

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего
образования «Нижегородская государственная
сельскохозяйственная академия»

На правах рукописи

ДАВЫДЮК
Алексей Викторович

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

03.03.01 – физиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н. А.К. Мартусевич

Нижегород - 2017

Содержание

	Стр.
Список сокращений	4
1 ВВЕДЕНИЕ	5
2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
2.1 Оксид азота как универсальный биорегулятор	10
2.2 Динитрозильные комплексы железа, их структура и биологическая роль	20
2.3 Дегидратационная структуризация компонентов крови и ее диагностическое значение	23
3 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ	27
3.1 Общая характеристика работы и дизайн исследования	27
3.2 Методы исследования	28
3.2.1 Исследование процессов липопероксидации на основании изучения биохемилюминесценции биологических жидкостей	28
3.2.2 Методы исследования кристаллогенных свойств биожидкостей	30
3.2.3 Оценка параметров энергетического обмена, ферментных систем детоксикации и физико-химических свойств крови	37
3.3 Методы статистической обработки данных	38
4 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	39
4.1 Сравнительный анализ модификации окислительного метаболизма крови при действии свободного и депонированного оксида азота	39
4.2 Влияние свободного и депонированного NO на энергетический метаболизм крови	50
4.3 Особенности действия динитрозильных комплексов железа на альдегиддегидрогеназу эритроцитов <i>in vitro</i>	57
4.4 Изменения некоторых физико-химических параметров плазмы крови при действии естественного донора оксида азота	61
4.5 Оценка действия динитрозильных комплексов железа на	

кристаллогенные свойства сыворотки крови <i>in vitro</i>	64
4.6 Оценка взаимосвязи ответа метаболических и физико-химических показателей крови в формировании ответа на введение динитрозильных комплексов железа	75
4.7 Оценка дозозависимости действия динитрозильных комплексов железа на баланс про- и антиоксидантных систем крови животных	80
4.8 Влияние физиологического донора NO на некоторые параметры энергетического метаболизма и ферментных детоксикационных систем крови крыс	84
4.9 Кристаллогенная активность сыворотки крови крыс в динамике применения депонированной формы оксида азота	89
4.10 Исследование инициаторного потенциала сыворотки крови животных при введении раствора динитрозильных комплексов железа	95
4.11 Характер трансформации физико-химических показателей крови при действии естественного донора оксида азота	98
4.12 Оценка сопряженности сдвигов биохимических и кристаллоскопических параметров крови в реакции на введение динитрозильных комплексов железа	102
5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	127

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

Введение

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 al., 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 (Vorodulin 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 работы: 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 146 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований, заключения, 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.

2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Оксид азота как универсальный биорегулятор

В настоящее время в лечебных целях все более активно применяются физико-химические факторы. Являясь прерогативой физиотерапии, сейчас они успешно демонстрируют свои возможности как полноценного дополнительного (Пономаренко Г.Н., 1995), а в некоторых случаях – самостоятельного (фотодинамическая терапия, лазерная медицина, озонотерапия и др.) метода коррекции различных заболеваний и патологических состояний (Илларионов В.Е., 1992; Узденский А.Б., 2010; Перетягин С.П. с соавт., 2011; Буйлин В.А., Москвин С.В., 2005). Несмотря на имеющую место в литературе дискуссию относительно эффективности применения данных технологий, последняя подтверждена, в частности, тридцатилетней историей экспериментально-клинического обоснования целесообразности применения озонотерапии при широком спектре патологии человека и животных (Гречко В.Н., Воробьев А.В., 2008; Перетягин С.П. с соавт., 2011), и более чем десятилетней – для синглетно-кислородной терапии (Заворотная Р.М., 2002; Tuner J., Hodl L., 1996). Исследования в области лазерных технологий прочно заняли свои позиции в медицине и биологии, результатом чего явились организация и успешное функционирование профильного научного центра, а также издание специализированного научного журнала.

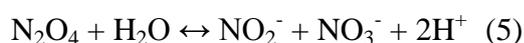
Даже с учетом кажущегося полиморфизма молекулярных и клеточных эффектов, вызываемых действием данных факторов, четко установлено, что все они оказывают существенное корригирующее влияние на интенсивность процессов липопероксидации (Илларионов В.Е., 1992; ; Буйлин В.А., Москвин С.В., 2005; Самосюк И.З., Фисенко Л.И., 2007; Узденский А.Б., 2010; Karu T., 1999). В свою очередь, окислительный стресс сейчас принято рассматривать как значимое патогенетическое звено различных патологических состояний (Владимиров Ю.А., 2000;

Величковский Б.Т., 2001; Меньщикова Е.Б. с соавт., 2008). Это дает основание предположить возможность стереотипности молекулярного ответа клеток и тканей на изучаемые физико-химические воздействия.

Ситуация с раскрытием молекулярных механизмов действия различных физико-химических агентов становится еще более затруднительной в свете революционного открытия роли оксида азота (NO) [NO] как одного из наиболее важных меж- и внутриклеточных молекулярных мессенджеров (Граник В.Г., Григорьев Н.Б., 2004; Ванин А.Ф. с соавт., 2009, 2011; Гусакова С.В., Ковалев И.В., Смаглий Л.В. с соавт., 2015; Gryglewsky R.J., Minuz P., 2001). Следствием этого стало признание NO «молекулой года» журнала «Science» в 1992 г. и получение учеными из США R.F. Furchgott, L.J. Ignarro и F. Murad Нобелевской премии в области физиологии и медицины за выяснение роли оксида азота в функционировании живого организма. Следует отметить, что в последнее десятилетие число работ в данной отрасли науки растет лавинообразно (Граник В.Г., Григорьев Н.Б., 2004; Ванин А.Ф. с соавт., 2009, 2011; Murad F., 1994; Gryglewsky R.J., Minuz P., 2001). Этими исследованиями было, в частности, показано, что NO определяет текущий тонус сосудов, ингибирует агрегацию тромбоцитов и их адгезию на стенках кровеносных сосудов, функционирует в центральной и вегетативной нервной системы, регулируя деятельность органов дыхания, желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы. Кроме того, данное соединение является нейротрансмиттером, а также принимает участие в регуляции системы иммунитета. В целом, NO - токсичный газ, способный выступать в биосистемах как свободный радикал, имеющий короткий период полужизни (4 с.) и легко подвергающийся различным химическим трансформациям. Он непрерывно продуцируется в организме человека и животных ферментным и неферментным путями, оказывая ключевое воздействие на целый ряд принципиально различных физиологических и патологических процессов.

