

На правах рукописи

Давыдюк  
Алексей Викторович

**Метаболические эффекты динитрозильных  
комплексов железа в отношении системы  
крови**

03.03.01 – физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2018

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия»

**Научный руководитель:** доктор биологических наук  
**Мартусевич Андрей Кимович**

**Официальные оппоненты:** **Гайнутдинов Халил Латыпович**  
доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник OpenLab «Двигательная нейрореабилитация», профессор кафедры физиологии человека и животных Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета

**Эмануэль Владимир Леонидович**  
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России

**Ведущая организация:** ФГАОУ ВО "Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского"

Защита состоится 20 марта 2018 г. в «12<sup>00</sup>» часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.02 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» (420029, г. Казань, Сибирский тракт, 35)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и на сайте [www.ksavm.senet.ru](http://www.ksavm.senet.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 года и размещен на сайтах <http://vak2.ed.gov.ru> и <http://www.ksavm.senet.ru>

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Р.А. Асрутдинова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Первооткрывателем физиологической депонированной формы монооксида азота проф. А.Ф. Ваниным (2009) предполагается наличие у динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) многочисленных биологических эффектов. Именно ДНКЖ были впервые выявлены как форма оксида азота в биологических системах в первых ЭПР-экспериментах, продемонстрировавших наличие NO в разных биологических объектах: дрожжевых клетках (Ванин А.Ф. с соавт., 1963), мышечных клетках и нейронах (Ignarro L. et al., 1964; Murad F. et., 1965). В то же время действие именно этого вещества на биологические системы стало активно изучаться лишь в последние два десятилетия.

Следует отметить, что ДНКЖ способны эффективно взаимодействовать с различными веществами, становящимися их лигандами. Наиболее распространенными среди них являются тиол-содержащие соединения, в частности, глутатион (Bogodulin R.R. et al., 2013) или цистеин (Санина Н.Н., 2005). Лиганды определяют особенности дополнительных эффектов ДНКЖ, детерминируя двухкомпонентность их активности, связанную не только с возможностью постепенного или болюсного высвобождения оксида азота, но и со свойствами функциональных групп лигандов (Ванин А.Ф., 2009).

Ранее для рассматриваемого соединения были описаны биорегулирующие свойства, однако акцент этих изысканий смещен в сторону исследований *in vitro* с изолированными системами (Шумаев К.В. с соавт., 2004, 2006; Ванин А.Ф., 2009). Следует отметить, что в большей степени эти изыскания касаются раскрытия особенностей влияния ДНКЖ на состояние про- и антиоксидантных систем в разнообразных биологических и абиогенных системах.

Работы, основанные на анализе системного действия вещества, сравнительно немногочисленны, реализованы на животных и преимущественно ориентированы на изучение гемодинамических эффектов соединения (Ванин А.Ф., Чазов Е.И., 2011; Тимошин А.А., 2012). Исследования действия ДНКЖ на организм здоровых добровольцев единичны и указывают на его вазодилатационную активность (Vanin A.F. et al., 2013). Следовательно, необходимо углубленное изучение физиологических эффектов соединения, что и было частично реализовано в настоящей работе.

**Цель исследования:** изучить действие динитрозильных комплексов железа с глутатионовыми лигандами на состояние системы крови.

### **Задачи работы:**

1. Изучить влияние ДНКЖ на окислительный и энергетический обмен, физико-химические и кристаллогенные свойства крови *in vitro*.
2. Сравнить характер изменений параметров системы крови на действие депонированного и газообразного оксида азота *in vitro*.
3. Исследовать биологические эффекты инъекций ДНКЖ по метаболическим и физико-химическим показателям крови крыс.

4. Оценить сопряженность ответа системы крови на действие различных доз ДНКЖ в условиях *in vitro* и *in vivo*.

**Научная новизна.** Впервые комплексно, с использованием биологических моделей различного уровня организации, установлены особенности метаболизма биосистем при воздействии динитрозильных комплексов железа с глутатионовыми лигандами. Показано, что в условиях *in vitro* (на образцах крови и *in vivo* (у здоровых крыс) введение данного донора оксида азота приводит к смещению ряда параметров энергетического и окислительного метаболизма, состояния детоксикационных систем эритроцитов, а также кристаллогенных свойств крови.

Выявлено, что выраженность сдвигов изучаемых метаболических и физико-химических показателей крови определяется действующей дозой динитрозильных комплексов железа, причем выделен оптимум действия данного агента, лежащий в пределах 0,1-0,2 мМ для изолированной крови и 0,30-0,45 мМ – для организма крысы.

Показано наличие взаимосвязи между метаболическими и кристаллоскопическими параметрами в процессе ответа на применение физиологического донора оксида азота, на основании чего предложена и обоснована схема системных реакции на введение в биосистему глутатион-содержащих динитрозильных комплексов железа.

**Научно-практическая значимость.**

Результаты работы позволяют получить представление о характере системного ответа на внутрибрюшинное введение динитрозильных комплексов железа. Эта информация имеет существенное значение для разработки фармакологических средств, содержащих в качестве основного действующего вещества данный донор оксида азота. В свою очередь, последние способны иметь гемодинамические и антиоксидантные эффекты, а также обладать нормализующим действием на энергетический метаболизм и кристаллогенную активность крови.

**Соответствие диссертации Паспорту научной специальности.**

Представленная диссертационная работа соответствует Паспорту специальности 03.03.01 - физиология. Работа посвящена изучению влияния донора оксида азота – глутатион-содержащих динитрозильных комплексов железа – на систему крови. Результаты научного исследования соответствуют следующим пунктам Паспорта специальности: п. 1. Изучение закономерностей и механизмов поддержания постоянства внутренней среды организма; п. 2. Анализ механизмов нервной и гуморальной регуляции, генетических молекулярных, биохимических процессов, определяющих динамику и взаимодействие физиологических функций; п. 3. Исследование закономерностей функционирования основных систем организма (нервной, иммунной, сенсорной, двигательной, крови, кровообращения, лимфообращения, дыхания, выделения, пищеварения, размножения, внутренней секреции и др.) и п. 6. Изучение механизмов функционирования клеток, тканей, органов, принципов их системной организации.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами при внутрибрюшинном введении (на протяжении 10 дней) стимулируют энергетический обмен эритроцитов, активируют антиоксидантной активности плазмы на фоне сохранения интенсивности липопероксидации, а также модуляцию кристаллогенной активности сыворотки крови.

2. Действие физиологического донора оксида азота нелинейно дозозависимо и имеет экстремум, соответствующий для изолированной крови концентрации 0,1-0,2 мМ, а для организма крыс – 0,30-0,45 мМ.

3. Сдвиги метаболических параметров крови и ее кристаллогенных свойств в ответ на экзогенное введение тиолсодержащих динитрозильных комплексов железа сопряжены как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, причем степень сопряжения зависит от дозы соединения.

#### **Апробация работы.**

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), Международном 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).

#### **Реализация результатов исследования**

Разработанные биокристалломные технологии используются при проведении научных исследований в Нижегородской государственной сельскохозяйственной академии, Кировской государственной медицинской академии, Вятской государственной сельскохозяйственной академии, Приволжском федеральном медицинском исследовательском центре, Кировском НИИ гематологии и переливания крови.

Материалы диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедр Кировской государственной медицинской академии, Вятской государственной сельскохозяйственной академии и Нижегородской государственной сельскохозяйственной академии.

#### **Публикация результатов исследования**

По материалам диссертации опубликовано 26 научных работ, в том числе 8 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Объем и структура диссертации.** Текст диссертации изложен на 147 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 2 глав с изложением результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Список литературы включает 177 источников, в том числе 110 - отечественных и 67 - зарубежных авторов. Диссертация содержит 1 таблицу и 44 рисунка.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материал и методы исследования**

Работа выполнена на кафедре физиологии и биохимии животных ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия».

#### ***Общий объем исследований и формирование групп обследуемых.***

*А. Изучение особенностей реагирования параметров сыворотки крови на введение различных форм оксида азота, в том числе динитрозильных комплексов железа с глутатионовыми лигандами.*

Данный фрагмент работы включал проведение экспериментов *in vitro*, выполненных на образцах цельной консервированной крови, полученной на Нижегородской областной станции переливания крови (г. Нижний Новгород) от практически здоровых доноров (n=60).

В образцах производили сравнительное изучение кристаллогенных свойств сыворотки крови (тезиокристаллоскопия), параметров окислительного метаболизма (биохемилюминесцентное определение интенсивности липопероксидации и общей антиоксидантной активности, уровня малонового диальдегида и активности эритроцитарной супероксиддисмутазы), энергетического обмена (оценка активности лактатдегидрогеназы эритроцитов в прямой и обратной реакциях, альдегиддегидрогеназы и концентрации лактата в эритроцитах), физико-химических свойств крови (рН, окислительно-восстановительный потенциал, парциальное давление кислорода и углекислого газа) при действии различных форм оксида азота (NO-содержащие газовые смеси от аппарата «Плазон» и экспериментального генератора оксида азота, созданного во ВНИИЭФ-РФЯЦ (г. Саров), глутатион-содержащие динитрозильные комплексы железа).

Всего в рамках данного этапа выполнено 1290 исследований.

