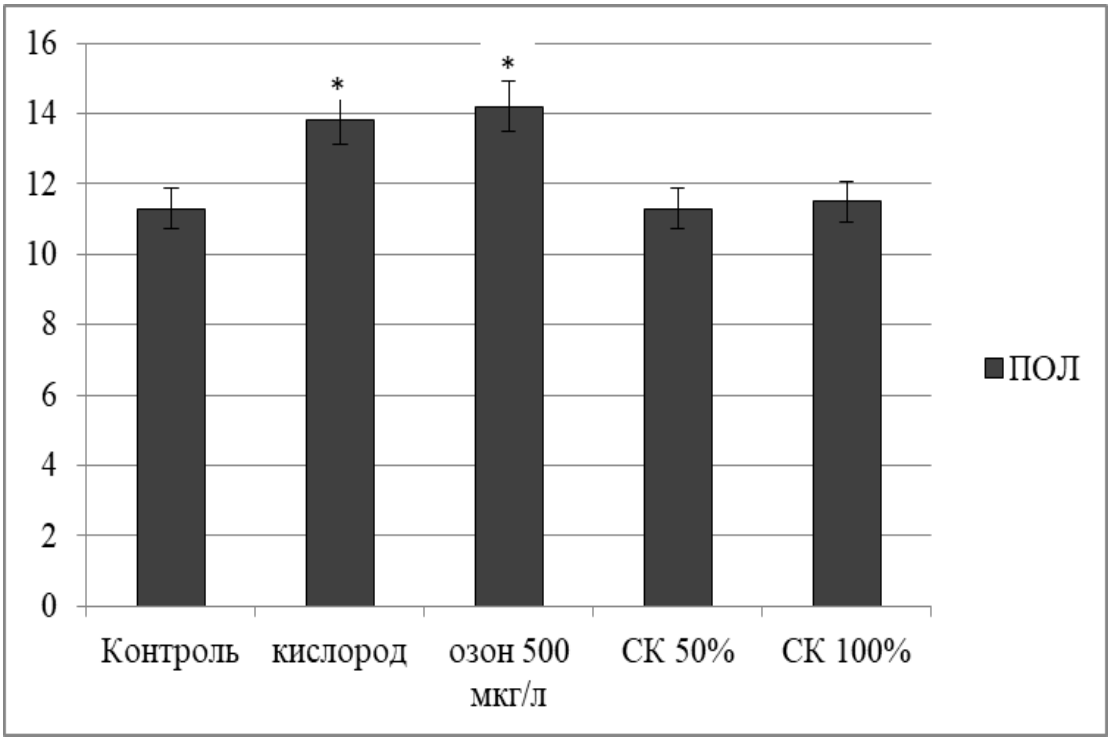

Рисунок 5 - Уровень перекисного окисления липидов в плазме крови после обработки активными формами кислорода in vitro (* - статистическая значимость различий $p<0,05$)

Иная динамика была зарегистрирована в отношении общей антиоксидантной активности плазмы крови (рис. 5). В частности, введение в образец биологической жидкости молекулярного кислорода обуславливает минимальное снижение антиоксидантного резерва биосреды, фиксируемое на уровне тенденции ($p<0,01$). Остальные воздействия способствовали повышению рассматриваемого параметра, однако выраженность этого сдвига зависела от вида активной формы кислорода и его концентрации. Так, низкая

концентрация озона увеличивала общую антиоксидантную активность на 27,9% (p<0,05). В целом, действие озоно-кислородной смеси на окислительный метаболизм крови на основании биохемилюминесцентного исследования можно оценить как сбалансированное, так как имеет место пропорциональное повышение интенсивности процессов липопероксидации и антиоксидантного потенциала плазмы крови. Это подтверждает данные проведенных ранее исследований (Перетягин С.П. с соавт., 2012).

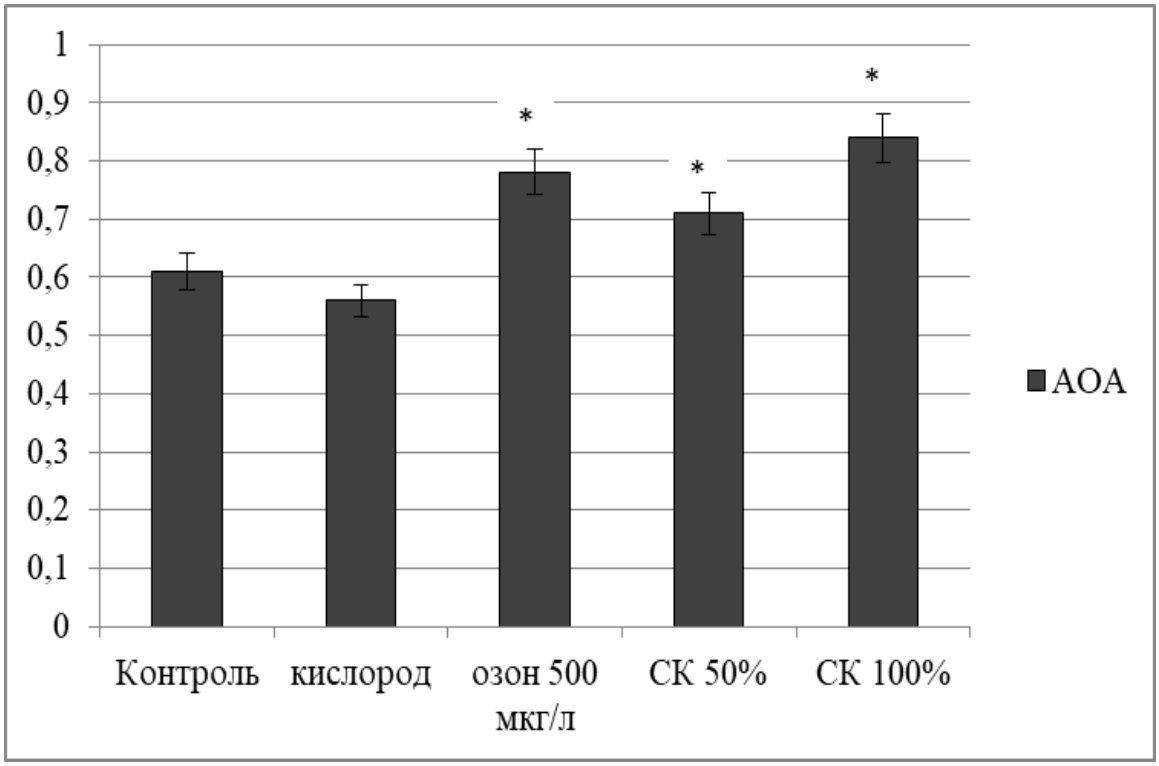

Рисунок 6 - Антиоксидантная активность плазмы крови после обработки синглетным кислородом in vitro (* - статистическая значимость различий p<0,05)

Обработка крови здоровых людей газовой смесью, содержащей синглетный кислород, инициирует ярко выраженное дозозависимое действие на антиоксидантный потенциал биологической жидкости (рис. 6). Так, если использование половинной мощности генератора обуславливает увеличение антиоксидантных свойств биосреды только на 16,4% (p<0,05 по сравнению с контрольным образцом), то барботаж крови газовым потоком при 100%

мощности аппарата приводит к повышению значения показателя уже на 37,7% по отношению к интактному уровню (p<0,05). Учитывая сохранность при этих воздействиях интенсивности липопероксидации на исходных цифрах, можно фиксировать наличие у исследуемого агента антиоксидантной активности плазмы крови при его применении в экспериментах in vitro.

Также нами произведена оценка состояния процессов липопероксидации в мембранах эритроцитов (рис. 15).

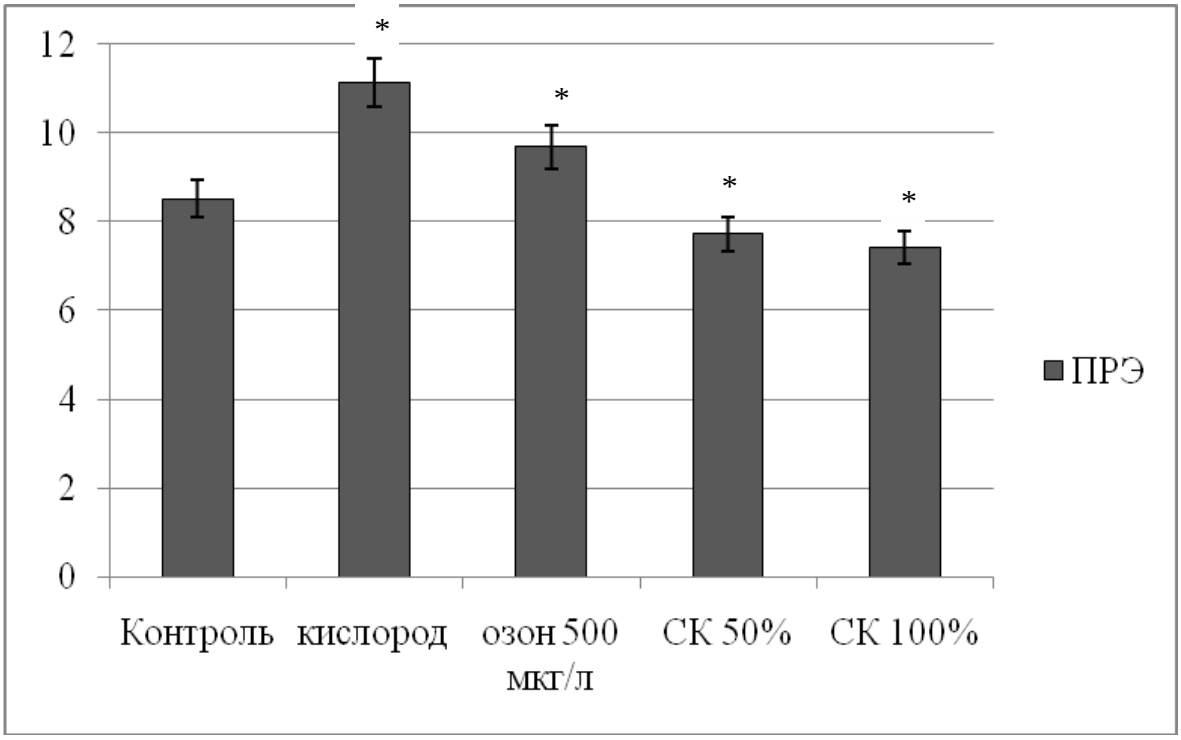

Рисунок 7 - Уровень перекисной резистентности эритроцитов при обработке образцов крови активными формами кислорода (* - статистическая значимость различий p<0,05)

Установлено, что наиболее существенно увеличивает перекисную резистентность эритроцитов оксигенация образцов крови (на 30,6% относительно интактного образца; p<0,05), что вполне сочетается с результатами оценки интенсивности липопероксидации в плазме крови. Озонирование биологической жидкости при введении низкой концентрации

агента (500 мкг/л) приводит к умеренному, но статистически значимому нарастанию значения параметра (на 13,6% по сравнению с контрольным образцом; $p<0,05$).

Иная тенденция имеет место при обработке крови синглетно-кислородной газовой смесью (рис. 7). Выявлено, что данная активная форма кислорода снижает значение параметра. Интересно, что в этом случае не реализуется дозозависимое действие агента: уровень перекисной резистентности эритроцитов при использовании 50 и 100% мощности генератора составляет 90,6 и 87,2% от контрольных значений ($p<0,05$ для обоих воздействий).

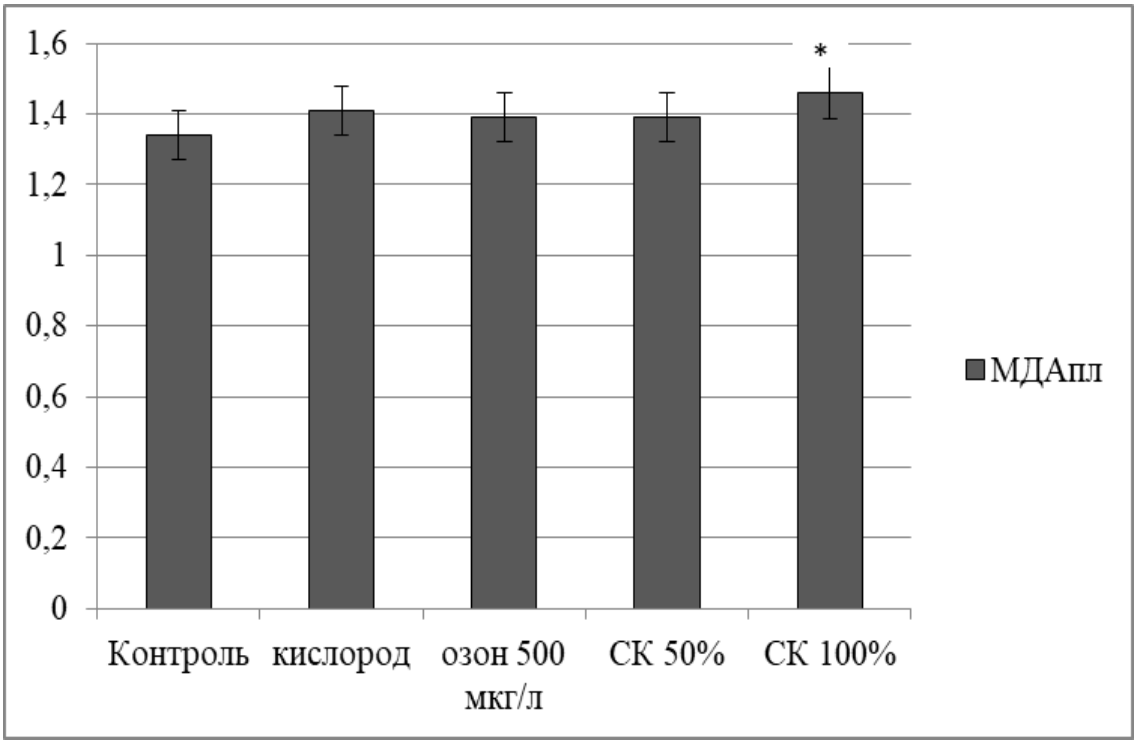

Рисунок 8 - Концентрация малонового диальдегида в плазме крови при воздействии активных форм кислорода in vitro (* - статистическая значимость различий $p<0,05$)

В качестве дополнительного критерия состояния окислительного метаболизма крови нами использован уровень одного из наиболее широко информативных показателей интенсивности процессов перекисного

окисления липидов – концентрации малонового диальдегида в плазме крови и эритроцитах (рис. 7 и 8). Установлено, что все изучаемые воздействия не оказывают существенного влияния на плазменный уровень рассматриваемого показателя, увеличиваясь по завершении обработки образцов биологической жидкости не более чем на 10% относительно интактных значений. При этом в наибольшей степени возрастает концентрация метаболита в плазме крови при введении в биосреду газового потока от генератора синглетного кислорода при применении его 100% мощности (на 9% относительно интактного образца; $p<0,05$).

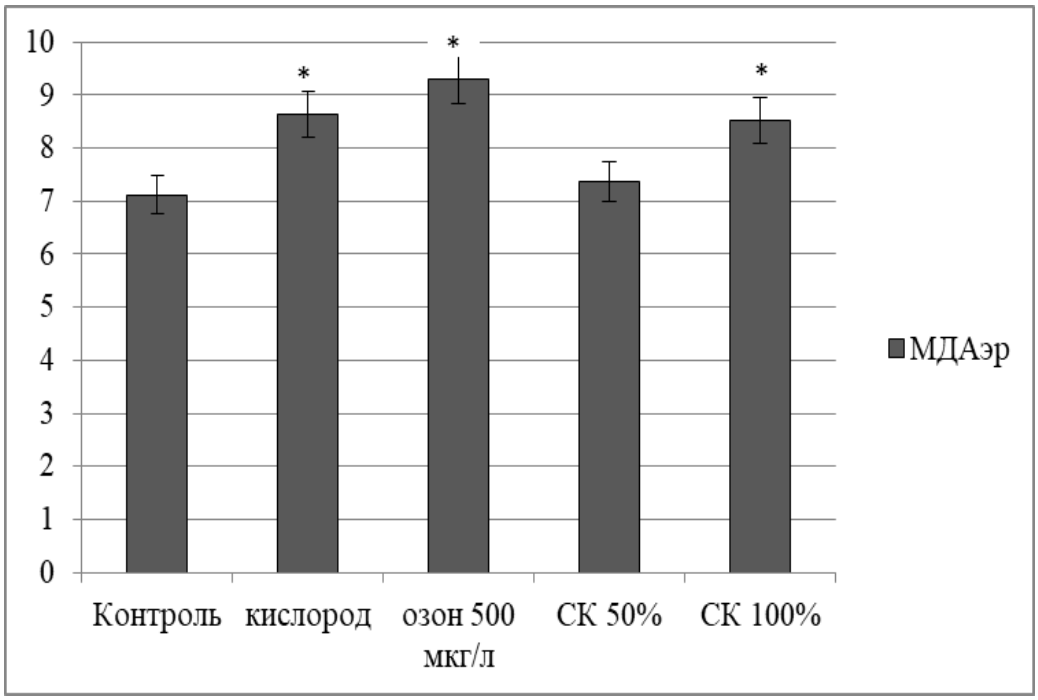

Рисунок 9 - Концентрация малонового диальдегида в эритроцитах при воздействии активных форм кислорода in vitro (* - статистическая значимость различий $p<0,05$)

Более существенная динамика концентрации малонового диальдегида зарегистрирована при исследовании эритроцитов (рис. 9). Так, обработка цельной крови молекулярным кислородом способствует увеличению значения показателя на 21,2% по сравнению с контрольным образцом ($p<0,05$). Введение в биологическую жидкость кислородно-озоновой смеси

приводило к более значимому повышению уровня малонового диальдегида (на 30,6%; p<0,05).

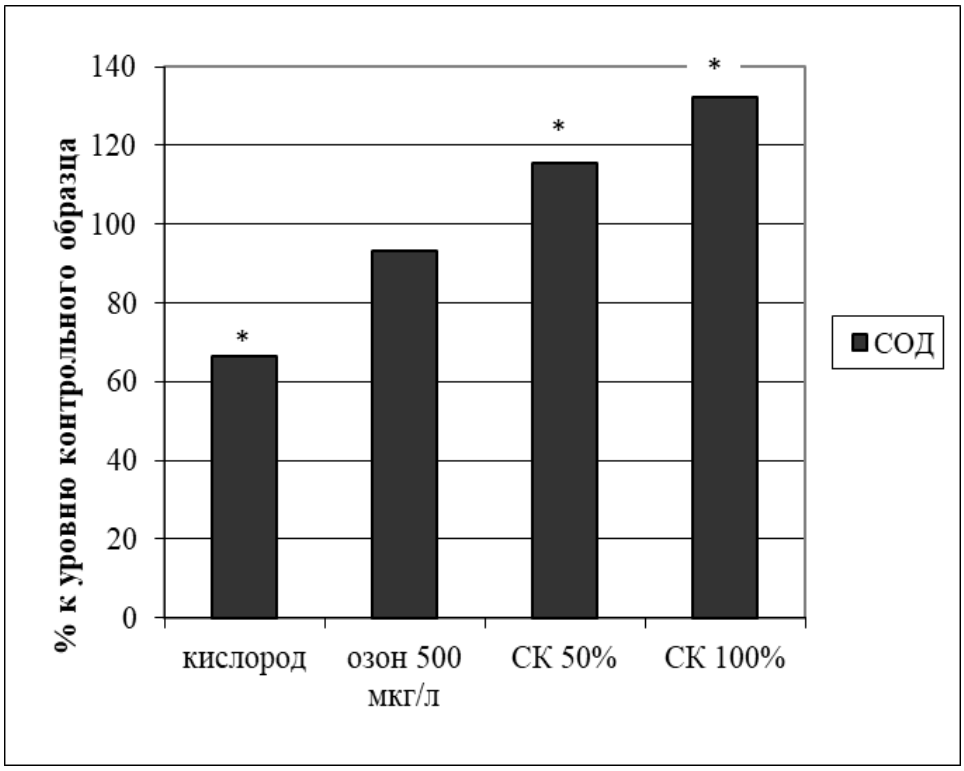

Рисунок 10 - Активность супероксидисмутазы эритроцитов при действии различных активных форм кислорода in vitro (в % к уровню интактного образца, принятого за 100%; * - статистическая значимость различий от сравнению с интактным образцом p<0,05)

Как и в отношении интенсивности процессов липопероксидации в плазме крови, в эритроцитах наблюдали признаки дозозависимости ответа окислительного метаболизма на действие газовой смеси, исходно содержащей синглетный кислород. В частности, при применении 50% мощности генератора не отмечали стимуляции перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов, тогда как использование 100% мощности аппарата обуславливало значимое увеличение концентрации малонового диальдегида в них (на 19,7% по сравнению с интактным образцом крови; p<0,05). Это может указывать на преимущественную реализацию антиоксидантных свойств биорадикалов, образование которых инициировано

синглетным кислородом, в плазме крови. В то же время признаки антиоксидантной активности изучаемого агента обнаруживаются и в эритроцитах, на что указывают результаты сравнительной оценки влияния рассматриваемых активных форм кислорода на каталитические свойства эритроцитарной супероксидисмутазы (рис. 10).

Выявлено, что исследуемые активные формы кислорода оказывают неодинаковое влияние на каталитические свойства одного из основных антиоксидантных ферментов, утилизирующих супероксидный радикал, - супероксидисмутазы (рис. 10). Так, оксигенация крови инициирует угнетение активности данного энзима (на 33,7% относительно контрольного образца; $p<0,05$), а обработка его низкой концентрацией озона практически не изменяет ее.

Введение в биологическую жидкость синглетного кислорода, сгенерированного при мощности аппарата 50% от полной, умеренно снижая уровень перекисной резистентности эритроцитов и не модифицируя концентрацию малонового диальдегида, приводит к нарастанию каталитической активности супероксиддисмутазы на 15,6% по сравнению с контрольным образцом ($p<0,05$). Увеличение мощности генератора до 100% приводит к более выраженной стимуляции изучаемого параметра (+32,1% по отношению к интактному уровню; $p<0,05$), что свидетельствует об активации антиоксидантной системы крови, превалирующей над инициацией липопероксидации, при действии данной активной формы кислорода.

Таким образом, проведенные на образцах изолированной крови здоровых людей эксперименты позволяют сделать вывод о наличии у синглетно-кислородной газовой смеси антиоксидантных свойств, причем приведенный эффект является дозозависимым.

Эти результаты могут быть использованы как метод повышения антиоксидантного потенциала крови в отношении разработки способов системной коррекции окислительного стресса путем ингаляционной

синглетно-кислородной терапии и при предтрансфузионной обработке переливаемых компонентов донорской крови.

2.2.1.2. Сравнительная характеристика эффекта синглетного кислорода и озона в отношении энергетического метаболизма эритроцитов

Система крови, являясь основной жидкой средой, традиционно рассматривается как интегральный индикатор состояния целостного организма на различные воздействия. Этому способствует наличие в ее составе как многочисленных клеточных пулов, так и жидкой части – плазмы, в комплексе обеспечивающих биологические и физико-химические свойства данного биосубстрата и его адаптационно-гомеостатический потенциал. С учетом активно протекающих в рассматриваемой биосреде процессов, обеспечивающих энергетический обмен ее клеточной составляющей, цельная кровь служит достаточно удобной биомоделью для оценки эффекта различных, в частности физико-химических, факторов на указанный аспект метаболизма.

В связи с этим целью данного фрагмента исследования служило изучение влияния газообразных активных форм кислорода на параметры энергетического метаболизма крови в эксперименте.

Анализ состояния энергетического обмена крови оценивали как с позиций субстратного обеспечения процесса, так и активности ферментных систем (табл. 4). Прежде всего, нами произведен анализ применимости консервированной крови для достижения цели исследования. На основании полученных данных установлено, что в цельной консервированной крови активность ЛДГ в обратной реакции преобладает над активностью фермента в прямой, что совпадает с динамикой, наблюдающейся в свежеполученной крови (Соловьева А.Г. с соавт., 2014), и свидетельствует об отсутствии значимого влияния применяемого консерванта на ее рассматриваемые параметры. Следовательно, используемая биомодель цельной

консервированной крови является адекватной и может быть применена для оценки характера воздействия на нее выбранных физико-химических факторов.

Таблица 4 - Основные и расчетные параметры энергетического метаболизма крови при действии различных источников активных форм кислорода

Параметр	**Фактор**			
	контроль	**кислород**	**озон**	**синглетный кислород**
ЛДГпр, нмоль НАДН/мин* мг белка	51,99±2,84	58,15±3,27*	60,29±4,12*	64,09±3,37*
ЛДГобр, нмоль НАДН/мин* мг белка	21,76±1,63	24,32±1,70	32,42±2,28*	22,09±2,06
Лактат плазмы, ммоль/л	6,93±0,21	7,15±0,24	7,15±0,26	6,37±0,23*
Лактат эритроцитов, ммоль/л	3,00±0,17	3,05±0,18	2,67±0,14*	2,70±0,15*

Примечание: «*» – статистически значимые различия по сравнению с контрольным образцом $p<0,05$ (по парному критерию Стъюдента)

Вторым этапом работы явилось непосредственное определение особенностей действия источников активных форм кислорода на состояние энергетического метаболизма биологической жидкости. Установлено, что активность ЛДГ в прямой реакции при действии на образцы цельной крови

изучаемых физических факторов существенно варьирует (табл. 4). Так при барботировании биологической жидкости кислородом и озоно-кислородной смесью с концентрацией озона 500 мкг/л наблюдали значимое нарастание данного показателя (на 11 и 15% относительно контрольного образца соответственно; $p<0,05$), а максимальная выраженность тенденции имела место при использовании синглетно-кислородной смеси (+23,3%; $p<0,05$). Повышенная активность ЛДГ в обратной реакции была зарегистрирована при воздействии на образцы крови озоно-кислородной смеси (на 48% соответственно; $p<0,05$).

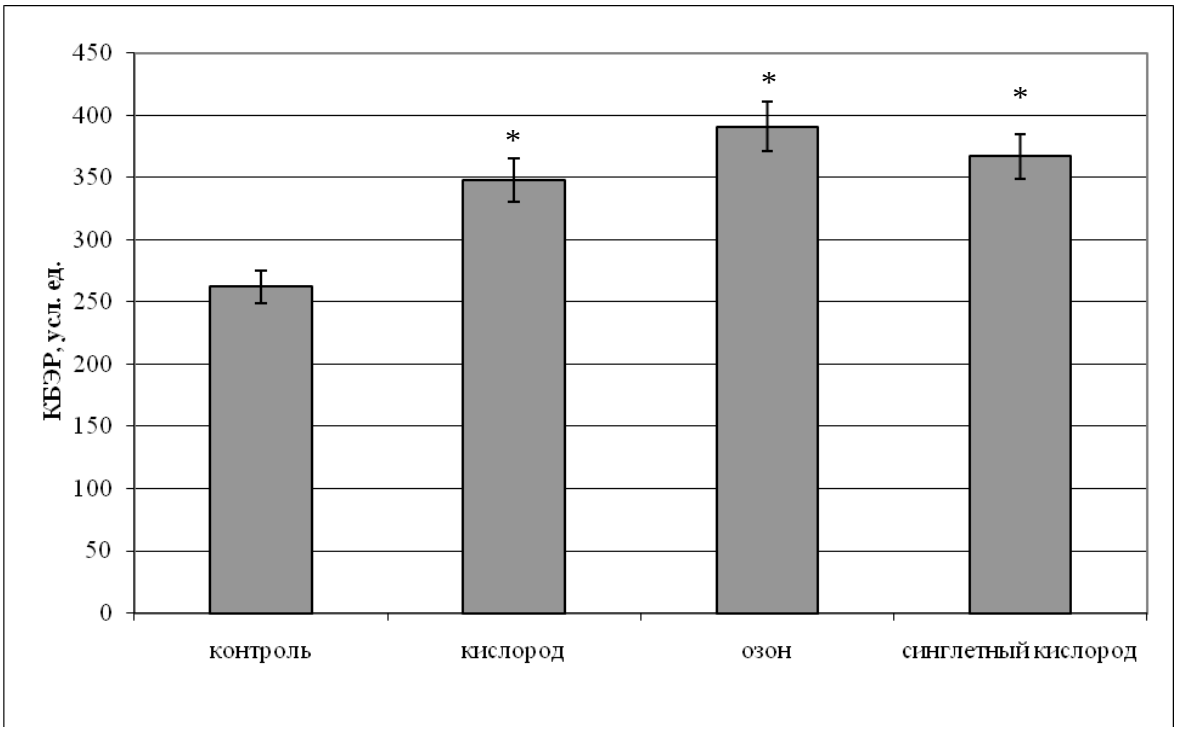

Рисунок 11 - Уровень коэффициента баланса энергетических реакций (КБЭР) крови при действии источников активных форм кислорода (* - статистическая значимость различий $p<0,05$)

Изучение уровня лактата в плазме крови, демонстрирующего в том числе и результат функционирования ЛДГ, позволило установить, что большинство оцениваемых факторов не оказывает существенного влияния на концентрацию изучаемого соединения (нарастание в диапазоне 3-6%

относительно контрольного образца). Только при барботировании биологической жидкости синглетным кислородом выявлено статистически значимое нарастание указанного показателя ($p<0,05$).

С наших позиций, клинически важны результаты определения содержания лактата в эритроцитах как модели клеточной биосистемы. Выявлено, что концентрация лактата в эритроцитах сохраняется на исходном уровне только в случае оксигенации биологической системы. В то же время после обработки консервированной крови озоно-кислородной смесью и синглетным кислородом регистрировали значимое снижение значения данного показателя (на 11 и 10% соответственно; $p<0,05$), что косвенно указывает на антигипоксический эффект изучаемых воздействий. Это обеспечивается стимуляцией активными формами кислорода аэробного пути функционирования ЛДГ и, соответственно, направленной утилизацией лактата на нужды энергообеспечения клетки при озонировании биологической жидкости.

С целью получения интегральной информации о сдвигах энергетического метаболизма, инициированных источниками активных форм кислорода, нами был осуществлен расчет некоторых производных коэффициентов, позволяющих оценить сбалансированность рассматриваемого компонента обменных процессов (рис. 11). На основании анализа динамики КБЭР выявлено, что барботирование цельной крови озоно-кислородной смесью, синглетным кислородом и молекулярным кислородом способствует смещению активности ЛДГ в сторону прямой реакции ($p<0,05$). Следует отметить, что в случае применения озона активация ЛДГпр также значительна, но сопровождается умеренной стимуляцией обратной реакции (табл. 4).

Таким образом, барботирование консервированной крови кислородом, озоно-кислородной смесью и синглетным кислородом благоприятно модифицирует энергетические резервы биосреды, причем каждое из воздействий имеет собственные особенности.

2.2.1.3. Оценка дозозависимости модификации синглетным кислородом некоторых физико-химических параметров крови

С учетом того, что продемонстрированы отличия метаболического эффекта действия синглетного кислорода на образцы крови человека по сравнению с другими активными формами кислорода, а также результатами экспериментов с абиогенными жидкостями, представляет интерес оценка влияния различных режимов работы аппарата «Airnergy» на физико-биохимические показатели биосреды с учетом потенциальной дозозависимости действия газового потока от генератора синглетного кислорода. Это послужило целью следующего фрагмента работы.

В первую очередь, с учетом продемонстрированного ранее действия АФК на компоненты энергетического обмена, нами проведена оценка влияния рассматриваемых факторов на активность соответствующих ферментных систем (рис. 12).

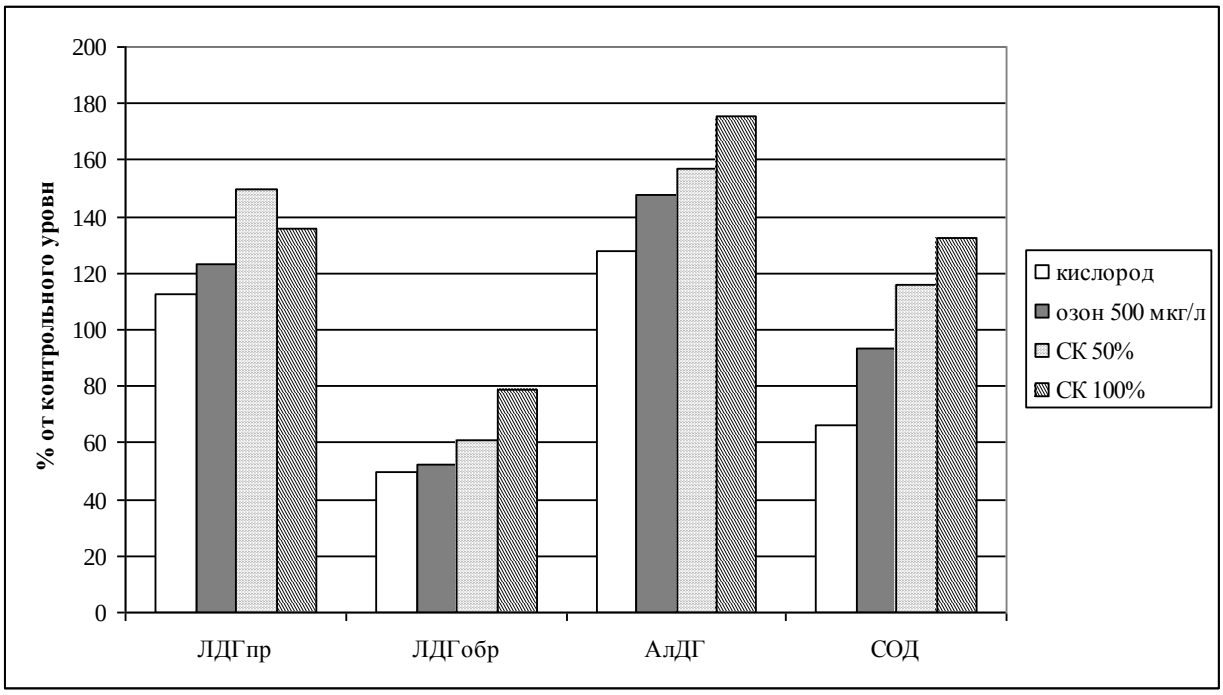

Рисунок 12 - Динамика активности ферментов в эритроцитах при действии активных форм кислорода (за 100% принят уровень, установленный для образцов крови, с которыми не проводили никаких манипуляций)

Установлено, что все изученные АФК обуславливают нарастание активности ЛДГ в прямой реакции в сочетании с умеренным угнетением обратной. В то же время выраженность этого эффекта для различных факторов существенно варьирует. В частности, кислород и низкие дозы озона (500 мкг/л) преимущественно оказывают ингибирующее влияние на обратную реакцию ЛДГ ($p<0,02$), тогда как обе изучаемые концентрации СК значимо и позитивно модифицируют режим функционирования ЛДГ, повышая активность энзима в прямой реакции и снижая ее – в обратной ($p<0,02$).