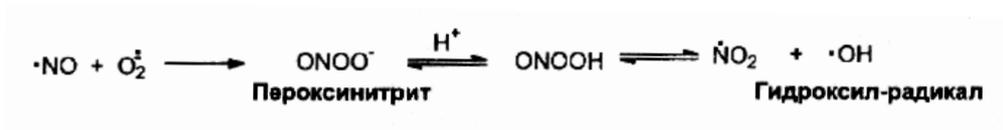
С этих позиций можно предположить, что результирующее изменение продукции и биологической активности NO имеет место и при применении физико-химических воздействий. Поэтому целью данной работы является анализ потенциального участия оксида азота (II) как единого мессенджера эффекта терапевтических физико-химических факторов (озона, синглетного кислорода, лазерного и ультрафиолетового излучения и др.).

Прежде всего, логично привести краткую физико-химическую характеристику NO с акцентом на свойства, необходимые для понимания его физиологических и биохимических эффектов. Оксид азота (II) [NO] – бесцветный газ, умеренно растворимый в воде (1,9 мкМ при 25°C), в водной среде легко окисляемый кислородом воздуха (Граник В.Г., Григорьев Н.Б., 2004). В связи с этим, сохранность растворов оксида азота некоторые авторы предлагают обеспечивать предварительной аэрацией их ультразвуком с последующим пропусканием через раствор, содержащий пирогаллол. В водных растворах в присутствии кислорода NO почти полностью превращается в нитрит-анион в процессе протекания следующих реакций (Граник В.Г., Григорьев Н.Б., 2004):



Показано, что в реальных жидкостях преобладают реакции 3 и 4 в сравнении с реакцией 5; вследствие этого образующиеся концентрации нитрат-иона невелики относительно концентрации нитрит-иона.

Свободнорадикальные свойства оксида азота проявляются в биологических и модельных системах в форме генерации пероксинитрита и гидроксил-анион радикала по следующей схеме:



Относительно метаболизма NO сравнительно недавно В.П. Реутовым с соавт. (1998) и Е.Б. Меньшиковой с соавт. (2000) сформулирована оригинальная концепция, характеризующая синтез, деградацию и рециркуляцию соединения в организме млекопитающих в форме нового метаболического цикла - «цикла оксида азота» (рис. 1). Следует отметить, что данный цикл является закономерным дополнением к уже хорошо изученным биохимическим циклам (Кребса, Кальвина, орнитинового, люциферинового и др.) и взаимосвязан с ними.

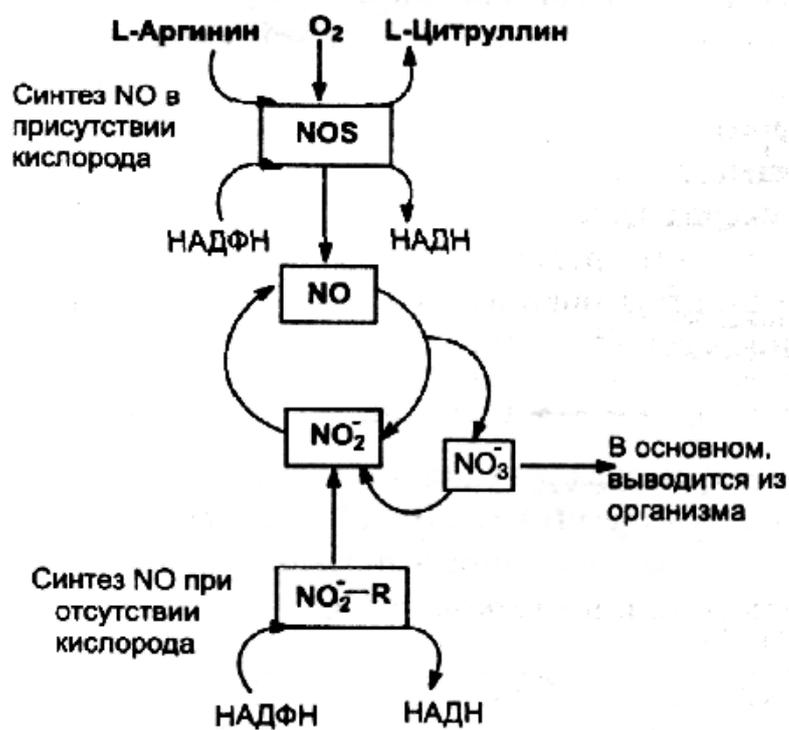


Рисунок 1 - Цикл оксида азота (по В.П. Реутову, 1998)

По мнению указанных авторов, цикл оксида азота включает 2 компонента (Реутов В.П. с соавт., 1998):

а) NO-синтазные реакции, заключающиеся в трансформации L-аргинина в L-цитруллин и оксид азота, который далее окисляется до нитритов и нитратов.

б) Нитритредуктазная реакция, катализируемая электронодонорными системами с участием НАДН, НАДФН, флавопротеинов, дезоксигемоглобина и цитохрома P450.

Одним из центральных компонентов данного цикла является фермент, обеспечивающий продукцию оксида азота, – синтаза оксида азота (NO-синтаза, NOS) [Ванин А.Ф., 2000]. В настоящее время обнаружены 3 основных изоформы рассматриваемого фермента, 2 из которых – конститутивные, кальций/кальмодулин-зависимые, одна – индуцибельная. Краткая характеристика изоформ NO-синтазы представлена в таблице 1.

Таблица 1 - Изоформы синтаз оксида азота (NOS) (по В.Г. Гранику, Н.Б. Григорьеву, 2004)

Тип NOS (молекулярная масса мономера)	Альтернативные названия	Распределение по тканям и клеткам	Тип активации
NOS-I (155 kDa)	Нейрональная NOS (nNOS), мозговая NOS	Нейроны центральной и периферической нервной системы, матка, скелетная мускулатура	Конститутивная форма, кальций/кальмодулин-зависимая
NOS-II (125 kDa)	Индукцибельная NOS (iNOS)	Макрофаги, печень, гладкая мускулатура, эндотелий, сердце	Индукцируется липополисахаридами, цитокинами и глюкокортикоидами, кальций/кальмодулин- независимая
NOS-III (133 kDa)	Эндотелиальная NOS (eNOS)	Эндотелий, сердце, мозг	Конститутивная форма, кальций/кальмодулин-зависимая

Несмотря на то, что сейчас обнаружены многочисленные эффекты оксида азота в отношении регуляции состояния биологических систем, наибольшее клинико-патофизиологическое значение имеет вазодилаторное действие NO (Ванин А.Ф., 2000, 2006). Механизм данного эффекта изучен достаточно подробно, и в общем виде может быть представлен в виде схемы (рис. 2). Соединение, синтезируемое конститутивными изоформами NO-синтазы в эндотелии и нервной системе, взаимодействуя с гуанилатциклазой и трансформируя ее пространственное строение, запускает синтез цГМФ, а через него – каскад других ферментных систем, результатом чего и является вазодилатация (Murad F., 1994; Kamasaki Y. et al., 1995).