*Б. Исследование системного ответа организма крыс на введение динитрозильных комплексов железа с глутатионовыми лигандами по параметрам сыворотки крови.*

Данный раздел работы был выполнен на здоровых половозрелых крысах-самцах линии Вистар (масса тела – 200-220 г.). На этом этапе оценивали особенности дозозависимого действия динитрозильных комплексов железа с глутатионовыми лигандами на указанные выше метаболические и физико-химические показатели крови. Учитывали

изменения приведенных показателей при внутрибрюшинном введении 1 мл 0,15; 0,30; 0,45 и 0,60 мМ водного раствора соединения.

Всего в рамках данного этапа выполнено 450 исследований.

*Биокристалломные методы исследования сыворотки крови.*

### **Пробоподготовка кристаллоскопических и тезиграфических фаций.**

На предварительно обезжиренное, промытое и просушенное предметное стекло наносят полученные на предыдущем этапе образцы биологического материала в объеме 0,1-0,2 мл. В дальнейшем для получения фации биосубстрата производится дегидратация микропрепарата в естественных условиях без ускорения процесса кристаллообразования (температура 18-20°C, влажность 50-70%).

**Визуальная морфометрия кристаллоскопических и тезиграфических фаций** (Мартусевич А.К., Гришина А.А., 2009). Для описания результата собственного и инициированного кристаллообразования биосубстратов применялась новая система критериев, исключая зависимость оценки от вида биоматериала и конкретных структур фации. Для кристаллограмм параметры включали основные показатели [индекс структурности (ИС); кристаллизуемость (Кр); степень деструкции фации (СДФ); выраженность краевой белковой зоны (Кз)] и дополнительные параметры [тип взаимодействия кристаллических и аморфных структур (ТВ); равномерность распределения кристаллических элементов фации (R); степень выраженности ячеистости фации (С); выраженность отдельных зон кристаллизации (Z); индекс хаотичности (ИХ); рельефность текстуры (Т)].

Для исследования тезиграмм использовали основной тезиграфический коэффициент (Q) или тезиграфический индекс (ТИ); коэффициент поясности (Р); кристалличность (К), степень деструкции фации (СДФ); выраженность краевой белковой зоны (Кз), индекс хаотичности (ИХ); равномерность распределения кристаллических элементов фации (R); степень выраженности ячеистости фации (С); выраженность отдельных зон кристаллизации (Z); рельефность текстуры (Т)]

**Исследование процессов липопероксидации на основании изучения биохемилюминесценции плазмы крови.** Одним из важнейших индикаторов действия озона является уровень хемилюминесценции, позволяющий оценить. Для их оценки действия озона использовали интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность антиоксидантной системы (АОА) в плазме крови на биохемилюминометре БХЛ-06 (Н.Новгород) с расчетом:

- площади под кривой интенсивности, или полной светосуммы (ПОЛ);
- тангенса угла максимального наклона кривой к оси времени (АОА)

### **Биохимические методы исследования**

*Оценка параметров энергетического метаболизма эритроцитов.* В качестве маркера интенсивности энергетического метаболизма 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). Уровень лактата в эритроцитах оценивали с помощью автоматического анализатора SuperGL Ambulance.

*Исследование иных биохимических показателей.* В донорской крови спектрофотометрически определяли активность альдегиддегидрогеназы (АлДГ) – по методу Б.М. Кершенгольца, Е.В. Серкиной (1981). Содержание белка устанавливали по методу Лоури. Уровень малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах определяли с помощью тест-набора (ЗАО «АГАТ», Россия).

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

Исследования с участием животных одобрены локальным этическим комитетом КГМА, соответствовали Хельсинской декларации (2000). Эксперименты с использованием животных проводились с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (№86/609/ЕЕС, Страсбург, 1986). Все животные проходили карантин и акклиматизацию в условиях вивария в течение не менее 14 суток. Содержание животных и экспериментальные вмешательства осуществляли согласно приказу Минздрава СССР №775 от 12.08.1977 г. Животных кормили натуральными кормами в соответствии с утвержденными нормами.

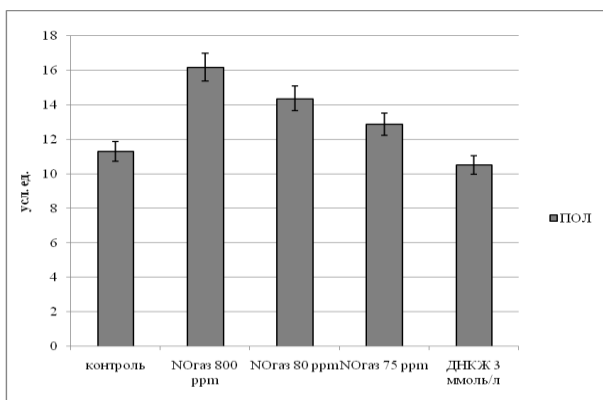
Расчеты выполняли с помощью лицензионной программы SPSS 16.0. Нормальность распределения значений параметров оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом характера распределения признака для оценки статистической значимости различий применяли Т-критерий Стьюдента и Н-критерий Краскала-Уоллеса.

## **Результаты собственных исследований и их обсуждение**

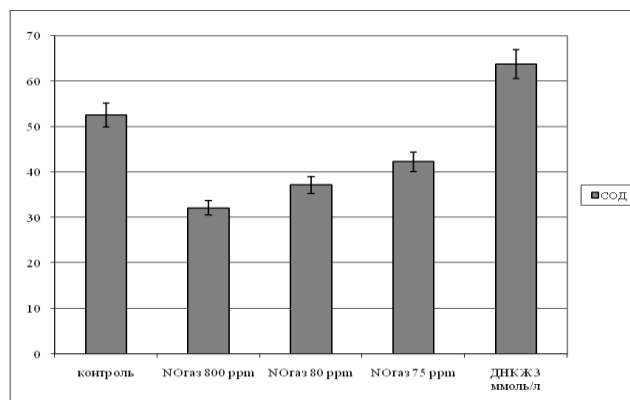
### **1 Влияние динитрозильных комплексов железа на состояние крови *in vitro*.**

В рамках первого этапа работы установлено, что водный раствор ДНКЖ характеризуется умеренным антиоксидантным действием, реализующимся в плазме крови как ограничение процессов липопероксидации (рис. 1А), а в эритроцитах – за счет повышения активности супероксиддисмутазной системы (рис. 1Б). Результаты экспериментов позволяют говорить о мембранопротекторном действии водного раствора ДНКЖ.





А. Интенсивность липопероксидации плазмы



Б. Активность супероксиддисмутазы эритроцитов

Рисунок 1 - Некоторые показатели окислительного метаболизма крови при действии различных форм оксида азота *in vitro*

В плане мониторинга действия рассматриваемого соединения на энергетический метаболизм эритроцитов *in vitro* показано, что депонированные формы оксида азота, способные вследствие возможности связывания с белковыми макромолекулами к длительному сохранению в крови даже *in vivo* (в биологической жидкости кролика - до нескольких дней [Vanin A.F., 2009]) к оптимальному по скорости высвобождению NO, оказывают выраженный стимулирующий эффект в отношении энергетического обмена эритроцитов. Следует отметить, что он носит дозозависимый характер, что позитивно характеризует фармакологические свойства экзогенных ДНКЖ.

По результатам оценки каталитических свойств альдегиддегидрогеназы эритроцитов в условиях NO-стимуляции можно заключить, что в условиях *in vitro* форма поступления оксида азота имеет принципиальное значение для определения характера ответа биологической жидкости (крови человека) на данное воздействие. Так, при действии свободного оксида азота на образцы изолированной крови регистрируется умеренное ингибирование каталитической активности АлДГ, тогда как при введении ДНКЖ – активация фермента вследствие потенциального сходства «традиционных» субстратов (органических нитратов) и нитрозильных комплексов (рис. 2). Наиболее метаболически благоприятный «ответ» крови на обработку оксидом азота регистрировали при использовании низких доз ДНКЖ (0,3 мкмоль и менее), тогда как большие количества соединения способствовали перенасыщению биосистемы NO.