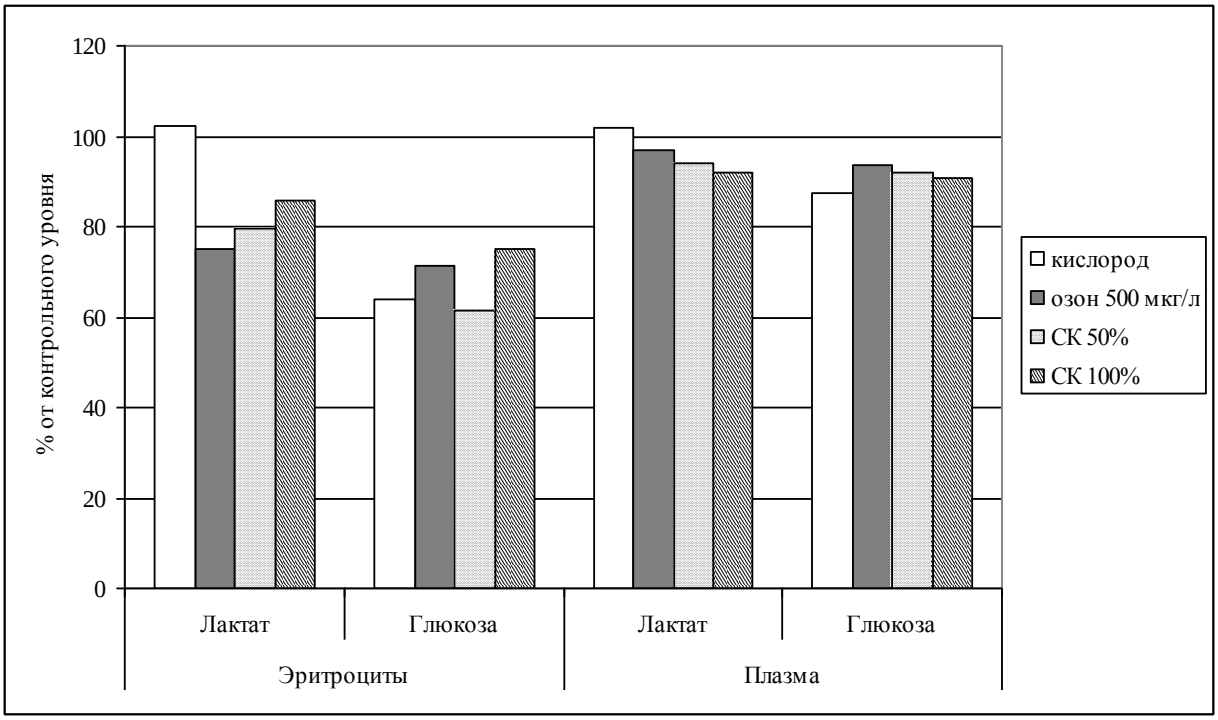

Рисунок 13 - Изменение концентрации глюкозы и лактата в эритроцитах и плазме крови при ее обработке активными формами кислорода (за 100% принят уровень, установленный для образцов крови, с которыми не проводили никаких манипуляций)

Следует отметить, что эти сдвиги в большей степени обеспечиваются активацией прямой реакции. Важно, что указанные процессы сопряжены с сонаправленным изменением внутриэритроцитарной концентрации лактата

(рис. 13), существенно уменьшающейся при действии всех изучаемых АФК ($p<0,02$ для всех случаев). Это обусловлено повышенным расходованием лактата в условиях данного варианта активации ЛДГ.

На основании проведенных исследований также обнаружено, что рассматриваемые АФК оказывают влияние и на другие ферментные системы крови (рис. 12). В частности, при обработке биологической жидкости кислородно-озоновой смесью и СК наблюдали активацию фермента детоксикации – АлДГ, причем этот эффект предположительно связан с самостоятельным действием СК на функционирование энзима. Несмотря на существование мультиэнзимного комплекса «ЛДГ – АлДГ» (Зимин Ю.В. с соавт., 2011), динамика вариации активности данных ферментов при нарастании концентрации данной АФК не аналогична, что косвенно подтверждает указанную тенденцию.

Различное влияние оказывают изучаемые физические агенты и на компоненты ферментной антиоксидантной системы, в том числе на активность СОД (рис. 12). Так, выявлено, что кислород выраженно ингибирует данный фермент, озон в небольшой концентрации практически не изменяет его активность, а СК дозозависимо его стимулирует ($p<0,05$). Интересно заметить, что эта тенденция может быть механизмом активирующего действия последнего на антиоксидантную активность крови, что соответствует результатам наших предшествующих пилотных исследований в отношении биологической жидкости как практически здоровых людей, так и пациентов, имеющих окислительный стресс вследствие развития ожоговой болезни.

Состояние ферментных систем крови естественным образом отражается и на уровне метаболитов в плазме и эритроцитах (рис. 13). Так, оказывающие наиболее значимое действие на активность оксидоредуктаз озон и синглетный кислород в большей степени снижают внутриэритроцитарную и плазменную концентрации лактата ($p<0,05$). Этот эффект распространяется и на уровень данного соединения в плазме крови.

Интерес представляет тот факт, что под влиянием всех изучаемых АФК происходит снижение уровня глюкозы в эритроцитах (на 65-75% относительно значений, характерных для крови, с которой не проводили никаких манипуляций; $p<0,05$), хотя плазменная концентрация соединения практически не изменяется. По нашему мнению, это может быть обусловлено его повышенной утилизацией в энергетическом обмене, стимулированном изучаемыми окислителями.

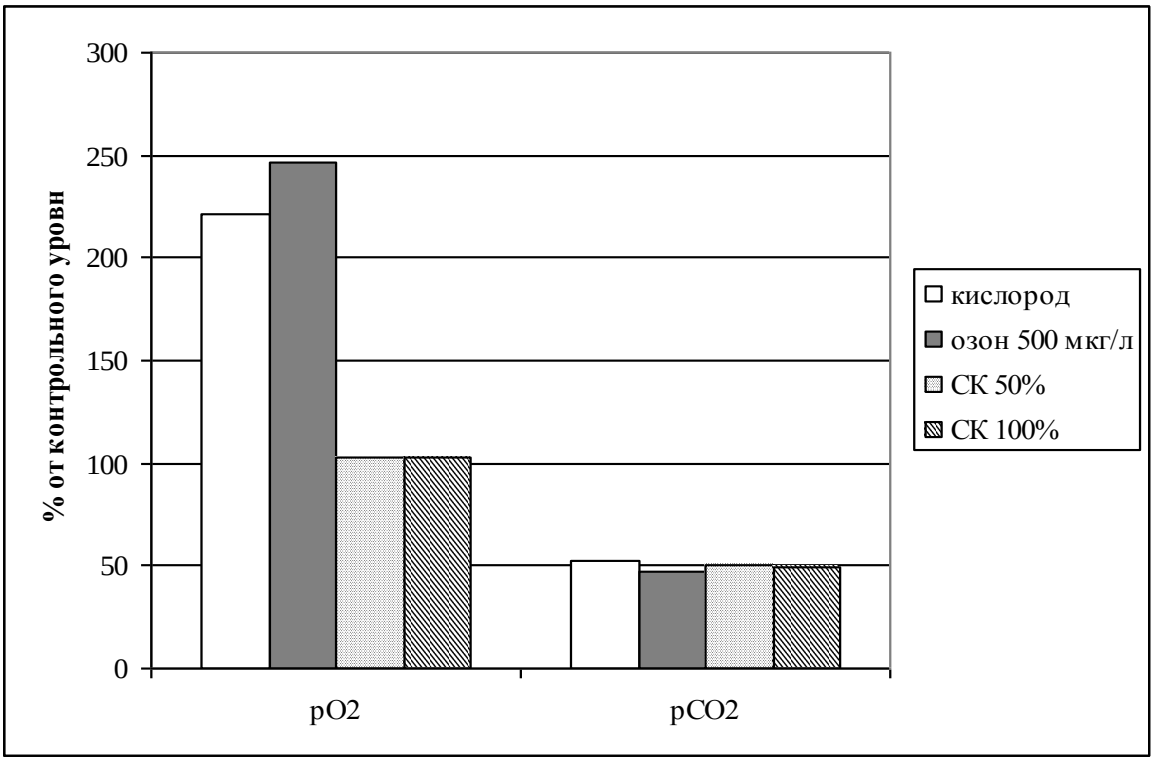

Рисунок 14 - Парциальное давление газов крови при обработке крови активными формами кислорода

С учетом того, что в результате изучаемых воздействий в кровь вводятся кислород-содержащие газовые смеси, по их завершении наблюдали существенные сдвиги газового состава крови (рис. 14). В частности, все рассматриваемые факторы обеспечивали снижение парциального давления углекислого газа практически на 50% относительно исходного уровня ($p<0,05$), однако только чистый кислород и кислородно-озоновая смесь

выраженно повышали парциальное давление кислорода в крови более чем в 2 раза по сравнению с контрольными значениями ($p<0,05$).

Под влиянием АФК изменяются и показатели кислотно-щелочного равновесия крови (рис. 14). Так, все исследуемые факторы приводят к умеренному защелачиванию образцов крови (на 0,13; 0,20; 0,18; 0,18 и 0,20 усл. ед. при обработке кислородом, кислородно-озоновой смесью и СК при мощностях прибора 50 и 100% соответственно; $p<0,05$ для всех случаев). Механизм этих сдвигов может быть связан с генерацией гидроксид-ионов в процессе деградации АФК в биологической жидкости, а также со снижением концентрации растворенного углекислого газа. Последняя тенденция одинаково просматривается для всех изучаемых воздействий как по общему уровню данного параметра, так и концентрации бикарбоната в плазме крови (рис. 15), составляющих после барботажа 70-75% от исходных значений ($p<0,05$).

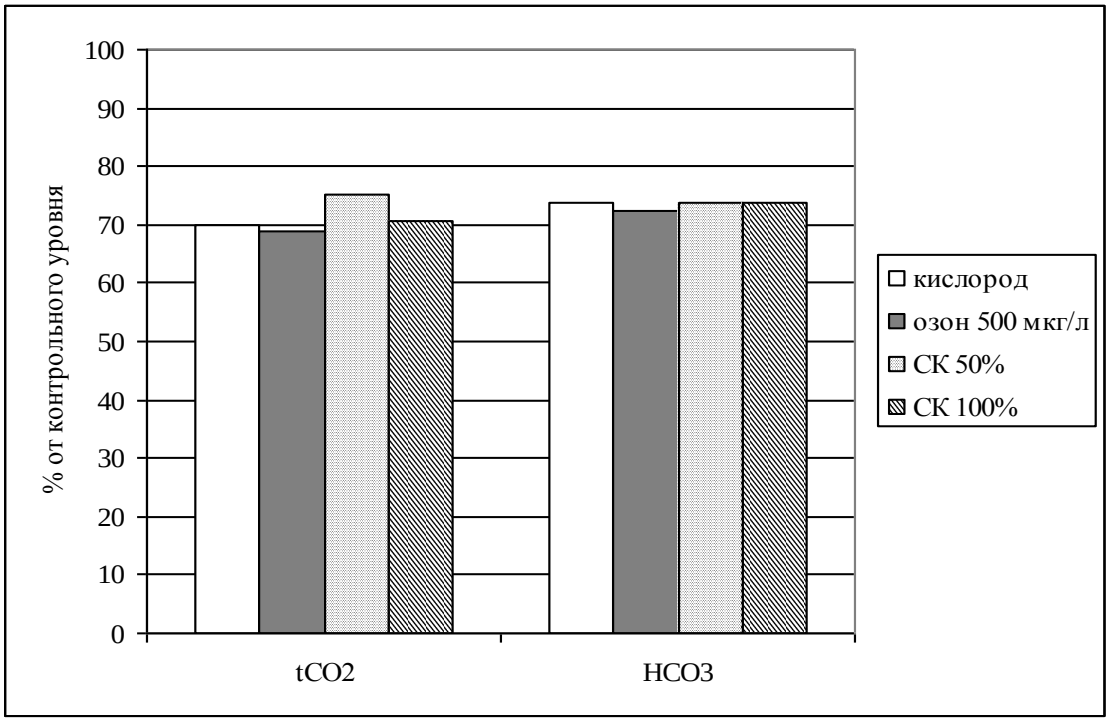

Рисунок 15 - Общее количество углекислого газа и уровень бикарбонатов плазмы при обработке крови активными формами кислорода

В целом, установлено, что обработка крови синглетным кислородом в условиях in vitro создает позитивные условия для функционирования ферментов энергетического обмена, детоксикации и компонентов антиоксидантной системы, проводя к соответствующим сдвигам плазменной и эритроцитарной концентрации глюкозы и лактата, а также оптимизирует газовый состав и параметры кислотно-щелочного баланса биологической жидкости. Следует подчеркнуть, что по действию на активность изучаемых ферментов эффект синглетного кислорода более выражен, чем кислородно-озоновой смеси. Кроме того, важно отметить, что на выраженность сдвигов оцениваемых показателей оказывает непосредственное влияние выбранный режим генерации синглетного кислорода, причем эта зависимость имеет нелинейный характер.

2.2.1.4. Электрофоретическая подвижность эритроцитов и кристаллогенные свойства крови при действии активных форм кислорода in vitro

Известно, что активные формы кислорода (АФК) и азота, входящие в комплексное понятие «биорадикалы», способны выступать в качестве универсальных молекулярных биорегуляторов, включающихся как в физиологические, так и патологические пути метаболизма. Показано их многогранное участие практически во всех компонентах обмена веществ, причем результирующая биологического действия биорадикалов непосредственно определяется дозой агента. Следует отметить, что в отношении этих соединений часто имеет место нелинейная зависимость «доза - эффект».

С другой стороны, особенности реализации модулирующего влияния биорадикалов на живые системы, обусловленные их природой и физико-химическими свойствами, расшифрованы недостаточно полно. В частности, неизвестным остается характер воздействия биорадикалов на электрокинетические свойства эритроцитов. Ранее нашими исследованиями и

работами других авторов было показано, что электрофоретическая подвижность эритроцитов (ЭФПЭ), являющаяся их количественной мерой, может рассматриваться как неспецифический индикатор состояния эритрона и его реакции на изменения гомеостаза и внешние воздействия на организм (Крылов В.Н., Дерюгина А.В., 2011; Sheremetev Y.A. et al., 2000; Xie L. et al., 2002; Nihei Y. et al., 2008). В то же время подобные сведения имеются лишь в отношении озона, причем они приводятся только в единичных публикациях (Симутис И.С. Дерюгина А.В., Бояринов Г.А. с соавт., 2013). На основании этого целью фрагмента работы служило изучение электрофоретической подвижности эритроцитов при действии экзогенных активных форм кислорода на образцы крови человека in vitro.

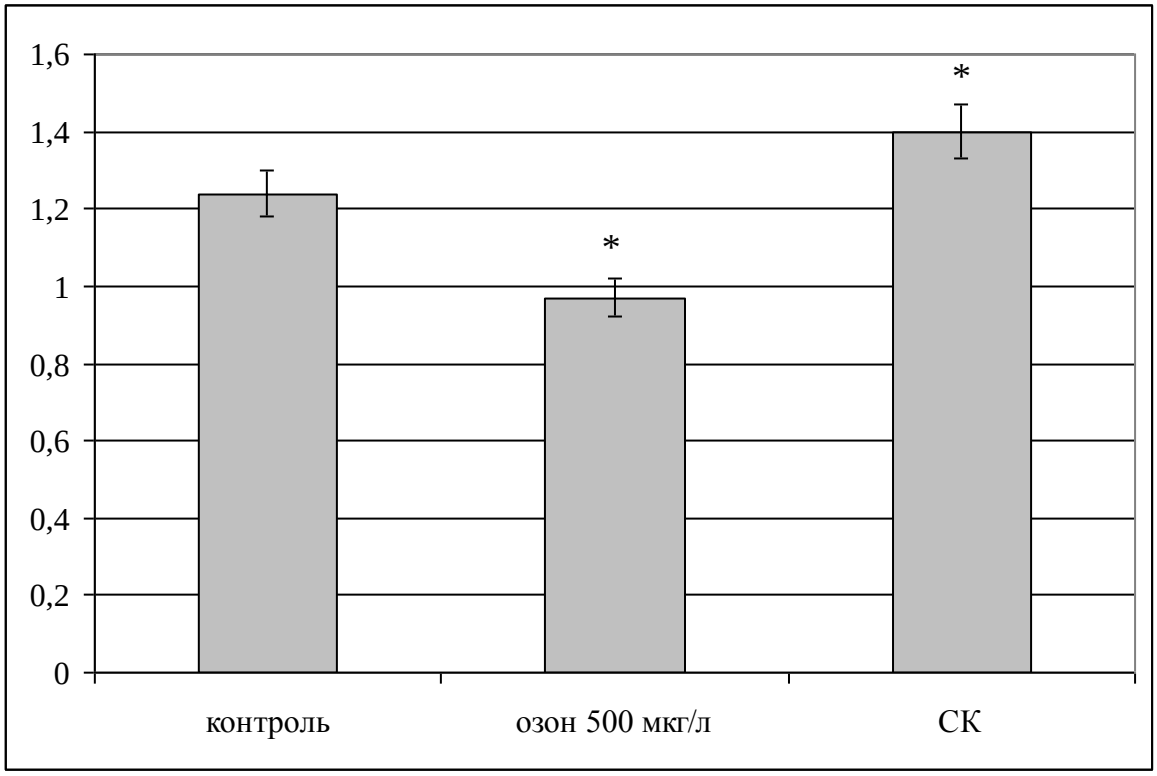

Рисунок 16 - Электрофоретическая подвижность эритроцитов (мкм•см•В$^{-1}$•с$^{-1}$) при действии активных форм кислорода (* - статистическая значимость различий по сравнению с контролем $p<0,05$)

Установлено, что изучаемые экзогенные биорадикалы оказывают неодинаковое влияние на ЭФПЭ крови человека. Так, обе изучаемые АФК (озон и синглетный кислород) изменяют данный показатель, однако эти сдвиги разнонаправлены (рис. 16). В частности, барботирование крови озоно-кислородной смесью с концентрацией озона 500 мкг/л, что соответствует низким терапевтическим дозам (Перетягин С.П. с соавт, 2011), инициирует существенное снижение значения параметра (на 22%; $p<0,05$ по сравнению с контрольным образцом), тогда как обработка биологической жидкости синглетно-кислородной газовой смесью вызывает умеренное повышение уровня ЭФПЭ (на 13% относительно контроля; $p<0,05$). Это обусловлено тем обстоятельством, что даже небольшие количества озона, введенные в биосреду, обеспечивают стимуляцию процессов липопероксидации, приводя к структурным перестройкам мембраны эритроцитов и, следовательно, изменению их электрокинетических характеристик.

Напротив, показанное нами антиоксидантное действие синглетного кислорода способствует стабилизации эритроцитарных мембран и повышению их устойчивости, что, в свою очередь, способствует увеличению подвижности клеток крови в электрическом поле.

На основании проведенных исследований показано, что экзогенные биорадикалы (активные формы кислорода) специфично и дозозависимо влияют на электрокинетические свойства эритроцитов человека в условиях in vitro. При этом озоно-кислородная смесь обеспечивает снижение данного показателя, а обработка образцов крови синглетным кислородом приводит к усилению электрокинетической активности клеток крови.

Вторым компонентом данного фрагмента служила оценка влияния активных форм кислорода на характер дегидратационной структуризации плазмы крови. Установлено, что обе рассматриваемых нами активных формы кислорода оказывают модулирующее воздействие на кристаллогенные свойства биологической жидкости, причем этот эффект специфичен для озоно-кислородной смеси и газового потока, исходно содержащего

синглетный кислород. Так, по основному количественному параметру кристаллизации биосреды – кристаллизуемости – для изучаемых факторов зарегистрирована единая тенденция, заключающаяся в увеличении плотности кристаллических элементов (рис. 17). В то же время выраженность данной тенденции неодинакова: в большей степени они проявляется для синглетного кислорода, чем для озоно-кислородной смеси (+54,0 и +37,8% относительно контрольного образца соответственно; $p<0,05$ для обоих рассматриваемых воздействий).

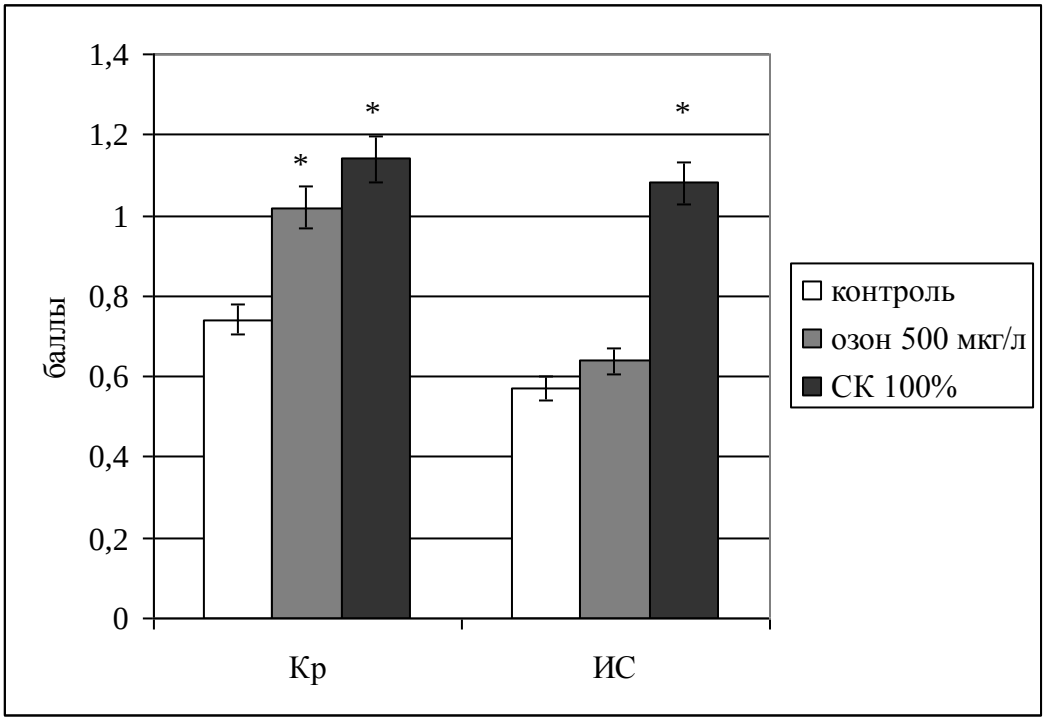

Рисунок 17 - Влияние озона и синглетного кислорода на уровень кристаллизуемости (Кр) и индекса структурности (ИС) в фациях плазмы крови человека при обработке in vitro (* - статистическая значимость различий по сравнению с контролем $p<0,05$)

Также специфичность ответа плазмы крови на обработку различными источниками радикалов реализуется и в отношении качественного показателя кристаллоскопического теста – индекса структурности, который характеризует сложность морфологии формирующихся кристаллических

фигур (рис. 17). Выявлено, что обработка биологической жидкости озоно-кислородной смесью не способствует усложнению структурных элементов, тогда как применение газового потока от генератора синглетного кислорода обеспечивает значительное повышение уровня параметра (на 89,5% по сравнению с контрольным образцом, с которыми не проводили никаких минапуляций; $p<0,05$). Морфологически эти сдвиги реализуются как обнаружение в высушенных микропрепаратах биосреды единичных дендритных элементов, отсутствующих в контрольных фациях.

Приведенная выше динамика кристаллизуемости и индекса структурности плазмы крови указывает на общее стимулирующее действие активных форм кислорода в отношении кристаллогенных свойств биосреды, однако оно выражено более отчетливо при использовании в качестве внешнего фактора газового потока от генератора синглетного кислорода.

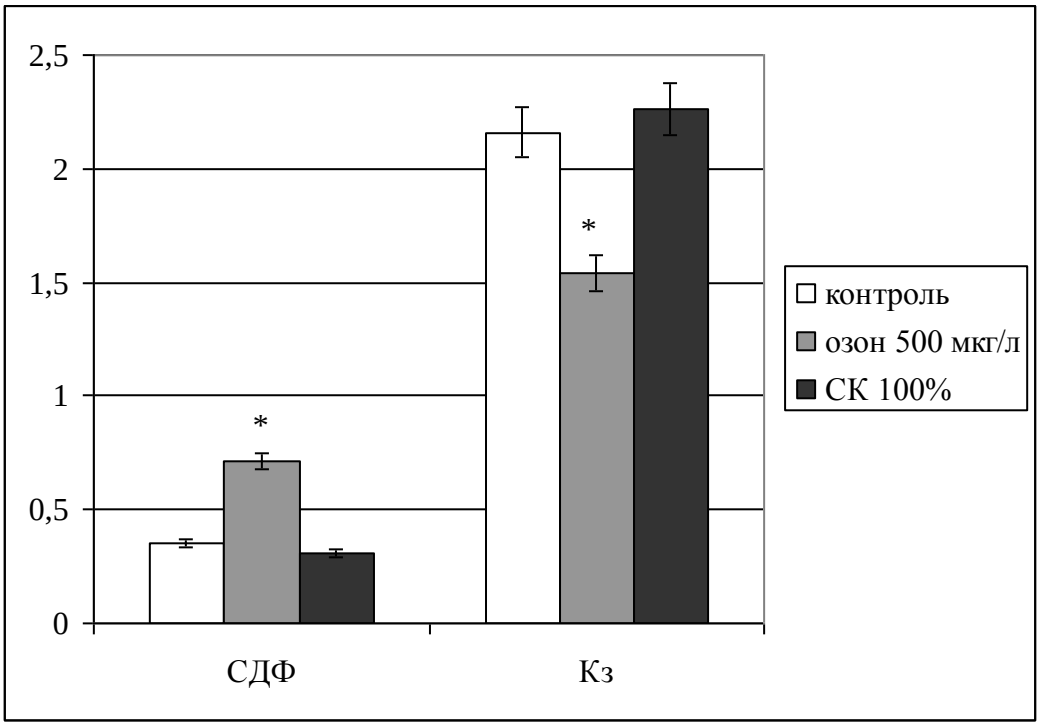

Рисунок 18 - Влияние озона и синглетного кислорода на степень деструкции фации (СДФ) и выраженность краевой зоны (Кз) в фациях плазмы крови человека при обработке in vitro (* - статистическая значимость различий по сравнению с контролем $p<0,05$)

Дополнительно нами были проанализированы показатель правильности кристаллогенеза (степень деструкции фации) и критерий, характеризующий состояние протеома биожидкости – выраженность краевой зоны микропрепарата (рис. 18). Показано, что только обработка биосреды озоно-кислородной смесью способствует значимому нарастанию степени деструкции фации (в 2,03 раза относительно контрольного уровня; $p<0,05$), причем даже в этом случае значение параметра не превышал 1 балла, что соответствует умеренной деструкции структурных элементов. С другой стороны, воздействие на биологическую жидкость газового потока, исходно содержащего синглетный кислород, не оказывало существенного влияния на данный показатель.

Аналогичные сдвиги наблюдали и в отношении выраженности краевой зоны фаций плазмы крови (рис. 18). Данный показатель, косвенно свидетельствующий о количестве нативного белка в анализируемой биосреде, сохраняется на исходном уровне при обработке биообъекта потоком от генератора «Airnergy», тогда как использование озоно-кислородной смеси приводит к снижению относительного размера краевой зоны микропрепаратов на 28,7% по сравнению с контрольным образцом ($p<0,05$). Это может быть обусловлено стимуляцией окислительной модификации белков плазмы крови при действии озона и продуктов его трансформации.

Таким образом, в условиях in vitro рассмотренные активные формы кислорода (озон и интермедиаты синглетного кислорода) повышают кристаллогенные свойства плазмы крови, причем данный эффект более выраженно проявляется в отношении потока от генератора синглетного кислорода. Следует дополнительно отметить, что последний оказывает на способность биосреды к дегидратационной структуризации более мягкое воздействие, т.к. не изменяет уровень деструкции элементов и сохраняет на физиологических значениях размеры краевой зоны фации.

2.2.2. Изучение влияния синглетного кислорода на функционально-метаболический статус организма животного

2.2.2.1. Интенсивность процессов липопероксидации и состояние антиоксидантных систем крови и тканей крыс при действии синглетного кислорода и озона

Целью данного фрагмента работы являлся сравнительный анализ особенностей влияния ингаляций синглетного кислорода и озона на состояние процессов липопероксидации и антиоксидантную активность органов и крови животного.

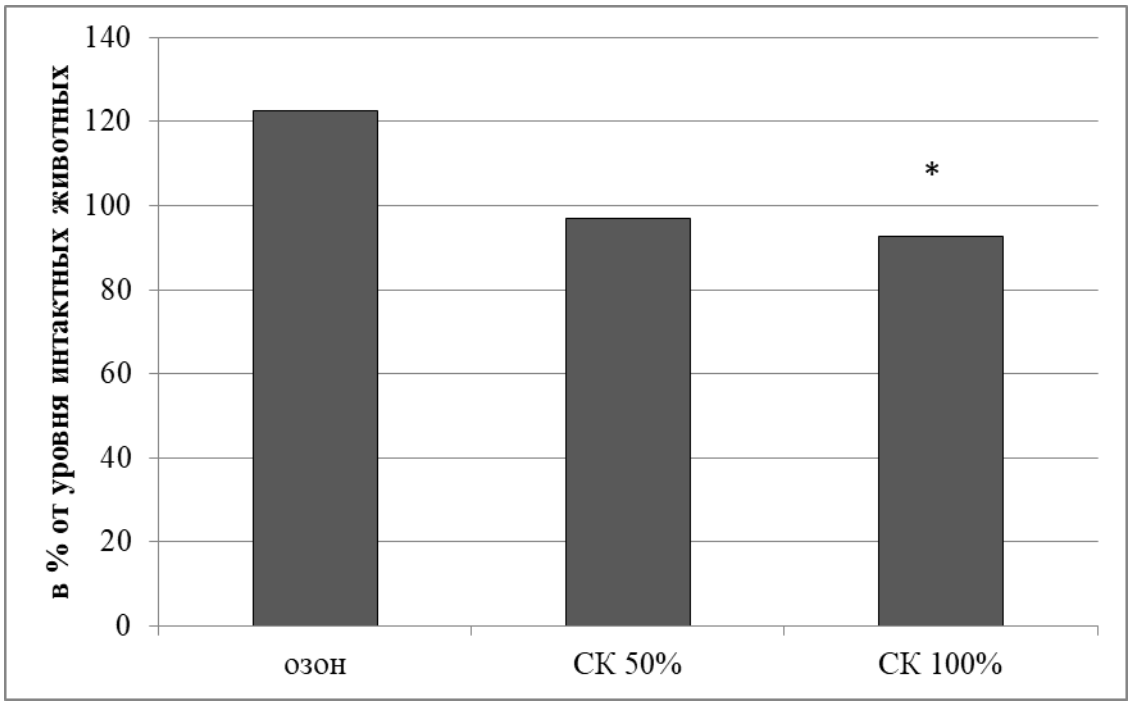

Рисунок 19 - Интенсивность липопероксидации в плазме крови крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

Проведенные исследования позволили комплексно охарактеризовать состояние окислительного метаболизма крови и тканей крыс при

ингаляционном применении активных форм кислорода. Так, на основании данных биохемилюминесцентного анализа установлено, что изучаемые воздействие оказывают неодинаковое влияние на интенсивность процессов перекисного окисления липидов в плазме крови животных (рис. 19). В частности, ингаляции озоно-кислородной смеси существенно стимулируют их (на 22,7% относительно интактной группы; $p<0,05$), тогда как использование синглетно-кислородной газовой смеси либо не изменяет данный показатель (при мощности генератора 50%), либо умеренно его снижает (на 7,3% при 100% мощности прибора; $p<0,05$ по сравнению со здоровыми животными).

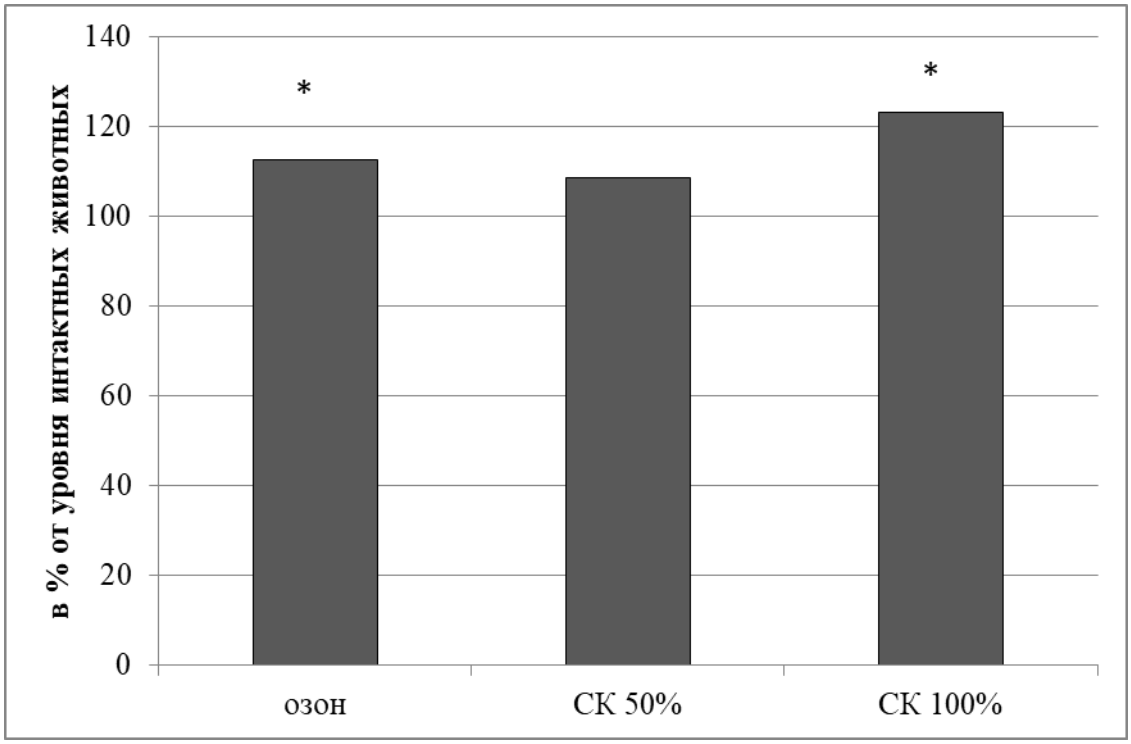

Рисунок 20 - Антиоксидантная активность плазмы крови крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

Напротив, в отношении общей антиоксидантной активности плазмы крови все исследуемые ингаляционные воздействия демонстрируют единую динамику изменения (рис. 20).