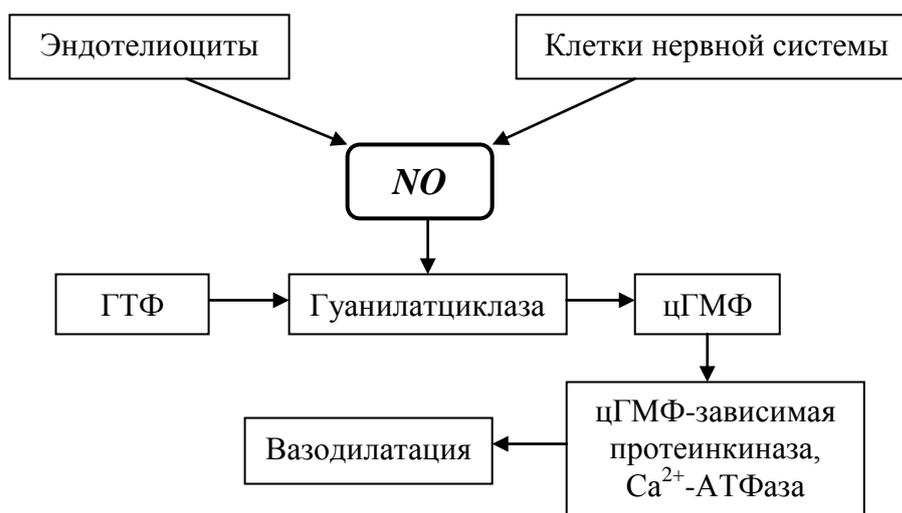


Рисунок 2 - Схема генерации и вазодилаторного действия оксида азота

Открытие данного механизма способствовало стимуляции исследований в области обнаружения способов увеличения продукции оксида азота соответствующей синтазой, что обусловлено многочисленностью патологии, сопровождающейся нарушением тонуса сосудов по спазматическому типу. В частности, заманчивой целью подобной коррекции являются артериальная гипертензия различного генеза, ишемическая болезнь сердца, инсульт и др. Наиболее простым и логичным подходом к решению данной проблемы с позиций

патофизиологии и биохимии служит экзогенное введение субстрата для NO-синтазы – L-аргинина (Граник В.Г., Григорьев Н.Б., 2004; Костюк В.А., Потапович А.И., 2004; Меньщикова Е.Б. с соавт., 2008). Однако последующими работами было показано, что, во-первых, период полужизни оксида азота крайне мал (Костюк В.А., Потапович А.И., 2004; Самосюк И.З., Фисенко Л.И., 2007), а увеличение темпов депонирования соединения (как в форме S-нитротиолов, так и комплексов железа) затруднительно; во-вторых, избыток NO может по принципу обратной связи ингибировать собственную синтазу (Граник В.Г., Григорьев Н.Б., 2004) и, в-третьих, высокая концентрация L-аргинина способствует изменению превалирующего продукта реакции на супероксид-анион радикал, обладающий, в частности, мембраноповреждающим действием (Ванин А.Ф. с соавт., 2007; 2009; van der Vliet A. et al., 1997). Именно последнее обстоятельство реализуется в случае цитотоксического эффекта NO, когда в результате уже описанной реакции при взаимодействии продуктов функционирования NO-синтазы образуется пероксинитрит, в отсутствие или недостаточной концентрации/активности молекул-гасителей (супероксиддисмутазы, восстановленного глутатиона и др.) вызывающий повреждение соприкасающихся с ним клеточных элементов, прежде всего биомембран (Граник В.Г., Григорьев Н.Б., 2004; Костюк В.А., Потапович А.И., 2004). В целом, наряду с позитивными эффектами у NO как свободного радикала присутствует и токсическое действие, проявляющееся только в определенных условиях (рис. 3). В связи с этим, следует подчеркнуть, что для адекватного функционирования организма имеет место оптимальный уровень синтеза оксида азота, а его отклонения (в любую сторону), ведут к негативным последствиям (van der Vliet A. et al., 1997).

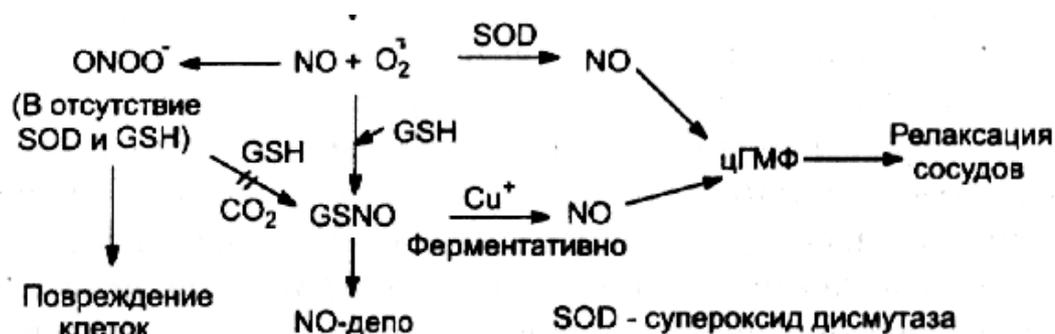


Рисунок 3 - Комплекс позитивных и негативных молекулярно-клеточных эффектов NO

Совокупность свойств и убиквитарность оксида азота как низкомолекулярного регулятора физиологических и патологических процессов указывают на потенциальную многочисленность механизмов, звеном которых является данное соединение. Это касается и внешних воздействий. Так, одним из механизмов реализации саногенетического эффекта многих лекарственных препаратов, как было установлено в последнее десятилетие, служит модуляция синтеза NO, причем подобное действие обнаружено и для целого ряда известных и давно применяемых в медицине и ветеринарии лекарственных средств (нитроглицерина, нитропрусида натрия, изосорбида моонитрат, пропранолола) [Ванин А.Ф., 2000; Граник В.Г., Григорьев Н.Б., 2004; Ванин А.Ф. с соавт., 2006]. Данные препараты, являясь донорами NO, запускают соответствующий каскад его эффектов, оказывая необходимое клиническое (прежде всего - антиангинальное) действие (Марцевич С.Ю., 2003; Мазур Н.А., 2005). С учетом этого аспекта действия лекарств с подобной химической структурой разрабатываются средства, комбинирующие NO-донорные свойства и способность выступать в качестве лигандов к рецепторам (Korzycka L, Szmigielska H, Czarna E., 2000). Например, известный препарат небиволол сочетает в себе NO-донорный и β_1 -адреноблокирующий эффекты (Cominacini L., Pasini A. F., Garbin U. et al., 2003).