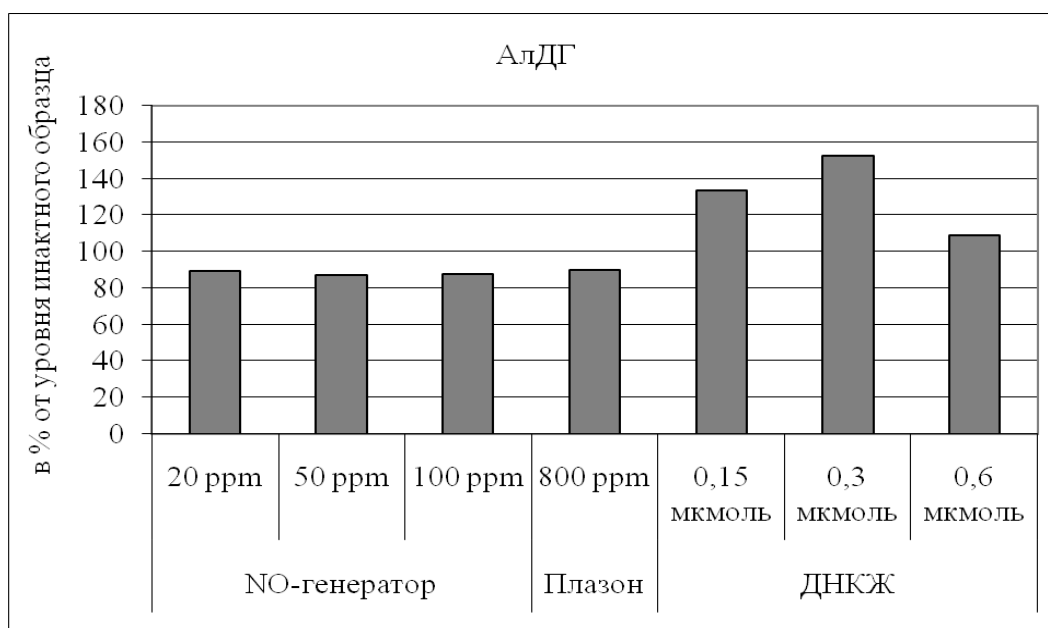
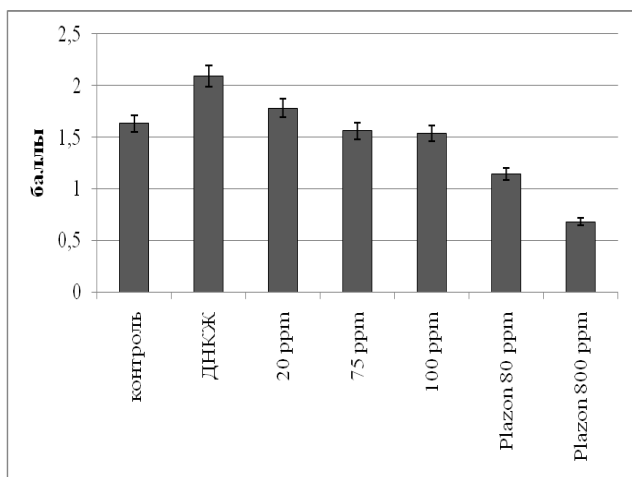


Рисунок 2 - Активность альдегиддегидрогеназы эритроцитов при действии различных форм оксида азота *in vitro*

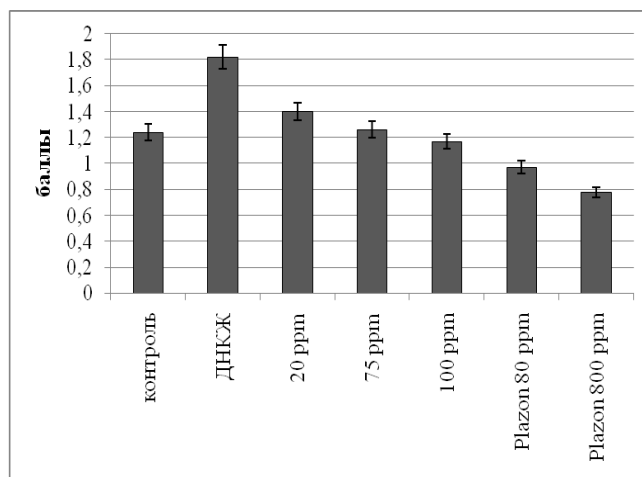
Кроме того, проведенные экспериментальные исследования позволили установить наличия выраженного действия ДНКЖ на физико-химические свойства и газовый состав крови. Оно включает умеренное смещение рН в щелочную сторону, а также оптимизацию соотношения газов вследствие снижения парциального давления углекислого газа в сочетании с увеличением давления кислорода *in vitro*. В целом, полученные данные косвенно свидетельствуют о позитивном эффекте ДНКЖ в онтошении изученных физико-химических параметров крови человека.

Наконец, изучение модификации дегидратационной структуризации рассматриваемой биологической жидкости дало возможность выявить, что результат влияния монооксида азота на кристаллогенные свойства сыворотки крови также непосредственно определяется концентрацией NO и его формой (свободной или депонированной), а также наличием примесей активных форм кислорода. При этом наиболее выраженный стимулирующий эффект выявлен для депонированной формы оксида азота – динитрозильных комплексов железа с глутатионовми лигандами (рис. 3).

Низкие концентрации монооксида азота оказывают модулирующее действие на кристаллогенные свойства сыворотки крови человека, причем их влияние реализуется преимущественно в модуляции свойств белков. Установлено, что наиболее оптимальным эффектом, проявляющимся в расширении краевой зоны и формировании в ней регулярных центростремительных разломов, обладает газовый поток с концентрацией оксида азота 20 ppm (рис. 4Б).



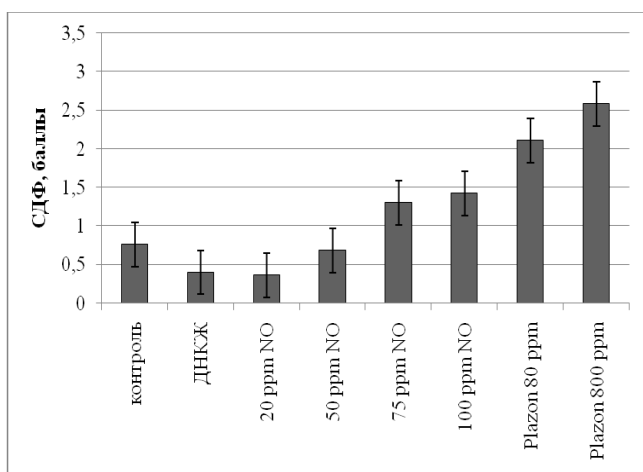
А. Кристаллизуемость



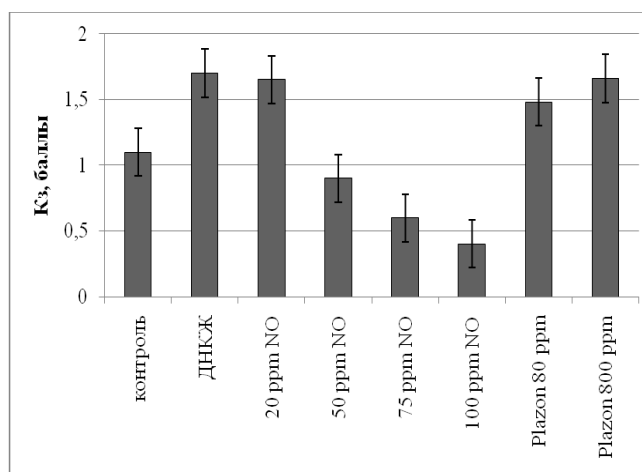
Б. Индекс структурности

Рисунок 3 - Влияние различных форм оксида азота на параметры собственной кристаллизации сыворотки крови *in vitro*

Напротив, высокие концентрации NO способствуют ингибированию кристаллогенной активности биосреды, многократно повышая степень деструкции формирующихся структурных элементов (рис. 4А) и способствуя формированию дополнительной полосы в краевой зоне микропрепарата.



А. Степень деструкции фазии



Б. Выраженность краевой зоны

Рисунок 4 - Влияние различных форм оксида азота на параметры собственной кристаллизации сыворотки крови *in vitro*

Изучение особенностей сопряжения оцениваемых показателей путем расчета корреляций между ними позволило продемонстрировать наличие многочисленных взаимосвязей разной силы. Характер и особенности последних рассматривался нами в контексте отдельных компонентов метаболизма. Так, наиболее отчетливая взаимосвязь была обнаружена между параметрами, указывающими на состояние про- и антиоксидантных систем крови, и кристаллоскопическими показателями. В частности, общая антиоксидантная активность коррелировала с индексом структурности и степенью деструкции фазии (связь средней силы –  $r=0,61$  и  $0,58$  соответственно), а также с выраженностью краевой зоны образца (слабая, но

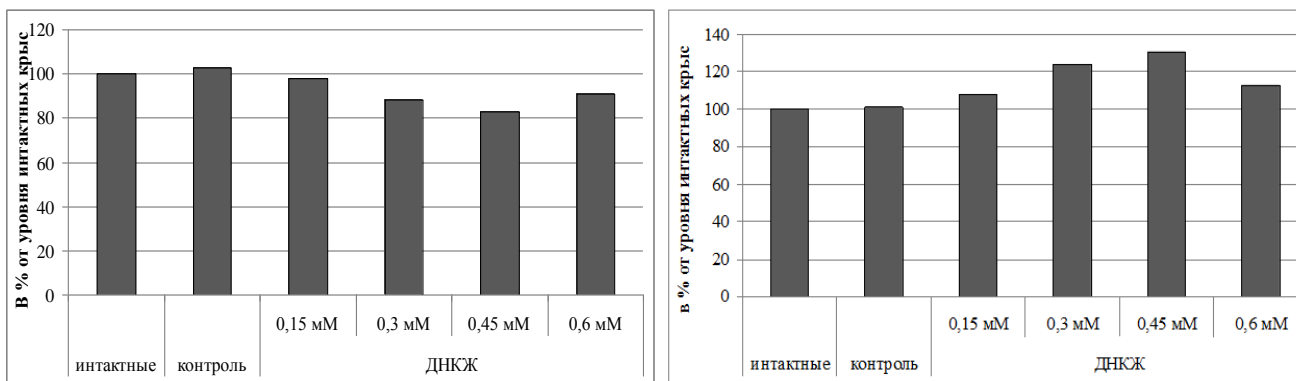
значимая связь – 0,39). Концентрация малонового диальдегида в плазме крови также демонстрировала наличие корреляций средней силы со степенью деструкции фации и сформированностью краевой зоны ( $r=0,72$  и  $-0,62$  соответственно;  $p<0,05$ ), а с кристаллизуемостью – слабую взаимосвязь, приближающуюся к средней ( $r=0,47$ ). Интенсивность липопероксидации оказалась сопряженной с выраженностью краевой белковой зоны ( $r=0,58$ ;  $p<0,05$ ), как и с индексом структурности и кристаллизуемостью биожидкости ( $r=0,43$  и  $0,35$  соответственно;  $p<0,05$  для обоих случаев).