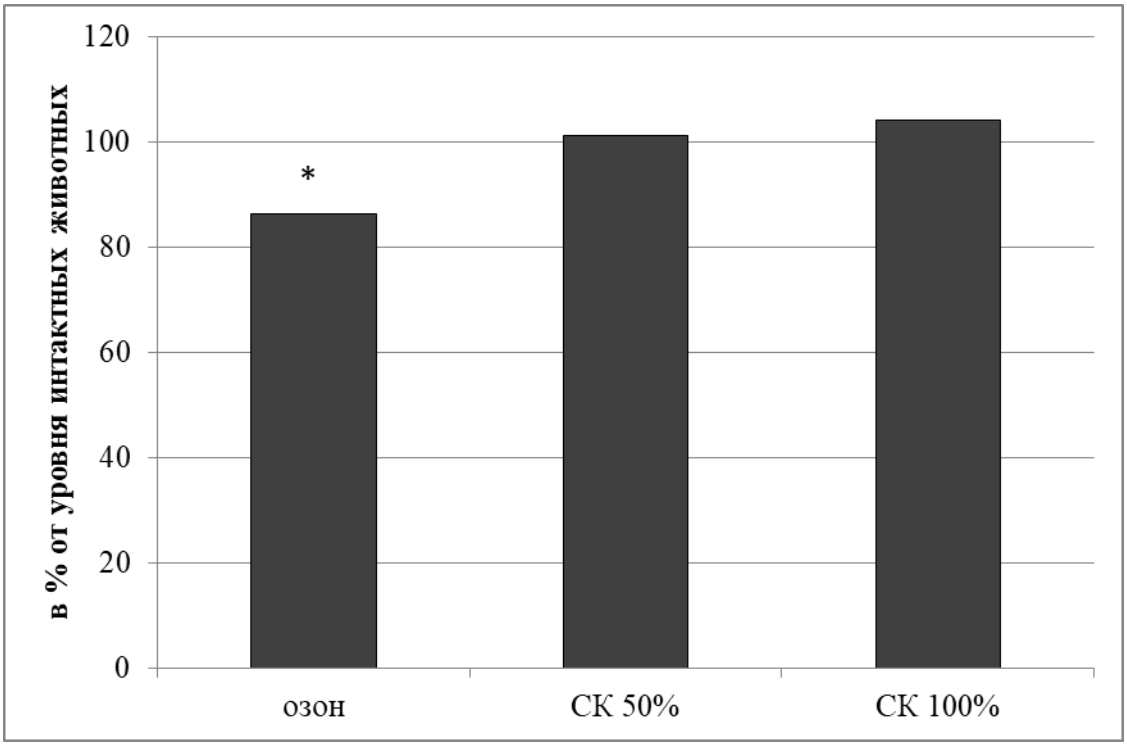

Рисунок 21 - Перекисная резистентность эритроцитов крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

Так, курс ингаляций озоно-кислородной смеси способствует статистически значимой активации антиоксидантного потенциала плазмы крови (на 12,5% относительно интактных крыс; $p<0,05$), что частично компенсирует прооксидантный эффект рассматриваемого фактора, проявляющийся в сдвигах интенсивности липопероксидации (рис. 20). Проведение 10 сеансов воздействия синглетно-кислородной смеси при мощности генератора 50% не оказывает значимого влияния на общую антиоксидантную активность биологической жидкости, тогда как

использование полной мощности прибора демонстрирует наиболее существенному повышению антиокислительной способности плазмы крови крыс (на 23,1% по сравнению с животными интактной группы; $p<0,05$). Это в совокупности с ингибирующим действием данного фактора на интенсивность свободнорадикальных процессов в ней указывает на антиоксидантные свойства ингаляций синглетного кислорода в выбранном режиме (100% мощности генератора).

Приведенные тенденции в целом находят подтверждение и в отношении процессов перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов, оцениваемых по уровню перекисной резистентности данных клеток крови (рис. 21). В частности, проведение курса сеансов воздействия озоно-кислородной смеси приводит к снижению изучаемого параметра (на 13,8% относительно интактных животных; $p<0,05$), что свидетельствует об интенсификации липопероксидации. В то же время оба варианта применения синглетно-кислородной газовой смеси (при обеих мощностях генератора) не вызывают существенных сдвигов перекисной резистентности эритроцитов ($p>0,05$ по отношению к крысам интактной группы).

Известно, что малоновый диальдегид, являющийся вторичным продуктом перекисного окисления липидов (Владимиров Ю.А. с соавт., 2009), в настоящее время рассматривается как надежный маркер интенсивности окислительных процессов в крови и тканях человека и животных. В связи с этим нами исследован уровень данного метаболита в плазме крови и эритроцитах крыс при действии активных форм кислорода, молекулярной мишенью которых непосредственно и служит баланс про- и антиоксидантных систем организма. Выявлено, что, как и в отношении биохемилюминесцентного анализа, изучаемые агенты оказываю разнонаправленное влияние на концентрацию малонового диальдегида в плазме крови и эритроцитах (рис. 22 и 23). Так, проведение курса ингаляций озона обеспечивает существенное нарастание значения параметра в плазме крови (на 41,7% по сравнению с крысами интактной группы; $p<0,05$).

Подобного эффекта не наблюдалось по завершении 10 ингаляций синглетно-кислородной смеси, образованной при 50% мощности генератора, тогда как увеличение последней до 100% способствовало снижению концентрации малонового диальдегида на 25% относительно интактных животных ($p<0,05$), что подчеркивало антиоксидантные свойства данного фактора.

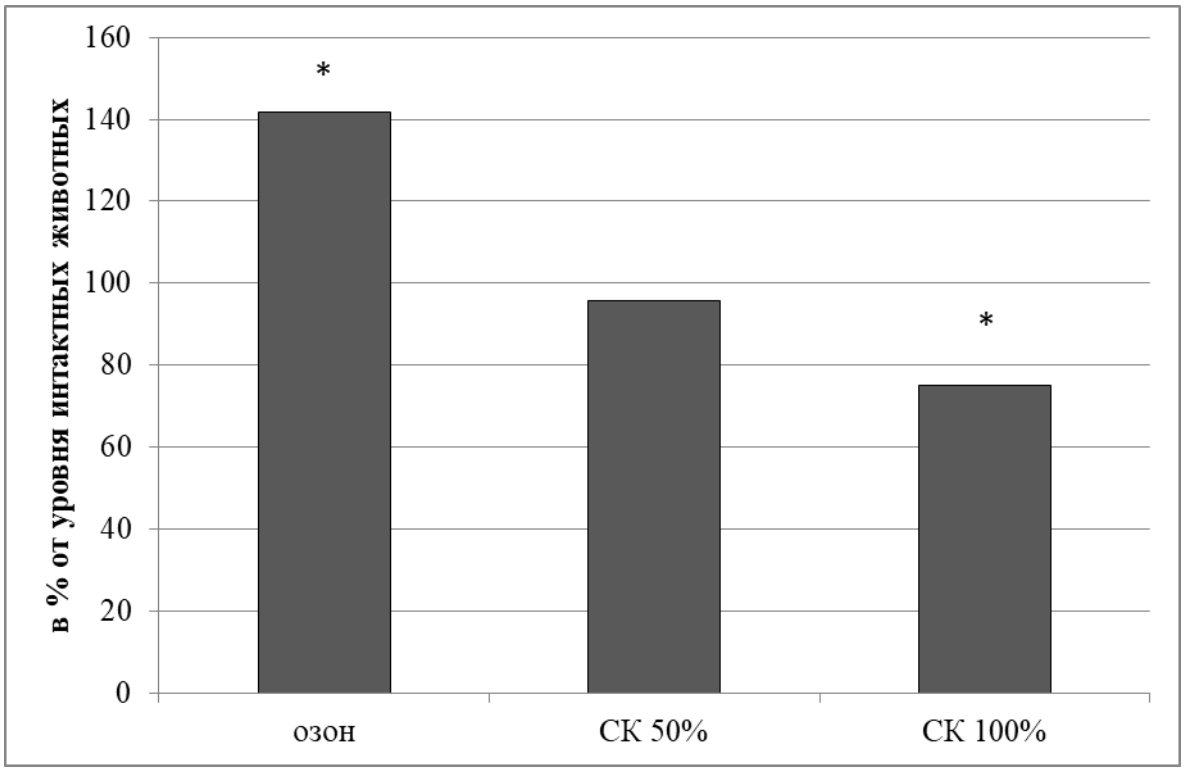

Рисунок 22 - Уровень малонового диальдегида в плазме крови крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

Динамика, аналогичная выявленной для плазмы крови, была зафиксирована и при оценке уровня данного метаболита в эритроцитах (рис. 23). В частности, внутриэритроцитарная концентрация малонового диальдегида под влиянием курса ингаляций озоно-кислородной смеси возрастала на 26,1% по сравнению с крысами, не подвергавшимися никаким

воздействиям (p<0,05), в то время как использование синглетного кислорода либо не приводило к смещению уровня показателя (при мощности генератора 50%), либо умеренно снижало его (на 13,8% относительно животных интактной группы; p<0,05) при 100% мощности.

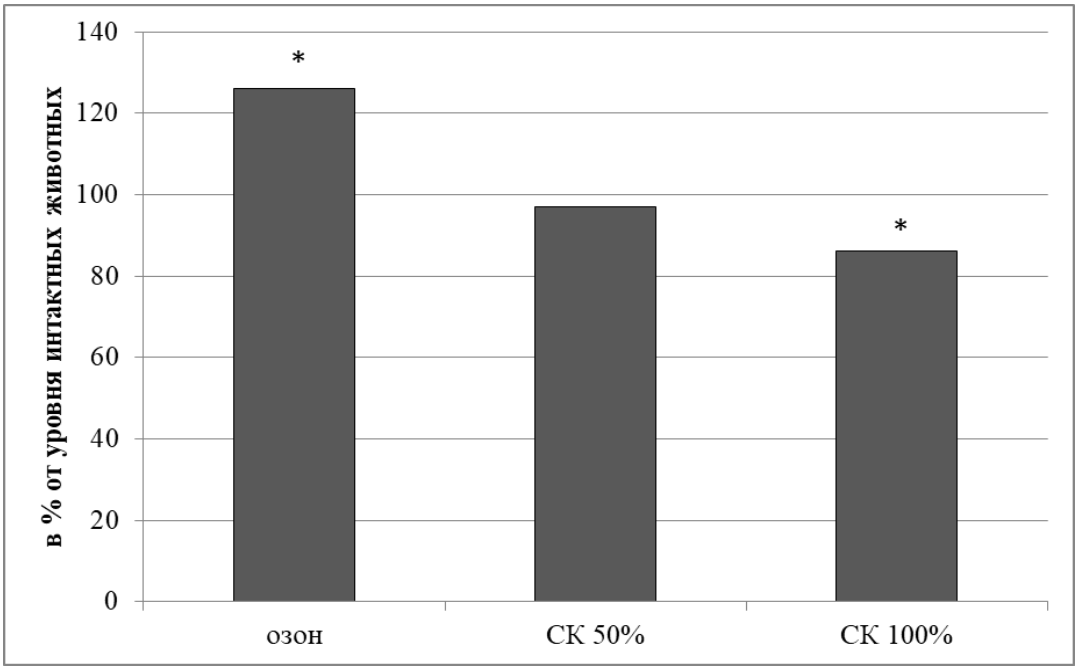

Рисунок 23 - Уровень малонового диальдегида в эритроцитов крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным p<0,05; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

Эти результаты также подтверждают характеристику озона как первично прооксидантного агента, а синглетного кислорода и его интермедиатов – как стимулятора антиоксидантной системы крови.

В целях уточнения механизмов действия изучаемых активных форм кислорода на антиоксидантные механизмы нами проведена оценка их влияния на состояние одного из основных компонентов указанной системы – супероксиддисмутазы эритроцитов (рис. 24). Исследования позволили установить, что активность данного антиоксидантного фермента значимо

ингибируется по окончании курса ингаляционного применения озоно-кислородной смеси (на 17,8% относительно крыс интактной группы; $p<0,05$). Напротив, использование в качестве воздействующего агента синглетно-кислородной газовой смеси обеспечивало активацию каталитических свойств энзима, зависящую от мощности генератора. Так, при применении половинной мощности эти сдвиги были зафиксированы на уровне тенденции (возрастание на 8,7%; $p<0,1$), тогда как полная мощность прибора способствовала существенному увеличению активности супероксиддисмутазы (на 57,3% по сравнению с животными, включенными в интактную группу; $p<0,05$).

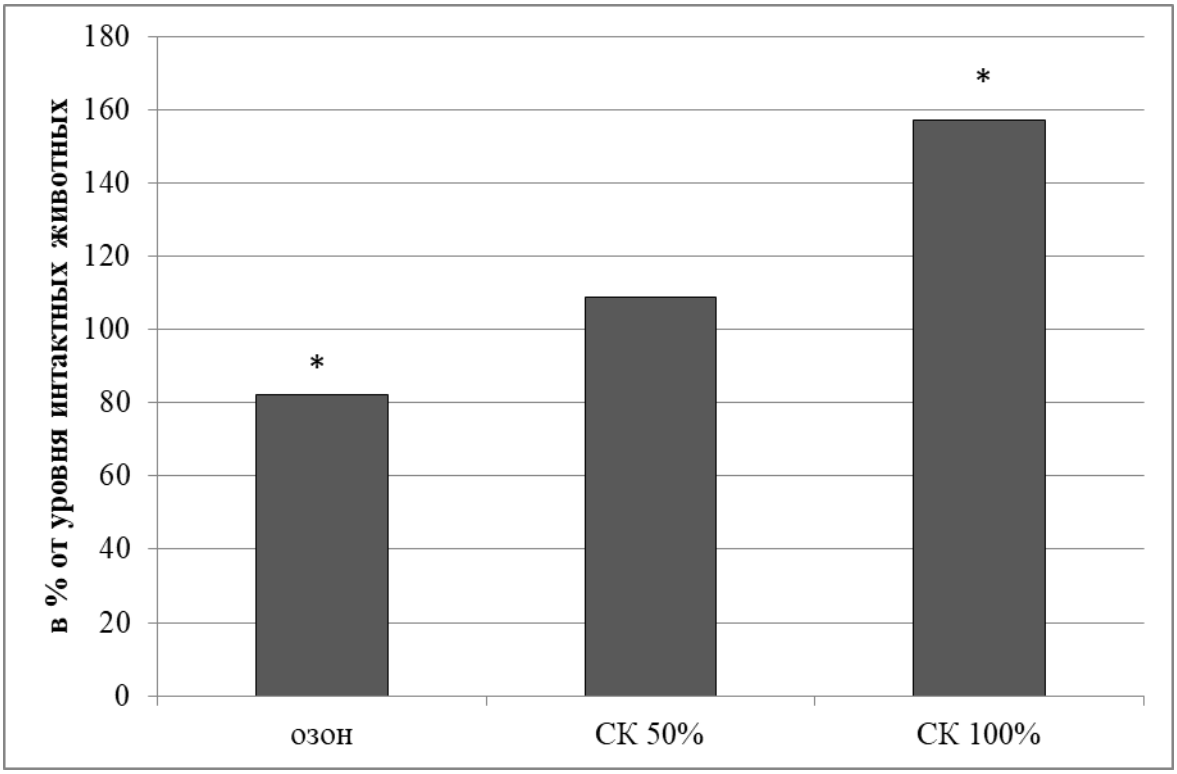

Рисунок 24 - Активность супероксиддисмутазы эритроцитов крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

Таким образом, краткий курс ингаляций озоно-кислородной смеси (10 процедур) оказывает умеренное прооксидантное действие на метаболизм крови крыс, а использование в подобной схеме синглетно-кислородной смеси, образованной при полной мощности генератора, выступает как стимулятор антиоксидантного потенциала биологической жидкости.

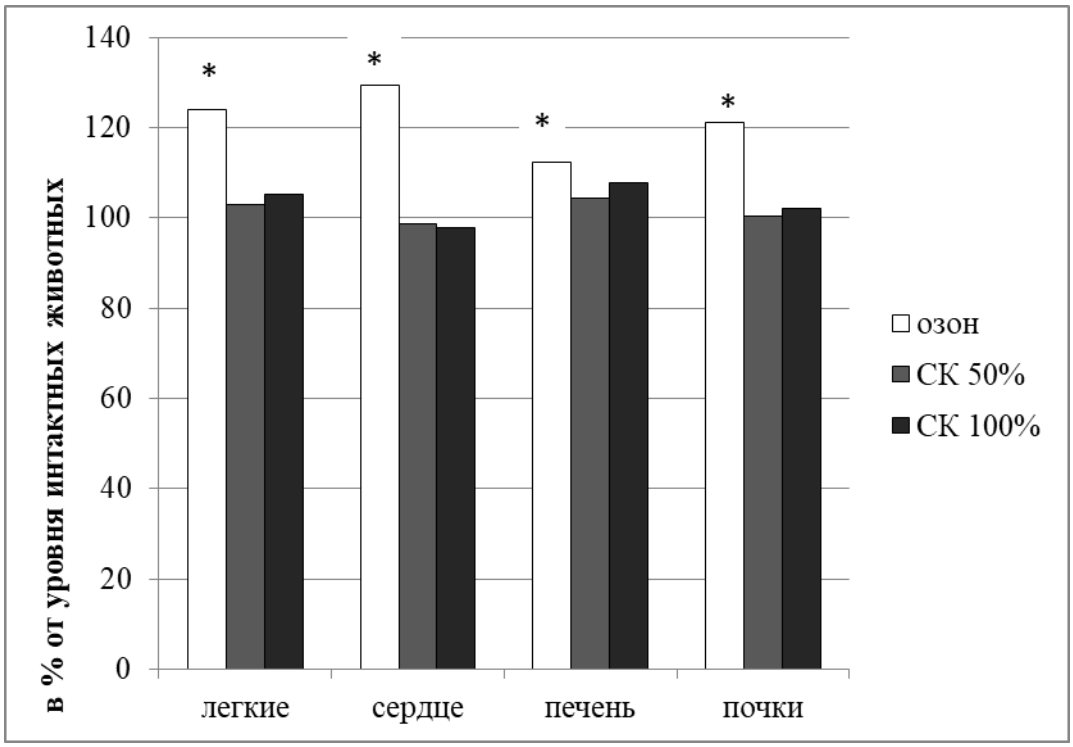

Рисунок 25 - Интенсивность липопероксидации в ткани органов крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

Характеристика воздействия рассматриваемых факторов на баланс про- и антиоксидантных систем была нами дополнена оценкой интенсивности свободнорадикальных процессов и общей антиоксидантной активности тканей организма крыс. Установлено, что проведение курса ингаляций озоно-кислородной смеси вызывает стимуляцию процессов перекисного окисления липидов во всех изученных органах животных (рис. 25), причем наиболее

выражена указанная тенденция в сердце и легких крыс (повышение светосуммы индуцированной биохемилюминесценции на 29,4 и 24,0% по сравнению с интактной группой соответственно; p<0,05 для обоих органов). В почках и печени интенсификация липопероксидации также достаточно значительна (на 21,1 и 12,2% относительно контроля соответственно; p<0,05 для обоих органов). Напротив, по завершении полного курса ингаляций синглетно-кислородной газовой смеси ни в одном из изученных органов не выявили статистически значимого повышения уровня показателя. Тенденция к таковому была зафиксирована лишь в печени при использовании 100% мощности генератора (увеличение интенсивности перекисного окисления липидов на 7,7% относительно крыс, которых не подвергали никаким воздействиям; p<0,1).

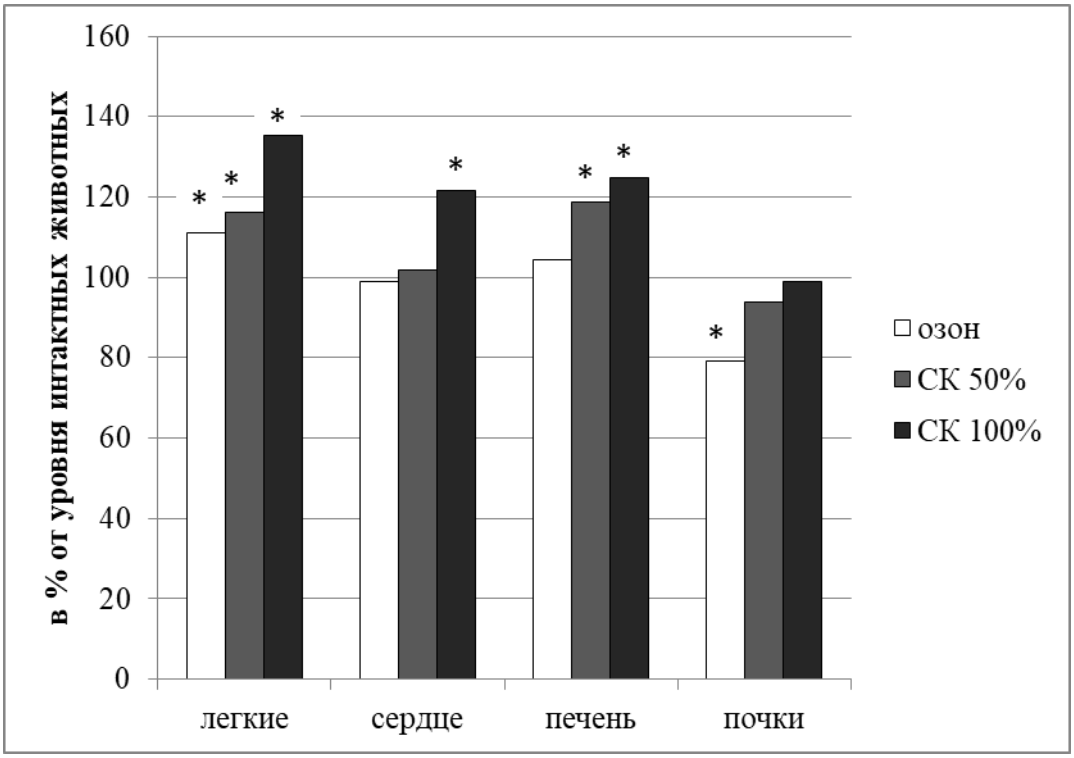

Рисунок 26 - Антиоксидантная активность в ткани органов крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным p<0,05; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

Анализ общей антиоксидантной активности гомогенатов тканей позволил установить, что изучаемые воздействия оказывают неодинаковое влияние на нее (рис. 26), причем эти эффекты органоспецифичны. Так, в легких все активные формы кислорода способствуют повышению антиоксидантного потенциала, однако степень выраженности указанного действия существенно различается. Наиболее значимое увеличение уровня параметра обнаружено при использовании синглетного кислорода, образованного при 100% мощности генератора (на 35,2% по сравнению с животными интактной группы; $p<0,05$). Снижение мощности последнего до 50% приводило к снижению антиоксидантных свойств (нарастание параметра на 16,1% относительно интактных крыс; $p<0,05$), что было сопоставимо с влиянием озоно-кислородной смеси (+11%; $p<0,05$). Следует отметить, что уровень антиоксидантной активности ткани легких в первом случае также был статистически значимо выше, чем при других воздействиях ($p<0,05$ для обоих случаев).

В гомогенатах сердца существенные сдвиги общей антиоксидантной активности были зарегистрированы только по завершении курса ингаляций синглетно-кислородной газовой смеси, образованной при 100% мощности прибора (увеличение в 1,22 раза по сравнению с крысами, с которыми не проводили никаких дополнительных манипуляций; $p<0,05$), в то время как при использовании половинной мощности генератора и проведении ингаляций озоно-кислородной смеси значимых изменений уровня показателя не обнаружено.

В гомогенатах печени крыс стимуляцию антиоксидантного потенциала наблюдали только при применении синглетно-кислородной смеси, причем в этом случае мощность прибора не оказывала существенного влияния на значимость эффекта, но определяла его выраженность. Фиксировали увеличение значения параметра на 18,6 и 24,8% при мощностях генератора 50 и 100% соответственно ($p<0,05$ для обоих случаев), что свидетельствует о

дозозависимости выявленного эффекта. Следует отметить, что использование озоно-кислородной смеси не оказывало существенного действия на рассматриваемый показатель.

Обратную динамику наблюдали при изучении общей антиоксидантной активности гомогенатов почек крыс (рис. 26). В этом органе статистически значимые сдвиги регистрировали только по завершении курса ингаляций озоно-кислородной смеси, для которых было характерно снижение уровня показателя на 20,7% относительно животных интактной группы ($p<0,05$), тогда как ни один из режимов воздействия синглетно-кислородной газовой смеси не вызывал существенных изменений показателя.

В целом, анализ влияния ингаляций активных форм кислорода на окислительный метаболизм крови и тканей позволил продемонстрировать дифференцированный характер ответа, причем озоно-кислородная смесь обладает умеренным прооксидантным действием, а применение синглетно-кислородной газовой смеси (в первую очередь – при 100% мощности генератора) способствует стимуляции антиоксидантного потенциала, что в том числе реализуется за счет активации супероксиддисмутазы.

3.2.2. Оценка действия ингаляций активных форм кислорода на энергетический метаболизм организма животных

Известно, что окислительный метаболизм крови и тканей тесно сопряжен с их энергетическим обменом (Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б., 2001; Костюк В.А., Потапович А.И., 2004; Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. с соавт., 2008). Следовательно, формирование сдвигов состояния про- и антиоксидантных систем организма при системном действии активных форм кислорода должно сопровождаться изменениями энергетического обмена, однако сведения в этом как в профильной литературе единичны (Соловьева А.Г. с соавт., 2016). В связи с этим, целью фрагмента работы служило сравнительное изучение метаболического

действия ингаляций озона и синглетного кислорода на энергетический обмен крови и гомогенатов тканей у здоровых животных.

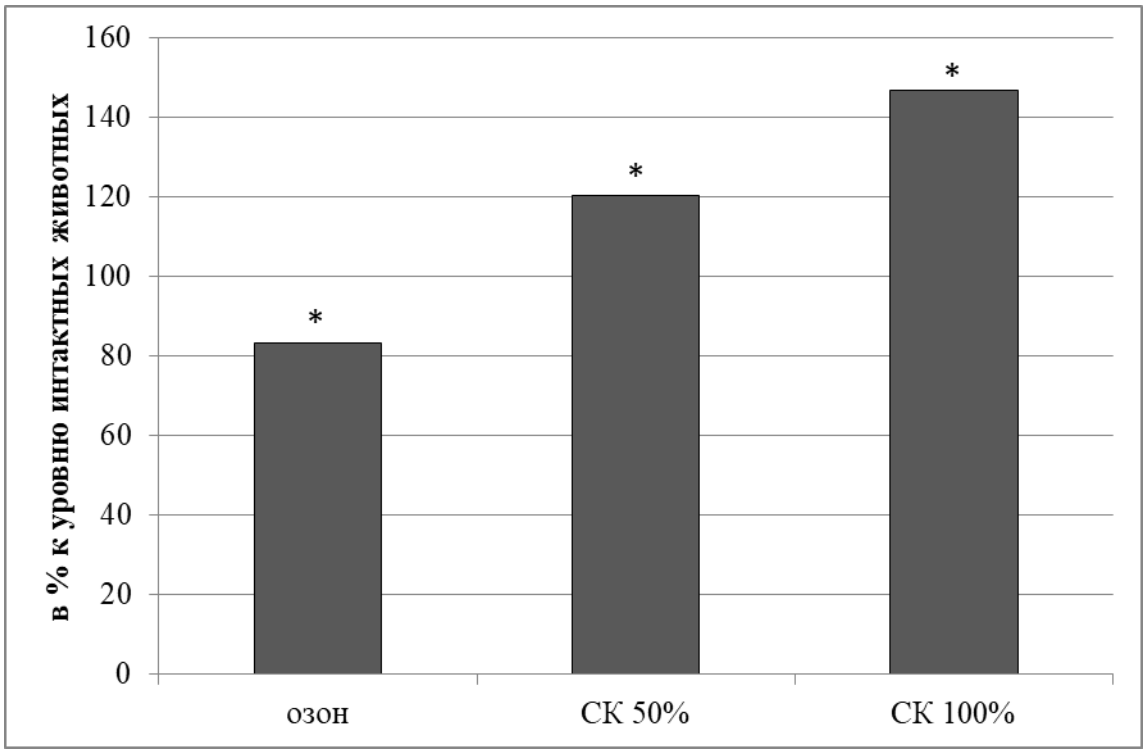

Рисунок 27 - Активность лактатдегидрогеназы эритроцитов крыс в прямой реакции при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

На основании проведенных исследований установлено, что рассматриваемые активные формы кислорода оказывают разнонаправленное действие на активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) эритроцитов в прямой реакции (рис. 27). Так, проведение курса ингаляций озоно-кислородной смеси способствует снижению каталитической активности фермента относительно животных интактной группы (на 16,8%; $p<0,05$), а использование синглетно-кислородной газовой смеси повышает ее. При этом степень данной активации энзима непосредственно зависит от примененной

мощности генератора синглетного кислорода: при 50% мощности аппарата происходит увеличение показателя на 20,3% по сравнению с интактными крысами (p<0,05), а при 100% мощности – на 46,8% (p<0,05).

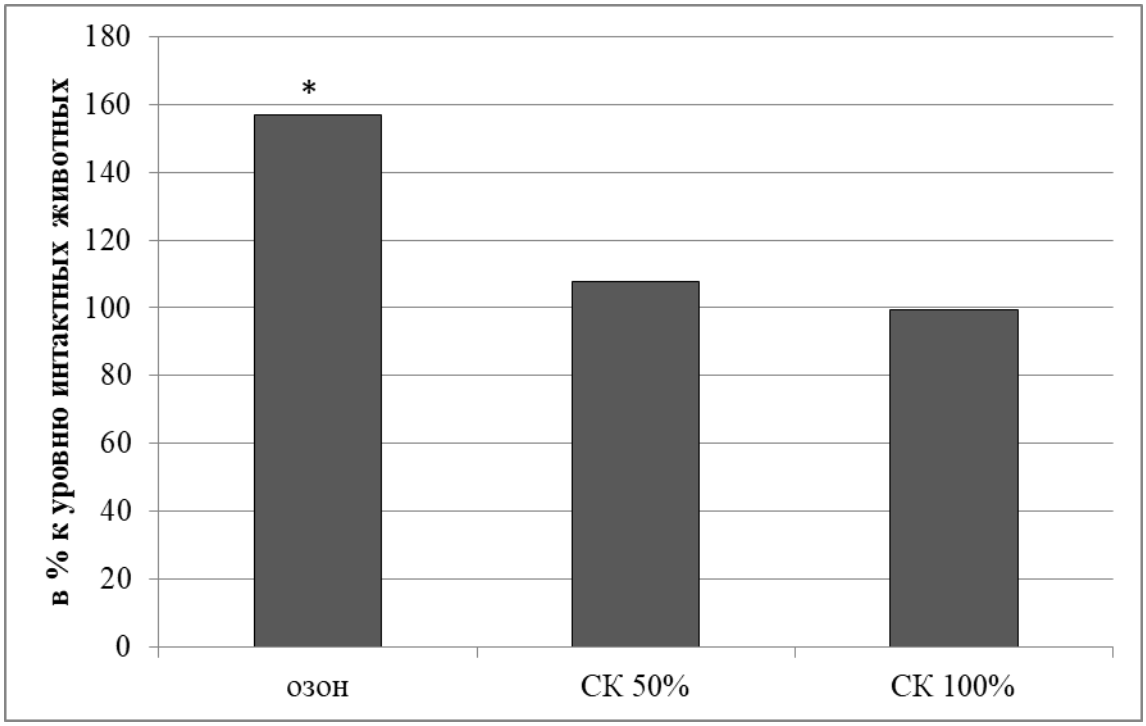

Рисунок 28 - Активность лактатдегидрогеназы эритроцитов крыс в обратной реакции при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным p<0,05; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

Противоположную тенденцию наблюдали в отношении обратной реакции лактатдегидрогеназы эритроцитов (рис. 28). В частности, курсовое применение озоно-кислородной смеси вызывает существенную активацию каталатических свойств изучаемого фермента на 56,7% по сравнению с крысами, не получавшими ингаляций активных форм кислорода (p<0,05). При этом проведение 10 ежедневных процедур вдыхания животными синглетно-кислородной газовой смеси не вызывали сдвигов активности рассматриваемого энзима относительно животных интактной группы вне

зависимости от используемой мощности генератора синглетного кислорода (50 или 100%).

Подобный характер влияния источников радикалов на каталитические свойства лактатдегидрогеназы наиболее наглядно отобразился в сдвигах коэффициента баланса энергетических реакций (Соловьева А.Г., Зимин Ю.В., 2012) который позволяет интегрировать активность фермента в прямой и обратной реакциях, а также уточнять направленность этих изменений (Мартусевич А.К. с соавт., 2013).

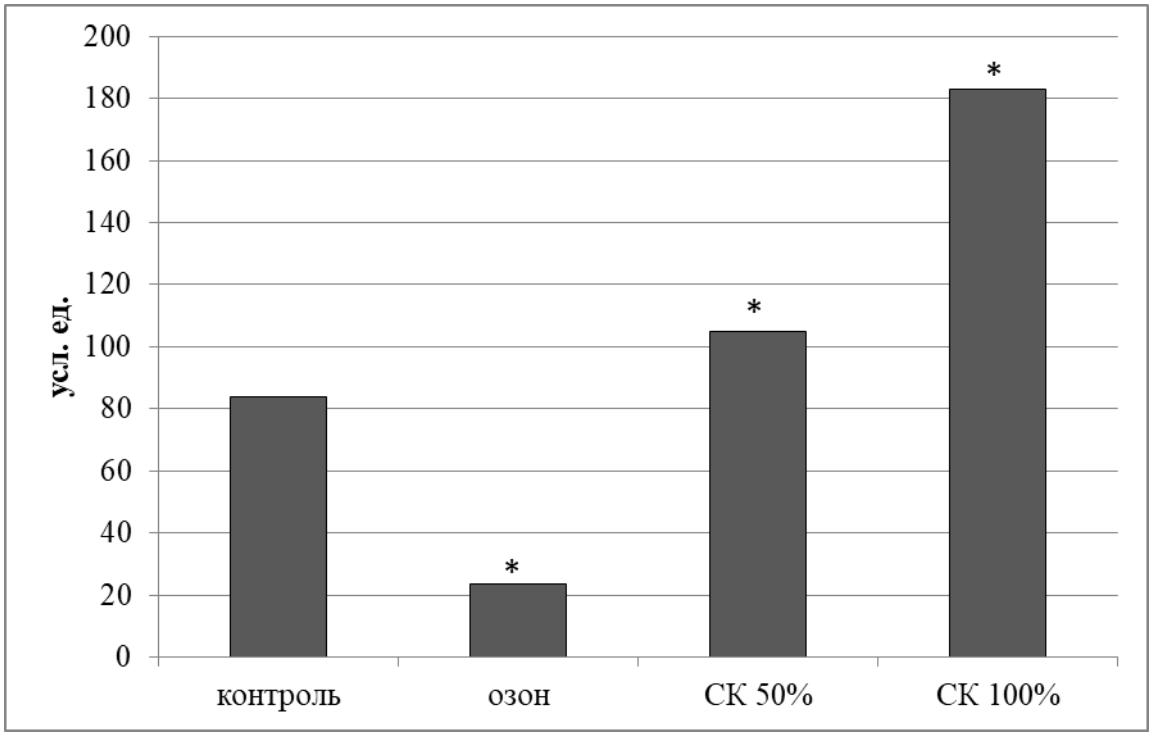

Рисунок 29 - Коэффициент баланса энергетических реакций в крови крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$)

Установлено, что под влиянием курса ингаляций озоно-кислородной смеси изучаемый коэффициент снижается в 3,55 раза по отношению к интактным животным ($p<0,05$). Данный эффект складывается из

ингибирования активности лактатдегидрогеназы в прямой реакции, реализующегося на фоне стимуляции обратной реакции (рис. 29). Следует отметить, что подобный режим функционирования фермента не является оптимальным, так как способствует накоплению промежуточного продукта энергетического метаболизма – лактата - и косвенно свидетельствует о формирующейся тканевой гипоксии (Griendling K.K., FitzGerald G.A., 2003).

Напротив, при проведении курса ингаляций синглетно-кислородной газовой смесью имеет место нарастание коэффициента баланса энергетических реакций, реализующееся за счет синергетического увеличения активности лактатдегидрогеназы в прямой реакции при сохранности свойств фермента в обратной реакции. Следует отметить, что данный эффект дозозависим, так как степень нарастания изучаемого показателя определяется примененной мощностью генератора синглетного кислорода. Так, при использовании 50% мощности прибора коэффициент баланса энергетических реакций повышается на 25% относительно животных интактной группы ($p<0,05$), а то время как при 100% мощности аппарата – в 2,18 раза соответственно ($p<0,05$). Это является отображением общей стимуляции промежуточного звена энергетического метаболизма, т.к. приводит к увеличению образования пирувата, пополняющего цикл Кребса и обеспечивающего нарастание продукции макроэргических соединений (Костюк В.А., Потапович А.И., 2004). Данный факт позволяет говорить о положительном влиянии интермедиатов синглетного кислорода на состояние энергетического обмена, что подтверждает результаты, полученные в экспериментах на образцах крови in vitro.