Другие интересные варианты сочетанных эффектов лекарственных средств включают комбинацию NO-донорных свойств и характеристик нестероидного противовоспалительного препарата (Машковский М.Д., 1998; Граник В.Г., Григорьев Н.Б., 2004). К ряду таких лекарств, в частности, относится мелоксикам (Насонов Е.Л., 2001; Barrachina M.D., Panés J., Esplugues J.V., 2001). Эти «гибридные» молекулы способны предотвратить гастропатию, обусловленную длительным приемом неселективных блокаторов циклооксигеназы. Таким образом, различные экзогенные соединения при введении в организм обладают модулирующим действием в отношении оксида азота.

В то же время эти исследования касаются исключительно фармакологических препаратов, тогда как физико-химические факторы, существенно изменяющие многие параметры клеточного гомеостаза, характеристики биологических жидкостей и функциональное состояние органов и тканей, как модуляторы генерации оксида азота практически не рассматривались. Упоминание о подобном эффекторном каскаде приводится лишь в единичных работах по применению генераторов синглетного кислорода (Заворотная Р.М., 2002; Самосюк И.З., Фисенко Л.И., 2007). Кроме того, предполагается, что применение экзогенного NO также стимулирует и эндогенный синтез данного соединения (Граник В.Г., Григорьев Н.Б., 2004).

Принцип молекулярных мишеней в отношении действия физических факторов наиболее полно изучен и представлен для фотодинамической терапии, однако синглетный кислород является не единственной мишенью, т. к. в процессе фотохимических реакций образуется не только он, но и другие активные биорадикалы (Костюк В.А., Потапович А.И., 2004; Узденский А.Б., 2010). Сходные внутриклеточные процессы наблюдаются при действии ультрафиолетового и лазерного излучения на биологические объекты, хотя каждое из данных воздействий имеет особенности реализации эффекта (Илларионов В.Е., 1992; Karu T., 1999).

С другой стороны, многие методы лечения, основанные на действии физико-химических факторов, традиционно рассматриваются с позиций самостоятельного эффекта их действующего начала (Владимиров Ю.А., 1994; Lubart R., Malik Z., Rochkind S., Fisher T., 1990). Так, биологическая активность озона достаточно подробно изучена и положена в основу тактики применения озонотерапии при различных патологических состояниях (Масленников О.В., Конторщикова К.Н., Грибкова И.А., 2008; Щербатюк Т.Г., 2010; Перетягин С.П. с соавт., 2011), тогда как в этом случае результирующее действие связано с совокупностью образующихся активных форм кислорода и озона. Одним из косвенных доказательств связи озона и метаболизма оксида азота является то, что только в присутствии окислителей (перекиси водорода, кислорода, озона и др. [Ванин А.Ф. с соавт., 2006]) реакция NO с тиолами приводит к образованию S-нитрозотиолов – известных молекулярных депо оксида азота (Ванин А.Ф. с соавт., 1999, 2003).

Учитывая вышеперечисленные факты, можно предположить, что оксид азота способен выступать в качестве единого молекулярного интермедиата, реализующего на клеточном уровне эффекты действия различных физико-химических факторов. Есть основания причислять к спектру данных воздействий озонотерапию, синглетно-кислородную терапию, фотодинамическую терапию, применение ультрафиолетового и лазерного излучения, местную дарсонвализацию, а также непосредственно NO-терапию. Важно подчеркнуть, что большинство из перечисленных воздействий опосредует эффект через дополнительные промежуточные звенья, среди которых особое место занимает эндогенный синглетный кислород (Заворотная Р.М., 2002; Самосюк И.З., Фисенко Л.И., 2007; Moncada S., Radomski M.W., Palmer R.M.J., 1998). Кроме того, принимая в расчет нестабильность оксида азота, в рамках предлагаемой концепции предполагается, что рассматриваемые факторы влияют и на процессы депонирования и высвобождения NO, на что, в частности, указывает роль

окислителей в формировании S-нитротиолов (Ванин А.Ф. с соавт., 2003; Граник В.Г., Григорьев Н.Б., 2004; Stamler J.S., Singel D.J., Loscalzo J., 1992).

2.2 Динитрозильные комплексы железа, их структура и биологическая роль

Многогранная биорегуляторная роль монооксида азота (регуляция сосудистого тонуса, нейротрансмиссия, апоптоз и др. [Vanin A.F., 2009]), а также возможность его участия как в процессах регенерации и реадaptации, так и в патогенезе различных заболеваний (прежде всего, за счет формирования нитрозативного стресса [Казимирко В.К. с соавт., 2004; Меньщикова Е.Б. с соавт., 2008; Sies H., 1997; van der Vliet A. et al., 1997; Gryglewsky R.J., Minuz P., 2001]) детерминируют целесообразность направленной коррекции уровня NO. Для этого в настоящее время существуют 3 основных пути: применение фармацевтических доноров оксида азота или модуляторов активности NO-синтазы (Марцевич С.Ю., 2003; Мазур Н.А., 2005), действие газового потока, содержащего NO и генерируемого аппаратом «Плазон» (Мартусевич А.К., Перетягин С.П., Ванин А.Ф., 2012; Martusevich A.K. et al., 2013, 2014), а также использование физических факторов-индукторов эндогенного синтеза соединения (терагерцовое электромагнитное излучение [Буйлин В.А., Москвин С.В., 2005]). С другой стороны, только первый из перечисленных вариантов способен обеспечить четкое дозирование «добавляемой» концентрации оксида азота, однако биотрансформация NO из лекарственных доноров происходит болuсно или в течение короткого промежутка времени, что полезно лишь в отдельных ситуациях (например, при коррекции ишемии коронарных сосудов нитроглицерином [Мазур Н.А., 2005]).