Менее выраженные, но также многочисленные взаимозависимости были установлены для параметров энергетического метаболизма эритроцитов и физико-химических показателей крови по отношению к ее кристаллогенным свойствам. При этом среди первой группы показателей наибольшее системообразующее значение имел текущий уровень лактата в эритроцитах, который обнаруживал слабое, но статистически значимое сопряжение со всеми основными критериями кристаллоскопического теста ( $p<0,05$ ). Во второй группе показателей максимально связанным с параметрами дегидратационной структуризации оказался окислительно-восстановительный потенциал плазмы. Его значение коэффициента корреляции с индексом структурности, кристаллизуемостью и степенью деструкции фации составило  $0,34$ ;  $0,31$  и  $-0,40$  соответственно ( $p<0,05$  для всех указанных случаев). рН плазмы крови имел сопряжение только с кристаллизуемостью и выраженностью краевой белковой зоны микропрепарата сыворотки крови ( $r=0,49$  и  $0,42$  соответственно;  $p<0,05$  для обоих параметров).

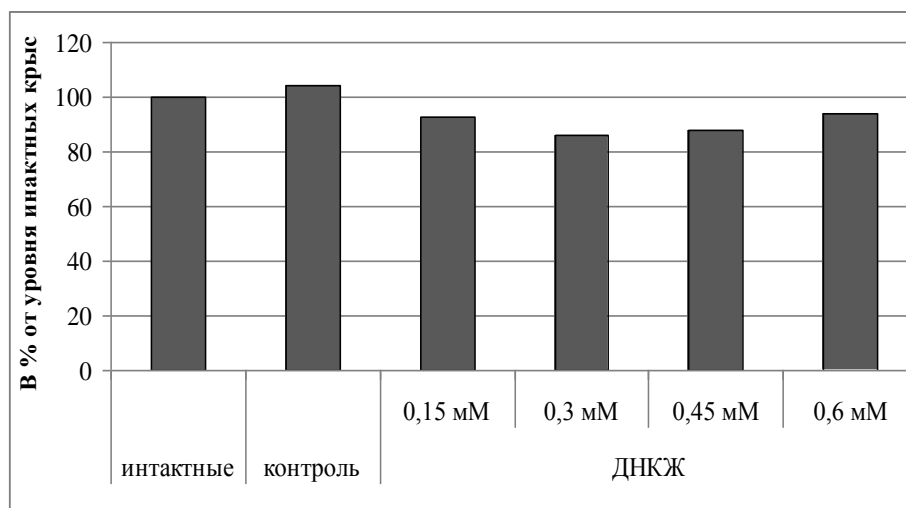
В целом, результаты проведенных экспериментальных исследований *in vitro*, указывающие не только на наличие сдвигов отдельных параметров метаболизма и физико-химического гомеостаза крови при действии ДНКЖ с глутатионовыми лигандами, однозначно свидетельствуют о многогранности и системности ответа биологической жидкости на изучаемое воздействие. При этом направленность изменений показателей указывает на стабилизирующий характер выявленного ответа.

## **2 Модификация метаболических и физико-химических показателей крови животных при введении тиол-содержащих динитрозильных комплексов железа**

Второй этап работы включал оценку системного действия тиол-содержащих ДНКЖ на организм здоровых крыс. В этом плане установлено, что по действию на окислительный метаболизм крови для изучаемого соединения подтверждено наличие выявленного в эксперименте *in vitro* антиоксидантного эффекта (рис. 5, 6), причем выраженность этих свойств демонстрирует нелинейную зависимость от их дозы с оптимумом, лежащим в диапазоне  $0,3-0,45$  мМ (доза агента -  $2,86-4,29$  мкг/г массы животного).

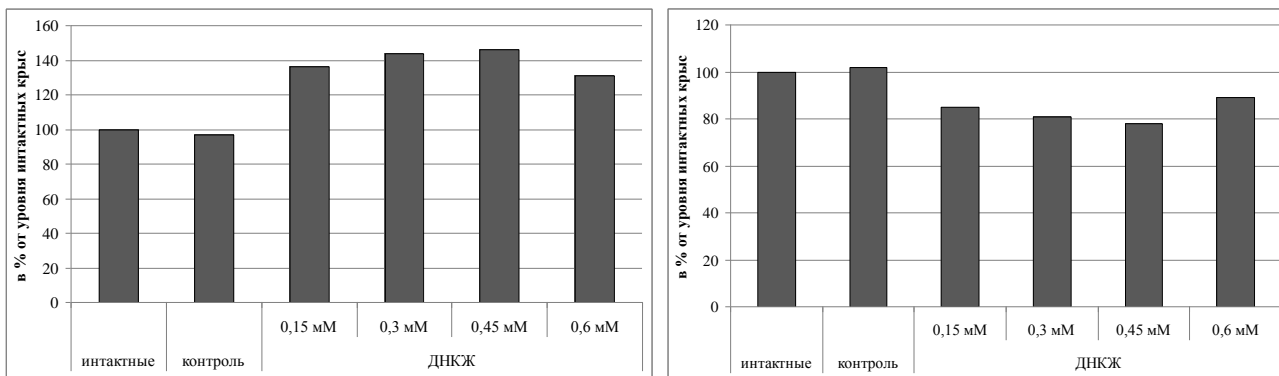


А. Интенсивность липопероксидации плазмы      Б. Общая антиоксидантная активность  
*Рисунок 5 - Параметры окислительного метаболизма плазмы крови крыс в зависимости от количества введенного раствора динитрозильных комплексов железа*



*Рисунок 6 - Уровень малонового диальдегида в плазме крови животных при введении им растворов с различной концентрацией динитрозильных комплексов железа*

Вторым компонентом мультифакторного системного действия динитрозильных комплексов железа является стимуляция данным соединением энергетического обмена эритроцитов. По результатам проведенных изысканий показано, динамика оцениваемых показателей указывает на оптимальность этих средних концентраций ДНКЖ (0,3 и 0,45 мМ) для стимуляции промежуточной стадии энергетического метаболизма клеток крови, в частности, эритроцитов, что просматривается как по модификации каталитических свойств лактатдегидрогеназы (рис. 7), так и по уровню одного из ее субстратов – лактата (рис. 8), известного маркера гипоксических состояний клеток, тканей и организма в целом. Также установлено, что ДНКЖ как депонированная форма оксида азота оказывает выраженное активирующее действие на состояние альдегиддегидрогеназы эритроцитов (рис. 9), причем наиболее значительным эффектом обладают более низкие дозы соединения (прежде всего – в диапазоне 0,3-0,45 мМ).



А. Активность фермента в прямой реакции    Б. Активность фермента в обратной реакции  
 Рисунок 7 - Активность лактатдегидрогеназы эритроцитов при введении крысам различных доз динитрозильных комплексов железа