Одним из дополнительных критериев, характеризующих направленность и активность энергетического метаболизма, служит уровень лактата, вследствие чего нами также проведена оценка плазменного уровня данного метаболита в крови животных сформированных групп (рис. 30). Выявлено, что под влиянием курса ингаляций озоно-кислородной смеси происходит увеличение указанного показателя на 34,8% по сравнению с

крысами интактной группы (p<0,05), что объясняется превалированием обратной реакции лактатдегидрогеназы на прямой в этом случае, показанным на предшествующих рисунках 35-36. Подобные сдвиги при их реализации не только в крови, но и в тканях, создают предпосылки для развития признаков гипоксии в них.

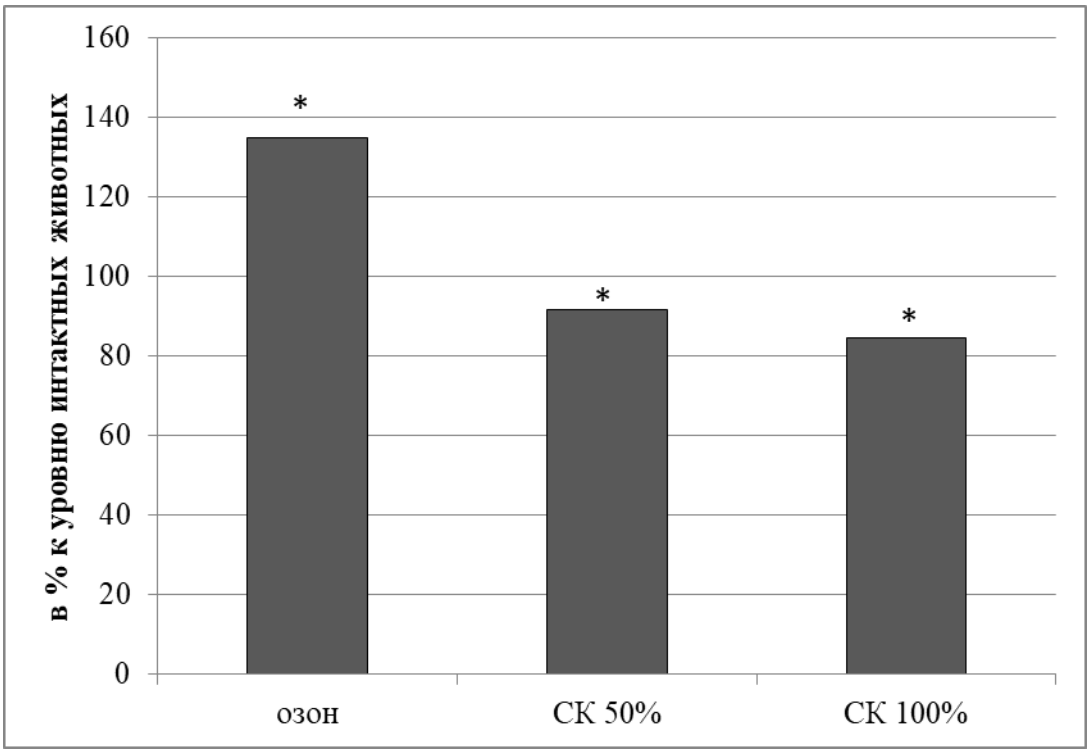

Рис. 30 - Уровень лактата плазмы крови крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным p<0,05; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

С другой стороны, проведение курса воздействия синглетно-кислородной смеси, инициируя активацию прямой реакции лактатдегидрогеназы, обеспечивает утилизацию в ней лактата, что приводит к снижению его плазменной концентрации (рис. 30). Важно отметить, что, как и в отношении модификации каталитических свойств фермента в прямой

и обратной реакциях, редукция уровня лактата плазмы крови зависит от мощности генератора синглетного кислорода. Так, при использовании 50% мощности прибора наблюдали лишь умеренное, но статистически значимое снижение концентрации метаболита в плазме крови по сравнению с животными интактной группы (на 8,5%; $p<0,05$), тогда как при применении полной мощности аппарата (100%) указанная тенденция выражена более существенно (–15,3%; $p<0,05$). Это дополнительно позволяет с положительной стороны охарактеризовать метаболическое действие интермедиатов синглетного кислорода.

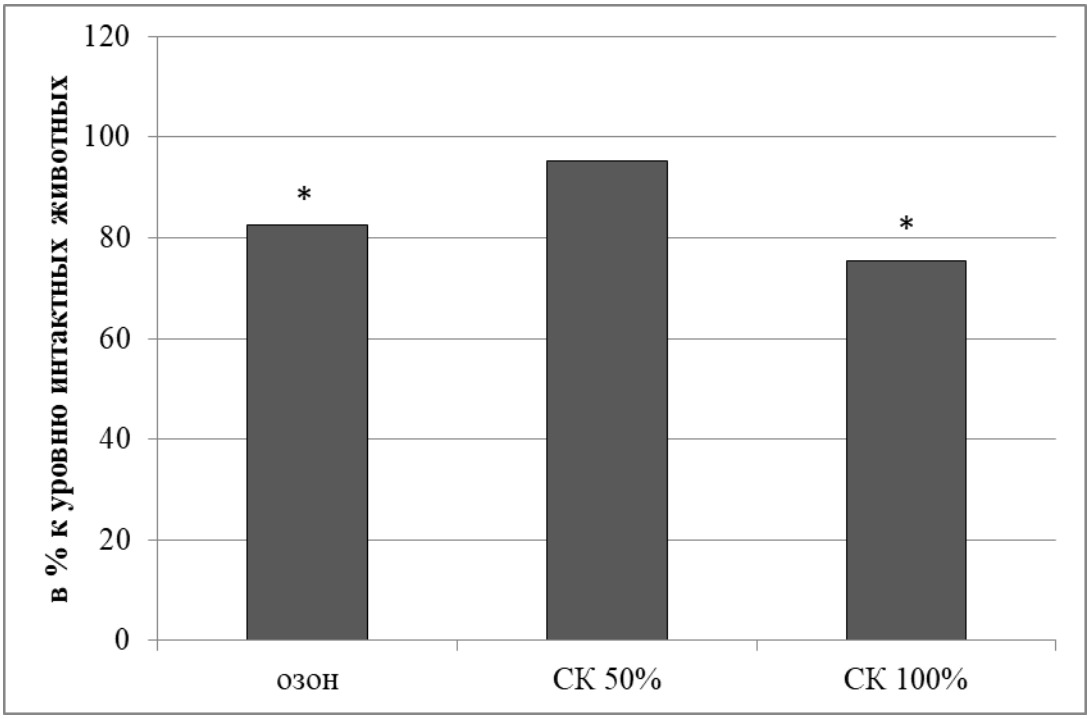

Рисунок 31 - Уровень глюкозы в плазме крови крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

Известно, что уровень гликемии является результирующей состояния энергетического метаболизма крови и тканей (Halliwell B.; Gutteridge J.M.C.,

1999; Genestra M., 2007). Следовательно, ее оценка служит интегративным маркером влияния рассматриваемых активных форм кислорода на энергетический обмен организма. Нашими исследованиями показано, что применение курсов ингаляций озоно-кислородной (при использовании стандартной терапевтической концентрации озона) и синглетно-кислородной газовых смесей (при полной мощности генератора) способствует снижению уровня глюкозы в плазме крови на 17,4 и 24,7% относительно крыс интактной группы соответственно ($p<0,05$ для обоих случаев). В то же время проведение ингаляций синглетно-кислородной смеси при использовании половинной мощности аппарата не вызывает значимых изменений уровня глюкозы в плазме крови (рис. 31). По нашему мнению, установленное позитивное влияние озоно-кислородной смеси на плазменную концентрацию глюкозы при негативном эффекте на каталитические свойства лактатдегидрогеназы эритроцитов может реализоваться за счет тканевых эффектов озона и продуктов его трансформации в организме. С данных позиций представляет значительный интерес оценка состояния промежуточного звена энергетического метаболизма в основных органах и тканях. Для решения этой задачи нами было проведено исследование активности лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакциях в гомогенатах легких, сердца, почек и печени с расчетом коэффициента баланса энергетических реакций в каждом из них (рис. 40-42).

Выявлено, что рассматриваемые активные формы кислорода оказывают разнонаправленное влияние на активность лактатдегидрогеназы тканей крыс в прямой реакции (рис. 32). В частности, в гомогенатах легких применение озоно-кислородной смеси способствует снижению уровня параметра на 15,8% относительно животных интактной группы ($p<0,05$), в то время как воздействие интермедиатов синглетного кислорода на легочную ткань сопровождается возрастанием прямой реакции фермента в ней, причем эта тенденция дозозависима. Так, использование половинной мощности генератора повышает активность энзима на 16% по сравнению с крысами, с

которым не производили никаких манипуляций (p<0,05), при 100% мощности прибора – на 26,5% соответственно (p<0,05).

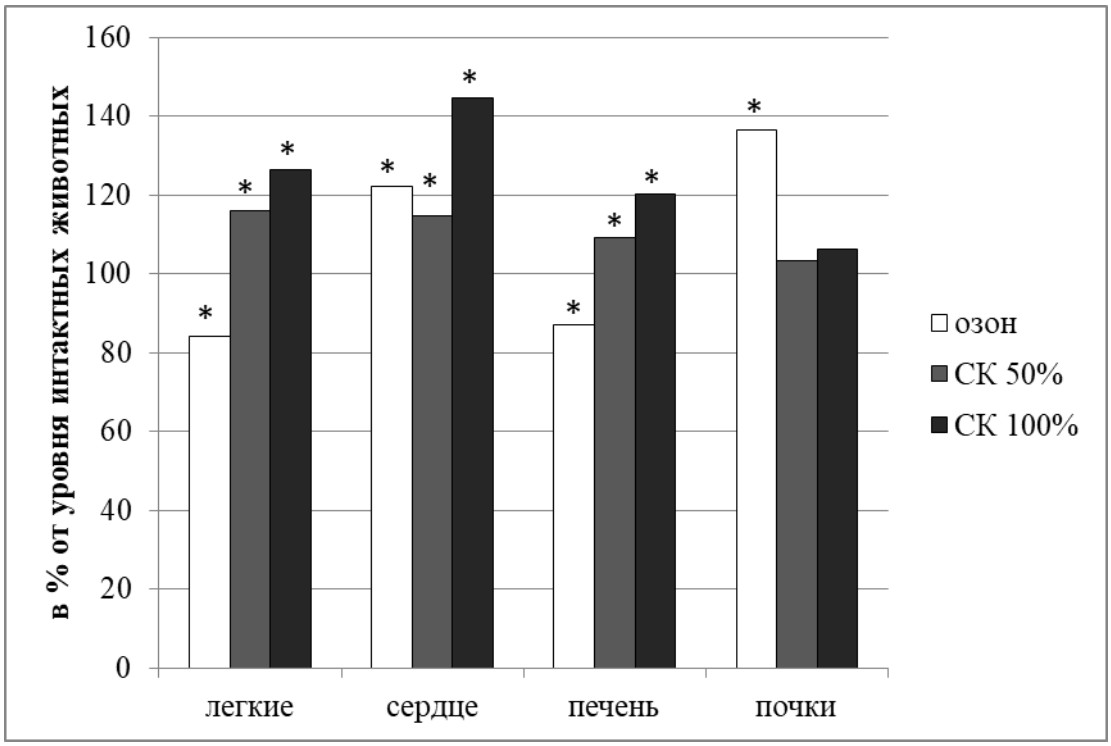

Рисунок 32 - Активность лактатдегидрогеназы тканей крыс в прямой реакции при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным p<0,05; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

В гомогенатах сердца активность лактатдегидрогеназы в прямой реакции возрастала при всех тестируемых воздействиях, однако выраженность данного эффекта существенно вариьровала. Так, курсы ингаляций озоно-кислородной смеси и синглетно-кислородной газовой смеси (при половинной мощности генератора) примерно в равной степени стимулировали каталитические свойства рассматриваемого фермента в прямой реакции (на 22,2 и 14,8% относительно интактных крыс соответственно; p<0,05 для обоих факторов), тогда как применение синглетно-кислородной смеси,

синтезированной при полной мощности аппарата демонстрировало более отчетливое активирующее действие на прямую реакцию лактатдегидрогеназы (+44,6%; $p<0,05$).

Характер модификации каталитических свойств рассматриваемого энзима в гомогенатах печени был в целом сопоставим с описанным для образцов ткани легких, однако амплитуда сдвигов показателя в данном органе была несколько ниже, чем в последних.

Наконец, особая динамика активности изучаемого фермента энергетического метаболизма была зарегистрирована в образцах ткани почек. Установлено, что в гомогенатах ткани указанного органа существенное изменение значения параметра по сравнению с интактными животными имело место лишь при использовании для ингаляций озоно-кислородной смеси (на 36,4%; $p<0,05$). При этом применение синглетно-кислородного воздействия на оказывало значимого влияния на активность фермента ни при одном из рассмотренных режимов.

Вариабельность действия различных активных форм кислорода на каталитические свойства лактатдегидрогеназы в обратной реакции также определялась их типом (рис. 33). В этом плане следует обратить внимание на то, что выявленные для указанной реакции тенденции сдвига практически противоположны установленным для прямой. Так, в ткани легких активность фермента в обратной реакции существенно возрастала (на 68,7% относительно интактных животных; $p<0,05$). Напротив, при действии синглетно-кислородной газовой смеси каталитические свойства энзима в обратной реакции умеренно ингибируются (на 10,5 и 23,5% при 50 и 100% мощностях генератора соответственно; $p<0,05$ для обоих случаев). Подобные, но меньшие по модулю изменения зафиксированы в ткани печени, что аналогично сдвигам, установленным для прямой реакции фермента в данном органе.

Кроме того, единая тенденция к угнетению каталитических свойств лактатдегидрогеназы в прямой реакции отмечена при действии

рассматриваемых активных форм кислорода в гомогенатах ткани сердца (рис. 33). При этом наиболее значительное снижение выявлено при действии синглетно-кислородной смеси, образованной при полной мощности аппарата (на 23,2% относительно интактных животных; $p<0,05$). Остальные воздействия были менее значимы и сопоставимы по интенсивности ингибирующего эффекта.

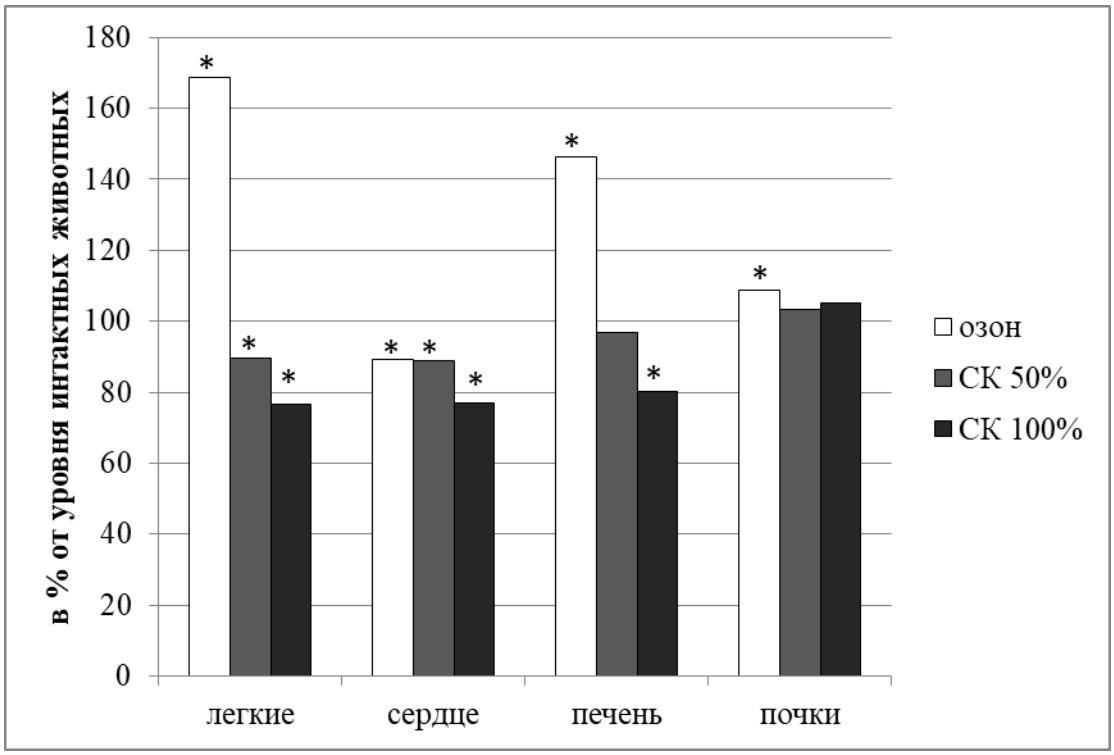

Рисунок 33 - Активность лактатдегидрогеназы тканей крыс в обратной реакции при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

В ткани почек существенные отклонения были зафиксированы только при проведении курса ингаляций озоно-кислородной смеси и проявлялись в нарастании значения показателя на 8,7% по сравнению с группой животных, не подвергавшихся никаким манипуляциям, кроме обследования ($p<0,05$).

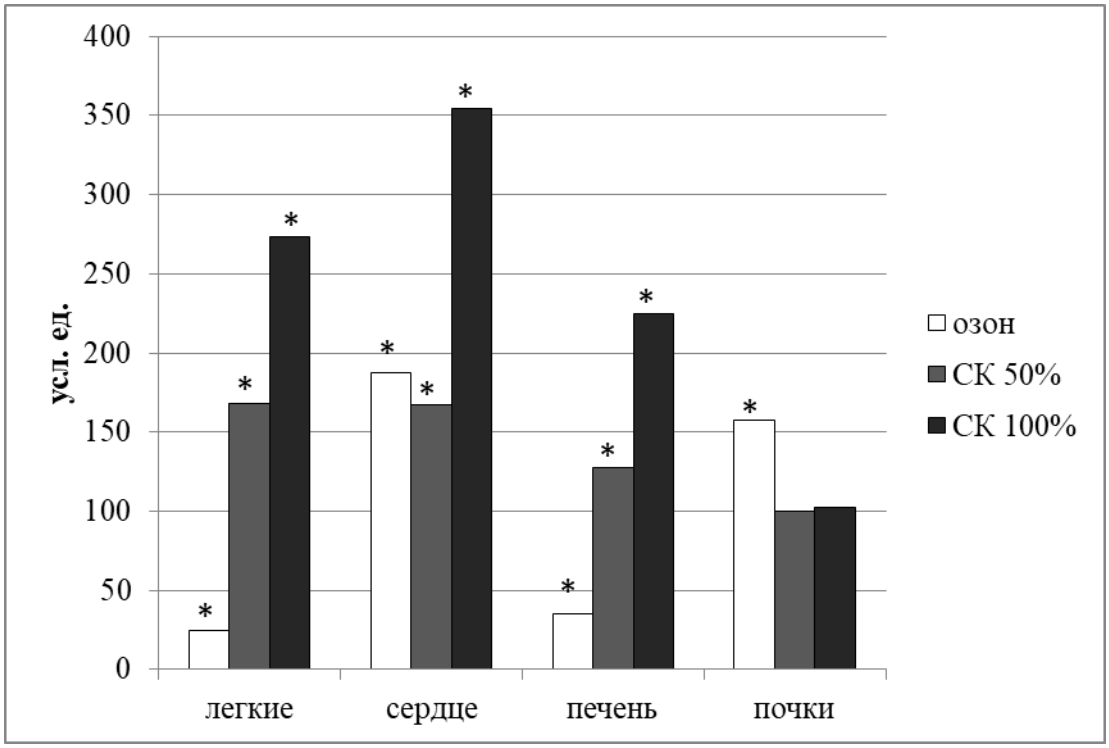

Рисунок 34 - Коэффициент баланса энергетических реакций в тканях органов крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимость различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

Тенденции изменений, приведенные для прямой и обратной реакций лактатдегидрогеназы и ассоциированные с применением активных форм кислорода, были интегрированы в рамках расчета коэффициента баланса энергетических реакций (рис. 34). Сущность данного показателя, представляющего собой квадрат отношения активности лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакциях (Соловьева А.Г., Зимин Ю.В., 2012; Мартусевич А.К. с соавт., 2013), указывает на прямую взаимосвязь между уровнем параметра и продукцией пирувата – субстрата для цикла Кребса, в котором непосредственно реализуется тканевая энергопродукция путем синтеза макроэргических соединений (АТФ, креатинфосфат и др.). Исходя из

этого, в ткани легких направленность сдвигов промежуточного звена энергетического метаболизма, оцениваемая с помощью коэффициента баланса энергетически реакций, указывает в случае использования озона на превалирование обратной реакции лактатдегидрогеназы, что способствует накоплению лактата и формировании тканевой гипоксии.

Иные источники активных форм кислорода, включающие курс ингаляций синглетно-кислородной газовой смеси, дозозависимо повышают коэффициент баланса энергетических реакций в легочной ткани (рис. 34). Так, при 50% мощности генератора синглетного кислорода уровень показателя увеличивался на 68% по сравнению с крысами интактной группы ($p<0,05$), а при использовании 100% режима – в 2,73 раза соответственно ($p<0,05$).

В гомогенатах сердца коэффициент баланса энергетических реакциях возрастал при всех изучаемых воздействиях, но в максимальной степени – при применении синглетно-кислородной смеси в режиме 100% мощности генератора (в 3,54 раза по отношению с животными интактной группы; $p<0,05$). Подобный характер ответа был характерен и для образцов ткани печени, однако в ткани сердца наблюдали снижение коэффициента баланса энергетических реакций при проведении курса ингаляций озоно-кислородной смеси (на 64,5%; $p<0,05$). С другой стороны, только это воздействие повышало значение рассматриваемого показателя в гомогенатах почек (на 57,5% по сравнению с крысами, с которыми не осуществляли никаких дополнительных манипуляций; $p<0,05$). Применение синглетно-кислородной газовой смеси не оказывали действия на коэффициент баланса энергетических реакций в данном органе.

Таким образом, активные формы кислорода при ингаляционном применении оказывают неодинаковое влияние на состояние энергетического обмена в тканях животных, причем синглетно-кислородная газовая смесь обладает преимущественных стимулирующим действием на него (прежде всего – в ткани легких, сердца и почек), тогда как озоно-кислородная смесь

активирует энергетический обмен в сердце и почках, угнетая его в легких и печени.

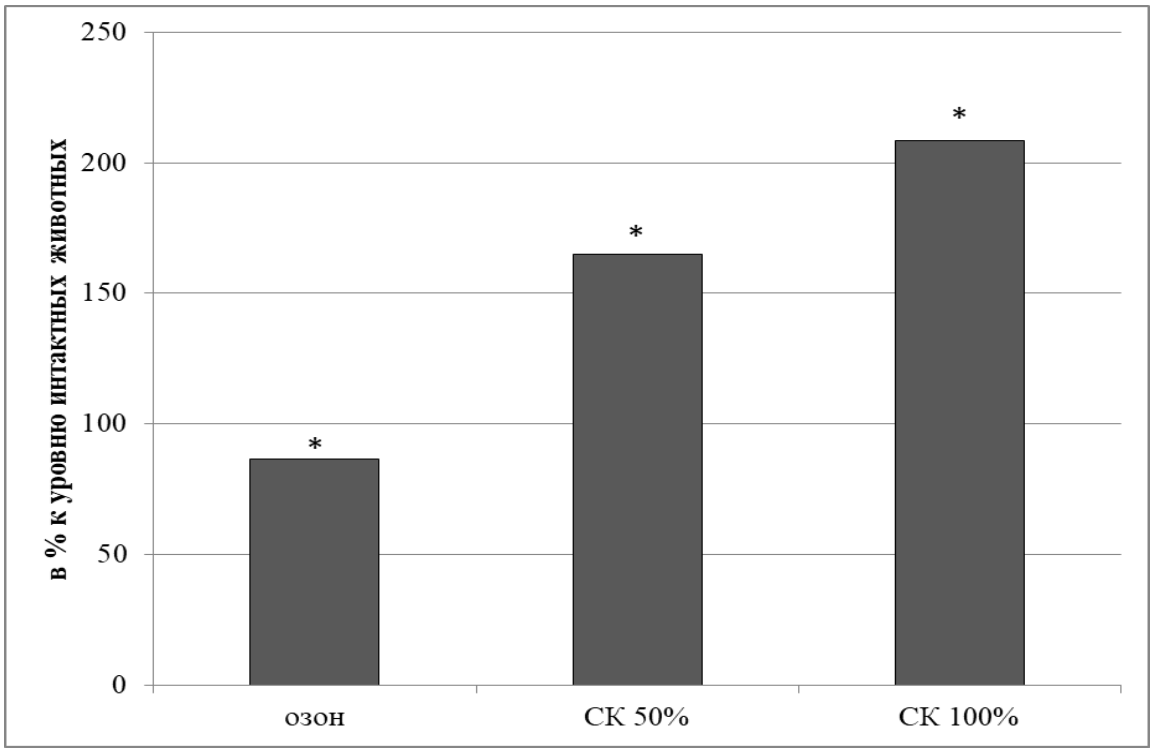

Рисунок 35 - Активность альдегиддегидрогеназы эритроцитов крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

Параллельно с оценкой системного действия различных активных форм кислорода на параметры энергетического метаболизма нами выполнено краткое тестирование состояния ферментных детоксикационных систем крови на основании анализа активности альдегиддегидрогеназы эритроцитов (рис. 35). Установлено, что приведение курса ингаляций озоно-кислородной смеси способствует снижению каталитической активности фермента (на 13,3% по сравнению с крысами интактной группы; $p<0,05$). Напротив, применение в качестве ингалируемого средства синглетно-кислородной

газовой смеси приводит к активации энзима, причем выраженность данного эффекта, как и в отношении большинства других показателей, зависит от используемой мощности генератора. В частности, при 50% мощности прибора активность альдегиддегидрогеназы возрастала на 64,8% относительно интактных животных ($p<0,05$), а при 100% - на 108,4% соответственно ($p<0,05$).

Таким образом, более оптимальным действием на каталитические свойства детоксикационного фермента альдегиддегидрогеназы обладает синглетно-кислородная газовая смесь, причем этот эффект дозозависим.

2.2.2.3. Сравнительное исследование некоторых гематологических показателей и электрофоретической подвижности эритроцитов крыс в динамике ингаляций синглетного кислорода и озона

Известно, что накопление в клетках продуктов перекисного окисления липидов является компонентом патогенеза многих заболеваний (Болдырев А.А. с соавт., 1998). С другой стороны, протекание процессов липопероксидации служит важным звеном обновления клеточных мембран и средством обеспечения их пластичности. В связи с этим, нормализация баланса в системе «прооксиданты - антиоксиданты» рассматривается как необходимый фактор поддержания гомеостаза на организменном уровне. Этому способствуют различные лечебные технологии, предусматривающие системное или локальное применение активных форм кислорода (АФК). В настоящее время наибольшее распространение получила озонотерапия, причем превалирует ее системное применение (введение озонированного физиологического раствора). В то же время эффективность использования других вариантов введения в организм активных форм кислорода, в том числе ингаляционного, изучена недостаточно полно. Следует отметить, что ингаляционное воздействие оказывает как местный, так системный эффект.

С учетом того, что ингаляционная терапия вызывает реакцию со стороны системы крови, логично предположить, что применение АФК в

газовой фазе будет способствовать изменению гематологических показателей. Подтверждением этого тезиса может служить то, что контроль лечебного и/или токсического эффекта различных соединений в качестве обязательного компонента включает изучение изменений в системе крови.

В связи с вышеперечисленным, целью данного фрагмента работы явилось исследование динамики гематологических показателей и электрофоретической подвижности эритроцитов при ингаляциях различными активными формами кислорода в эксперименте.

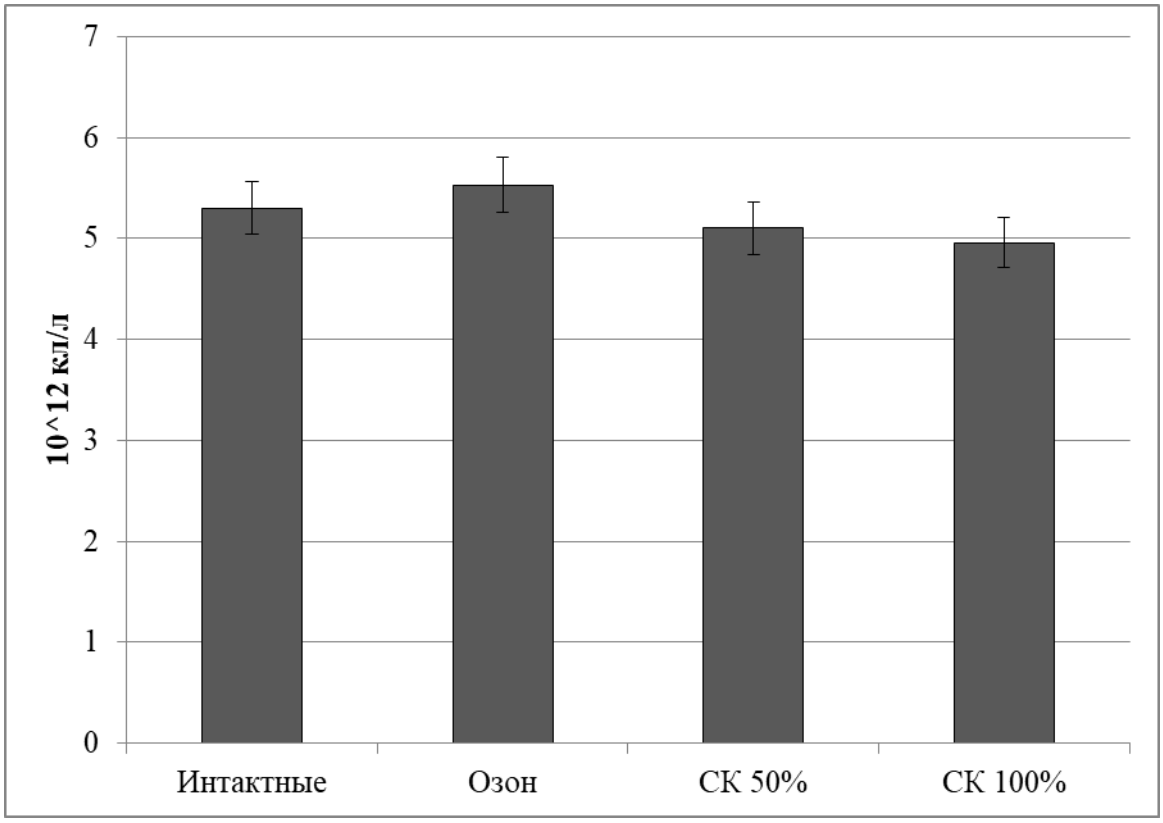

Рисунок 36 - Содержание эритроцитов в крови крыс при различных ингаляционных воздействиях (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

Проведенные гематологические исследования позволили установить, что все тестируемые факторы не оказывают значимого влияния на

количество эритроцитов в периферической крови (рис. 36). Это дает возможность исключить гематоксическое либо гемолитическое действие рассматриваемых активных форм кислорода (озона, синглетного кислорода и их интермедиатов) в отношении эритроцитов.

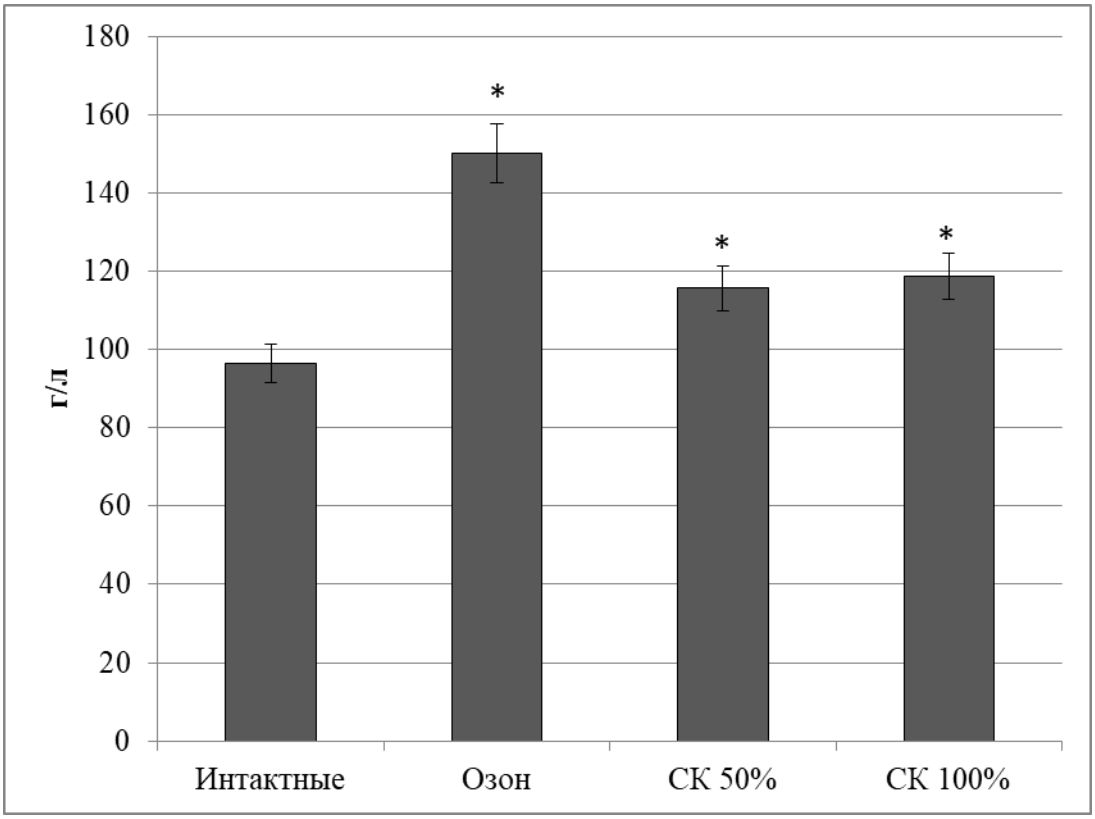

Рисунок 37 - Уровень гемоглобина в крови крыс при различных ингаляционных воздействиях (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

При этом более детальный анализ состояния эритрона, касающийся выполнения им основной функции – транспорта газов, был проведен путем оценки уровня гемоглобина в крови крыс (рис. 37). Обнаружено, что все изучаемые ингаляционные воздействия способствуют увеличению значения по данному критерию, однако степень выраженности подобного эффекта неодинакова. Так, применение озоно-кислородной смеси, значительно

повышающее кислородообеспечение крови (Перетягин С.П. с соавт., 2012), компенсаторно приводит к максимальному повышению концентрации гемоглобина (на 55,5% по сравнению с интактными животными; $p<0,05$) и, следовательно, к формированию умеренной гиперхромии эритроцитов.

Другие ингаляционные воздействия, связанные с генерацией в газовом потоке синглетного кислорода при двух мощностях аппарата (50 и 100%), также обнаруживают небольшое повышение уровня гемоглобина (на 20,0 и 23,1% относительно крыс, с которыми не проводили никаких манипуляций; $p<0,05$ для обоих случаев), но эти сдвиги не вызывают развития явлений гиперхромии вследствие сохранения данных колебаний соотношения «количество эритроцитов – концентрация гемоглобина в них» в физиологических пределах. Это может быть связано с тем, что при генерации синглетного кислорода не происходит обогащение газового потока дополнительным количеством кислорода, а указанном в процессе принимают участие лишь исходно содержащиеся в нем молекулы соединения.