Согласно представлениям ведущего специалиста в области NO-биологии проф. А.Ф. Ванина (2009), особая роль ДНКЖ связана с их

протективной функцией в отношении свободного NO (прежде всего, в предотвращении взаимодействия последнего с супероксид-аноином); возможностью пополнения пула S-нитрозитиолов – дополнительных депо оксида азота; участием ДНКЖ в процессах молекулярной сигнализации, регуляции экспрессии генов, апоптозе, активации ферментных комплексов и метаболизме железа; а также непосредственном влиянии на сосудистый тонус и, следовательно, артериальное давление.

Динитрозильные комплексы железа с тиолатными лигандами были обнаружены в тканях животных и дрожжевых клетках в 60-х гг. прошлого столетия тремя группами исследователей в СССР, США и Великобритании (Moncada S., Radomski M.W., Palmer R.M.J., 1988; Vanin A.F., 2009). Их наиболее специфичным признаком явилось обнаружение анизотропного сигнала при ЭПР-исследовании с центром при $g=2.03$ (Vanin A.F., 2009).

В настоящее время показаны многочисленные положительные эффекты естественной депонированной формы оксида азота – динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) – в отношении различных биологических систем. Так, продемонстрирована эффективность их применения при экспериментальном эндометриозе, эректильной дисфункции и другой патологии (Ванин А.Ф., 2000, 2009). Ранее в исследованиях *in vitro* установлен характер влияния ДНКЖ на отдельные компоненты метаболизма крови человека, включая энергетический обмен, состояние про- и антиоксидантных систем (Мартусевич А.К. с соавт., 2013-2015; Перетягин С.П., Мартусевич А.К., Ванин А.Ф., 2013) и т.д. Кроме того, получено подтверждение позитивного действия ДНКЖ на энергетический метаболизм эритроцитов при моделировании термической травмы, включавшего преимущественно оптимизацию функционирования лактатдегидрогеназы (ЛДГ) путем стимулирования прямой реакции фермента на фоне ингибирования обратной (Мартусевич А.К. с соавт., 2014). В то же время комплексный анализ влияния рассматриваемого

донора оксида азота на состояние крови при термической травме в литературе не представлен.

Учитывая показанные отечественными и зарубежными исследователями в системах *in vitro* антиоксидантные свойства ДНКЖ (Шумаев К.Б. с соавт., 2006, 2008), нашим коллективом были проведены внутрибрюшинные инъекции водного раствора данного соединения при экспериментальных ожогах у крыс (Мартусевич А.К. с соавт., 2014). Установлено, что рассматриваемый вариант воздействия способствует существенному уменьшению интенсивности перекисного окисления липидов, практически достигающему уровня интактных крыс, что косвенно подтверждает наличие антиоксидантных эффектов ДНКЖ *in vivo*. Оценка действия соединения на антиоксидантную активность плазмы крови продемонстрировала значительное нарастание значения параметра. Это свидетельствует о том, что ДНКЖ не только способны выступать в качестве «ловушки» свободных радикалов, пополнять пул антиоксидантов биологической жидкости за счет частичного распада до относительно стабильных S-нитрозотиолов и оказывать модулирующее действие на активность антиоксидантных ферментов.

Результаты проведенных исследований указывают на положительное действие ДНКЖ на энергетический метаболизм эритроцитов, которое реализуется посредством регуляции каталитических свойств лактатдегидрогеназы. Следует отметить, что данный адаптивный эффект наблюдали уже к третьим суткам послеожогового периода, причем он полноценно проявлялся лишь к десятому дню со времени нанесения термической травмы.

Особый интерес также представляло исследование влияния термической травмы на активность АлДГ – уникального фермента, обеспечивающего биodeградацию органических нитратов до монооксида азота в условиях *in vivo* (Cominacini L. et al., 2003; de la Lande I.S. et al., 2004; Chen Z. et al., 2005; Mayer B., Beretta M., 2008; Lang B.S. et al., 2012),

а также оценка его модуляции естественной формой NO – ДНКЖ. Установлено, что в условиях ожоговой токсемии активность АлДГ существенно снижена и составляла у животных с термической травмой только 61% от уровня, характерного для крыс интактной группы ($p < 0,05$).

Таким образом, динитрозильные комплексы железа могут рассматриваться как одно из центральных звеньев NO-метаболизма в организме человека и животных, выполняющее многочисленные функции и выступающее в качестве агента метаболической сигнализации и биорегулятора.

В наших исследованиях подтверждены положительное действие динитрозильных комплексов железа на метаболические параметры крови животных с термической травмой, в том числе на состояние про- и антиоксидантных систем, которое обусловлено способностью ДНКЖ защищать компоненты биосистем от активных форм кислорода, продуцируемых в условиях окислительного стресса. Этот эффект проявляется в существенном снижении интенсивности (нормализации) процессов перекисного окисления липидов на фоне значимого нарастания антиоксидантных резервов плазмы крови. Аналогичные тенденции имеют место и в мембранах эритроцитов.

Также выявлено, что ДНКЖ стимулируют энергетический метаболизм эритроцитов крыс с термической травмой за счет преимущественной активации ЛДГ в прямой реакции и снижения темпов нарастания уровня лактата. Кроме того, применение рассматриваемой депонированной формы NO способствует стимуляции каталитической активности АлДГ у имеющих термическую травму крыс.

2.3 Дегидратационная структуризация компонентов крови и ее диагностическое значение

В настоящее время сыворотку и плазму крови принято рассматривать как основной биологический субстрат для кристаллоскопических

исследований. Важно, что в различных аспектах это практически единственная биологическая жидкость, кристаллогенные свойства которой изучаются как у человека, так и у животных, однако задачи этих работ принципиально различаются. Так, основной целью кристаллоскопических исследований сыворотки крови человека является поиск информативных параметров описания кристаллоскопических (преимущественно) и тезиграфических фаций для разработки новых диагностических технологий. В частности, наиболее обширные и фундаментальные изыскания, выполненные акад. РАМН В.Н. Шабалиным (2001, 2004) и проф. Л.В. Савиной (1992, 1999, 2006), ориентированы на выявление морфологических кристаллоскопических маркеров сыворотки крови (особые структурные элементы типа «языков Арнольда», «рыбьей сети» и др.) либо характеристик текстуры микропрепарата («двойная фация», «отдельности» и их взаимное расположение и т.д.). Следует отметить, что результаты этих исследований позволили сформировать направление «Функциональная морфология биологических жидкостей» (Шабалин В.Н., Шатохина С.Н., 2001) и описать диагностически значимые кристаллоскопические «паттерны» сыворотки крови для различных патологических состояний в офтальмологии (Чухман Т.П., 2000; Девяткин А.А., 2009), гастроэнтерологии (Плаксина Г.В., 1999, 2002; Потехина Ю.П. с соавт., 2004; Кокуева О.В. с соавт., 2006; Савина Л.В. с соавт., 2006; Карпунина Т.В. с соавт., 2011) и других областях медицины.