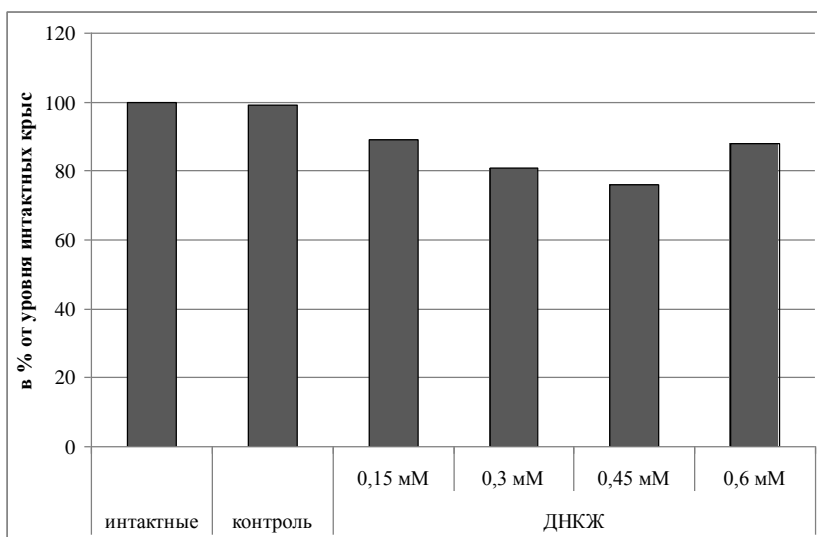
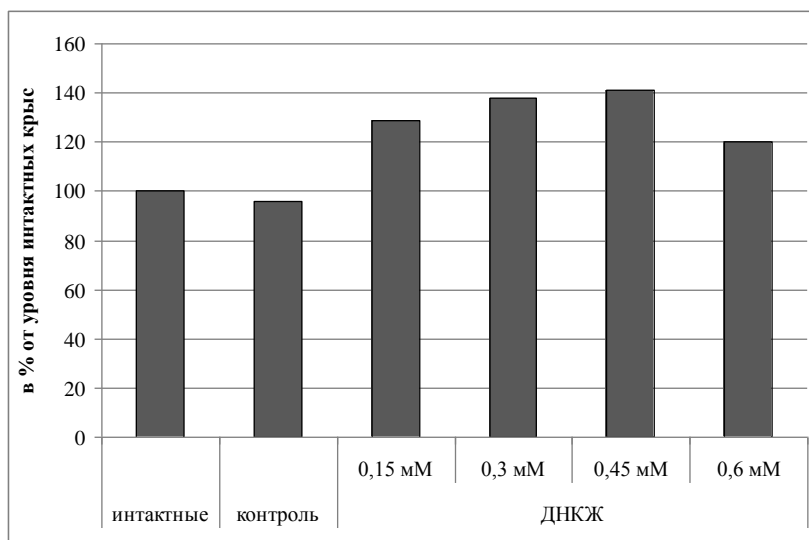
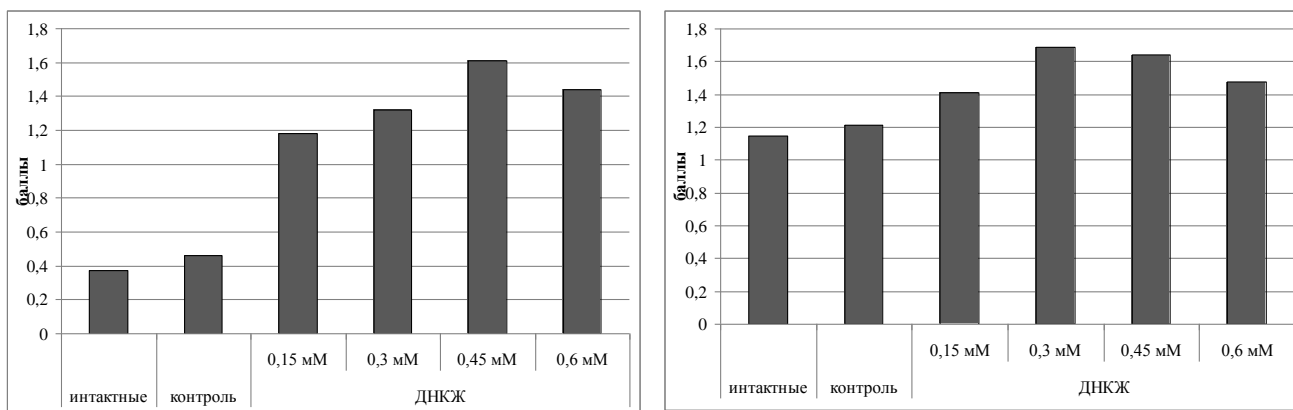


Рисунок 8 - Уровень лактата в эритроцитах при введении крысам различных доз динитрозильных комплексов железа



*Рисунок 9 - Активность альдегиддегидрогеназы эритроцитов при введении крысам различных доз динитрозильных комплексов железа*

Установлено, что введение животным физиологического раствора, не содержащего естественного донора оксида азота, не оказывало значимого воздействия на параметры собственной кристаллизации биологической жидкости. В то же время применение растворов ДНКЖ модифицировало уровень этих показателей. В частности, минимальная из использованных доз соединения (0,15 мМ) умеренно, но значимо повышала индекс структурности фаций сыворотки крови ( $p < 0,05$  по сравнению с интактными животными). Этот параметр отражает сложность структуропостроения элементов фации, а диапазон от 1 до 2 усл. ед. характеризуется присутствием в микропрепарате как одиночно-кристаллических, так и дендритных элементов, причем увеличение значения показателя свидетельствует о повышении доли последних в кристаллограмме.



А. Кристаллизуемость

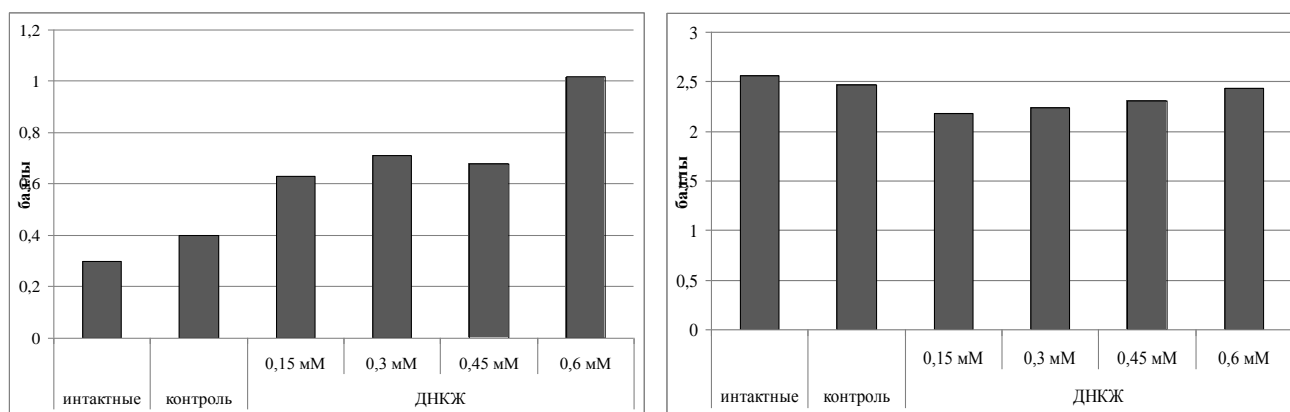
Б. Индекс структурности

*Рисунок 10 - Влияние внутрибрюшинного введения динитрозильных комплексов железа на параметры собственной кристаллизации сыворотки крови*

Максимальное нарастание индекса структурности определялось при введении крысам физиологического раствора, включающего 0,3 мМ ДНКЖ (рис. 10Б). В этом случае уровень параметра превышал физиологические значения в 1,47 раза ( $p < 0,05$ ), а значение показателя, достигнутое при концентрации агента 0,15 мМ – в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ). Интересно, что дальнейшее увеличение концентрации соединения приводило к менее выраженному повышению индекса структурности. Следует отметить, что при концентрации ДНКЖ 0,6 мМ данный показатель, с одной стороны, был на 28,7% выше уровня, характерного для интактных крыс ( $p < 0,05$ ), и, с другой стороны, на 14,2% ниже цифр, выявленных для 0,3 мМ соединения ( $p < 0,05$ ). Таким образом, стимулирующее действие изучаемого вещества на индекс структурности также параболически дозозависимо.

Сходная динамика изменения была зафиксирована и в отношении кристаллизуемости фаций сыворотки крови – основного количественного критерия оценки собственной кристаллизации последней (рис. 10А). В этом

плане значимо, что сдвиги индекса структурности и кристаллизуемости, выражающиеся в повышении обоих параметров при внутрибрюшинном введении животным ДНКЖ, однонаправлены и указывают на активацию кристаллогенных свойств биологической жидкости. В то же время, если максимальный градиент индекса структурности отмечен при использовании ДНКЖ в концентрации 0,3 мМ, то наиболее выраженное увеличение кристаллизуемости было зарегистрировано при введении 0,45 мМ ДНКЖ (+335% по сравнению с интактными животными;  $p < 0,05$ ). Следует заметить, что и при применении иных концентраций агента сдвиги параметра существенны и составляют более 3,2 раза ( $p < 0,05$  для всех рассмотренных воздействий).



А. Степень деструкции фации

Б. Выраженность краевой зоны

Рисунок 11 - Влияние различных форм оксида азота на параметры собственной кристаллизации сыворотки крови *in vitro*

Единственной монотонной зависимостью для изученных концентраций физиологического донора оксида азота является его влияние на степень деструкции кристаллоскопических фаций (рис. 11А). Установлено, что данный показатель умеренно нарастает с увеличением действующей дозы ДНКЖ, однако остается в пределах 0,7 усл. ед. при всех концентрациях кроме 0,6 мМ. Подобный уровень параметра свидетельствует о слабой выраженности деструктивных процессов при формировании кристаллических элементов фации, косвенно указывая на отсутствие значимого токсического эффекта соединения (Ющенко Н.Г. с соавт., 1996; Громова И.П., 2005; Мартусевич А.К., 2012). Умеренное разрушение структур образца отмечается лишь при введении крысам наиболее высокой из примененных концентраций вещества (0,6 мМ).