Наряду с эритроцитами, оценка характера гематологических сдвигов при системном (ингаляционном) действии активных форм кислорода включала анализ содержания в крови лейкоцитов (рис. 38). Установлено, что лишь применение озоно-кислородной смеси вызывало развитие умеренных сдвигов их концентрации, заключавшихся в повышении уровня показателя на 27,5% относительно животных интактной группы ($p<0,05$). В то же время даже у представителей группы, получавшей стандартную для ингаляций концентрацию озона в воздушном потоке, количество лейкоцитов оставалось в пределах физиологических значений, что свидетельствует об адаптивности зафиксированных сдвигов. Это, в частности, потенциально связано с формированием стресс-перестройки лейкоцитарной формулы, что не оценивалось детально в рамках настоящей работы.

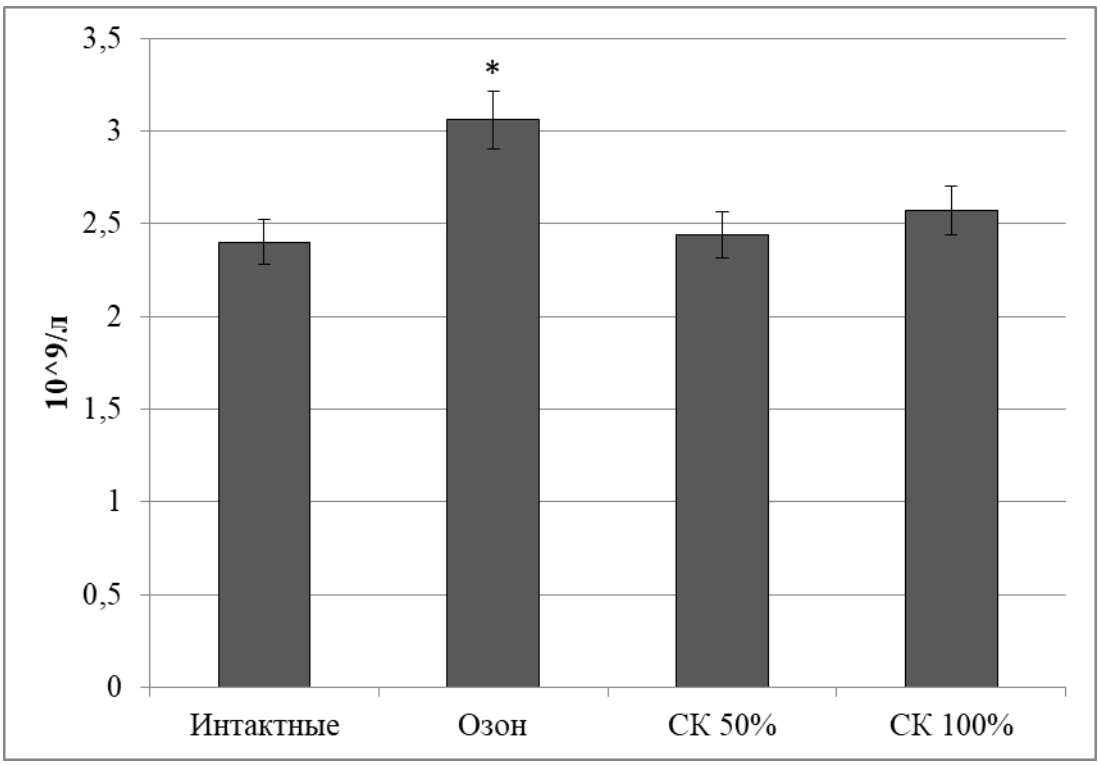

Рисунок 38 - Содержание лейкоцитов в крови крыс при различных ингаляционных воздействиях (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

Приведенные выше данные об адаптивной трансформации состояния эритрона и лейкоцитарного звена системы крови предопределили соответствующие им изменения уровня гематокрита (рис. 39). Они реализовались в отсутствии существенных сдвигов уровня показателя по завершении полного курса ингаляций синглетно-кислородной газовой смеси при обоих тестируемых режимах работы генератора, однако характеризовались умеренным повышением гематокрита у крыс, получавших в качестве активной формы кислорода озон в концентрации 60 мкг/л (на 27,9% по сравнению с животными интактной группы; $p<0,05$). Также следует отметить, что даже обнаруженное увеличение значения параметра не выводило его за пределы физиологического диапазона.

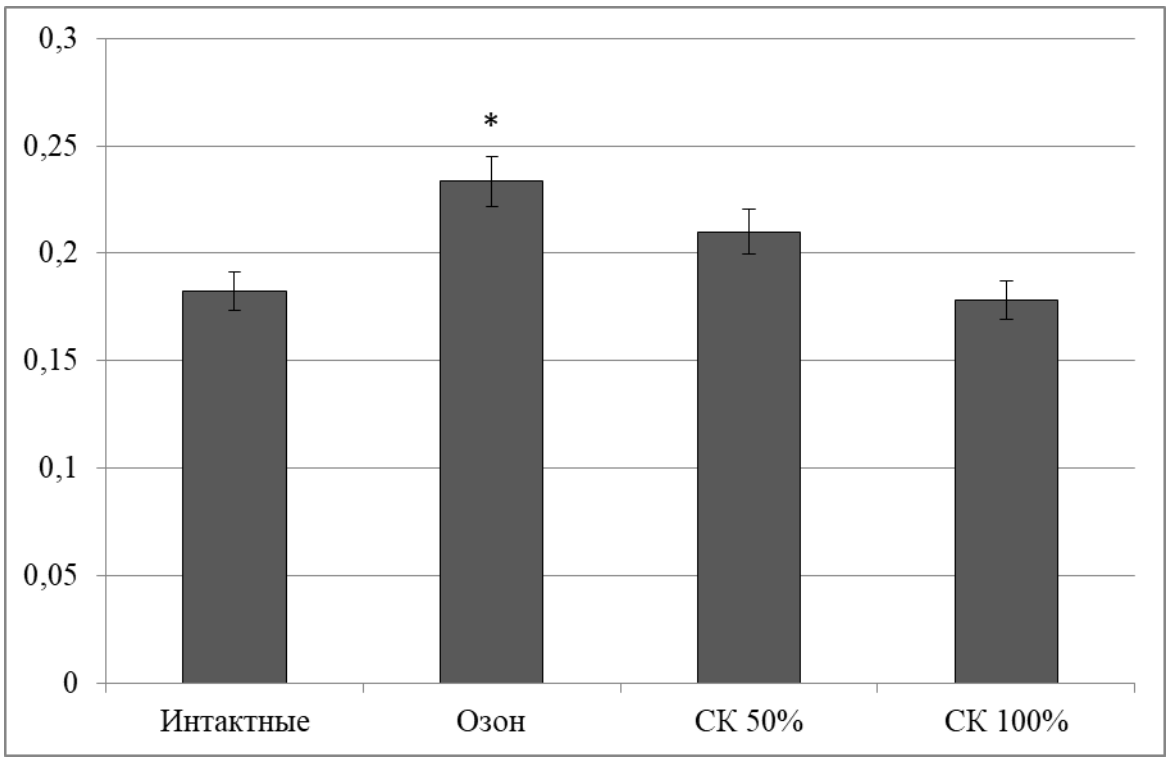

Рисунок 39 - Показатель гематокрита крови крыс при различных ингаляционных воздействиях (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

В целом, анализ влияния ингаляций активных форм кислорода на гематологические показатели позволил установить отсутствие значимого действия синглетно-кислородной смеси (при обоих изучаемых режимах работы генератора) на них, а при использовании озоно-кислородной смеси фиксировали адаптивные перестройки лейкоцитарного звена и эритрона, обусловленные гипероксией и развитием физиологического стресс-ответа на данное воздействие.

Биорадикалы, преимущественно представленные в живых системах активными формами кислорода (АФК) и оксидом азота, в настоящее время рассматриваются в качестве универсальных низкомолекулярных биорегуляторов, оказывающих влияние на широкий спектр физиологических и патологических процессов. Их регуляторное значение прослеживается в

отношении большинства метаболических путей, реализующихся на клеточно-тканевом уровне. Учитывая нелинейность биологического ответа живых систем на действие экзогенных и эндогенных биорадикалов, доза последних может рассматриваться в качестве фактора, лимитирующего их эффект.

С другой стороны, исследования в области свободнорадикальной медицины преимущественно ориентированы на изучение особенностей модулирующего действия эндогенных биорадикалов на различные параметры биосистем, тогда как характер влияния экзогенных соединений с радикальными свойствами до сих пор не раскрыт достаточно полноценно. В частности, на фоне наличия данных об особенностях протекания окислительных процессов в мембранах эритроцитов под влиянием АФК и монооксида азота, не уточнен характер воздействия биорадикалов на электрокинетические свойства эритроцитов, зависящие от состояния мембран последних. Ранее публикациями нашего коллектива и работами других авторов было показано, что электрофоретическая подвижность эритроцитов (ЭФПЭ), являющаяся их количественным критерием, может рассматриваться как неспецифический индикатор состояния эритрона и его реакции на изменения гомеостаза и внешние воздействия на организм. В то же время подобные сведения имеются лишь в отношении озона, причем они приводятся только в единичных источниках. На основании этого целью данного фрагмента работы служило изучение электрофоретической подвижности эритроцитов при действии экзогенных активных форм кислорода на организм здоровых крыс.

Изучены особенности модификации электрокинетических свойств мембран эритроцитов крыс при системном воздействии активных форм кислорода. Было установлено, что, как и в отношении непосредственной обработки крови источниками радикалов, характер формируемых сдвигов ЭФПЭ определяется количеством и химических составом воздействующих соединений. Так, при проведении ингаляций АФК выявлено, что озоно-

кислородная смесь и синглетный кислород разнонаправлено трансформируют изучаемый параметр (рис. 40). При этом проведение курса ингаляций озона способствует значительному снижению ЭФПЭ (на 30% относительно контрольной группы; $p<0,01$), что согласуется с результатами эксперимента in vitro. Напротив, проведение ингаляций синглетного кислорода обеспечивает стимуляцию подвижности эритроцитов, причем использование полной мощности (100%) генератора данной активной формы кислорода приводило к достаточно существенному смещению уровня параметра (+13%; $p<0,05$ по сравнению с интактными животными), тогда как при использовании 50% режима наблюдали сохранение физиологического уровня электрокинетической подвижности эритроцитов.

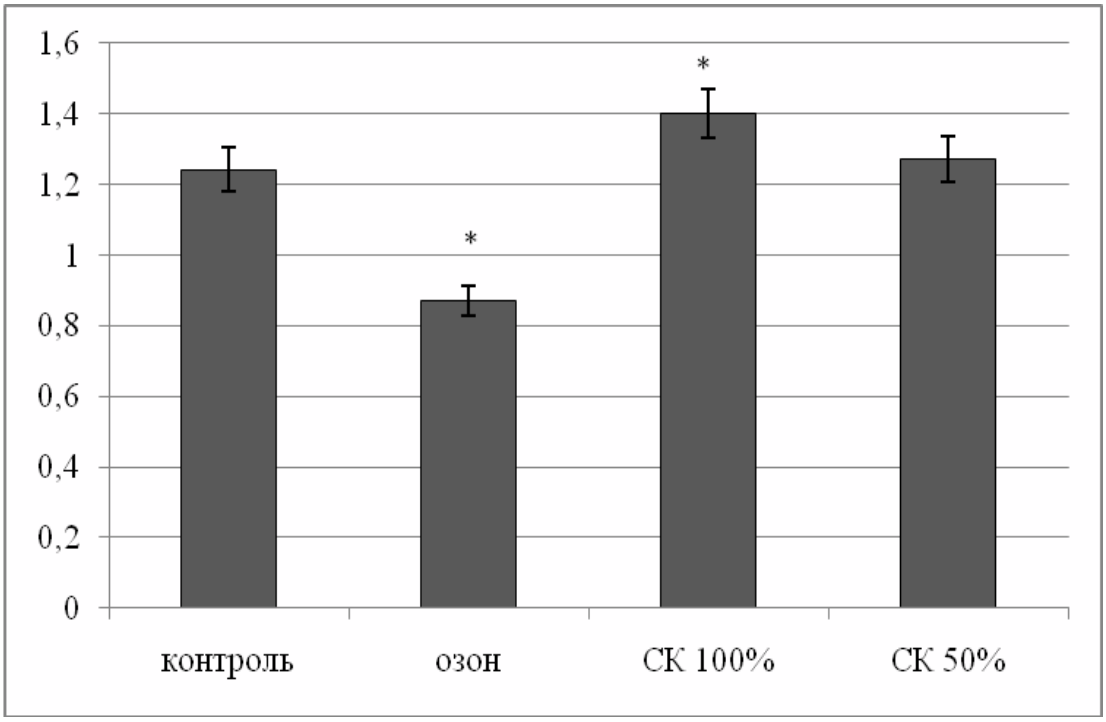

Рисунок 40 - Электрокинетические свойства эритроцитов крыс (мкм•см•$В^{-1}$•$с^{-1}$) при проведении ингаляций активных форм кислорода (СК – ингаляции синглетно-кислородной смеси; * - статистическая значимость различий по сравнению с контролем $p<0,05$)

На основании проведенных исследований обнаружен единый характер реагирования биосистем на опосредованное (в форме ингаляций) воздействие

данных соединений в изучаемых условиях. Так, озоно-кислородная смесь и обеспечивает снижение электрофоретической подвижности эритроцитов. Напротив, синглетный кислород оказывают стабилизирующее влияние на состояние мембран красных клеток крови, повышая антиоксидантный потенциал биосреды. Таким образом, показано, что экзогенные биорадикалы (активные формы кислорода) специфично и дозозависимо влияют на электрокинетические свойства эритроцитов крыс.

2.2.2.4. Вариабельность сердечного ритма и состояние микроциркуляции у животных, получавших ингаляции различных источников активных форм кислорода

Одним из значимых компонентов комплексной оценки системных эффектов ингаляций различных активных форм кислорода служило изучение их действие на гемодинамические показатели и состояние микроциркуляции. В наших предшествующих исследованиях было показано, что вдыхание крысами озона в различной форме способствует дифференцированному ответу как системной, так и локальной гемодинамики животных (Мартусевич А.К. с соавт., 2012). В то же время характер действия синглетно-кислородной газовой смеси на данные функциональные параметры ранее не рассматривался. Так, в одной из крупнейших биомедицинских баз данных Pubmed имеется лишь около двух десятков публикаций по ключевым словам «синглетный кислород» и «гемодинамика». Еще меньшее количество ссылок (12) обнаруживается при замене второго ключевого слова на «микроциркуляция». С другой стороны, важно подчеркнуть, что все найденные работы подразделяются на 2 категории: рассматривающие влияние на гемодинамику как побочной действие фотодинамической терапии, при которой выделение синглетного кислорода служит главным эффектором (Carneiro Z.A. et al. 2011; Dimitrova D.Z. e al., 2014), и направленные на уточнение потенциальной патогенетической роли высоких концентраций синглетного кислорода при окислительном стрессе,

возникающем в ткани сердца (Lee J.W. et al. 2000; Kaplan P. et al., 2005) либо в головном мозге (Rosenblum W.I., Nelson G.H., 1996) при ишемии, а также при постишемическом прекондиционировании миокарда (Toufektsian M.C. et al., 2002, 2003; Kaplan P. et al., 2005). В то же время работы по оценке влияния экзогенных источников радикалов, в том числе синглетного кислорода и продуктов его трансформации в литературе отсутствуют.

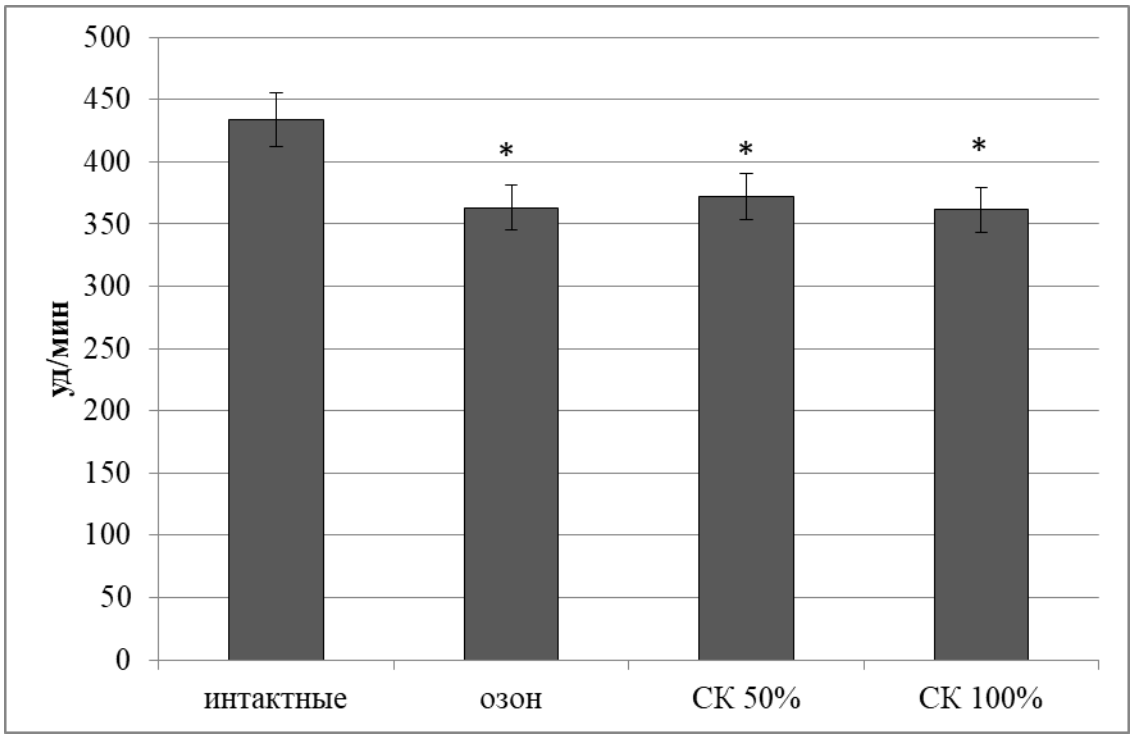

Рисунок 41 - Частота сердечных сокращений при ингаляциях различных активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

В связи с этим целью данного фрагмента работы явилась сравнительная оценка влияния ингаляций озона и синглетного кислорода на вариабельность сердечного ритма, а также интенсивность и регуляторные механизмы микроциркуляции крыс.

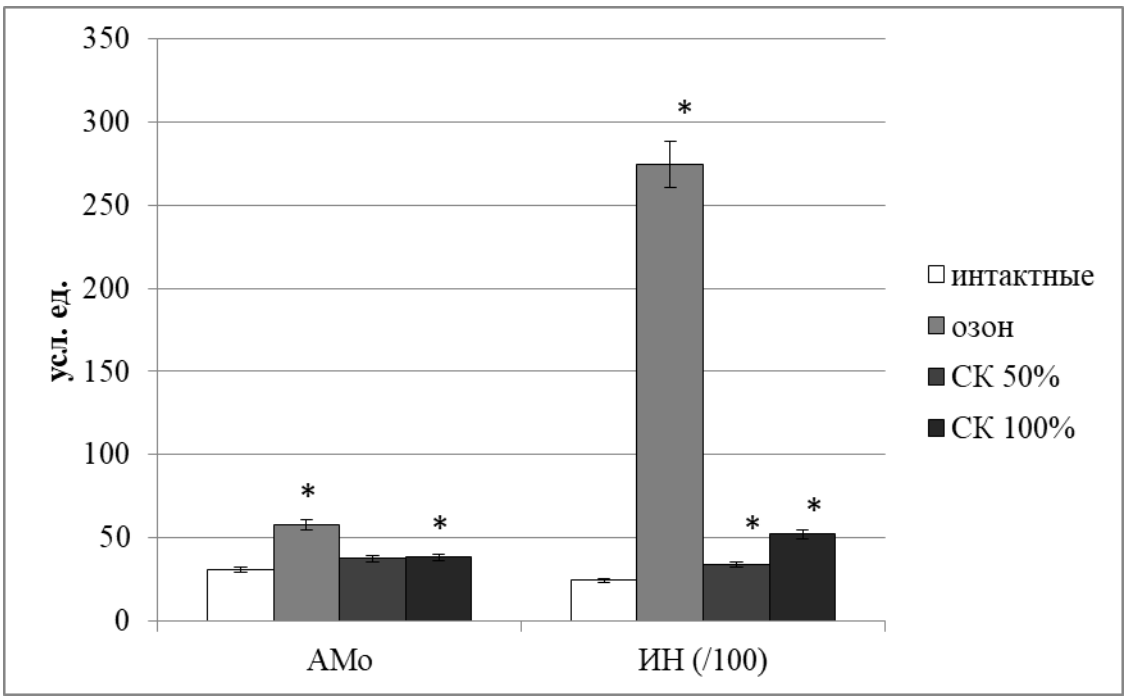

Рисунок 42 - Уровень амплитуды моды и индекса напряжения кардиоритма при ингаляциях различных активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

В рамках оценки состояния гемодинамики у крыс в условиях ингаляционного воздействия активных форм кислорода в первую очередь нами изучен уровень частоты сердечных сокращений (рис. 40). Установлено, что все рассматриваемые воздействия обеспечивают значимое снижение данного показателя, не зависящее от примененного фактора. С наших позиций, это обусловлено адаптивными перестройками вегетативного обеспечения кардиоритма, далее прослеживаемого по динамике статистических параметров активности симпатического и вагусного контуров его регуляции, и гуморального модулирующего канала, в условиях гипервентиляции (Клещеногов С.А., 2010). При этом, указанные сдвиги укладываются в физиологический диапазон, что позволяет считать их

компонентом неспецифической адаптивной реакции на ингаляционное воздействие.

Вегетативное обеспечение сердечного ритма регистрировалось нами на основании исследования классических (статистических) и спектральных характеристик (рис. 42 и 44). Выявлено, что при проведении курса ингаляционного применения озоно-кислородной смеси имеет место одновременное повышение амплитуды моды и индекса напряжения относительно интактных животных ($p<0,05$ для обоих параметров), однако градиент последнего существенно выше, что указывает на превалирование симпатической регуляции, соответствующей стресс-ответу.

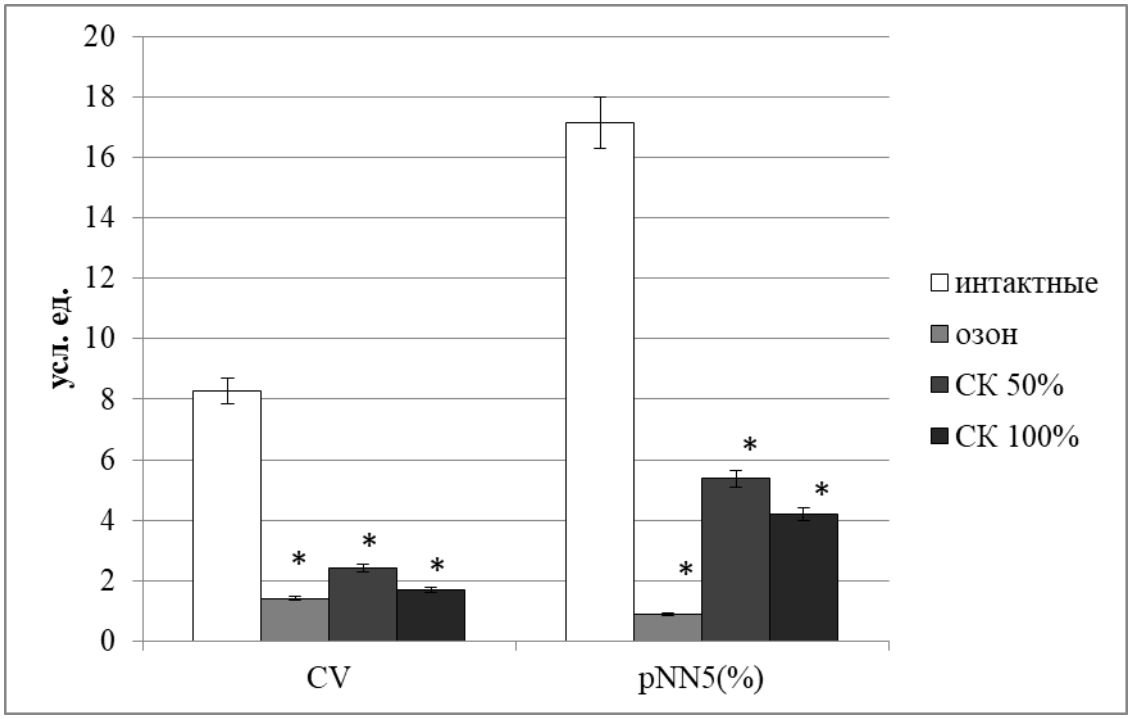

Рисунок 43 - Коэффициент вариации и параметр pNN5 кардиоритма крыс при ингаляциях активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

Использование в качестве ингалирующегого агента синглетно-кислородной газовой смеси в меньшей степени вызывает увеличение обоих показателей (в частности, для амплитуды моды оно статистически значимо только для 100% мощности генератора), но общая тенденция сдвига аналогична приведенному для озоно-кислородной смеси (рис. 50). Следует отметить, что для синглетного кислорода также характерна относительная пропорциональность прироста амплитуды моды и индекса напряжения, причем этот эффект дозозависим.

Важными показателями, характеризующими вариабельность сердечного ритма и его адаптивные возможности, служат коэффициент вариации, указывающий на максимальное отклонение продолжительности кардиоинтервала от среднего значения, и параметр pNN5, представляющий собой долю кардиоинтервалов, отличающихся от предыдущего на 5 мс. (рис. 43).

Обнаружено, что по завершении курса ингаляционного воздействия все изучаемые активные формы кислорода способствую существенному снижению обоих критериев, причем эта тенденция статистически значима для всех случаев относительно интактных крыс ($p<0,05$). С другой стороны, необходимо отметить, что данные сдвиги в максимальной степени выражены для озоно-кислородной смеси, чем для синглетного кислорода ($p<0,05$ по pNN5 для обоих режимов работы генератора и по коэффициенту вариации – для 50% его мощности). Учитывая достигнутые абсолютные значения показателей, можно заключить, что действие озона на рассматриваемые параметры снижает адаптивные резервы сердца, негативно сказываясь на вариабельности кардиоритма.

Эти закономерности свидетельствует о большей физиологичности воздействия интермедиатов синглетного кислорода по сравнению с озоном на кардиогемодинамику.

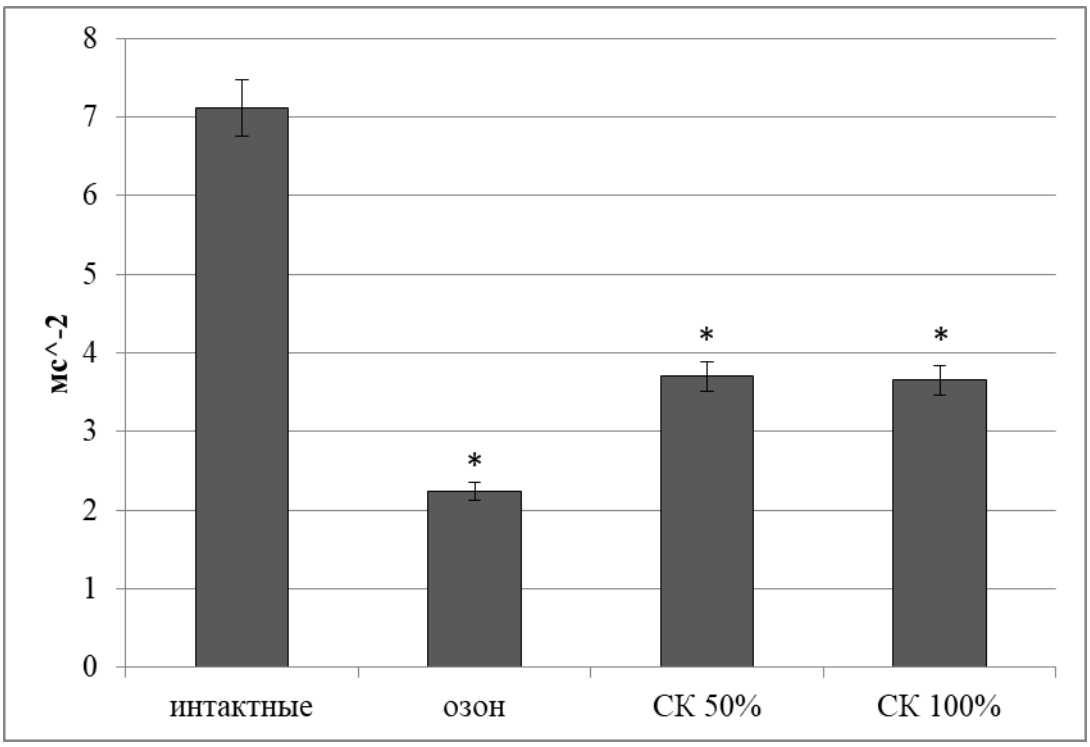

Рисунок 44 - Общая мощность спектра кардиоритма крыс при ингаляционном введении различных активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100%)

Спектральный анализ сердечного ритма позволил установить, что общая мощность спектра снижается при всех тестируемых воздействиях (рис. 44). При этом наиболее отчетливо указанная тенденция проявляется при использовании озоно-кислородной смеси, при котором мощность спектра уменьшается на 68,5% относительно животных контрольной группы ($p<0,05$). В то же время при проведении курса ингаляций синглетно-кислородной смеси показатель снижается на 48-49% независимо от примененной мощности генератора активной формы кислорода ($p<0,05$ по сравнению с интактными крысами), что также подтверждает большую физиологичность данного фактора относительно терапевтической концентрации озона.

Наряду с описанным выше статистическим анализом вегетативного обеспечения кардиоритма, нами был выполнен спектральный анализ последнего (рис. 45). На основании его результатов установлено, что все рассмотренные источники активных форм кислорода способствуют уменьшению соотношения мощностей в диапазонах низких и высоких частот, что соответствует смещению в сторону превалирования симпатической регуляции ($p<0,05$ для всех воздействий относительно животных интактной группы). Это полностью соответствует данным статистического анализа, проведенного по динамике амплитуды моды и индекса напряжения.

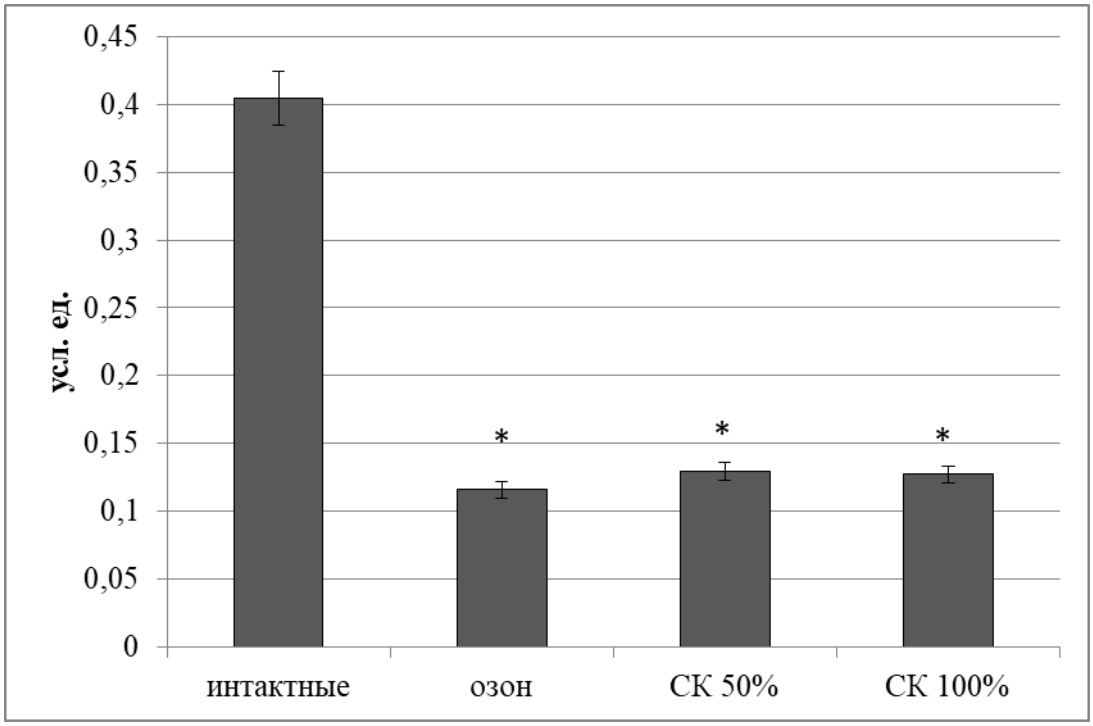

Рисунок 45 - Соотношение мощностей спектра кардиоритма в диапазонах низких и высоких частот у крыс по завершении курса ингаляционного введения активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$)

Таким образом, оценка вариабельности сердечного ритма позволила установить, что более мягким действием на системную гемодинамику по сравнению с сухой озоно-кислородной смесью обладает газовый поток от генератора синглетного кислорода, причем дозозависимые эффекты, связанные с использованием различных мощностей генератора синглетного кислорода, проявляются относительно слабо и лишь по отдельным показателям.

Вторым компонентом оценки функционального эффекта ингаляций различных активных форм кислорода явилось изучение их влияния на состояние микроциркуляции (рис. 46-49).

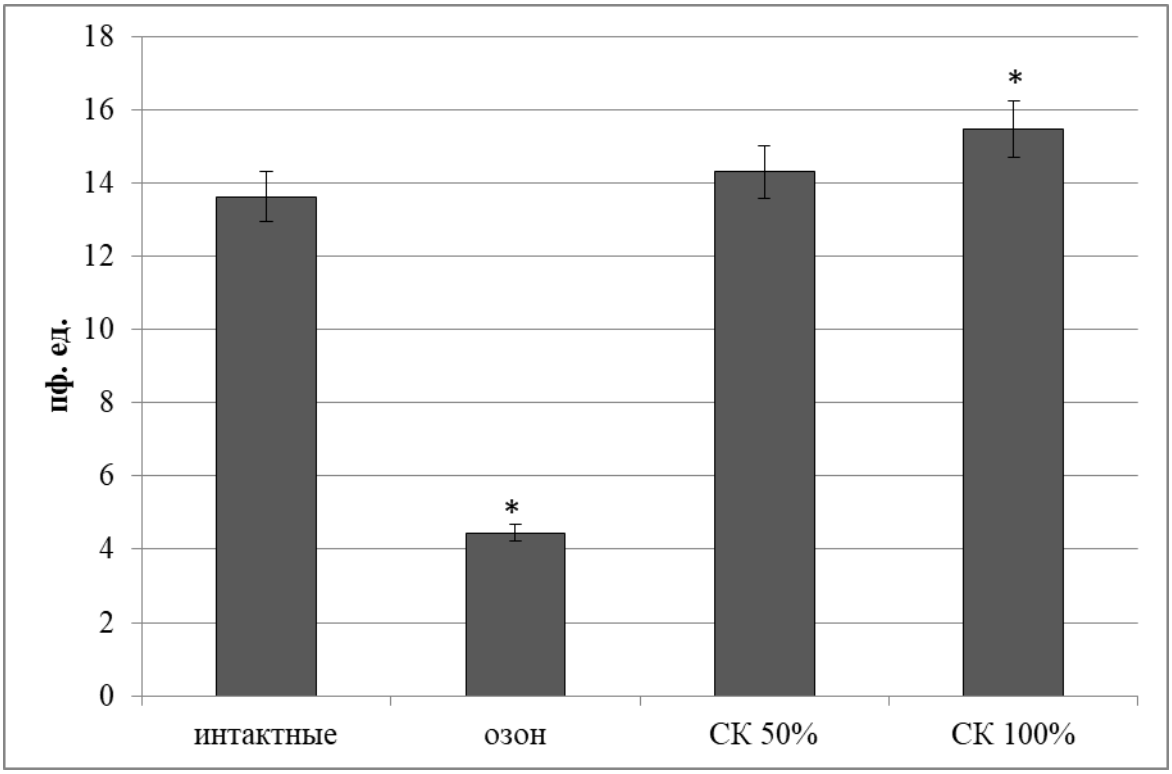

Рисунок 46 - Показатель микроциркуляции у крыс при проведении курса ингаляций различными активными формами кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %;
«*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$)

Изучение интегрального критерия интенсивности кровотока по сосудам малого диаметра – показателя микроциркуляции – позволило наглядно продемонстрировать дифференцированный характер ответа системы микроциркуляции на курс ингаляций различных активных форм кислорода (рис. 46). Так, использование в качестве действующего агента озоно-кислородной смеси существенно снижает интенсивности микрокровотока по отношению к интактным крысам (в 3,06 раза; $p<0,05$). Подобного эффекта не наблюдается при проведении ингаляций синглетно-кислородной смеси, причем, если при 50% мощности генератора показатель микроциркуляции сохраняется практически на уровне животных интактной группы, то применение полной мощности прибора умеренно улучшает кровоток по микрососудам (на 13,6%; $p<0,05$).