Как уже указывалось выше, с целью нивелирования негативного влияния субъективного компонента на результат кристаллоскопического анализа был предложен и апробирован ряд алгоритмов и программных средств описания кристаллоскопических и тезиграфических фаций (Бузоверя М.Э. с соавт., 2003; Шабалин В.В., 2004; Чухман Т.П., 2004; Тарасевич Ю.Ю., 2006). Следует отметить, что последние в силу различных причин не получили широкого распространения в исследованиях кристаллогенных свойств сыворотки крови человека.

Если в отношении рассматриваемой биологической жидкости человека работы, направленные на выяснение физиологических закономерностей и патогенетических механизмов, единичны, а преобладают публикации клинической и параклинической тематики, то изучение характера дегидратационной структуризации сыворотки крови животных зачастую служит инструментом оценки тех или иных воздействий. В частности, наиболее представительна в этом плане совокупность работ токсикологической направленности (Громова И.П., 2005). Так, с помощью кристаллоскопического анализа сыворотки крови были исследованы некоторые особенности токсического эффекта фосфор-содержащих соединений (Байдаулет О.И. с соавт., 2007), несимметричного диметилгидразина (Кулмагамбетов И.Р. с соавт., 2007), серосодержащего газа (Беднов И.А. с соавт., 2004).

Сведения о видовых особенностях дегидратационной структуризации сыворотки крови в литературе практически отсутствуют и представлены лишь публикациями нашего исследовательского коллектива (Мартусевич А.К. с соавт, 2008-2012) и работами Л.М. Обуховой (2009, 2011), при этом в последних содержатся лишь единичные данные о формировании «трещин» в макропортрете высушенной биологической жидкости у представителей некоторых позвоночных животных (Обухова Л.М. с соавт., 2011).

Существенно меньший объем данных получен ветеринарами для некоторых заболеваний животных. В частности, серия исследований проведена под руководством проф. А.А. Стекольников в СПбГАВМ (2009), имеются публикации специалистов из Перми и т. д. С другой стороны, многие работы в области ветеринарной биокристалломики основаны на изучении кристаллогенных свойств иных биологических субстратов, в т.ч. слюны, желчи и др. Так, при стоматологической патологии у собак показана информативность оценки собственного кристаллообразования слюны, причем данная метаболическая

диагностика, по мнению авторов работы, способна также служить инструментом выбора тактики лечения (Касумов М.К., 2006). Кроме того, исследование феномена арборизации (кристаллизации) слюны за рубежом активно используется для оценки овуляторного цикла у собак (Pardo-Carmona B. et al. 2010) Относительно много публикаций касаются кристаллогенной активности мочи животных различных видов и ориентированы на выявление мочекаменной болезни, частота которой у крупных и мелких домашних животных крайне высока, а также мониторинг эффективности ее лечения (Мартусевич А.К., Гришина А.А., Русских А.П., 2010). Некоторые работы оценку информативности изучения собственной кристаллизации желчи, особенно у крупного рогатого скота и свиней (Мишин С.Г., 1990; Быков А.В., 1992). В то же время наиболее доступный биологический субстрат организма животного – сыворотка и плазмы крови – остается незаслуженно, с наших позиций, малоисследованным. Не раскрыты также возможности его использования для верификации физиологических и патологических состояний в экспериментальной медицине и практической ветеринарии. Все вышеперечисленное и создает предпосылки для проведения настоящего исследования.

3 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

3.1 Общая характеристика работы и дизайн исследования

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВПО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия» и ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России.

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 (биохемиллюминесцентное 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 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.

Таким образом, в основу проведенного исследования легли результаты изучения образцов сыворотки крови, полученных от 90 крыс линии Вистар и 60 здоровых людей. В целом, выполнено 1740 исследований.

3.2 Методы исследования

3.2.1 Исследование процессов липопероксидации на основании изучения биохемилюминесценции биологических жидкостей

Одним из важнейших показателей эффективности действия озона, обладающего прооксидантными свойствами, является уровень хемилюминесценции (ХЛ), позволяющей оценить интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность антиоксидантной системы в пробах крови, мочи, слюны.

Биохемилюминометр БХЛ-06 является устройством, предназначенным для анализа кинетических кривых био- и хемилюминесценции: измерения АТФ, ФМН, НАД-Н - зависимых дегидрогеназ (биолуминесценция) 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 10 показателей биохемилюминесценции - светосумму, максимальную интенсивность, кинетические константы световой реакции и др.

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.

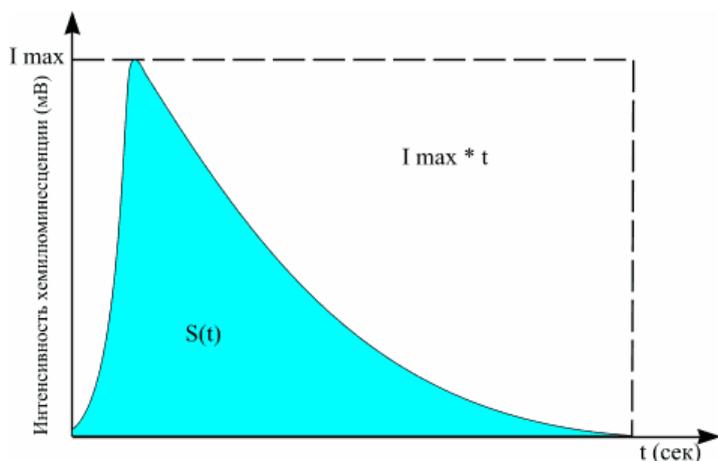


Рисунок 4 - Схематичное изображение кривой биохемилюминесценции

Описание метода. Метод индуцирования 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 прооксидантным 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 ПОЛ);
- $\text{tg}2\alpha$ - тангенс угла максимального наклона кривой к оси времени (показатель уровня антиоксидантной активности биосубстрата – АОА)
- I_{max} -значение максимальной интенсивности за время опыта, мВ;

3.2.2 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 60⁰С). После полного высыхания фации анализируют при помощи светового или электронного микроскопа, используя соответствующие способы анализа.