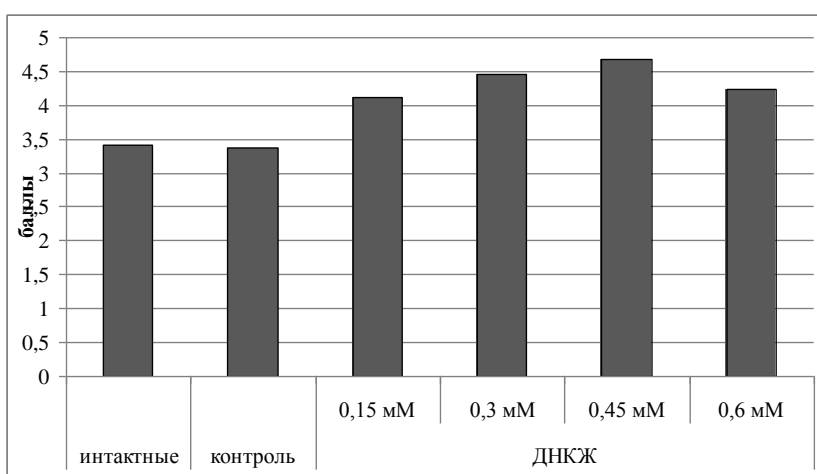
Однотипность выявлена нами и для выраженности краевой белковой зоны микропрепарата при действии различных концентраций ДНКЖ (рис. 11Б). Так, при всех используемых дозах соединения регистрировали умеренное снижение значения данного показателя, выраженность которого постепенно уменьшалась по мере нарастания концентрации вводимого агента. При этом лишь при применении 0,6 мМ раствора ДНКЖ отличия от



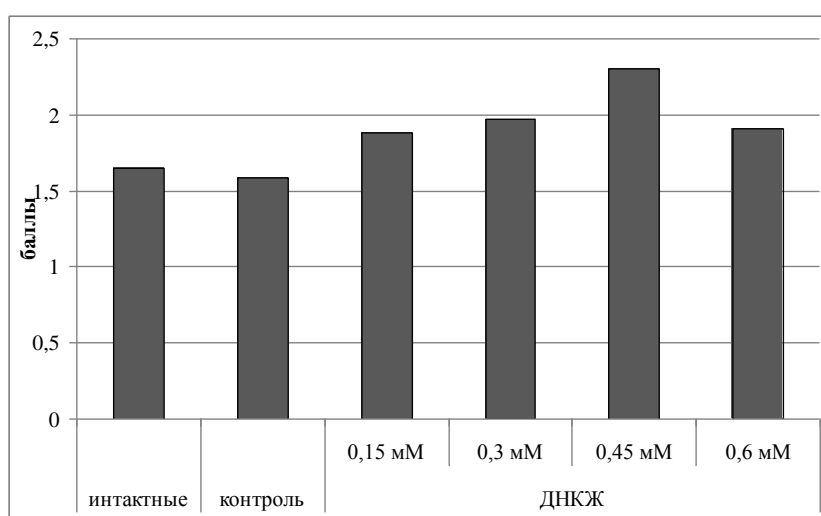
животных интактной и контрольной группы не имели статистической значимости.

В целом, однозначно установлено активирующее действие инъекций глутатион-содержащих ДНКЖ на кристаллогенный потенциал сыворотки крови здоровых крыс. Оно проявилось в увеличении плотности кристаллических элементов и их усложнении, причем, как и для метаболических показателей, максимальная выраженность данной тенденции соответствовала концентрациям 0,3 и 0,45 мМ.

Кроме того, для указанных концентраций ДНКЖ параллельно было проведено тезиграфическое исследование с использованием 0,9% раствора хлорида натрия в качестве базисного вещества, результаты которого было аналогичны полученным при кристаллоскопическом анализе образцов сыворотки крови крыс (рис. 12 и 13).



*Рисунок 12 - Тезиграфический индекс образцов сыворотки крови крыс при введении тиолсодержащих динитрозильных комплексов железа*



*Рисунок 13 - Кристалличность в тезиграфических фазах сыворотки крови крыс при введении тиолсодержащих динитрозильных комплексов железа*

Таким образом, титрокристаллоскопическая оценка образцов сыворотки крови животных после проведения курса инъекций ДНКЖ в различной концентрации четко указывает на активирующее действие соединения в отношении кристаллогенных и иницирующих свойств биожидкости, наиболее выражено проявляющееся при использовании вещества в 0,3- и 0,45-миллимолярных водных растворах. Не выявлено и признаков токсического влияния изучаемого агента.

Последним компонентом анализа влияния ДНКЖ на параметры физико-химического гомеостаза крови крыс служила оценка модификации показателей кислотно-щелочного равновесия и парциальное давление основных газов. Установлено, что изучаемое соединение дозозависимо снижает рН крови животных, причем имеет место обратная зависимость. При этом, если при использовании минимальной концентрации ДНКЖ (0,15 мМ) значимых отличий от интактной и контрольной групп не выявлено, от, начиная со следующей дозы (0,3 мМ), дальнейшее повышение концентрации вещества вызывало существенное снижение рН ( $p < 0,05$  для 0,3; 0,45 и 0,6 мМ относительно интактных крыс). Подобная динамика может быть обусловлена антиоксидантными свойствами как ДНКЖ в целом, так и входящего в его состав глутатиона.

Параллельно описанному выше уменьшению уровня рН крови, нарастание действующей концентрации физиологического донора оксида азота обеспечивало пропорциональное повышение окислительно-восстановительного потенциала крови. При этом низкие и средние концентрации соединения способствовали медленному увеличению значения параметра (на 8, 30 и 47% для 0,15; 0,3 и 0,45 мМ соответственно;  $p < 0,05$  для всех воздействий), тогда как максимальная из примененных доз агента инициировала резкий его скачок (в 2,16 раза;  $p < 0,05$ ). Подобная тенденция, по нашему мнению, связана с тем, что изучаемые тиол-содержащие ДНКЖ служат источником двух соединений с разнонаправленным действием на окислительно-восстановительный потенциал – оксида азота и глутатиона. Если NO, являясь молекулой со свободно-радикальными свойствами, провоцирует повышение параметра, то глутатион за счет тиоловых функциональных групп служит ловушкой радикалов. В связи с этим низкие концентрации ДНКЖ, обеспечивая высвобождение лишь небольшого количества NO, приводят к умеренному росту ОВП, тогда как наиболее высокая доза вещества (0,6 мМ), по-видимому, только частично приобретая белковые лиганды, способствует попаданию в плазму значительного объема свободных молекул оксида азота, не контролируемых глутатионом, и, следовательно, значительному росту окислительного потенциала.

Характеризуя динамику газового состава крови крыс после курса инъекций ДНКЖ, следует отметить положительные сдвиги, включающие отчетливое нарастание парциального давления кислорода на фоне снижения  $p\text{CO}_2$ . Данные эффекты не демонстрируют существенной зависимости от концентрации примененного раствора физиологического донора оксида

азота, т. к. лишь отражают позитивное действие соединения на функционально-метаболический статус организма животного в целом.

С учетом того, что анализ корреляций между метаболическими и кристаллоскопическими показателями крови при действии ДНКЖ на образцы изолированной крови человека продемонстрировал наличие многочисленных взаимосвязей слабой и средней силы между ними, нами была произведена аналогичная оценка для системного действия соединения. Следует подчеркнуть, что в рамках данного фрагмента изучали и особенности указанного сопряжения при использовании различных доз агента с целью исследования адаптивности ответа на них. Для этого по результатам проведенных исследований были выбраны 2 концентрации ДНКЖ: 0,3 мМ, которая по большинству показателей способствовала развитию оптимального ответа, и 0,6 мМ, вызывавшая наименее благоприятную динамику уровня параметров. Корреляционный анализ позволил подтвердить различия между ними.