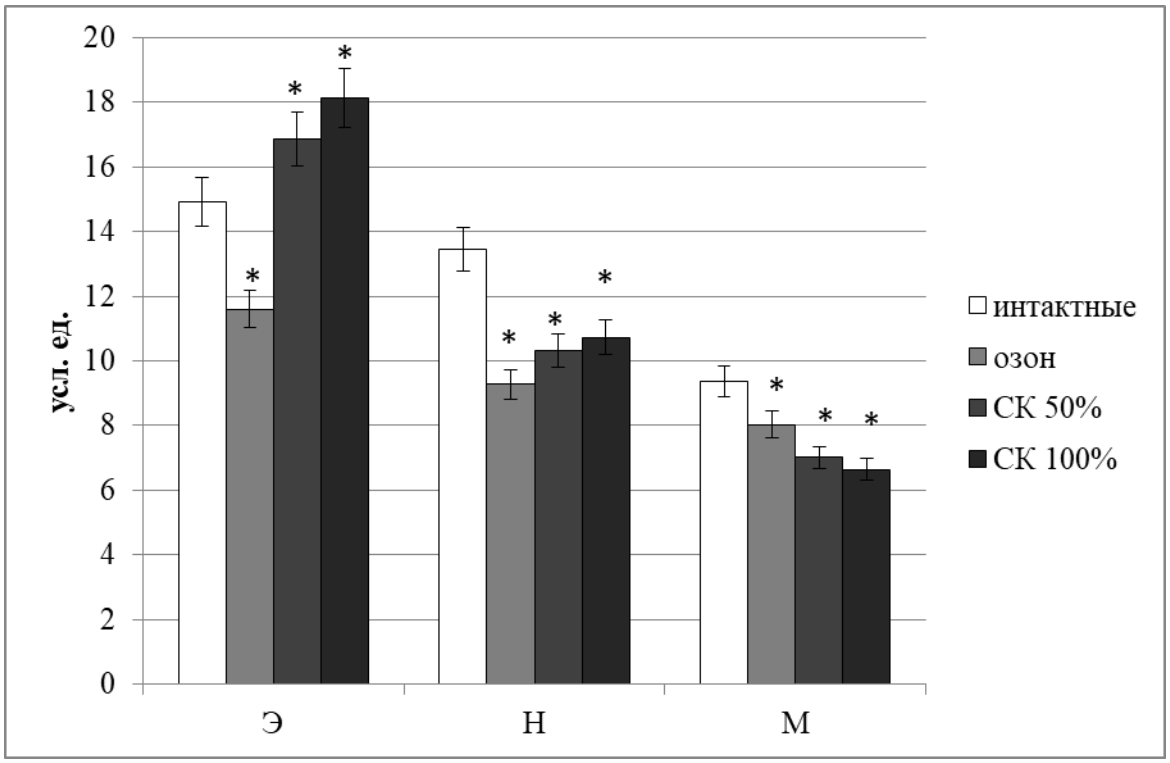

Рисунок 47 - Амплитуда активных регуляторных компонентов микроциркуляции при проведении ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$)

В целях уточнения механизмов модуляции состояния микроциркуляции нами были рассмотрены факторы регуляции кровотока по микрососудов (рис. 47 и 48). Так, в отношении активных факторов регуляции установлено, что амплитуда эндотелиального, NO-зависимого компонента при проведении ингаляций озоно-кислородной смеси значительно снижается (на 18,4% по сравнению с интактными крысами; $p<0,05$), тогда как при использовании синглетно-кислородной смеси – дозозависимо возрастает (на 18,7 и 27,6% для 50 и 100% мощности генератора по сравнению с животными, с которыми не проводили никаких манипуляций; $p<0,05$ для обоих случаев). Подобные сдвиги могут быть обусловлены тем, что повышенная концентрация активных форм кислорода, индуцированная введением озона, способна ингибировать продукцию и высвобождение монооксида азота эндотелиоцитами (Ванин А.Ф. с соавт., 2006; Shumaev K.V. et al., 2006). Следовательно, можно предположить, что интермедиаты синглетного кислорода (например, гидроксил-анион) способны активировать высвобождение оксида азота из эндотелиоцитов либо присутствующих в крови депонирующих соединений (в частности, динитрозильных комплексов железа с различными лигандами).

По другим активным факторам регуляции микроциркуляции (нейрогенному и миогенному) все рассмотренные воздействия демонстрируют единую тенденцию, направленную на снижение амплитуды указанных компонентов, однако выраженность этого сдвига неодинакова. В частности, по нейрогенному фактору наиболее значимо смещает уровень амплитуды курса ингаляций озоно-кислородной смеси (на 31,1% по отношению к животным интактной группы; $p<0,05$), причем этот показатель оказывается статистически ниже характерного для воздействия синглетно-кислородной газовой смеси, образованной при 100% мощности генератора ($p<0,05$).

Обратная закономерность имеет место для миогенного компонента, который выявляется на более низких значениях по завершении применения синглетно-кислородной смеси (уменьшение на 29,1 и 25,2% по сравнению с интактными крысами; $p<0,05$), чем при введении озоно-кислородной смеси (–14,2%; $p<0,05$). Это косвенно свидетельствует о задействованности различных механизмов в реализации вазотропных эффектов озона и интермедиатов синглетного кислорода.

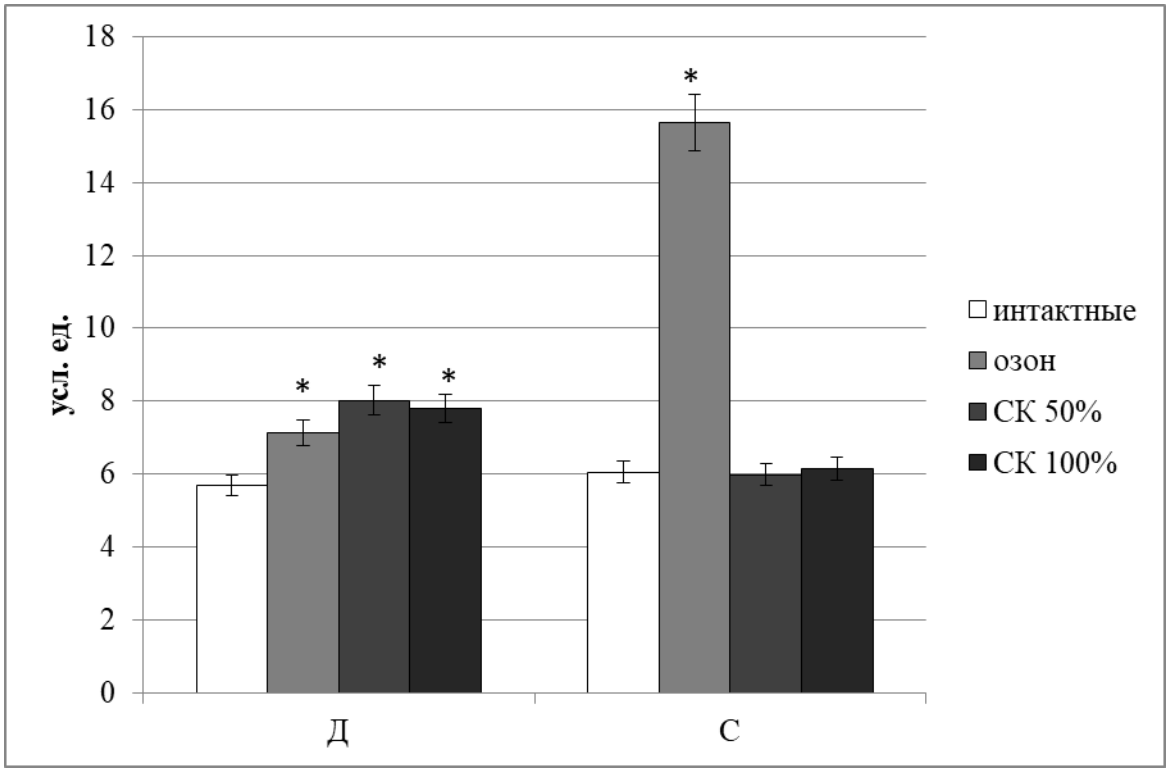

Рисунок 48 - Амплитуда пассивных регуляторных компонентов микроциркуляции при проведении ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$)

Анализ внешних, пассивных факторов регуляции микроциркуляторного русла позволил дополнить приведенную выше информацию (рис. 48). Характер изучаемого воздействия – курс процедур ингаляции – обусловил повышение вклада дыхательного компонента в модуляцию как системного,

так и локального кровотока, что предопределило неспецифическое повышение амплитуды соответствующего регуляторного компонента под влиянием всех тестируемых активных форм кислорода (на 25,5-41,3%; p<0,05 для всех случаев относительно животных интактной группы).

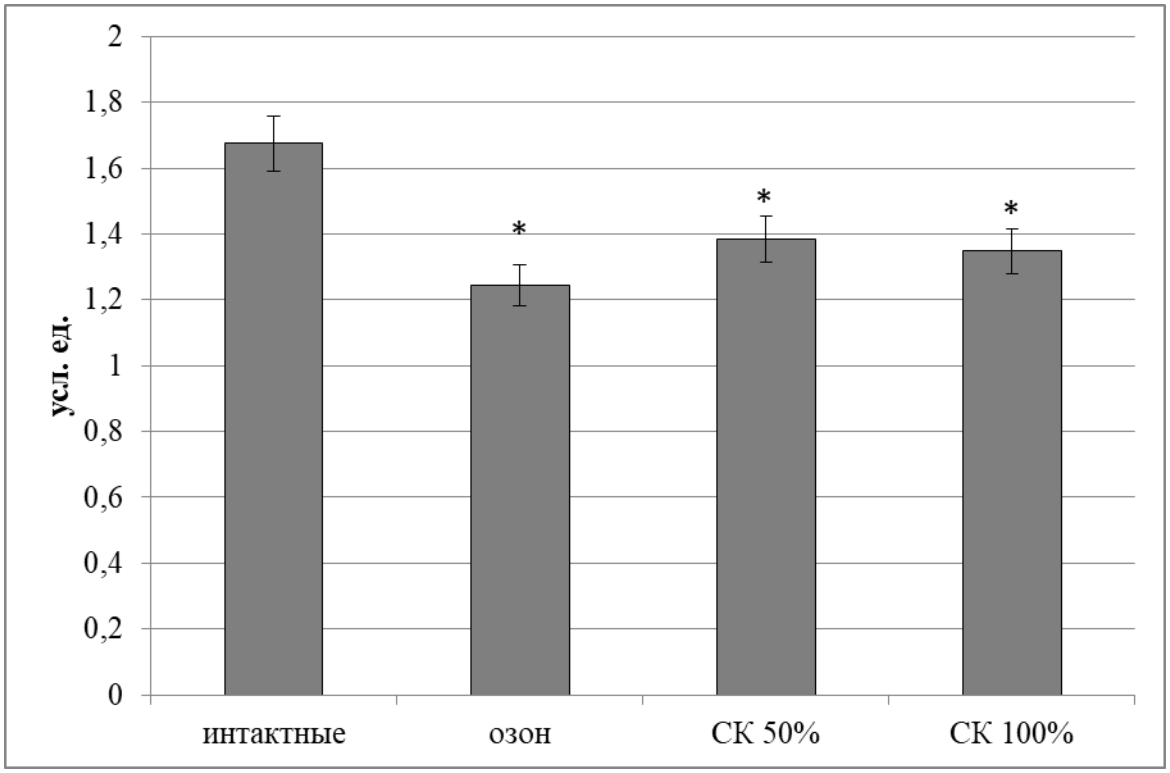

Рисунок 49 - Уровень показателя шунтирования у крыс при проведении курса ингаляций различными активными формами кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным p<0,05)

Особое внимание среди регуляторных факторов следует обратить на амплитуду сердечного компонента (рис. 48), которая существенно возрастает по завершении курса ингаляций озоно-кислородной смеси по сравнению с животными, с которыми не проводили никаких манипуляций (в 2,58 раза; p<0,05). При этом оба изученных режима воздействия синглетно-кислородной газовой смеси практически не оказывают влияния на данный регуляторный компонент. По нашему мнению, это демонстрирует четкую

взаимосвязь между оцениваемыми функциональными и лабораторными показателями и связано с выраженным стимулирующим действием озона на метаболизм миокарда, чего не прослеживается для интермедиатов синглетного кислорода.

Дополнительным параметром, характеризующим состояние микроциркуляторного русла на основании данных лазерной допплеровской флуометрии, служит показатель шунтирования (рис. 49), указывающий на степень вовлечения шунтирующих путей кровоток в перемещение крови из артериального в венозное русло (Крупаткин А.И., Сидоров В.В., 2015). Выявлено, что все рассматриваемые воздействия способствуют снижению участия шунтирующих механизмов в обеспечении «сброса» крови, минуя капиллярное русло, о чем свидетельствует уменьшение значения показателя шунтирования относительно интактных животных (на 74,1-82,4%; $p<0,05$). Это следует признать позитивным эффектом, так как в данном случае создаются условия для повышения обеспеченности тканей кислородом и нутриентами и, следовательно, оптимизации тканевого метаболизма.

В целом, на основании результатов исследования системной и локальной гемодинамики показан дифференцированный характер их ответа на ингаляционное применение озоно-кислородной газовой смеси и потока от генератора синглетного кислорода (при различной мощности последнего). При этом особенностью действия синглетного кислорода является стабилизирующее влияние на кардиоритм, проявляющееся в сохранении физиологического режима его вариабельности, а также стимуляция интенсивности микроциркуляции за счет преимущественной активации «внутренних» регуляторных регуляторных факторов (эндотелиальный и нейрогенный), а также дыхательного компонента.

2.2.2.5. Оценка влияния ингаляций активных форм кислорода на кристаллогенные свойства сыворотки крови крыс

С учетом того, что кристаллогенные свойства биологических жидкостей в последние десятилетия рассматриваются как интегральный индикатор физико-химических параметров биосред (Шабалин В.Н., Шатохина С.Н., 2001, 2004; Рапис Е.Г., 2003; Денисов А.Б., 2008; Мартусевич А.К., 2012), дополнительным компонентом оценки метаболического действия активных форм кислорода на организм здоровых крыс явилось изучение влияния указанных факторов на характер дегидратационной структуризации сыворотки крови, что и служило целью данного фрагмента работы.

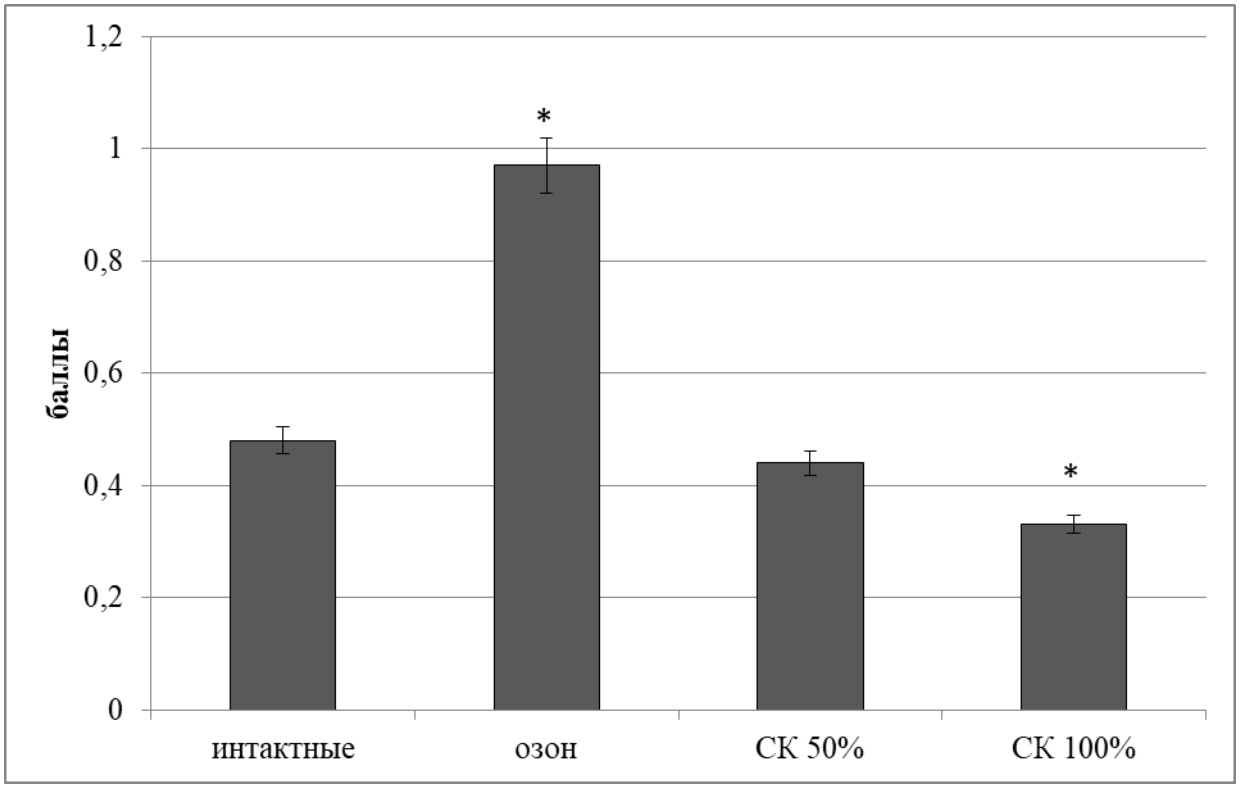

Рисунок 50 - Уровень кристаллизуемости в фациях сыворотки крови крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$)

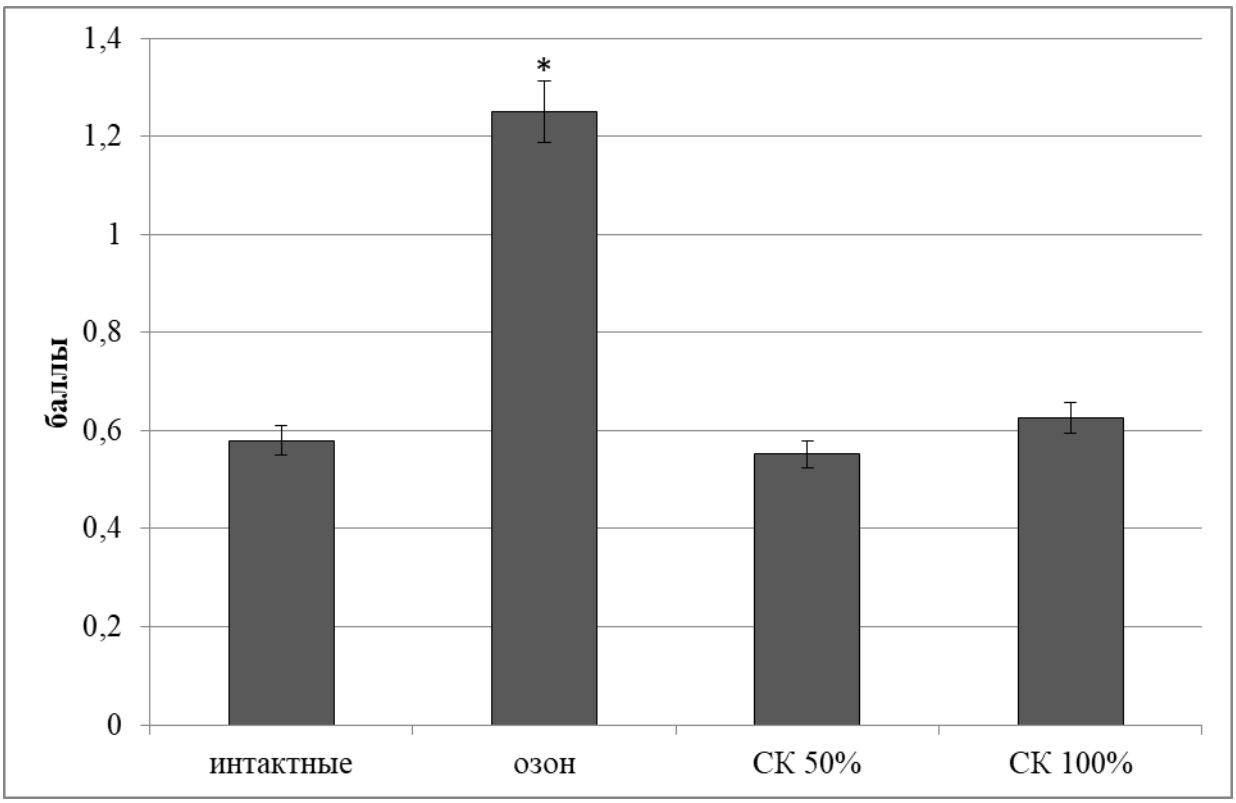

Рисунок 51 - Индекс структурности в фациях сыворотки крови крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$)

Проведенный анализ кристаллоскопических фаций сыворотки крови крыс сформированных групп позволил установить, что по основному количественному показателю – кристаллизуемости, отображающей плотность кристаллических элементов в образце, - изучаемые активные формы кислорода обнаруживают разнонаправленное действие (рис. 50). Так, применение озоно-кислородной смеси способствует выраженной активации кристаллообразования, что проявляется в форме резкого увеличения кристаллизуемости (в 2,02 раза по сравнению с интактными крысами; $p<0,05$). Напротив, использование синглетно-кислородной газовой смеси, генерированной при 100% мощности аппарата, обеспечивает умеренное снижение уровня данного параметра (на 31,2% относительно интактных

животных; p<0,05), а в случае ингалирования газовым потоком, образованным при обеспечении половинной мощности генератора модулирующий эффект по этому показателю практически не отличается от контрольных значений (p>0,05).

Количественная сторона процессов дегидратационной структуризации, описываемая индексом структурности, характеризующим сложность построения кристаллических элементов фации, также существенно варьирует в зависимости от примененного агента с радикальной активностью (рис. 51).

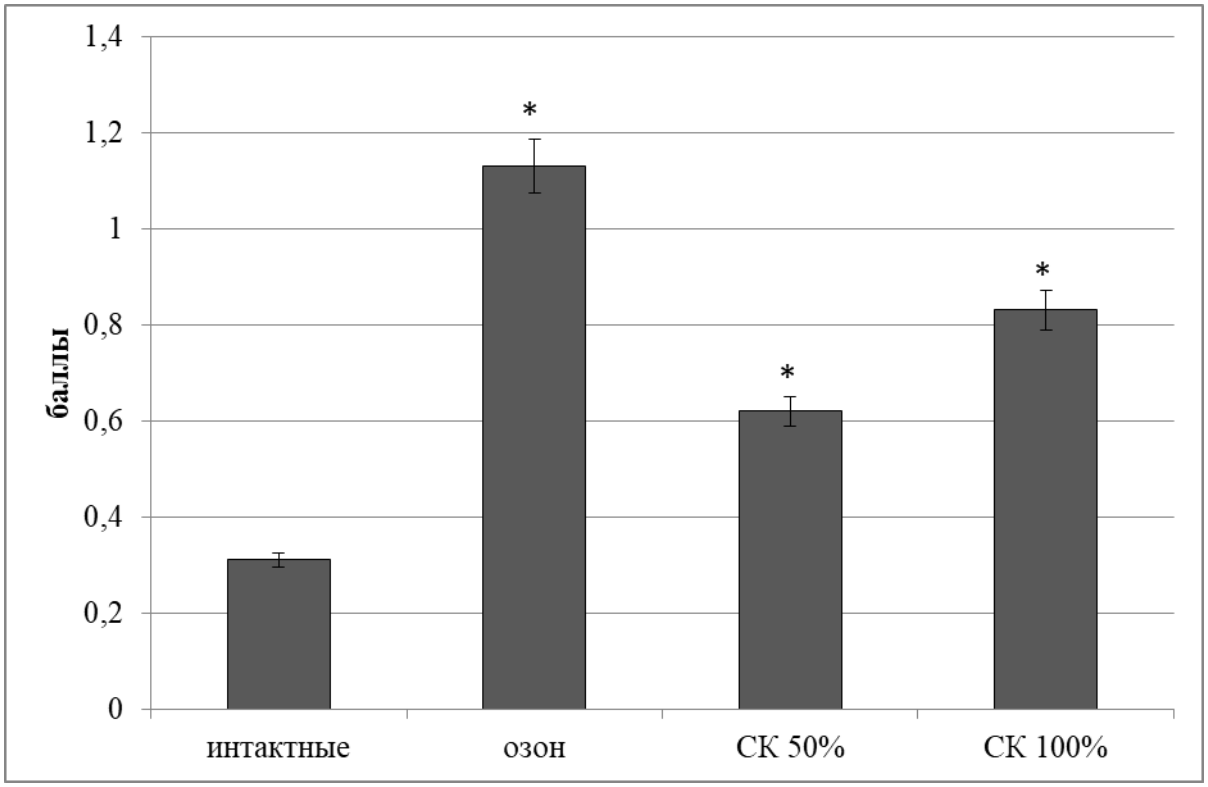

Рисунок 52 - Степень деструкции фации сыворотки крови крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным p<0,05)

Интересно, что по данному параметру значимые сдвиги, которые сопряжены с усложнением формируемых структур, имели место только по завершении курса воздействия озоно-кислородной смеси и заключались в

повышении индекса структурности в 2,16 раза по сравнению с крысами, с которыми не производили никаких манипуляций ($p<0,05$). Это подтверждает активирующее действие указанного фактора на кристаллогенные свойства сыворотки крови крыс, показанное для кристаллизуемости. В остальных случаях (при использовании обоих режимов ингалирования синглетно-кислородной газовой смесью) существенных изменений относительно животных интактной группы не зафиксировано.

По интегральному критерию правильности кристаллизации – степени деструкции фации – зарегистрирована единая тенденция для всех изучаемых активных форм кислорода (рис. 52). Она включала нарастание уровня параметра по завершении полного курса ингаляций, однако выраженность сдвигов была неодинаковой. Наиболее существенно рассматриваемый показатель увеличивался при использовании озоно-кислородной смеси (в 3,65 раза относительно интактных крыс; $p<0,05$), превышая в абсолютных значениях 1 балл, что соответствует наличию отчетливых признаков деструкции. Это косвенно свидетельствует о формирующемся дисбалансе компонентного состава биосреды.

Менее существенные, но значительные по относительным величинам отклонения фиксировали по завершении 10 процедур ингаляций синглетно-кислородной смеси, причем здесь имела место достаточно четкая дозозависимость. Так, при использовании полной мощности генератора степень деструкции фации возрастала в 2,67 раза по сравнению с животными, не подвергавшимися никаким воздействиям ($p<0,05$), а при применении половинной мощности – в 2,00 раза соответственно ($p<0,05$). В то же время по абсолютному уровню параметра в обоих случаях среднее его значение составляло менее 1 балла, что свидетельствует о наличии лишь минимальных признаков разрушения в образующихся кристаллических элементах фации сыворотки крови.

Дополнительным информативным показателем кристаллоскопического теста служит выраженность краевой зоны, связываемая различными

исследователями с уровнем нативного белка в исследуемой биологической жидкости (Шабалин В.Н., Шатохина С.Н., 2001; Рапис Е.Г., 2003). Проведенный нами анализ позволил установить, что по этому параметру рассматриваемые воздействия также гетерогенны (рис. 53). В частности, ингаляционное применение озоно-кислородной смеси обеспечивает отчетливое снижение относительных размеров краевой зоны микропрепаратов, что приводит к снижению значения соответствующего показателя на 37,7% по сравнению с животными интактной группы ($p<0,05$). Это может быть связано со стимуляцией окислительной модификации белков озоном и продуктами его трансформации, что способно негативно повлиять на конформацию и физико-химические свойства протеиновых макромолекул и, следовательно, их адекватную миграцию в краевой пояс фации при дегидратации.

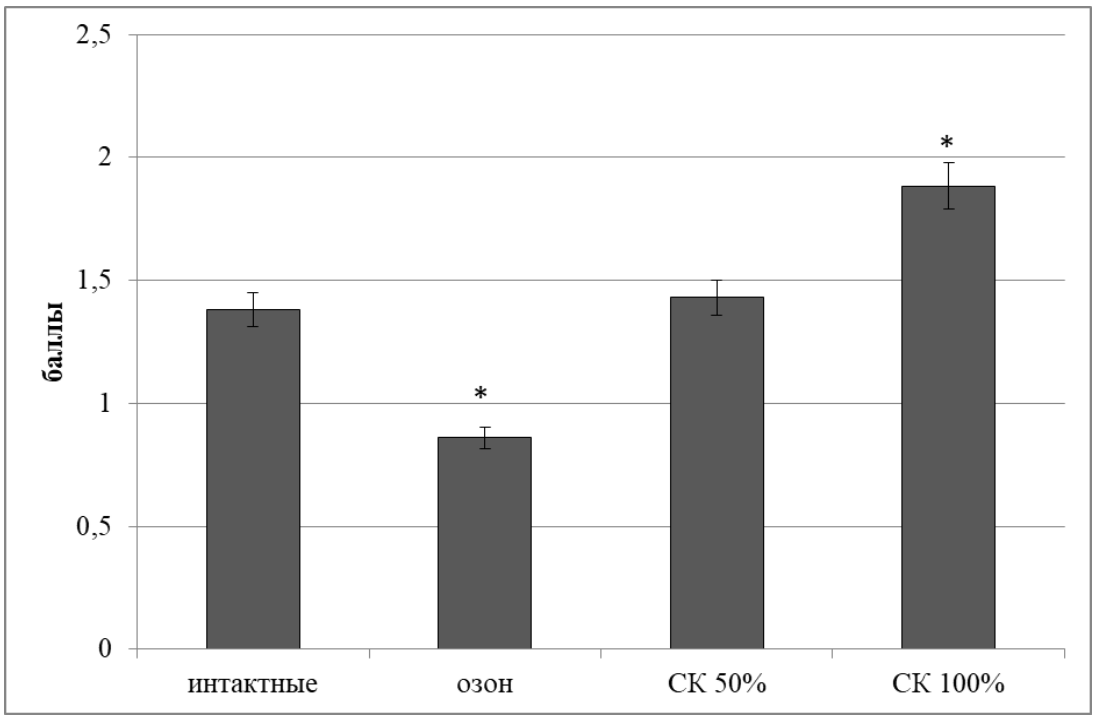

Рисунок 53 - Выраженность краевой зоны в фациях сыворотки крови крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (СК – синглетный кислород, применяемая мощность генератора указана в %; «*» - уровень статистической значимости различий по отношению к интактным животным $p<0,05$)

С другой стороны, использование в качестве действующего агента синглетного кислорода, образованного при 100% мощности генератора, индуцирует умеренное расширение краевой зоны высушенных образцов сыворотки крови (на 36,4% относительно интактных крыс; $p<0,05$). Приведенный эффект может быть обусловлен снижением уровня окислительной модификации белков биосреды за счет показанных выше антиоксидантных свойств данного газового потока, что индуцирует действие, обратное характерному для озоно-кислородной смеси. При этом снижение мощности генератора синглетного кислорода нивелирует указанный эффект, что, по нашему мнению, ассоциировано со снижением антиоксидантных свойств газового потока.

Таким образом, оценка модификации кристаллогенных свойств сыворотки крови крыс продемонстрировала дифференцированность изменения данного интегрального параметра на действие различных активных форм кислорода, причем озоно-кислородная смесь выступает как активатор структуризации биосреды (с признаками стимуляции окислительной модификации белков), а синглетно-кислородная газовая смесь – как умеренный ингибитор с обратным метаболическим действием.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время убедительно показана биорегуляторная роль малых молекул-радикалов, к числу которых относятся активные формы кислорода и монооксид азота (Костюк В.А., Потапович А.И., 2004; Меньщикова Е.Б. с соавт., 2008; Bartz R.R., Piantadosi C.A., 2010). С другой стороны, этот постулат касается преимущественно эндогенно генерируемых соединений (Griendling K.K., FitzGerald G.A., 2003; Novo E., Parola M., 2008; Forman H.J., 2010), тогда как в отношении экзогенного их введения подобные сведения немногочисленны (Hulten L.M., Holmstrem M., Soussi B., 1999; Самосюк И.З., Фисенко Л.И., 2007; Davies M.J., 2004).

Изучению про- и антиоксидантного баланса организма человека и животных в последнее десятилетие уделяется много внимания (Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б., 2001; Казимирко В.К. с соавт., 2004; Костюк В.А., Потапович А.И., 2004; Bartz R.R., Piantadosi C.A., 2010; Forman H.J., 2010). Одним из промежуточных результатов этих изысканий явилось формирование понятия «окислительный стресс» (Меньщикова Е.Б. с соавт., 2008; Uno K., Nicholls S.J., 2010), представляющего собой активацию свободнорадикального окисления, которое не может быть компенсировано собственными антиоксидантными резервами. Однако ассортимент средств его коррекции не слишком широк и остается представленным лишь озонотерапией (Перетягин С.П. с соавт, 2009; Масленников О.В., Конторщикова К.Н., Шахов Б.Е., 2016) и антиоксидантной терапией (Костюк В.А., Потапович А.И., 2004; Казимирко В.К. с соавт., 2004; Young I.S., Woodside J.V., 2001). В этом плане привлекает внимание синглетный кислород (СК), способный генерироваться в биологических системах при некоторых условиях in vivo (Заворотная Р.М., 2002; Schweitzer C., Schmidt R., 2003; Davies M.J., 2004), в том числе при фотобиологических процессах (Briviba K., Klorz l-O., Sies H., 1998; Landry M.P. et al., 2009), а также как один из редокс-мессенджеров в реализации межклеточных взаимодействий (Thannickal V.J., Fanburg B.L., 2000; Bartz R.R., Piantadosi C.A., 2010;

Forman H.J., 2010). В то же время биологические эффекты СК, как и характер ответа организма на его экзогенное введение, раскрыты недостаточно полно, причем имеющиеся сведения получены преимущественно в клинических условиях (Заворотная Р.М., 2002; Самосюк И.З., Фисенко Л.И., 2997; Kumar P. et al., 2014), что не позволяет говорить о молекулярно-клеточных механизмах, активируемых рассматриваемым соединением. Следовательно, необходимы углубленные исследования, направленные на оценку биологического ответа на действие экзогенного СК в норме и при патологии, что позволит более четко отобразить его саногенетический потенциал.

Исходя из вышеперечисленного, целью работы служила комплексная оценка биологических эффектов газового потока от генератора синглетного кислорода.