При большом количестве однократно исследуемых образцов целесообразно сначала проводить фотографирование фаций при помощи цифрового фотоаппарата или видеокамеры с последующим занесением изображений в компьютер (создание фотобанка фаций), а затем осуществлять анализ полученных изображений.

Для описания результатов собственного и инициированного кристаллогенеза биосред использовали алгоритмы, предложенные А.К. Мартусевичем и А.А. Гришиной (2009).

Алгоритм количественного описания результатов свободного кристаллообразования биологических жидкостей

Индекс структурности (ИС) отражает состав элементов образца, аличие и абсолютное количество тел 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.

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

Определяется по 4-балльной шкале:

0 баллов – нет центров кристаллизации;

1 балл – единичные мелкие кристаллы преимущественно одиночного ряда (не более 10 в поле зрения при суммарном увеличении микроскопа x56);

2 балла – значительное количество центров кристаллизации (более 10 в поле зрения при суммарном увеличении микроскопа x56);

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

Тип взаимодействия кристаллических и аморфных структур (ТВ; в англоязычной литературе – interaction type [IAT]). Биологическая сущность и информативность данного феномена не изучены.

Возможны два варианта реализации показателя:

а) *налипание* аморфных частиц на крупные кристаллы;

б) *оттеснение* аморфных элементов от кристаллических структур.

Степень деструкции фации (СДФ) – интегральный показатель, отражающий правильность протекания кристаллогенеза, так и эндогенные факторы. 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, образец представляет собой бесформенную массу аморфного материала.

Равномерность распределения кристаллических и аморфных элементов фации (R) – критерий, свидетельствующий о правильности протекания процесса свободного кристаллогенеза. Интерпретируется с использованием шестибальной шкалы:

0 баллов – полная хаотичность фации, наличие разнородных элементов, пустот, мест скопления кристаллических структур, различная ориентация образований в поле зрения.

1 балл – некоторая сгруппированность кристаллов, намечаются единичные участки правильного их построения, занимающие менее 30% от общей площади поля зрения, направленность фигур еще хаотичная.

2 балла – наблюдаются четкие "островки" упорядоченности, занимающие от 30 до 50% поля зрения (изучается не менее трех), расстояния между элементами в группах приблизительно уравниваются, регистрируется некоторая закономерность направленности структурных образований фации.

3 балла – элементы фации в значительном числе (более 50% от общего количества) структурированы, "островки" равномерности переходят в участки сравнительно большой площади. Внутри этих зон наблюдаются правильное расположение и равномерность расстояний между отдельными образованиями. Закономерность направленности элементов и зональность просматриваются достаточно четко.

4 балла – элементы фации в большинстве своем структурированы (свыше 75% от общего количества), остальные распространяются "островками" по полю зрения, чаще в краевой (маргинальной) зоне. Расстояния между отдельными образованиями практически постоянны. Ориентация элементов подчиняется определенной закономерности почти по всему полю зрения.

5 баллов – все элементы тезиграфической фации четко структурированы на всем поле зрения, что подтверждается рассмотрением

нескольких полей. Деление на центральную, промежуточную и краевую зоны четко просматривается. Границы последних можно установить даже без микроскопа. Расстояния между элементами картины постоянны, ориентация фигур правильная, закономерная на всей поверхности фации.

Степень выраженности ячеистости фации (С) отражает особенности органико-минеральных взаимодействий в фации. Оценка производится по шестибальной прямой шкале:

0 баллов – полное отсутствие признаков появления ячеистости, однородность картины, нет выделения «островков» кристаллов. Фации представляют единый «пласт» кристаллических образований.

1 балл – наличие первых признаков неоднородности, «дробления» кристаллоскопической картины:

- начало обособления групп элементов (менее 30% от числа всех образований, занимающих менее 30% поля зрения);
- появление некоторой неоднородности картины;
- начало «дробления» единого «пласта» кристаллических фигур.

2 балла – отмечается достаточно просматриваемая тенденция к «дроблению» фации, образованию «островков» кристаллов:

- количество обособившихся элементов в «островках» – от 30 до 50% от числа всех структур, они занимают более 30% поля зрения фации;
- выраженная неоднородность, зональность картины;
- визуализируется процесс «разделения» фации на участки, регистрируются формирующиеся пояса кристаллизации.

3 балла – наблюдаются выраженные изменения в фации:

- элементы в «островках» составляют от 50 до 75% от общего числа, занимаемая ими поверхность – более 50% поля зрения;
- выраженная неоднородность, «зернистость» картины;
- четко просматривается процесс «расчленения» фации;
- пояса кристаллизации довольно четкие, образованы более чем одним рядом кристаллических структур.

4 балла – достоверно просматриваются признаки появления ячеистости:

- число сгруппированных в ячейки структур - от 75 до 100%;
- сгруппированные элементы занимают **все** поле зрения;
- очень четко выражены «дробность», «зернистость» картины;
- пояса кристаллизации образованы более чем одним рядом кристаллов, имеются на всей поверхности поля зрения, окружают «островки» полностью.

5 баллов – картина характеризуется следующими признаками:

- число сгруппированных в ячейки структур - от 75 до 100%;
- сгруппированные элементы занимают **все** поле зрения;
- очень четко выражена "дробность", "зернистость" картины;
- пояса кристаллизации образованы более чем одним рядом кристаллов, имеются на всей поверхности поля зрения, окружают "островки" полностью;
- присутствуют "разломы" картины (кроме фаций сыворотки крови).

Выраженность отдельных зон кристаллизации (Z) – четкость формирования центральной, промежуточной и краевой зон в фации биожидкости. Выражается в баллах (от 0 до 3):

0 баллов – невозможность выделения каких-либо зон фации;

1 балл – при малом увеличении светового микроскопа выделение зон неотчетливое, наблюдаются незначительные признаки зонализации;

2 балла – наличие зон фации четко определяется при малом увеличении микроскопа;

3 балла – четкая визуализация зон даже без микроскопа.

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

0 баллов – полное отсутствие краевой зоны, невозможно выделение краевой зоны под «малым» (мельче $\times 56$) 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;

3 балла – соотношение «ширина краевой зоны : радиус фации» превышает 1 : 3;

4 балла – выраженная краевая зона в сочетании с наличием «разломов»;

5 баллов – краевая зона визуализируется даже без микроскопа.

Рельефность текстуры (Т) позволяет оценить состояние фонового рисунка, на котором располагаются основные кристаллы и аморфные тела.