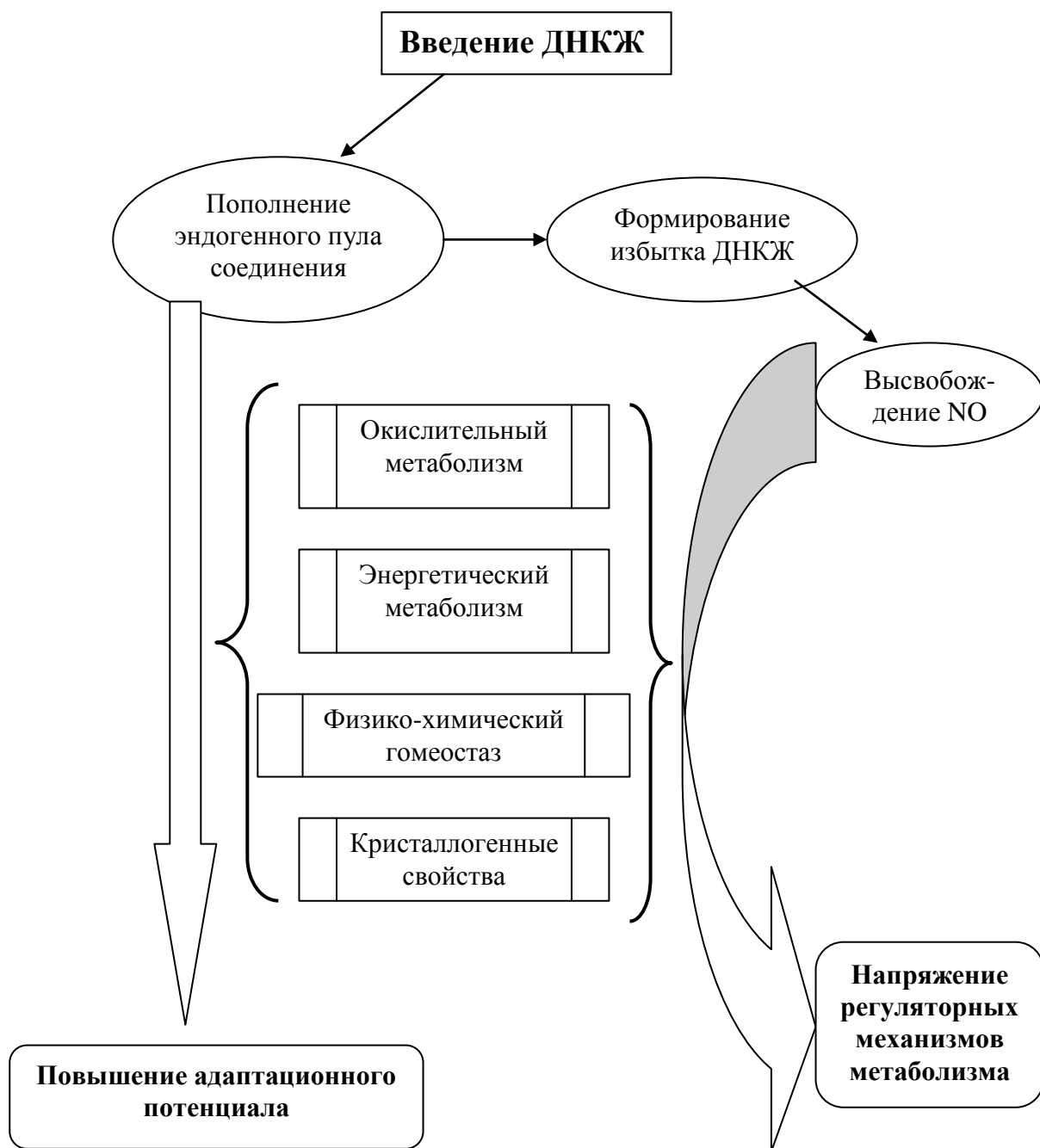
Так, в случае использования оптимальной концентрации ДНКЖ (0,3 мМ) между параметрами, характеризующими окислительный метаболизм (интенсивность липопероксидации, общая антиоксидантная активность, уровень малонового диальдегида), обнаруживались преимущественно корреляции слабой силы. Например, интенсивность процессов перекисного окисления липидов, имеющая наибольшее количество значимых сопряжений, коррелировала с индексом структурности, кристаллизуемостью и выраженностью краевой зоны на уровне  $r=0,41$ ;  $0,33$  и  $0,33$  соответственно ( $p<0,05$  для всех зависимостей).

С другой стороны, применение относительно высокой для изучаемой биологической жидкости концентрации ДНКЖ (0,6 мМ) способствовало формированию более выраженных взаимозависимостей между индикаторами окислительного метаболизма и кристаллоскопическими показателями. В частности, уровень корреляционной связи интенсивности липопероксидации с кристаллизуемостью, степенью деструкции фации и выраженностью краевой зоны достигает средней силы ( $r=0,64$ ;  $0,52$  и  $0,67$  соответственно;  $p<0,05$ ). Также появляется корреляция средней силы между общей антиоксидантной активностью и степенью деструкции фации ( $r=0,67$ ;  $p<0,05$ ). По нашему мнению, подобная картина неслучайна и является отражением дифференцированности ответа крови на различные дозы физиологического донора оксида азота. Так, оптимальная концентрация ДНКЖ, к которой биологическая жидкость легко адаптируется с учетом текущего эндогенного уровня NO и его производных, не вызывает напряжения метаболических систем и не приводит к формированию «жесткого» сопряжения реагирования последних на воздействие. Напротив, введение повышенной концентрации соединения способствует организации комплексного ответа различных метаболических систем крови на действие донора оксида азота, о чем и свидетельствует увеличение степени сопряженности сдвигов отдельных показателей, оцениваемое по нарастающему значению соответствующих коэффициентов корреляций. Подобное

состояние, по-видимому, следует трактовать как напряжение адаптационных систем крови.

Аналогичные тенденции имели место и в отношении энергетического метаболизма эритроцитов. При этом интересно, что подобное сопряжение не коснулось активности лактатдегидрогеназы в прямой реакции, не продемонстрировавшей значимых корреляционных зависимостей при применении ни одной из изученных концентраций ДНКЖ. В то же время оптимальная доза донора оксида азота (0,3 мМ) обеспечивала сопряжение слабой силы лишь между обратной реакцией энзима и кристаллизуемостью ( $r=0,31$ ;  $p<0,05$ ), тогда как при введении более высокой концентрации агента (0,6 мМ) наблюдали появление дополнительных корреляций средней силы с индексом структурности ( $r=0,52$ ;  $p<0,05$ ) и слабых – со степенью деструкции фации и выраженностью краевой зоны ( $r=0,48$  и  $0,45$  соответственно;  $p<0,05$  для обоих случаев) наряду с усилением зависимости с кристаллизуемостью (до  $r=0,61$ ;  $p<0,05$ ).

Для уровня лактата в эритроцитах имело место увеличение коэффициента корреляции с выраженностью краевой зоны: при введении 0,3 мМ ДНКЖ он составлял -0,35, а при использовании 0,6 мМ соединения – -0,51 ( $p<0,05$  для обоих случаев).



*Рисунок 14* - Системные механизмы ответа организма на введение различных доз донора оксида азота

Также показательным является сопоставление уровня сопряженности физико-химических параметров крови (рН и окислительно-восстановительного потенциала плазмы) с кристаллоскопическими показателями. При применении более низкой концентрации донора оксида азота (0,3 мМ) не наблюдали зависимостей средней силы между ними, несмотря на наличие значимой корреляции практически между всеми указанными индексами. Так, уровень рН плазмы крови обнаруживал взаимосвязь с индексом структурности, кристаллизруемостью и выраженностью краевой зоны ( $r=0,32$ ; 0,35 и 0,43 соответственно;  $p<0,05$  для

всех параметров), как и окислительно-восстановительный потенциал ( $r=0,38$ ;  $0,37$  и  $0,42$  соответственно;  $p<0,05$  для всех параметров).

Введение животным раствора ДНКЖ в более высокой концентрации ( $0,6$  мМ) существенно повышало выраженность сопряжения между параметрами, причем в этом случае все кристаллоскопические показатели были включены в корреляции, а значение коэффициента корреляции входило в область сильной связи. Например, для рН крови оно по отношению к индексу структурности, кристаллизуемости, степени деструкции фации и сформированности краевой зоны составляло  $0,64$ ;  $0,68$ ;  $0,74$  и  $0,89$  соответственно ( $p<0,05$  для всех параметров).

На основании этого можно заключить, что при действии физиологической дозы донора оксида азота ( $0,3$  мМ) биологическая жидкость способна достаточно свободно адаптироваться к изменениям рН и окислительно-восстановительного потенциала (рис. 14), что положительно характеризует адаптивные резервы организма в целом (широкий диапазон «метаболической адаптации»).

Напротив, влияние более высокой концентрации тиол-содержащих ДНКЖ ( $0,6$  мМ) приводит к усилению метаболического сопряжения, свидетельствующего о напряжении метаболических систем адаптации, и может создавать условия для развития окислительного дисбаланса. Он способен провоцироваться за счет ускоренного высвобождения NO из комплекса с выраженной стимуляцией окислительного потенциала плазмы крови и, следовательно, гиперактивацией процессов липопероксидации как в ней самой, так и в мембранах эритроцитов.

### Заключение

1. В условиях *in vitro* действие водного раствора ДНКЖ на параметры крови характеризуется умеренным антиоксидантным действием, реализующимся в плазме крови как ограничение процессов липопероксидации (на  $7-19\%$  относительно контроля), а в эритроцитах – за счет повышения активности супероксиддисмутазной системы (на  $21\%$ ); а также в модификации энергетического метаболизма эритроцитов (стимуляция каталитической активности лактатдегидрогеназы в прямой реакции на  $38-45,4\%$ ). Напротив, обработка крови газообразным оксидом азота приводит к формированию окислительного стресса (активация перекисного окисления липидов на  $45\%$ , снижение антиоксидантной активности на  $56\%$  и повышение концентрации малонового диальдегида в  $2,43$  раза) и энергодефицита (ингибирование активности лактатдегидрогеназы в прямой реакции на  $35\%$ , а в обратной – на  $24,8\%$ ).

2. Различные формы оксида азота оказывают неодинаковое влияние на кристаллогенные свойства сыворотки крови *in vitro*, причем особенностью действия ДНКЖ является наиболее выраженная стимуляция структуризации биожидкости (повышение кристаллизуемости в  $1,28$  раза, а индекса структурности – в  $1,47$  раза), сочетающаяся со снижением деструкции элементов (в  $1,95$  раза) и расширением краевой зоны (в  $1,56$  раза). Выявлено,

что данные сдвиги коррелируют с динамикой других изученных метаболических и физико-химических показателей.

3. На организменном уровне действие глутатион-содержащих ДНКЖ в оптимальной концентрации (0,30-0,45 мМ) проявляется в повышении антиоксидантного потенциала плазмы крови (на 24-31% по сравнению с интактными крысами), стимуляции энергетического обмена (возрастание активности лактатдегидрогеназы в прямой реакции на 44-46%) и активности альдегиддегидрогеназы эритроцитов (на 38-41% соответственно).