В основу исследования положен двухэтапный дизайн работы, причем на первом этапе нами изучались особенности влияния газового потока от генератора синглетного кислорода на тканевую биологическую систему (образцы крови человека), а на третьем – на организм здоровых животных. На первом этапе произведено сопоставление действия молекулярного кислорода, синглетного кислорода (с учетом выбранной мощности генератора – 50 или 100%) и озоно-кислородной газовой смеси (500 мкг/л) на параметры окислительного (интенсивность перекисного окисления липидов и общая антиоксидантная активность плазмы крови, перекисная резистентность эритроцитов, активность супероксиддисмутазы, уровень малонового диальдегида в плазме крови и эритроцитах) и энергетического (активность лактатдегидрогеназы эритроцитов в прямой и обратной реакциях, уровень глюкозы и лактата) метаболизма, состояния ферментных систем детоксикации (по активности альдегиддегидрогеназы), ряду параметров кислотно-щелочного равновесия, электрокинетическим свойствам эритроцитов и кристаллогенной активности плазмы крови.

На первом этапе в сравнительном аспекте изучали биологические эффекты ингаляций синглетного кислорода (при полной и половинной

мощности генератора) и озоно-кислородной смеси (60 мкг/л) на указанные для экспериментов in vitro метаболические и функциональные показатели крови половозрелых крыс-самцов линии Вистар. Кроме того, состояние энергетического и окислительного обмена дополнительно оценивали в гомогенатах ткани основных органов животных (сердце, легкие, печень, почки). Биохимические особенности реакции организма животных на действие ингаляций газового потока, исходно содержащего синглетный кислород, сопоставляли с результатами исследования системной гемодинамики (по критериям вариабельности сердечного ритма) и микроциркуляции (на основании применения лазерной доплеровской флуометрии).

В целом, в рамках проведения данной работы выполнено 650 исследований in vitro (на образцах крови человека) и 1740 исследований in vivo (на 60 крысах линии Вистар).

Система крови, являясь основной жидкой средой, традиционно рассматривается как интегральный индикатор состояния целостного организма на различные воздействия (Новицкий В.В. с соавт., 2008). Этому способствует наличие в ее составе как многочисленных клеточных пулов, так и жидкой части – плазмы, в комплексе обеспечивающих биологические и физико-химические свойства данного биосубстрата и его адаптационно-гомеостатический потенциал (Судаков К.В., 1998, 2004). С учетом активно протекающих в рассматриваемой биосреде процессов, обеспечивающих энергетический обмен ее клеточной составляющей, цельная кровь служит достаточно удобной биомоделью для оценки эффекта различных, в частности физико-химических, факторов на различные пути метаболизма.

В связи с этим на втором этапе работы нами было рассмотрено действие синглетного кислорода и озона в концентрации 500 мкг/л на образцы изолированной крови человека.

В первую очередь изучали эффекты рассматриваемых факторов отношении состояния окислительного метаболизма, являющегося

непосредственной «мишенью» для реализации их действия. Установлено, что изучаемые активные формы кислорода оказывают неодинаковое действие на изучаемые параметры окислительного метаболизма, что сопоставляется с результатами оценки их влияния на физико-химические показатели абиогенных жидкостей. Так, оксигенация и озонирование путем воздействия на образцы крови низких концентраций озона (500 мкг/л) приводят к значимому нарастанию интенсивности процессов перекисного окисления липидов в плазме крови (на 22,1 и 25,7% относительно контрольного уровня; $p<0,05$ для обоих случаев). В то же время обработка биологической жидкости газовым потоком, исходно содержащим синглетный кислород, не вызывает существенных сдвигов светосуммы хемилюминесценции, причем эта особенность его действия не зависит от мощности генератора.

Иная динамика была зарегистрирована в отношении общей антиоксидантной активности плазмы крови. В частности, введение в образец биологической жидкости молекулярного кислорода обуславливает минимальное снижение антиоксидантного резерва биосреды, фиксируемое на уровне тенденции ($p<0,01$). Остальные воздействия способствовали повышению рассматриваемого параметра, однако выраженность этого сдвига зависела от вида активной формы кислорода и его концентрации. Так, низкая концентрация озона увеличивала общую антиоксидантную активность на 27,9% ($p<0,05$). В целом, действие озоно-кислородной смеси на окислительный метаболизм крови на основании биохемилюминесцентного исследования можно оценить как сбалансированное, так как имеет место пропорциональное повышение интенсивности процессов липопероксидации и антиоксидантного потенциала плазмы крови. Это подтверждает данные проведенных ранее исследований (Перетягин С.П. с соавт., 2012). Обработка крови здоровых людей газовой смесью, содержащей синглетный кислород, инициирует ярко выраженное дозозависимое действие на антиоксидантный потенциал биологической жидкости. Так, если использование половинной мощности генератора обуславливает увеличение антиоксидантных свойств

биосреды только на 16,4% ($p<0,05$ по сравнению с контрольным образцом), то барботаж крови газовым потоком при 100% мощности аппарата приводит к повышению значения показателя уже на 37,7% по отношению к интактному уровню ($p<0,05$).

Также нами произведена оценка состояния процессов липопероксидации в мембранах эритроцитов. Установлено, что наиболее существенно увеличивает перекисную резистентность эритроцитов оксигенация образцов крови (на 30,6% относительно интактного образца; $p<0,05$), что вполне сочетается с результатами оценки интенсивности липопероксидации в плазме крови. Озонирование биологической жидкости при введении низкой концентрации агента (500 мкг/л) приводит к умеренному, но статистически значимому нарастанию значения параметра (на 13,6% по сравнению с контрольным образцом; $p<0,05$). Иная тенденция имеет место при обработке крови синглетно-кислородной газовой смесью. Выявлено, что данная активная форма кислорода снижает значение параметра. Интересно, что в этом случае не реализуется дозозависимое действие агента: уровень перекисной резистентности эритроцитов при использовании 50 и 100% мощности генератора составляет 90,6 и 87,2% от контрольных значений ($p<0,05$ для обоих воздействий).

В качестве дополнительного критерия состояния окислительного метаболизма крови нами использован уровень одного из наиболее широко информативных показателей интенсивности процессов перекисного окисления липидов – концентрации малонового диальдегида в плазме крови и эритроцитах. Установлено, что все изучаемые воздействия не оказывают существенного влияния на плазменный уровень рассматриваемого показателя, увеличиваясь по завершении обработки образцов биологической жидкости не более чем на 10% относительно интактных значений. При этом в наибольшей степени возрастает концентрация метаболита в плазме крови при введении в биосреду газового потока от генератора синглетного

кислорода при применении его 100% мощности (на 9% относительно интактного образца; $p<0,05$).

Более существенная динамика концентрации малонового диальдегида зарегистрирована при исследовании эритроцитов. Так, обработка цельной крови молекулярным кислородом способствует увеличению значения показателя на 21,2% по сравнению с контрольным образцом ($p<0,05$). Введение в биожидкость кислородно-озоновой смеси приводило к более значимому повышению уровня малонового диальдегида (на 30,6%; $p<0,05$).

Как и в отношении интенсивности процессов липопероксидации в плазме крови, в эритроцитах наблюдали признаки дозозависимости ответа окислительного метаболизма на действие газовой смеси, исходно содержащей синглетный кислород. В частности, при применении 50% мощности генератора не отмечали стимуляции перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов, тогда как использование 100% мощности аппарата обуславливало значимое увеличение концентрации малонового диальдегида в них (на 19,7% по сравнению с интактным образцом крови; $p<0,05$). Это может указывать на преимущественную реализацию антиоксидантных свойств биорадикалов, образование которых инициировано синглетным кислородом, в плазме крови. В то же время признаки антиоксидантной активности изучаемого агента обнаруживаются и в эритроцитах, на что указывают результаты сравнительной оценки влияния рассматриваемых активных форм кислорода на каталитические свойства эритроцитарной супероксидисмутазы.

Выявлено, что исследуемые активные формы кислорода оказывают неодинаковое влияние на каталитические свойства одного из основных антиоксидантных ферментов, утилизирующих супероксидный радикал, - супероксидисмутазы. Так, оксигенация крови инициирует угнетение активности данного энзима (на 33,7% относительно контрольного образца; $p<0,05$), а обработка его низкой концентрацией озона практически не изменяет ее. Введение в биологическую жидкость синглетного кислорода,

сгенерированного при мощности аппарата 50% от полной, умеренно снижая уровень перекисной резистентности эритроцитов и не модифицируя концентрацию малонового диальдегида, приводит к нарастанию каталитической активности супероксиддисмутазы на 15,6% по сравнению с контрольным образцом ($p<0,05$). Увеличение мощности генератора до 100% приводит к более выраженной стимуляции изучаемого параметра (+32,1% по отношению к интактному уровню; $p<0,05$), что свидетельствует об активации антиоксидантной системы крови, превалирующей над инициацией липопероксидации, при действии данной активной формы кислорода. Таким образом, проведенные на образцах изолированной крови здоровых людей эксперименты позволяют сделать вывод о наличии у синглетно-кислородной газовой смеси антиоксидантных свойств, причем приведенный эффект является дозозависимым.

Установлено, что все изученные активные формы кислорода (АФК) обуславливают нарастание активности ЛДГ в прямой реакции в сочетании с умеренным угнетением обратной. В то же время выраженность этого эффекта для различных факторов существенно варьирует. В частности, кислород и низкие дозы озона (500 мкг/л) преимущественно оказывают ингибирующее влияние на обратную реакцию ЛДГ ($p<0,02$), тогда как обе изучаемые концентрации СК значимо и позитивно модифицируют режим функционирования ЛДГ, повышая активность энзима в прямой реакции и снижая ее – в обратной ($p<0,02$). Следует отметить, что эти сдвиги в большей степени обеспечиваются активацией прямой реакции. Важно, что указанные процессы сопряжены с сонаправленным изменением внутриэритроцитарной концентрации лактата, существенно уменьшающейся при действии всех изучаемых АФК ($p<0,02$ для всех случаев). Это обусловлено повышенным расходованием лактата в условиях данного варианта активации ЛДГ.

Состояние ферментных систем крови естественным образом отражается и на уровне метаболитов в плазме и эритроцитах. Так, оказывающие наиболее значимое действие на активность оксидоредуктаз озон и

синглетный кислород в большей степени снижают внутриэритроцитарную и плазменную концентрации лактата ($p<0,05$). Этот эффект распространяется и на уровень данного соединения в плазме крови.

Интерес представляет тот факт, что под влиянием всех изучаемых АФК происходит снижение уровня глюкозы в эритроцитах (на 65-75% относительно значений, характерных для крови, с которой не проводили никаких манипуляций; $p<0,05$), хотя плазменная концентрация соединения практически не изменяется. По нашему мнению, это может быть обусловлено его повышенной утилизацией в энергетическом обмене, стимулированном изучаемыми окислителями.

С учетом того, что в результате изучаемых воздействий в кровь вводятся кислород-содержащие газовые смеси, по их завершении наблюдали существенные сдвиги газового состава крови. В частности, все рассматриваемые факторы обеспечивали снижение парциального давления углекислого газа практически на 50% относительно исходного уровня ($p<0,05$), однако только чистый кислород и кислородно-озоновая смесь выраженно повышали парциальное давление кислорода в крови более чем в 2 раза по сравнению с контрольными значениями ($p<0,05$).

Под влиянием АФК изменяются и показатели кислотно-щелочного равновесия крови. Так, все исследуемые факторы приводят к умеренному защелачиванию образцов крови (при обработке кислородом, кислородно-озоновой смесью и СК при мощностях прибора 50 и 100% соответственно; $p<0,05$ для всех случаев). Механизм этих сдвигов может быть связан с генерацией гидроксид-ионов в процессе деградации АФК в биологической жидкости, а также со снижением концентрации растворенного углекислого газа. Последняя тенденция одинаково просматривается для всех изучаемых воздействий как по общему уровню данного параметра, так и концентрации бикарбоната в плазме крови, составляющих после барботажа 70-75% от исходных значений ($p<0,05$).

В целом, установлено, что обработка крови синглетным кислородом в условиях in vitro создает позитивные условия для функционирования ферментов энергетического обмена, детоксикации и компонентов антиоксидантной системы, проводя к соответствующим сдвигам плазменной и эритроцитарной концентрации глюкозы и лактата, а также оптимизирует газовый состав и параметры кислотно-щелочного баланса биологической жидкости. Следует подчеркнуть, что по действию на активность изучаемых ферментов эффект синглетного кислорода более выражен, чем кислородно-озоновой смеси.

Ранее нашими исследованиями и работами других авторов было показано, что электрофоретическая подвижность эритроцитов (ЭФПЭ), являющаяся их количественной мерой, может рассматриваться как неспецифический индикатор состояния эритрона и его реакции на изменения гомеостаза и внешние воздействия на организм (Крылов В.Н. с соавт., 2005, 2009, 2015; Дерюгина А.В. с соавт., 2013, 2015). В то же время подобные сведения имеются лишь в отношении озона, причем они приводятся только в единичных публикациях (Симутис И.С. с соавт., 2014). Установлено, что изучаемые экзогенные биорадикалы оказывают неодинаковое влияние на ЭФПЭ крови человека. Так, обе изучаемые АФК (озон и синглетный кислород) изменяют данный показатель, однако эти сдвиги разнонаправлены. В частности, барботирование крови озоно-кислородной смесью с концентрацией озона 500 мкг/л, что соответствует низким терапевтическим дозам (Перетягин С.П. с соавт., 2009), инициирует существенное снижение значения параметра (на 22%; $p<0,05$ по сравнению с контрольным образцом), тогда как обработка биологической жидкости синглетно-кислородной газовой смесью вызывает умеренное повышение уровня ЭФПЭ (на 13% относительно контроля; $p<0,05$). Это обусловлено тем обстоятельством, что даже небольшие количества озона, введенные в биосреду, обеспечивают стимуляцию процессов липопероксидации (Перетягин С.П. с соавт., 2012),

приводя к структурным перестройкам мембраны эритроцитов и, следовательно, изменению их электрокинетических характеристик.

Также обнаружено, что обе рассматриваемых нами активных формы кислорода оказывают модулирующее воздействие на кристаллогенные свойства биологической жидкости, причем этот эффект специфичен для озоно-кислородной смеси и газового потока, исходно содержащего синглетный кислород. Так, по основному количественному параметру кристаллизации биосреды – кристаллизуемости – для изучаемых факторов зарегистрирована единая тенденция, заключающаяся в увеличении плотности кристаллических элементов. В то же время выраженность данной тенденции неодинакова: в большей степени они проявляется для синглетного кислорода, чем для озоно-кислородной смеси (+54,0 и +37,8% относительно контрольного образца соответственно; $p<0,05$ для обоих рассматриваемых воздействий).

Также специфичность ответа плазмы крови на обработку различными источниками радикалов реализуется и в отношении качественного показателя кристаллоскопического теста – индекса структурности, который характеризует сложность морфологии формирующихся кристаллических фигур. Выявлено, что обработка биологической жидкости озоно-кислородной смесью не способствует усложнению структурных элементов, тогда как применение газового потока от генератора синглетного кислорода обеспечивает значительное повышение уровня параметра (на 89,5% по сравнению с контрольным образцом, с которыми не проводили никаких минапуляций; $p<0,05$). Морфологически эти сдвиги реализуются как обнаружение в высушенных микропрепаратах биосреды единичных дендритных элементов, отсутствующих в контрольных фациях.

Приведенная выше динамика кристаллизуемости и индекса структурности плазмы крови указывает на общее стимулирующее действие активных форм кислорода в отношении кристаллогенных свойств биосреды,

однако оно выражено более отчетливо при использовании в качестве внешнего фактора газового потока от генератора синглетного кислорода.

Дополнительно нами были проанализированы степень деструкции фации и выраженность краевой зоны микропрепарата. Показано, что только обработка биосреды озоно-кислородной смесью способствует значимому нарастанию степени деструкции фации (в 2,03 раза относительно контрольного уровня; $p<0,05$), причем даже в этом случае значение параметра не превышал 1 балла, что соответствует умеренной деструкции структурных элементов. С другой стороны, воздействие на биологическую жидкость газового потока, исходно содержащего синглетный кислород, не оказывало существенного влияния на данный показатель.

Аналогичные сдвиги наблюдали и в отношении выраженности краевой зоны фаций плазмы крови. Данный показатель, косвенно свидетельствующий о количестве нативного белка в анализируемой биосреде, сохраняется на исходном уровне при обработке биообъекта потоком от генератора «Airnergy», тогда как использование озоно-кислородной смеси приводит к снижению относительного размера краевой зоны микропрепаратов на 28,7% по сравнению с контрольным образцом ($p<0,05$). Это может быть обусловлено стимуляцией окислительной модификации белков плазмы крови при действии озона и продуктов его трансформации.

Таким образом, в условиях in vitro рассмотренные активные формы кислорода (озон и интермедиаты синглетного кислорода) повышают кристаллогенные свойства плазмы крови, причем данный эффект более выраженно проявляется в отношении потока от генератора синглетного кислорода. Следует дополнительно отметить, что последний оказывает на способность биосреды к дегидратационной структуризации более мягкое воздействие, т.к. не изменяет уровень деструкции элементов и сохраняет на физиологических значениях размеры краевой зоны фации.

На третьем этапе работы был выполнен сравнительный анализ особенностей влияния ингаляций синглетного кислорода и озона на

функционально-метаболический статус организма здоровых половозрелых крыс линии Вистар.

Проведенные исследования позволили комплексно охарактеризовать состояние окислительного метаболизма крови и тканей крыс при ингаляционном применении активных форм кислорода. Так, на основании данных биохемилюминесцентного анализа установлено, что изучаемые воздействие оказывают неодинаковое влияние на интенсивность процессов перекисного окисления липидов в плазме крови животных. В частности, ингаляции озоно-кислородной смеси существенно стимулируют их (на 22,7% относительно интактной группы; $p<0,05$), тогда как использование синглетно-кислородной газовой смеси либо не изменяет данный показатель (при мощности генератора 50%), либо умеренно его снижает (на 7,3% при 100% мощности прибора; $p<0,05$ по сравнению со здоровыми животными).

Напротив, в отношении общей антиоксидантной активности плазмы крови все исследуемые ингаляционные воздействия демонстрируют единую динамику изменения. Так, курс ингаляций озоно-кислородной смеси способствует статистически значимой активации антиоксидантного потенциала плазмы крови (на 12,5% относительно интактных крыс; $p<0,05$), что частично компенсирует прооксидантный эффект рассматриваемого фактора, проявляющийся в сдвигах интенсивности липопероксидации. Проведение 10 сеансов воздействия синглетно-кислородной смеси при мощности генератора 50% не оказывает значимого влияния на общую антиоксидантную активность биологической жидкости, тогда как использование полной мощности прибора демонстрирует наиболее существенному повышению антиокислительной способности плазмы крови крыс (на 23,1% по сравнению с животными интактной группы; $p<0,05$). Это в совокупности с ингибирующим действием данного фактора на интенсивность свободнорадикальных процессов в ней указывает на антиоксидантные свойства ингаляций синглетного кислорода в выбранном режиме (100% мощности генератора).

Выявлено, что, как и в отношении биохемилюминесцентного анализа, изучаемые агенты оказывают разнонаправленное влияние на концентрацию малонового диальдегида в плазме крови и эритроцитах. Так, проведение курса ингаляций озона обеспечивает существенное нарастание значения параметра в плазме крови (на 41,7% по сравнению с крысами интактной группы; $p<0,05$). Подобного эффекта не наблюдалось по завершении 10 ингаляций синглетно-кислородной смеси, образованной при 50% мощности генератора, тогда как увеличение последней до 100% способствовало снижению концентрации малонового диальдегида на 25% относительно интактных животных ($p<0,05$), что подчеркивало антиоксидантные свойства данного фактора.

Динамика, аналогичная выявленной для плазмы крови, была зафиксирована и при оценке уровня данного метаболита в эритроцитах. В частности, внутриэритроцитарная концентрация малонового диальдегида под влиянием курса ингаляций озоно-кислородной смеси возрастала на 26,1% по сравнению с крысами, не подвергавшимися никаким воздействиям ($p<0,05$), в то время как использование синглетного кислорода либо не приводило к смещению уровня показателя (при мощности генератора 50%), либо умеренно снижало его (на 13,8% относительно животных интактной группы; $p<0,05$) при 100% мощности. Эти результаты также подтверждают характеристику озона как первично прооксидантного агента, а синглетного кислорода и его интермедиатов – как стимулятора антиоксидантной системы.

В целях уточнения механизмов действия изучаемых активных форм кислорода на антиоксидантные механизмы нами проведена оценка их влияния на состояние одного из основных компонентов указанной системы – супероксиддисмутазы эритроцитов. Исследования позволили установить, что активность данного антиоксидантного фермента значимо ингибируется по окончании курса ингаляционного применения озоно-кислородной смеси (на 17,8% относительно крыс интактной группы; $p<0,05$). Напротив, использование в качестве воздействующего агента синглетно-кислородной

газовой смеси обеспечивало активацию каталитических свойств энзима, зависящую от мощности генератора. Так, при применении половинной мощности эти сдвиги были зафиксированы на уровне тенденции (возрастание на 8,7%; $p<0,1$), тогда как полная мощность прибора способствовала существенному увеличению активности супероксиддисмутазы (на 57,3% по сравнению с животными, включенными в интактную группу; $p<0,05$).

Характеристика воздействия рассматриваемых факторов на баланс про- и антиоксидантных систем была нами дополнена оценкой интенсивности свободнорадикальных процессов и общей антиоксидантной активности тканей организма крыс. Установлено, что проведение курса ингаляций озоно-кислородной смеси вызывает стимуляцию процессов перекисного окисления липидов во всех изученных органах животных, причем наиболее выражена указанная тенденция в сердце и легких крыс (повышение светосуммы индуцированной биохемилюминесценции на 29,4 и 24,0% по сравнению с интактной группой соответственно; $p<0,05$ для обоих органов). В почках и печени интенсификация липопероксидации также достаточно значительна (на 21,1 и 12,2% относительно контроля соответственно; $p<0,05$ для обоих органов). Напротив, по завершении полного курса ингаляций синглетно-кислородной газовой смеси ни в одном из изученных органов не выявили статистически значимого повышения уровня показателя. Тенденция к таковому была зафиксирована лишь в печени при использовании 100% мощности генератора (увеличение интенсивности перекисного окисления липидов на 7,7% относительно крыс, которых не подвергали никаким воздействиям; $p<0,1$).

Анализ общей антиоксидантной активности гомогенатов тканей позволил установить, что изучаемые воздействия оказывают неодинаковое влияние на нее, причем эти эффекты органоспецифичны. Так, в легких все активные формы кислорода способствуют повышению антиоксидантного потенциала, однако степень выраженности указанного действия существенно различается. Наиболее значимое увеличение уровня параметра обнаружено

при использовании синглетного кислорода, образованного при 100% мощности генератора (на 35,2% по сравнению с животными интактной группы; $p<0,05$). Снижение мощности последнего до 50% приводило к снижению антиоксидантных свойств (нарастание параметра на 16,1% относительно интактных крыс; $p<0,05$), что было сопоставимо с влиянием озоно-кислородной смеси (+11%; $p<0,05$). Следует отметить, что уровень антиоксидантной активности ткани легких в первом случае также был статистически значимо выше, чем при других воздействиях ($p<0,05$ для обоих случаев).

В гомогенатах сердца существенные сдвиги общей антиоксидантной активности были зарегистрированы только по завершении курса ингаляций синглетно-кислородной газовой смеси, образованной при 100% мощности прибора (увеличение в 1,22 раза по сравнению с крысами, с которыми не проводили никаких дополнительных манипуляций; $p<0,05$), в то время как при использовании половинной мощности генератора и проведении ингаляций озоно-кислородной смеси значимых изменений уровня показателя не обнаружено.

В гомогенатах печени крыс стимуляцию антиоксидантного потенциала наблюдали только при применении синглетно-кислородной смеси, причем в этом случае мощность прибора не оказывала существенного влияния на значимость эффекта, но определяла его выраженность. Фиксировали увеличение значения параметра на 18,6 и 24,8% при мощностях генератора 50 и 100% соответственно ($p<0,05$ для обоих случаев), что свидетельствует о дозозависимости выявленного эффекта. Следует отметить, что использование озоно-кислородной смеси не оказывало существенного действия на рассматриваемый показатель.

Обратную динамику наблюдали при изучении общей антиоксидантной активности гомогенатов почек крыс. В этом органе статистически значимые сдвиги регистрировали только по завершении курса ингаляций озоно-кислородной смеси, для которых было характерно снижение уровня

показателя на 20,7% относительно животных интактной группы ($p<0,05$), тогда как ни один из режимов воздействия синглетно-кислородной газовой смеси не вызывал существенных изменений показателя.

В целом, анализ влияния ингаляций активных форм кислорода на окислительный метаболизм крови и тканей позволил продемонстрировать дифференцированный характер ответа, причем озоно-кислородная смесь обладает умеренным прооксидантным действием, а применение синглетно-кислородной газовой смеси (в первую очередь – при 100% мощности генератора) способствует стимуляции антиоксидантного потенциала, что в том числе реализуется за счет активации супероксиддисмутазы.

На основании проведенных исследований установлено, что рассматриваемые активные формы кислорода оказывают разнонаправленное действие на активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) эритроцитов в прямой реакции. Так, проведение курса ингаляций озоно-кислородной смеси способствует снижению каталитической активности фермента относительно животных интактной группы (на 16,8%; $p<0,05$), а использование синглетно-кислородной газовой смеси повышает ее. При этом степень данной активации энзима непосредственно зависит от примененной мощности генератора синглетного кислорода: при 50% мощности аппарата происходит увеличение показателя на 20,3% по сравнению с интактными крысами ($p<0,05$), а при 100% мощности – на 46,8% ($p<0,05$).

Противоположную тенденцию наблюдали в отношении обратной реакции лактатдегидрогеназы эритроцитов. В частности, курсовое применение озоно-кислородной смеси вызывает существенную активацию каталатических свойств изучаемого фермента на 56,7% по сравнению с крысами, не получавшими ингаляций активных форм кислорода ($p<0,05$). При этом проведение 10 ежедневных процедур вдыхания животными синглетно-кислородной газовой смеси не вызывали сдвигов активности рассматриваемого энзима относительно животных интактной группы вне

зависимости от используемой мощности генератора синглетного кислорода (50 или 100%).

Одним из дополнительных критериев, характеризующих направленность и активность энергетического метаболизма, служит уровень лактата, вследствие чего нами также проведена оценка плазменного уровня данного метаболита в крови животных сформированных групп. Выявлено, что под влиянием курса ингаляций озоно-кислородной смеси происходит увеличение указанного показателя на 34,8% по сравнению с крысами интактной группы ($p<0,05$), что объясняется превалированием обратной реакции лактатдегидрогеназы на прямой в этом случае. Подобные сдвиги при их реализации не только в крови, но и в тканях, создают предпосылки для развития признаков гипоксии в них.

Напротив, проведение курса воздействия синглетно-кислородной смеси, инициируя активацию прямой реакции лактатдегидрогеназы, обеспечивает утилизацию в ней лактата, что приводит к снижению его плазменной концентрации. Важно отметить, что, как и в отношении модификации каталитических свойств фермента в прямой и обратной реакциях, редукция уровня лактата плазмы крови зависит от мощности генератора синглетного кислорода. Так, при использовании 50% мощности прибора наблюдали лишь умеренное, но статистически значимое снижение концентрации метаболита в плазме крови по сравнению с животными интактной группы (на 8,5%; $p<0,05$), тогда как при применении полной мощности аппарата (100%) указанная тенденция выражена более существенно (–15,3%; $p<0,05$). Это дополнительно позволяет с положительной стороны охарактеризовать метаболическое действие интермедиатов синглетного кислорода.

Известно, что уровень гликемии является результирующей состояния энергетического метаболизма крови и тканей (Halliwell B.; Gutteridge J.M.C., 1999; Genestra M., 2007). Нашими исследованиями показано, что применение курсов ингаляций озоно-кислородной и синглетно-кислородной газовых смесей (при полной мощности генератора) способствует снижению уровня

глюкозы в плазме крови на 17,4 и 24,7% относительно крыс интактной группы соответственно ($p<0,05$ для обоих случаев). В то же время проведение ингаляций синглетно-кислородной смеси при использовании половинной мощности аппарата не вызывает значимых изменений уровня глюкозы в плазме крови. По нашему мнению, установленное позитивное влияние озоно-кислородной смеси на плазменную концентрацию глюкозы при негативном эффекте на каталитические свойства лактатдегидрогеназы эритроцитов может реализоваться за счет тканевых эффектов озона и продуктов его трансформации в организме. С данных позиций представляет значительный интерес оценка состояния промежуточного звена энергетического метаболизма в основных органах и тканях. Для решения этой задачи нами было проведено исследование активности лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакциях в гомогенатах легких, сердца, почек и печени.

Выявлено, что рассматриваемые активные формы кислорода оказывают разнонаправленное влияние на активность лактатдегидрогеназы тканей крыс в прямой реакции. В частности, в гомогенатах легких применение озоно-кислородной смеси способствует снижению уровня параметра на 15,8% относительно животных интактной группы ($p<0,05$), в то время как воздействие интермедиатов синглетного кислорода на легочную ткань сопровождается возрастанием прямой реакции фермента в ней, причем эта тенденция дозозависима. Так, использование половинной мощности генератора повышает активность энзима на 16% по сравнению с крысами, с которым не производили никаких манипуляций ($p<0,05$), при 100% мощности прибора – на 26,5% соответственно ($p<0,05$).

В гомогенатах сердца активность лактатдегидрогеназы в прямой реакции возрастала при всех тестируемых воздействиях, однако выраженность данного эффекта существенно вариьровала. Так, курсы ингаляций озоно-кислородной смеси и синглетно-кислородной газовой смеси (при 50% мощности генератора) примерно в равной степени стимулировали

каталитические свойства фермента в прямой реакции (на 22,2 и 14,8% относительно интактных крыс соответственно; $p<0,05$ для обоих факторов), тогда как применение синглетно-кислородной смесий при полной мощности аппарата демонстрировало более отчетливое активирующее действие на прямую реакцию лактатдегидрогеназы (+44,6%; $p<0,05$).

Характер модификации каталитических свойств рассматриваемого энзима в гомогенатах печени был в целом сопоставим с описанным для образцов ткани легких, однако амплитуда сдвигов показателя в данном органе была несколько ниже, чем в последних.

Наконец, особая динамика активности изучаемого фермента энергетического метаболизма была зарегистрирована в образцах ткани почек. Установлено, что в гомогенатах ткани указанного органа существенное изменение значения параметра по сравнению с интактными животными имело место лишь при использовании для ингаляций озоно-кислородной смеси (на 36,4%; $p<0,05$). При этом применение синглетно-кислородного воздействия на оказывало значимого влияния на активность фермента ни при одном из рассмотренных режимов.

Вариабельность действия различных активных форм кислорода на каталитические свойства лактатдегидрогеназы в обратной реакции также определялась их типом. Так, в ткани легких активность фермента в обратной реакции существенно возрастала (на 68,7% относительно интактных животных; $p<0,05$). Напротив, при действии синглетно-кислородной газовой смеси каталитические свойства энзима в обратной реакции умеренно ингибируются (на 10,5 и 23,5% при 50 и 100% мощностях генератора соответственно; $p<0,05$ для обоих случаев). Подобные, но меньшие по модулю изменения зафиксированы в ткани печени, что аналогично сдвигам, установленным для прямой реакции фермента в данном органе.

Кроме того, единая тенденция к угнетению каталитических свойств лактатдегидрогеназы в прямой реакции отмечена при действии рассматриваемых активных форм кислорода в гомогенатах ткани сердца. При

этом наиболее значительное снижение выявлено при действии синглетно-кислородной смеси, образованной при полной мощности аппарата (на 23,2% относительно интактных животных; $p<0,05$). Остальные воздействия были менее значимы и сопоставимы по интенсивности ингибирующего эффекта.

В ткани почек существенные отклонения были зафиксированы только при проведении курса ингаляций озоно-кислородной смеси и проявлялись в нарастании значения показателя на 8,7% по сравнению с группой животных, не подвергавшихся никаким манипуляциям, кроме обследования ($p<0,05$).

Таким образом, активные формы кислорода при ингаляционном применении оказывают неодинаковое влияние на состояние энергетического обмена в тканях животных, причем синглетно-кислородная газовая смесь обладает преимущественных стимулирующим действием на него, тогда как озоно-кислородная смесь активирует энергетический обмен в сердце и почках, угнетая его в легких и печени.

Параллельно с оценкой системного действия различных активных форм кислорода на параметры энергетического метаболизма нами выполнено тестирование состояния детоксикационных систем крови на основании анализа активности альдегиддегидрогеназы эритроцитов. Установлено, что приведение курса ингаляций озоно-кислородной смеси способствует снижению каталитической активности фермента (на 13,3% по сравнению с крысами интактной группы; $p<0,05$). Напротив, применение в качестве ингалируемого средства синглетно-кислородной газовой смеси приводит к активации энзима, причем выраженность данного эффекта, как и в отношении большинства других показателей, зависит от используемой мощности генератора. В частности, при 50% мощности прибора активность альдегиддегидрогеназы возрастала на 64,8% относительно интактных животных ($p<0,05$), а при 100% - на 108,4% соответственно ($p<0,05$).

Кроме того, в рамках третьего этапа исследования изучены особенности модификации электрокинетических свойств мембран эритроцитов крыс при системном воздействии активных форм кислорода. Нами обнаружено, что

проведение курса ингаляций озона способствует значительному снижению ЭФПЭ (на 30% относительно контрольной группы; $p<0,01$), что согласуется с результатами эксперимента in vitro. Напротив, проведение ингаляций синглетного кислорода обеспечивает стимуляцию подвижности эритроцитов, причем использование полной мощности (100%) генератора данной активной формы кислорода приводило к достаточно существенному смещению уровня параметра (+13%; $p<0,05$ по сравнению с интактными животными), тогда как при использовании 50% режима наблюдали сохранение физиологического уровня электрокинетической подвижности эритроцитов.

Одним из значимых компонентов комплексной оценки системных эффектов ингаляций активных форм кислорода служило изучение их действие на гемодинамические показатели и состояние микроциркуляции. На основании результатов исследования системной и локальной гемодинамики показан дифференцированный характер их ответа на ингаляционное применение озоно-кислородной газовой смеси и потока от генератора синглетного кислорода (при различной мощности последнего). При этом особенностью действия синглетного кислорода является стабилизирующее влияние на кардиоритм, проявляющееся в сохранении физиологического режима его вариабельности, а также стимуляция интенсивности микроциркуляции за счет преимущественной активации «внутренних» регуляторных регуляторных факторов (эндотелиальный и нейрогенный), а также дыхательного компонента.

Оценка модификации кристаллогенных свойств сыворотки крови крыс указала на дифференцированность изменения данного интегрального параметра на действие различных активных форм кислорода, причем озоно-кислородная смесь выступает как активатор структуризации биосреды (с признаками стимуляции окислительной модификации белков), а синглетно-кислородная газовая смесь – как умеренный ингибитор с обратным метаболическим действием.

В целом, проведенные комплексные исследования позволили продемонстрировать многогранность биологического действия газового потока от генератора синглетного кислорода, проявляющегося как в модификации метаболических, так и функциональных показателей.

Наши исследования позволили установить, что поток от генератора синглетного кислорода оказывает модулирующее действие на образцы крови и организм здоровых крыс, проявляющееся в следующем:

1. Обработка крови газовым потоком синглетного кислорода (при 100 % мощности) приводит к повышению общей антиоксидантной активности плазмы (на 37,7 %), каталитических свойств супероксиддисмутазы (на 32,1 %), активации кристаллогенных свойств плазмы (по индексу структурности – на 89,5 %, по кристаллизуемости – на 54 %) и нарастанию электрофоретического потенциала эритроцитов (на 13 %).