4. Результаты тезиокристаллоскопической оценки образцов сыворотки крови животных после проведения курса внутрибрюшинных инъекций ДНКЖ указывают на активирующее влияние соединения на кристаллогенные (повышение кристаллизуемости на 20-47%, индекса структурности – в 3,2-3,37 раза) и иницирующие свойства биожидкости, наиболее выражено проявляющееся при использовании вещества в 0,3- и 0,45-миллимолярных водных растворах. Установлено, что степень сопряженности с метаболическими показателями у последних существенно ниже по сравнению с 0,6-миллимолярным раствором ДНКЖ.

#### **Список основных публикаций по теме диссертации:**

(\* - публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ)

1. \* 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, А.В. Давыдюк // Медицинский альманах. – 2013. - №3. – С. 37-38.
2. \* Соловьева, А.Г. Состояние про- и антиоксидантных систем крови при экспериментальной терапии термической травмы динитрозильными комплексами железа / А.Г. Соловьева, А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин, А.В. Давыдюк // Ученые записки Орловского государственного университета. – 2014. – №7. - С. 259-260.
3. \* Мартусевич, А.К. Влияние динитрозильных комплексов железа на метаболические параметры крови животных с экспериментальной термической травмой / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин, А.В. Давыдюк // Биофизика. – 2014. – Т. 59. - Вып. 6. – С. 1173-1179.
4. \* Мартусевич, А.К. К нормированию уровня микроциркуляции у крыс линии Вистар / А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин, П.В. Перетягин, А.В. Давыдюк // Лазерная медицина. – 2014. – Т. 18. - Вып. 4. – С. 66-67.
5. \* Давыдюк, А.В. Метаболическая адаптация эритроцитарных оксидоредуктаз к воздействию глутатион-содержащих динитрозильных комплексов железа / А.В. Давыдюк, А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, Р.Г. Каримова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2015. – Т. 221. - №1. – С. 60-64.
6. \* Мартусевич, А.К. Влияние динитрозильных комплексов железа на параметры окислительного метаболизма при экспериментальной термической травме / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, А.В. Давыдюк, С.П.

Перетягин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78. - №7. – С. 15-19.

7. \* Мартусевич, А.К. Оксид азота в модуляции кристаллогенных свойств биологической жидкости / А.К. Мартусевич, Л.К. Ковалева, А.В. Давыдюк // Биофизика. – 2016. – Т. 61. - №2. – С. 345-351.

8. \* Мартусевич, А.К. Влияние физиологического донора оксида азота на окислительный метаболизм крови крыс / А.К. Мартусевич, А.В. Давыдюк, А.А. Мартусевич, Л.К. Ковалева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163. - №5. – С. 553-555.

9. Мартусевич, А.К. Депонированные формы оксида азота: биомедицинские аспекты / А.К. Мартусевич, С.П. Ашихмин, С.П. Перетягин, А.В. Давыдюк // Вятский медицинский вестник. – 2014. - №3-4. – С. 18-24.

10. Vanin A.F. Estimation of dinitrosyl iron complexes action on some physical and chemical blood parameters in vitro / A.F. Vanin, A.K. Martusevich, S.P. Peretyagin, A.V. Davyduk // Revista Espaniola de Ozonoterapia. – 2013. – Vol. 3. - №2. - Suppl. 1. – P. 92.

11. Мартусевич, А.К. Комплексный алгоритм оценки функционально-метаболического статуса крысы для задач биомоделирования / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, П.В. Перетягин, А.В. Давыдюк // Тез. докл. XXII Съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2013. – С. 329.

12. Мартусевич, А.К. Изучение некоторых метаболических эффектов динитрозильных комплексов железа в экспериментах in vitro и in vivo / А.К. Мартусевич, А.Ф. Ванин, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин, А.В. Давыдюк // Мат. восьмой Национ. научно-практ. конф. с междунар. участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека». – Смоленск. – 25-29 мая 2014. - С. 123-124.

13. Martusevich A.K. Investigation of some metabolic effects of dinitrozyl iron complexes in vitro and in vivo / A.K. Martusevich, A.F. Vanin, A.G. Soloveva, S.P. Peretyagin, A.V. Davyduk // Proc. of 8<sup>th</sup> National Scientific Practical Conf. with Int. Participation «Reactive oxygen species, nitric oxide, antioxidants and human health». – Smolensk. – May 25-29, 2014. – P. 124-125.

14. Soloveva A.G. State of blood oxidative metabolism at experimental therapy with dinitrosyl iron complexes in burned rats / A.G. Soloveva, A.K. Martusevich, S.P. Peretyagin, A.V. Davyduk // Proc. of Intern. Symp. “Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology”. – Kazan, Russia. – 21-23 September 2014. – P. 67-68.

15. Давыдюк, А.В. Состояние оксидоредуктаз эритроцитов при действии экзогенного донора оксида азота in vivo / А.В. Давыдюк, А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, А.Д. Плеханова // Мат. Всеросс. научн. конф. «Механизмы устойчивости и адаптации биологических систем к природным и техногенным факторам». – Киров. – 2015. – С. 250-252.

16. Мартусевич, А.К. Влияние комбинированной NO-терапии на показатели окислительного метаболизма крови при экспериментальной термической травме / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, А.А. Мартусевич, А.В. Давыдюк // Амурский медицинский журнал. – 2015. - №4. – С. 165-167.

17. Мартусевич, А.К. Синтетические депонированные формы NO в коррекции нарушений метаболизма при термической травме / А.К. Мартусевич, А.Г.



Соловьева, А.В. Давыдюк // Сб. статей «Биотехнология и общество в XXI веке». – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. – С. 63-67.

18. Мартусевич, А.К. Влияние свободного и депонированного оксида азота на кристаллогенные свойства сыворотки крови *in vitro* / А.К. Мартусевич, Л.К. Ковалева, А.В. Давыдюк // Мат. докл. V Съезда биофизиков России. – Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета. – 2015. – Т. 2. – С. 102.

19. Давыдюк, А.В. Влияние свободного и депонированного оксида азота на кристаллогенные свойства сыворотки крови / А.В. Давыдюк, А.Д. Плеханова, А.К. Мартусевич // Научные и инновационные разработки молодых ученых-аграриев: Сб. тр. молодых ученых ФГБОУ ВПО «Нижегородская ГСХА» за 2014-20154 гг. / Под ред. А.Г. Самоделкина, Е.В. Дабаховой, А.А. Романова. – Нижний Новгород. – 2015. – С. 63-67.

20. Мартусевич, А.К. Влияние динитрозильных комплексов железа на структуризацию сыворотки крови крыс / А.К. Мартусевич, А.В. Давыдюк, Л.К. Ковалева, К.М. Сысуев, В.А. Бобков, В.В. Наумов // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2015. – Т. 2. - №4. – С. 37-43.

21. Мартусевич, А.К. Модуляция окислительного метаболизма крови физиологическим NO-донором при экспериментальной термической травме / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин, А.В. Давыдюк // Мат. научно-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 70-летию первого ожогового центра России «Современные аспекты лечения термической травмы». – Санкт-Петербург. – 2016. – С. 67-68.

22. Разумовский, А.В. Оценка адаптивного потенциала кристаллостаза крови крыс на действие физиологического донора оксида азота / А.В. Разумовский, А.К. Мартусевич, А.В. Давыдюк, Л.К. Ковалева // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2016. – Т. 3. - №3. – С. 208-211.

23. Ковалева, Л.К. Технологии биокристалломики в оценке биологических эффектов активных форм кислорода и монооксида азота / Л.К. Ковалева, А.К. Мартусевич, А.А. Мартусевич, А.В. Давыдюк // Тез. докл. IX Междунар. научн. конф. «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация и материалы будущего». – Иваново. – 2016. – С. 164-165.

24. Мартусевич, А.К. Изучение NO-модуляции кристаллогенных свойств сыворотки крови человека *in vitro* / А.К. Мартусевич, Л.К. Ковалева, А.В. Давыдюк, А.Д. Плеханова // Мат. X междунар. научн. конф. «Системный анализ в медицине (САМ-2016)». – Благовещенск. – 2016. – С. 133-136.

25. Martusevich A.K. The estimation of adaptive potential of rats blood crystallostasis at the action of natural donor of nitric oxide / А.К. Martusevich, А.В. Razumovsky, А.В. Davyduk, L.K. Kovaleva // Revista de ozonoterapia. – 2016. – Vol. 6, N 2 Suppl. – P. 48.

26. Мартусевич, А.К. Дегидратационная структуризация биологических жидкостей в оценке системных эффектов экзогенных источников биорадикалов / А.К. Мартусевич, Л.К. Ковалева, А.А. Мартусевич, А.В. Давыдюк // Сб. тез. Первого российского кристаллографического конгресса «От конвергенции наук к природоподным технологиям». – Москва. – 2016. – С. 245.

### Список сокращений

ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа

ПОЛ – перекисное окисление липидов

АОА – общая антиоксидантная активность  
ЛДГ – лактатдегидрогеназа  
МДА – малоновый диальдегид  
АлДГ - альдегиддегидрогеназа  
ОВП – окислительно-восстановительный потенциал  
Кр – кристаллизуемость  
ИС – индекс структурности  
СДФ – степень деструкции фации  
Кз – выраженность краевой белковой зоны  
ТИ – тезиграфический индекс  
К - кристалличность