2. Проведение курса ингаляций синглетного кислорода сопровождается нарастанием антиоксидантной активности плазмы крови крыс (на 23,1 %), снижением концентрации малонового диальдегида в плазме и эритроцитах (на 25 и 13,8 % соответственно), стимуляцией каталитических свойств супероксиддисмутазы (на 57,3 %) и альдегиддегидрогеназы (на 108,4 %), снижением концентрации лактата и глюкозы в плазме крови (на 15,3 и 24,7 % соответственно), увеличением активности лактатдегидрогеназы в прямой реакции (на 46,8%), умеренным снижением кристаллогенной активности плазмы (по кристаллизуемости – на 31,2 %) и электрофоретического потенциала эритроцитов (на 13 %).

3. При ингаляционном применении синглетного кислорода, по параметрам окислительного и энергетического метаболизма наблюдали тканеспецифичный ответ. Его особенности при действии 100 % мощности генератора включают выраженное повышение антиоксидантной активности в ткани легких, сердца и печени (на 35,2; 22,0 и 24,8 % соответственно). Кроме того, после курса ингаляций сиглетного кислорода в данном режиме фиксировали активацию прямой реакции лактатдегидрогеназы на 26,5; 44,6 и 36,4 % и ингибирование обратной реакции фермента на 23,5; 23,2 и 19,9 % в гомогенатах легких, сердца и печени соответственно.

4. Ингаляции синглетного кислорода повышают показатель микроциркуляции (на 13,6 %) преимущественно за счет увеличения амплитуды эндотелиального компонента (на 27,6 %)

5. Применение синглетного кислорода вызывает умеренную брадикардию (на 16,6 %) и повышение активности симпатической стимуляции миокарда (по повышению индекса напряжения на 113 % на фоне возрастания амплитуды моды на 23,6 %, а также уменьшению соотношения мощностей спектра в диапазонах низких и высоких частот на 20,3 %).

Список литературы:

1. Алехина, С.П. Озонотерапия. Клинические и экспериментальные аспекты / С.П. Алехина, Т.Г. Щербатюк. - Нижний Новгород, 2003.
2. Арутюнян, А.В. Методы оценки свободно-радикального окисления и антиоксидантной системы организма / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина. - СПб: Фолиант; 2000. - 104 с.
3. Ашихмин, С.П. Соединения азота в биомедицинских науках / С.П. Ашихмин, А.К. Мартусевич, О.Б. Жданова, А.Е. Колосов / Под ред. д.м.н., проф. И.В. Шешунова. - М.: Издательский дом Академии Естествознания, 2012. - 88 с.
4. Барабой, В.А. Биоантиоксиданты / В.А. Барабой. - Киев: Книга плюс; 2006. - 462 с.
5. Барер, Г.М. Кристаллографический метод изучения слюны / Г.М. Барер, А.Б. Денисов. - М.: ФГОУ «ВУНМЦ Росздрава», 2008. - 240 с.
6. Болдырев, А.А. Введение в биомембранологию / А.А. Болдырев. - М: Изд-во МГУ; 1990. 208 с.
7. Болдырев, А.А. Антиоксидантные системы в тканях мышей с ускоренным темпом старения (SAM, Senescence Accelerated Mice) / А.А. Болдырев, М.О. Юнева, Е.В. Сорокина с соавт. // Биохимия. – 2001. – Vol. 66. – С. 1157-1163.
8. Бузоверя, М.Э. Морфометрический анализ фаций сыворотки крови / М.Э. Бузоверя с соавт. // Клиническая лабораторная диагностика. 2003. №9. С. 22-23.
9. Буйлин, В.А. Низкоинтенсивные лазеры в терапии различных заболеваний / В.А. Буйлин, С.В. Москвин. - М.: ТОО «Фирма «Техника», 2005. - 176 с.
10. Ванин, А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях / А.Ф. Ванин // Вестник РАМН. - 2000. - №4. - С. 3-5.
11. Ванин, А.Ф. Оценка действия динитрозильных комплексов железа на некоторые физико-химические показатели крови in vitro / А.Ф. Ванин,

А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин с соавт. // Медицинский альманах. - 2013. - №3. - С. 37-38.

12. Ванин, А.Ф. Действие динитрозильного комплекса железа на метаболизм и клеточные мембраны ишемизированного сердца крысы / А.Ф. Ванин, О.И. Писаренко, И.М. Студнева с соавт. // Кардиология. - 2009. - №12. - С. 43-49.

13. Ванин, А.Ф. Участие активных форм кислорода в модуляции гипотензивного эффекта динитрозильных комплексов железа / А.Ф. Ванин, Е.И. Чазов, В.И. Капелько с соавт.// Кардиологический вестник. - 2007. - №2. - С. 31-37.

14. Величковский, Б.Т. Свободно-радикальное окисление как звено срочной и долговременной адаптации организма к факторам окружающей среды / Б.Т. Величковский // Вестник РАМН. – 2001. - N 6. С. 45-53.

15. Величковский, Б.Т. Экологическая пульмонология (роль свободно-радикальных процессов) / Б.Т. Величковский // Екатеринбург: Издание ЕМНЦ ПОЗРПП Минздрава России; 2003. - 141 с.

16. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурина // Успехи биологической химии. - 2009. - Т. 49. - С. 341-385.

17. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 2000. –Т. 6, N 12. – С. 13-19.

18. Волчецкий, А.Л. Кристаллизация и кристаллография: медико-биологические аспекты / А.Л. Волчецкий с соавт. - Архангельск, 1999. - 374 с.

19. Воробьев, А.В.. Кристаллогенез биологических жидкостей и субстратов в оценке состояния организма / А.В. Воробьев, А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин. - Нижний Новгород: ФГУ «ННИИТО Росмедтехнологий», 2008. - 384 с.

20. Гаркави, Л.Х. Антистрессорные реакции и активационная терапия / Л.Х. Гаркави, Е.Б. Квакина, Т.С. Кузьменко. - М.: Имедис, 1998. – 35 с.

21. Гречканев, Г.О. Озонотерапия в гинекологии (современное состояние вопроса) / Г.О. Гречканев, Т.С. Качалина // Нижегородский мед журнал. Приложение «Озонотерапия». – 2003. - С. 112-115.

22. Голиков, П.П. Оксид азота и перекисное окисление липидов как фактор эндогенной интоксикации при неотложных состояниях / П.П. Голиков, Н.Ю. Николаева, И.А. Гавриленко // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2000. № 2. С. 6–9.

23. Граник, В.Г. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств / В.Г. Граник, Н.Б. Григорьев. - М.: Вузовская книга, 2004. - 360 с.

24. Гудков, Л.Л. Антиоксидантное и прооксидантное действие доноров и метаболитов оксида азота / Л.Л. Гудков, К.Б. Шумаев, Е.И. Каленникова с соавт. // Биофизика. - 2007. - Т. 52, №3. - С. 503-508.

25. Гусакова, С.В. Газовая сигнализация в клетках млекопитающих / С.В. Гусакова, И.В. Ковалев, Л.В. Смаглий с соавт. // Успехи физиологических наук. - 2015. - Т. 46, №4. - С. 53-73.

26. Денисов, А.Б. Алгоритм оценки кристаллических фигур, полученных при высушивании смешанной слюны / А.Б. Денисов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2004. - Т. 136. №7. - С. 37-40.

27. Егорова, М.О. Биохимическое обследование в клинической практике / М.О. Егорова. - М.: Практическая медицина. 2008. - 143 с.

28. Журавлев, А.И. Свободно-радикальная биология / А.И. Журавлев. - М: Моск. вет. академия; 1993. - 70 с.

29. Заворотная, Р.М. Синглетный кислород при лечении ряда патологических процессов: физико-химические аспекты / Р.М. Заворотная // Украинский ревматологический журнал. - 2002. - Т. 7. №1. - С. 35-37.

30. Зайцев, В.Я. Озониды олефинов как относительно новый и весьма перспективный класс биологически активных соединений / В.Я. Зайцев, С.Д.

Разумовский // В кн.: Озон в биологии и медицине. Материалы 1-й Украинско-русской науч.-практ. конф. Одесса; 2003. - С. 9-11.

31. Зенков, Н.К. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. - М: МАИК "Наука/Интерпериодика", 2001.

32. Змызгова, А.В. Клинические аспекты озонотерапии / А.В. Змызгова, В.А. Максимов - М: НПЦ озонотерапии; 2003. - 287 с.

33. Казимирко, В.К. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия / В.К. Казимирко, В.И. Мальцев, В.Ю. Бутылин, Н.И. Горобец. - К.: Морион, 2004.

34. Кидалов, В.Н. Тезиографические исследования крови и их практические возможности / В.Н. Кидалов, А.А. Хадарцев, Г.Н. Якушина // Вестник новых медицинских технологий. - 2004. - Т. 11. №1-2. - С. 23-25.

35. Коган, А.Х. Модулирующая роль CO_2 в действии активных форм кислорода / А.Х. Коган, С.В. Грачев, С.В. Елисеева. - М: ГЭОТАР-Медиа; 2006. - 224 с.

36. Крыжановский, Г.Н. Дизрегуляционная патология / Г.Н. Крыжановский // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2002. - №3. – С. 2-19.

37. Крыжановский, Г.Н. Некоторые общебиологические закономерности и базовые механизмы развития патологических процессов / Г.Н. Крыжановский // Архив патологии. – 2001. – N 6. – С. 44-49.

38. Крылов, В.Н. Изменение электрофоретической подвижности изолированных эритроцитов при действии стресс-факторов / В.Н. Крылов, А.В. Дерюгина // Гематология и трансфузиология. - 2011. - №5. - С. 18-21.

39. Костюк, В.А. Биорадикалы и биоантиоксиданты / В.А. Костюк, А.И. Потапович. - Минск: БГУ, 2004.

40. Кочетов, Г.А. Практическое руководство по энзимологии / Г.А. Кочетов. - Москва: Высшая школа, 1980.

41. Ланкин, В.З. Свободно-радикальные процессы в норме и при патологических состояниях / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков. - М: РКНПК МЗ РФ; 2001. - 78 с.

42. Малков, М.А. Разработка способа фотодинамической терапии для лечения неопластических новообразований с использованием фотосенсибизатора на основе препарата копропорфирин / М.А. Малков, Н.Н. Петрищев, С.Н. Мишуткин // Фундаментальные исследования. - 2008. - №1. - С. 141-146.

43. Мартусевич, А.К. Основы биокристалломики. Теория, методология, методы / А.К. Мартусевич. - LAP LAMBERT Academic Publishing, 2011. - 200 с.

44. Мартусевич А.К. Процесс структурной самоорганизации биологических жидкостей при дегидратации: системный анализ / А.К. Мартусевич // Информатика и системы управления. - 2010. - №2. - С. 31-34.

45. Мартусевич, А.К. Кристаллография биологической жидкости как метод оценки ее физико-химических свойств / А.К. Мартусевич, Н.Ф. Камакин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2007. - Т. 143, №3. - С. 358-360.

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

47. Мартусевич, А.К. Кристаллогенные свойства биологической жидкости при введении химического агента / А.К. Мартусевич, Ж.Г. Симонова // Современные технологии в медицине. – 2011. - №1. – С. 95-98.

48. Мартусевич, А.К. Влияние ингаляций оксида азота на состояние окислительного и энергетического метаболизма крови крыс / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, С.П. Ашихмин, С.П. Перетягин // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2015. - Т. 101, №2. - С. 180-188.

49. Мартусевич, А.К. Влияние свободного и депонированного оксида азота на энергетический метаболизм крови / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин // Современные технологии в медицине. - 2013. - Т. 5, - №4. - С. 33-38.

50. Мартусевич, А.К. Оценка влияния некоторых физических факторов на энергетический метаболизм крови in vitro / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин с соавт. // Биомедицина. - 2013. - № 1. - С. 103-108.

51. Масленников, О.В. Озонотерапия: Руководство для врачей / О.В. Масленников, К.Н. Конторщикова. - Нижний Новгород, 2008.

52. Машковский, М.Д. Лекарства XX века / М.Д. Машковский / М.: Новая волна. - 1998.

53. Меньщикова, Е.Б. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, И.А. Бондарь, В.А. Труфакин / Новосибирск: АРТА. - 2008. - 284 с.

54. Мерзляк, М.Н. Роль супероксидных анион-радикалов и синглетного кислорода в патологии мембран / М.Н. Мерзляк, А.С. Соболев // Итоги науки и техники. Биофизика. М: ВИНИТИ 1975. - Т. 5. – С. 118-165.

55. Нагорная, Н.В. Энергетический обмен клетки в норме и патологии. Возможности его оценки / Н.В. Нагорная, Н.А. Четверик, А.А. Федорова, Я.В. Куриленко // В помощь педиатру. - 2008. - Т. 15, - №6. - С. 34-38.

56. Назаренко, Г.И. Лабораторные методы диагностики неотложных состояний./ Г.И. Назаренко, А.А. Кишкун / М.: Медицина. - 2002. - 566 с.

57. Новицкий, В.В. Физиология и патофизиология эритроцита. / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая / Томск: Изд-во ТГУ, - 2004. - 202 с.

58. Перетягин, С.П. Патофизиологическое обоснование озонотерапии постгеморрагического периода / С.П. Перетягин. - Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Казань; 1991.

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

60. Перетягин, С.П. Молекулярно-клеточные механизмы трансформации гомеостаза биосистем активными формами кислорода и азота / С.П. Перетягин, А.К. Мартусевич, А.Ф. Ванин // Медицинский альманах. - 2013. - №3. - С. 80-81.

61. Рапис, Е.Г. Белок и жизнь. Самоорганизация, самосборка и симметрия наноструктурных супрамолекулярных пленок белка. / Е.Г. Рапис / М.: МИЛТА-ПКП ГИТ, - 2003. - 368 с.

62. Рапис, Е.Г. Самоорганизация и супермолекулярная химия пленки белка от нано- до макромасштаба / Е.Г. Рапис // Журнал технической физики. - 2004. - Т. 74. - Вып. 4. - С. 117–122.

63. Саакян, И.Р. Физиологическая активация перекисного окисления отрицательными аэроионами / И.Р. Саакян, В.Г. Гогвадзе, Т.В. Сирота с соавт. // Биофизика. - 1998. – Т. 43, №4. – С. 580-587.

64. Савина, Л.В. Кристаллоскопические структуры сыворотки крови здорового и больного человека./ Л.В. Савина / Краснодар, - 1999. - 238 с.

65. Самосюк, И.З. Синглетно-кислородная терапия. Аппараты «МИТ-С» / И.З. Самосюк, Н.В. Чухраев, О.И. Писанко с соавт. // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. - 2007. - №1. - С. 67-75.

66. Саприн, А.Н. Окислительный стресс как возможный универсальный этиологический фактор развития различных патологических процессов / А.Н. Саприн. - В кн.: Национальная науч.-практ. конф. с международным участием «Свободные радикалы и болезни человека». Смоленск;1999. - С. 42-44.

67. Сидоркин, В.Г. Метод определения МДА в эритроцитах и плазме крови с помощью тиобарбитуровой кислоты. / В.Г. Сидоркин, И.А. Чулошникова / Авторское свидетельство СССР - №1807410. - 1993.

68. Симутис, И.С. Изменение электрофоретической подвижности и формы эритроцитов при действии озона на эритроцитарную массу / И.С. Симутис, А.В. Дерюгина, Г.А. Бояринов с соавт. // Медиаль. - 2013. - №4. - С. 20-21.

69. Синглетно-кислородная терапия. Научно-методическое пособие / Под ред. И.З. Самосюк, Л.И. Фисенко. - Киев, 2007. - 228 с.

70. Сирота, Т.В. Новый подход к исследованию аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы / Т.В. Сирота // Вопросы медицинской химии. - 1999. - №3. - С. 56-58. - Бюлл. № 13.

71. Соловьева, А.Г. Новый способ оценки динамики метаболизма крови у больных и термической травмой / А.Г. Соловьева, Ю.В. Зимин // Современные технологии в медицине. – 2012. – №2. – С. 116-117.

72. Соловьева, А.Г. Модификация состояния некоторых детоксикационных систем крови при ее обработке оксидом азота в свободной и связанной форме / А.Г. Соловьева, А.К. Мартусевич // Врач-аспирант. - 2014. - №1.2. - С. 294-299.

73. Судаков, К.В. Нормальная физиология. Курс физиологии функциональных систем. / К.В. Судаков с соавт. /М.: «Медицинское информационное агенство», - 1999.

74. Тарасевич, Ю.Ю. Механизмы и модели дегидратационной самоорганизации биологических жидкостей / Ю.Ю. Тарасевич // Успехи физических наук. - 2004. - Т. 174, №7. - С. 779-790.

75. Узденский, А.Б. Клеточные-молекулярные механизмы фотодинамической терапии./ Узденский А.Б. / М.: Наука, - 2010. - 321 с.

76. Улащик, В.С. Активные формы кислорода, антиоксиданты и действие лечебных физических факторов / В.С. Улащик // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. 2013. №1. С. 60-69.

77. Улащик, В.С. Синглетно-кислородная терапия — новый модифицированный метод лечения кислородом / В.С. Улащик // Здравоохранение. - 2007. - №10. - С. 21-23.

78. Шабалин, В.Н. Морфология биологических жидкостей человека. / В.Н. Шабалин, С.Н. Шатохина. - М.: Хризопраз, - 2001. - 304 с.

79. Шанин, Ю.Н. Антиоксидантная терапия в клинической практике (теоретическое обоснование и стратегия проведения). / Ю.Н. Шанин, В.Ю. Шанин, Е.В. Зиновьев / Санкт-Петербург: ЭЛБИ-СПб., - 2003. - 128 с.

80. Шинкаренко, Н.В. Химические свойства синглетного молекулярного кислорода и значение его в биологических системах / Н.В. Шинкаренко, В.Б. Алесковский // Успехи химии. - 1982. - Т. 51, №5. - С. 713-735.

81. Шумаев, К.Б. Взаимодействие динитрозильных комплексов железа с интермедиатами окислительного стресса / К.Б. Шумаев, А.А. Губкин, С.А. Губкина с соавт. // Биофизика. - 2006. - Т.51, №3, - С.472-477.

82. Щербатюк, Т.Г. Современное состояние озонотерапии в медицине. Перспективы применения в онкологии / Т.Г. Щербатюк // Современные технологии в медицине. – 2010. - №1. – С. 99-106.

83. Яхно, Т.А Белок и соль: пространственно-временные события в высыхающей капле / Т.А. Яхно с соавт. // Журнал технической физики. - 2004. - Т. 74,вып. 8. - С. 100-108.

84. Яхно, Т.А. Капли биологических жидкостей, высыхающие на твердой подложке: динамика морфологии, массы, температуры и механических свойств. / Т.А. Яхно, В.В. Казаков, О.А. Санина с соавт. // Журнал технической физики. - 2010. - Т. 80, вып. 7. - С.17-23.

85. Aruoma, O.I. Free radicals, oxidants and antioxidants: trend towards the year 2000 and beyond. In: Molecular Biology of Free Radicals in Human Disease / O.I. Aruoma // Aruoma O. and Halliwell B. (Eds.). Oica International, Saint Lucia, London. 1998. – P. 1-28.

86. Bailey S.M. A review of the role of reactive oxygen and nitrogen species in alcohol-induced mitochondrial energy metabolism / S.M. Bailey // Free Radic. Res. – 2003. – Vol. 37. – P. 585-596.

87. Bartz, R.R. Clinical review: oxygen as a signaling molecule / R.R. Bartz, C.A. Piantadosi // Crit. Care. – 2010. – Vol. 14, N 5. – P. 234.

88. Bajrovic, F. et al. The contribution of lumbal sympathetic neurones activity to rats skin blood flow oscillation / F. Bajrovic et al. // European Juornal of Physiology. - 2000. - Vol. 439 (suppl.). - P. R158-R159.

89. Biewenga, G.P. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid / G.P. Biewenga, G.R, Haenen. A. Bast // Genю Pharmacol. –1997. - Vol. 29. P. 315–331.

90. Bocci, V. Ozone as a bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozonetherapy today / V. Bocci // J. Biolog. Regulators and Homeostatic agents. - 1997. – Vol. 10, no. 2/3. – P. 31-53.

91. Briviba, K. Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems / K. Briviba, l-O. Klorz, H. Sics // Biol. Chem. - 1997. - Vol. 378. - P. 1259-1265.

92. Cadenas, E. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging / Cadenas E., Davies K.J. // Free Radical Biol. Med. – 2000. – Vol. 29. – P. 222-230.

93. Cederbaum, A.I. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury / A.I. Cederbaum, Y. Lu, D. Wu // Arch. Toxicol. – 2009. – Vol. 83. – P. 519-548.

94. Chen, Z. An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation / Z. Chen, M.W. Foster, J. Zhang et al. // PNAS. - 2005. - Vol. 102,N 34. - P. 12159-12164.

95. Chen, W.R. Laser-photosensitizer assisted immunotherapy: a novel modality for cancer treatment / W.R. Chen et al. // Cancer Lett. – 1997. – Vol. 115. – P. 25-30.

96. Clavo, B. J.L Pérez, L. López et al. Ozone therapy for tumor oxygenation: a pilot study / B. Clavo, J.L Pérez, L. López et al. // Evid. Based Complement. Alternat. Med. – 2004. – Vol. 13, no. 3. – P. 186-193.

97. Cominacini L., Pasini A. F., Garbin U. et al. // JACC. - 2003. - Vol. 42, №10. - P. 1838–1844.

98. Commoner, B. Free radicals in biological materials / B. Commoner, J. Townsend, G.E. Pake // Nature. – 1954. – Vol. 174. – P. 689-691.

99. D'Autrèaux, B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis / B. D'Autrèaux, M.B. Toledano // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. – 2007. - N 8. – P. 813-824.

100. Davies, M.J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences / M.J. Davies // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – Vol. 305. – P. 761-770.

101. Davies, M.J. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen / M.J. Davies // Photochem. Photobiol. Sci. – 2004. – Vol. 3. – P. 17–25.

102. de la Lande, I.S. Aldehyde dehydrogenase, nitric oxide synthase and superoxide in ex vivo nitrate tolerance in rat aorta / I.S. de la Lande, J.M. Stepien, A.C. Philpott et al. // Eur J. Pharmacol. - 2004. - Vol. 496, № 1-3. - P. 141-149.

103. DeMaster, E.G. Mechanism for the inhibition of aldehyde dehydrogenase by nitric oxide / E.G. DeMaster, B. Redfern, B.J. Quast et al. // Alcohol. - 1997. - Vol. 14,N 2. - P. 181-189.

104. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Dröge // Physiol. Rev. – 2002. – Vol. 82. - P. 47-95.

105. Evans, J.L. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes / J.L. Evans et al. // Endocr. Rev. – 2003. – Vol. 23. – P. 599-622.

106. Fialkow, L. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function / L. Fialkow, Y. Wang, G.P. Downey // Free Radical Biol. Med. – 2007. – Vol. 42. – P. 153-164.

107. Flors, C. Imaging the production of singlet oxygen in vivo using a new fluorescent sensor, singlet oxygen sensor green (R) / C. Flors et al. // J. Exp. Bot. – 2006. – Vol. 57. – P. 1725–1734.

108. Forman, H.J. Reactive oxygen species and alpha,beta-unsaturated aldehydes as second messengers in signal transduction / H.J. Forman // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2010. – Vol. 1203. – P. 35–44.

109. Frederiksen, P.K. Two-photon photosensitized production of singlet oxygen / P.K. Frederiksen, M. Jorgensen, P.R. Ogilby // J. Am. Chem. Soc. 2001. – Vol. 123. – P. 1215–1221.

110. Hallett, F.R. Reactions between singlet oxygen and the constituents of nucleic acids. Importance of reactions in photodynamic processes / F.R. Hallett, B.P. Hallett, W. Snipes // Biophys. J. – 1970. – no. 10. – P. 305-315.

111. Halliwell, B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. - Oxford, UK: Oxford University Press; 1999.

112. Hulten, L.M. Effect of singlet oxygen energy on reactive oxygen species generation by human monocytes / L.M. Hulten, M. Holmstrem, B. Soussi // Free Radic. Biol. Med. – 1999. – Vol. 27, no. 11/12. – P. 1203-1207.

113. Husain, K. Dose response of alcohol-induced changes in BP, nitric oxide and antioxidants in rat plasma / K. Husain, J. Mejia, J. Lalla, S. Kazim // Pharmacol. Res. – 2005. – Vol. 51, no. 4. – P. 337–343.

114. Genestra, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants / M.Genestra // Cell Signal. - 2007. - Vol. 19. - P. 1807-1819.

115. Griendling, K.K. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS / K.K. Griendling, G. FitzGerald // Circulation. - 2003. - Vol. 21. - P. 1912-1916.

116. Gries, A. Inhaled nitric oxide inhibits human platelet aggregation, p-selectin expression, and fibrinogen binding in vitro and in vivo / A. Gries, C. Bode, K. Peter et al. // Circulation. - 1998. - Vol. 97. - P. 1481-1487.

117. Gryglewsky, R.J. Nitric Oxide. Basic Research and Clinical / R. J. Gryglewsky, P. Minuz /Application, IOS Press, Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington, - 2001.

118. Kalyanaraman, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms / B. Kalyanaraman // Redox biology. - 2013. - Vol. 1. - P. 244-257.

119. Kondrashova, M.N. Preservation of native properties of mitochondria in rat liver homogenate / M.N. Kondrashova, N.I. Fedotcheva, I.R. Saakyan et al. // Mitochondrion. – 2001. – no. 1. – P. 249–267.

120. Koppaka, V. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application / V. Koppaka, D.C. Thompson, Y. Chen et al. /// Pharmacol. Rev. - 2012. - Vol. 64,№ 3. - P. 520-539.

121. Krasnovsky, A.A., Jr. Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems: IR phosphorescence studies / A.A. Krasnovsky, Jr. // Membr. Cell Biol. – 1998. – Vol. 12, no. 5. – P. 665-690.

122. Landry, M.P. Characterization of photoactivated singlet oxygen damage in single-molecule optical trap experiments / M.P. Landry, P.M. McCall, Z. Qi, Y.R. Chemla // Biophys. J. – 2009. – Vol. 97, no. 8. – P. 2128-2136.

123. Lubart R., Malik Z., Rochkind S., Fisher T. // Laser Theor. - 1990. - Vol. 2,№1. - P. 65–68.

124. Manukhina, E.B. Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. / E.B. Manukhina, H.F. Downey, R.T. Mallet // Exp. Biol. Med. - 2006. - Vol. 231. - P. 343-365.

125. Martusevich, A.K. Experimental study of erythrocytes energy metabolism under inhalations of nitric oxide / A.K. Martusevich, A.G. Samodelkin, A.G. Soloveva, R.G. Karimova et al. // Asian Journal of Biochemical and Pharmacuetical Research. - 2015. - Vol. 5, № 2. - P. 130-135.

126. Martusevich, A.K. Action of gaseous nitric oxide on some physical and chemical parameters of human blood samples / A.K. Martusevich, A.G. Soloveva,

S.P. Peretyagin, A.F. Vanin // J. Biomedical Science and Engineering. - 2014. - Vol. 7, №9. - P. 675-681.

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

128. Moncada S., Radomski M.W., Palmer R.M.J. // Biochem. Pharmacol. - 1988. - Vol. 37. - P. 2495-2501.

129. Nihei, Y. Detection of surface immunoreactions on individual cells by electrophoretic mobility measurement in a micro-channel / Y. Nihei, H. Asai, T. Ukai et al. // Sensors and actuators. - 2008. - № 131. - P. 285-289.

130. Nitric Oxide. Basic Research and Clinical Application / Ed. R.J. Gryglewsky, P. Minuz. Amsterdam; Berlin; Oxford; Tokyo; Washington: IOS Press, DC, - 2001.

131. Novo, E. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis / E. Novo, M. Parola // Fibrogenesis Tissue Repair. - 2008. - Vol. 1, №5. - P. 1-58.

132. Peretyagin, S.P. Respiratory Function and Blood Gases Transport State at Experimental Hypoxia: Ozone Therapy Correction / S.P. Peretyagin, A.K. Martusevich, A.A. Struchkov et al. // Revista Espanola de Ozonoterapia. - 2012. - Vol. 2, №1. - P. 141-146.

133. Peretyagin, S.P. Ozone therapy in traumatology and burns treatment / S.P. Peretyagin, A.A. Struchkov // Revista Española de Ozonoterapia. - 2013. - Vol. 3, №1. - P. 67-73.

134. Petrushanko, I. Na-K-ATPase in rat cerebellar granule cells is redox sensitive / I. Petrushanko, N. Bogdanov, E. et Bulygina al. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2006. – Vol. 290. – P. 916-925.

135. Radicals for Life: The Various forms of Nitric Oxide / E. van Faassen, A.F. Vanin (Eds.). Amsterdam, Elsevier, 2007.

136. Rahman, I. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases / I. Rahman, S.K. Biswas, A. Kode // Eur. J. Pharmacol. - 2006. - Vol. 533. - P. 222-239.

137. Ravanat, J.L. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA / J.L. Ravanat et al. // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275. – P. 40601-40604.

138. Ribeiro, D.T. Singlet oxygen induced DNA damage and mutagenicity in a singlestranded SV40-based shuttle vector / D.T. Ribeiro et al. // Photochem. Photobiol. – 1992. – Vol. 55. – P. 39-45.

139. Ribeiro, D.T. Singlet oxygen induces predominantly G to T transversions on a singlestranded shuttle vector replicated in monkey cells / D.T. Ribeiro et al. // Free Radical Res. – 1994. – Vol. 21. – P. 75-83.

140. Ricciardi, M.J. Inhaled nitric oxide in primary hypertension: A safe and effective agent for predicting response to nifedipine / M.J. Ricciardi, B.P. Knight, F.J. Martinez, M. Rubenfire // Journal of the American College of Cardiology. - 1998. - Vol. 32. - P. 1068-1073.

141. Rilling, S. The use of ozone in medicine / S. Rilling, R. Vieban. - New York: Haug; 1987. - 180 p.

142. Sanina, N.A. Reactions of sulfur-nitrosyl iron complexes of “g = 2.03” family with hemoglobin (Hb): Kinetics of Hb–NO formation in aqueous solutions / N.A. Sanina, L.A. Syrtsova, N.I. Shkondina et al. // Nitric Oxide: Biol. Chem. - 2007. - V. 16. - P. 181-188.

143. Schweitzer, C. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen / C. Schweitzer, R. Schmidt // Chem. Rev. – 2003. – Vol. 103, no. 5. – P. 1685-1757.

144. Shekhter, A.B. Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds / A.B. Shekhter, V.A. Serezhenkov, T.G. Rudenko et al. // Nitric oxide. - 2005. - Vol. 12. - P. 210-219.

145. Sheremetev, Y.A. Effect of neuramidase and proteolytyc enzymes on electrophoretic mobility of erythrocytes and their aggregation induced by La^{3+} /

Y.A. Sheremetev, F.I. Suslov, A.V. Deriugina, A.V. Sheremetev // Biophysics. - 2000. - Vol. 45, no. 1. - P. 79-82.

146. Shumaev, K.B. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl iron complexes / K.B. Shumaev, A.A. Gubkin, V.A. Serezhenkov et al. // Nitric Oxide Biol. Chem. - 2008. - Vol. 18. - P. 37-46.

147. Shumaev, K.B. Globins and other nitric oxide-reactive proteins. Dinitrosyl iron complexes bound with haemoglobin as markers of oxidative stress / K.B. Shumaev, O.V. Kosmachevskaya, A.A. Timoshin et al. // Methods in Enzymology. - 2008. - V.436. - P. 441-457.

148. Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants / H. Sies // Exp. Physiol. - 1997. - Vol. 82. - P. 291–295.

149. Stamler, J.S. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms / J.S. Stamler, D.J. Singel, J. Loscalso // Science. - 1992. - Vol. 258. - P. 1898-1902.

150. Stanley, W.C. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart / W.C. Stanley, F.A. Recchia, G.D. Lopaschuk // Physiol. Rev. - 2005. - Vol. 85. - P. 1093-1120.

151. Szabó, C. The mechanism of the inhibitory effect of polyamines on the induction of nitric oxide synthase: role of aldehyde metabolites / C. Szabó, G.J. Southan, C. Thiemermann, J.R. Vane // Br. J. Pharmacol. - 1994. - Vol. 113, № 3. - P. 757-766.

152. Tatsumi, T. Cytokine-induced nitric oxide production inhibits mitochondrial energy production and impairs contractile function in rat cardiac myocytes./ T. Tatsumi, S. Matoba, A. Kawahara et al. // J. Am. College Cardiol. – 2000. – Vol. 35, №5. – P. 1338-1346,.

153. Thannickal, V.J. Reactive oxygen species in cell signaling / V.J. Thannickal, B.L. Fanburg // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. - 2000. - Vol. 279. - P. 1005- 1028.

154. ter Steege, J. Nitrotyrosine in plasma of celiac disease patients as detected by a new sandwich ELISA / J. ter Steege et al. // Free Rad. Biol. Med. - 1998. - Vol. 25. - P. 953.

155. Trabanco, A.A. A seco-porphyrazine: Superb sensitizer for singlet oxygen generation and endoperoxide synthesis / A.A. Trabanco et al. // Synlett. – 2000. – P. 1010–1012.

156. Tuner, J. Laser Therapy in Dentistry and Medicine / J. Tuner, L. Hodl. - Prima Books AB, 1996. - 156 p.

157. Uno, K. Biomarkers of inflammation and oxidative stress in atherosclerosis / K. Uno, S.J. Nicholls // Biomark. Med. 2010. – Vol. 4, №3. - P. 361–373.

158. Van der Valk, T. Singlet oxygen therapy. A manual / Van der Valk T. - Goteborg, 1996.

159. van der Vliet, A. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity / A. van der Vliet, J.P. Eiserich, B. Halliwell, C.E. Cross // J. Biol. Chem. - 1997. - Vol. 272. - P. 7617-7625.

160. Vanin, A.F. Dinitrosyl-iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology / A.F. Vanin // Nitric Oxide Biol. Chem. - 2009. - Vol. 21. - P. 136-149.

161. Vanin, A.F. Prospects of desingning medicines with diverse therapeutic activity on the basis of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands / A.F. Vanin, E.I. Chazov // Biophysics. - 2011. - Vol. 56, №2. - P. 268-275.

162. West, J.D. Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death / J.D. West, L.J. Marnett // Chem. Res. Tox. – 2006. – Vol. 19. – P. 173-194.

163. Wu, W.S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression / W.S. Wu // Cancer Metastasis Rev. – 2006. – Vol. 25. – P. 695-705.

164. Xie, L. Microrheological characteristics of reticulocyte in vivo / L. Xie, D. Sun, W. Yao, Z. Wen // Science in China. - 2002. - Vol. 45, №1. - P. 50-55.

165. Yakhno, T. Protein phase instability developed in plasma of sick patients: clinical observations and model experiments / T. Yakhno // Natural Science. - 2010. - №3. - P. 220-227.

166. Young, I.S. Antioxidant in health and disease / I.S. Young, J.V. Woodside // J. Clin. Pathol. - 2001. - P. 54. - P. 176-186.

167. Zamora, Z.B. Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF-alpha release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock / Z.B. Zamora, A. Borrego, O.Y. López et al. // Mediators Inflamm. – 2005. – Vol. 24, no. 1. – P. 16-22.