Оценивается по прямой 4-балльной схеме:

0 баллов – нет признаков наличия текстуры;

1 балл – едва заметные *при микроскопии* элементы (участки) текстуры;

2 балла – хорошо различимая *при микроскопии* текстура фации;

3 балла – визуализируемая без использования микроскопа текстура.

Алгоритм количественного описания результатов иницированного кристаллообразования биологических субстратов

Большинство параметров иницированного кристаллогенеза аналогичны применяемым при анализе кристаллоскопических фаций, особого описания требуют лишь некоторые показатели, специфичные для тезиграфии:

Основной тезиграфический коэффициент (Q) указывает на степень организации / дезорганизации кристаллогенеза базисного под воздействием биоматериала. Расчет показателя производится по следующей формуле:

$$Q = \frac{A}{B}$$

где А - количество центров кристаллизации в опытном образце, ед.; В - количество центров кристаллизации в контрольном образце, ед.

Коэффициент поясности (Р) демонстрирует степень гетерогенности изучаемого биосубстрата по дисперсии молекулярных масс компонентов. В расчет принимаются диаметры наибольшего и наименьшего из имеющихся в образце поясов кристаллизации:

$$P = \frac{d_1}{d_2},$$

где d_1 – радиус минимального пояса кристаллизации, мм; d_2 – радиус максимального пояса кристаллизации, мм.

Кристалличность (К) по своей сущности и значению является аналогом индекса структурности, применяемого в отношении кристаллоскопических фаций, и позволяет оценить сложность организации тезиграфической фации.

Описание результатов осуществляется по 6-балльной шкале:

0 баллов – фация полностью образована аморфными телами;

1 балл – большинство элементов, формирующих образец, имеют аморфное строение, но встречаются «островки» кристаллов, составляющие менее 30% от объема микропрепарата и количества фигур;

2 балла – большинство структур являются аморфными телами, но значительная часть образований – это моно- и поликристаллы (30-50%);

3 балла – соотношение «аморфное вещество : кристаллические структуры» приближается или составляет 1 : 1;

4 балла – среди дискретных составляющих фации преобладают кристаллические элементы, но присутствует и аморфный компонент;

5 баллов – фацию полностью образуют кристаллические элементы.

3.2.3 Оценка параметров энергетического обмена, ферментных систем детоксикации и физико-химических свойств крови

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.

3.3 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.

4 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1 Сравнительный анализ модификации окислительного метаболизма крови при действии свободного и депонированного оксида азота

Известно, что молекула монооксида азота (NO), являясь биорадикалом, способна вступать в различные реакции с органическими соединениями и активными формами кислорода (Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1999; van Faassen E., Vanin A.F., 2007; Vanin A.F., 2009). В результате этого, в зависимости от текущего уровня NO (Гудков Л.Л., Шумаев К.Б., Каленникова Е.И., 2007; Hall C.N., Garthwaite J., 2009), могут проявляться либо его биорегуляторная активность, либо токсические эффекты, главным образом обусловленные синтезом пероксинитрита (ONOO⁻) [Zhang X., Li D., 2006; Szabo C., Ischiropoulos H., Radi R., 2007]. Напротив, для естественной депонированной формы оксида азота – динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) – в единичных отечественных и зарубежных публикациях описаны антиоксидантные свойства (Шумаев К.Б. с соавт., 2006; Гудков Л.Л., Шумаев К.Б., Каленникова Е.И., 2007; Губкина С.А., 2009), однако их механизм раскрыт недостаточно полно. В частности, в работе С.А. Губкиной (2009) показано, что тиол-содержащие ДНКЖ способствуют элиминации субстратов карбонильного стресса из модельной среды, что подтверждено данными эксперимента на крысах. Для некоторых модельных биосистем эти результаты доказаны и в публикациях К.В. Шумаева с соавт. (2006, 2010), в которых антиоксидантная активность ДНКЖ проиллюстрирована и в отношении оксидативного и нитрозативного стрессов.

С другой стороны, в настоящее время отсутствуют сведения о сопоставимости и особенностях действия газообразного и депонированного NO на параметры физико-химического гомеостаза крови. В связи с этим нами проведен анализ динамики окислительного

метаболизма крови под влиянием оксида азота в газообразном виде и в форме ДНКЖ, что и являлось целью данного фрагмента исследования.

Нами проведена оценка действия различных форм NO на образцы изолированной консервированной крови человека, полученной от практически здоровых доноров (n=30). Для генерации газообразного NO использовали генератор холодной плазмы «Плазон», а также экспериментальный аппарат для синтеза оксида азота, разработанный в Российском федеральном ядерном центре (РФЯЦ). В создаваемом этим аппаратом воздушном потоке, содержащем NO, в отличие от аналогичного потока, создаваемого Плазоном, практически отсутствовала примесь озона и других активных форм кислорода (Карелин В.И. с соавт., 2013). В качестве депонированной формы NO применяли ДНКЖ с глутатионом, которые синтезировали по методике, разработанной Р.Р. Бородулиным с соавт. в лаборатории А.Ф. Ванина (2013).

Для проведения экспериментов каждый образец крови разделяли на 5 порций по 5 мл, первая из которых являлась контрольной (интактный образец), вторую барботировали газовым потоком от аппарата «Плазон» (средняя мощность, концентрация NO - 800 ppm; V=100 мл; продолжительность обработки – 3 мин), третью – тем же потоком, но с концентрацией NO 800 ppm (десятикратное разведение воздухом), четвертую – воздушной газовой смесью от экспериментального NO-генератора, разработанного в РФЯЦ (концентрация оксида азота – 75 ppm; объем и продолжительность воздействия аналогичны), пятую – изотоническим водным раствором ДНКЖ (концентрация – 3 ммоль/л, объем – 0,05 мл). Концентрация ДНКЖ в растворе была определена спектрофотометрически при длинах волны 310 и 360 нм (спектрофотометр PowerWave XS, США). Экспозиция после введения NO во всех случаях составляла 5 минут.

В образцах определяли интенсивность процессов липопероксидации, общую антиоксидантную активность плазмы крови и перекисную

резистентность эритроцитов методом Fe-индуцированной биохемилюминесценции на аппарате БХЛ-06. Уровень малонового диальдегида (МДА) в плазме крови и эритроцитах оценивали по методу В.Г. Сидоркина, И.А. Чулошниковой (1993). Супероксиддисмутазную активность оценивали по методу Т.В. Сироты (1999).

В соответствии с целью работы нами проведена оценка состояния про- и антиоксидантных систем как в плазме крови, так и в мембранах эритроцитов.

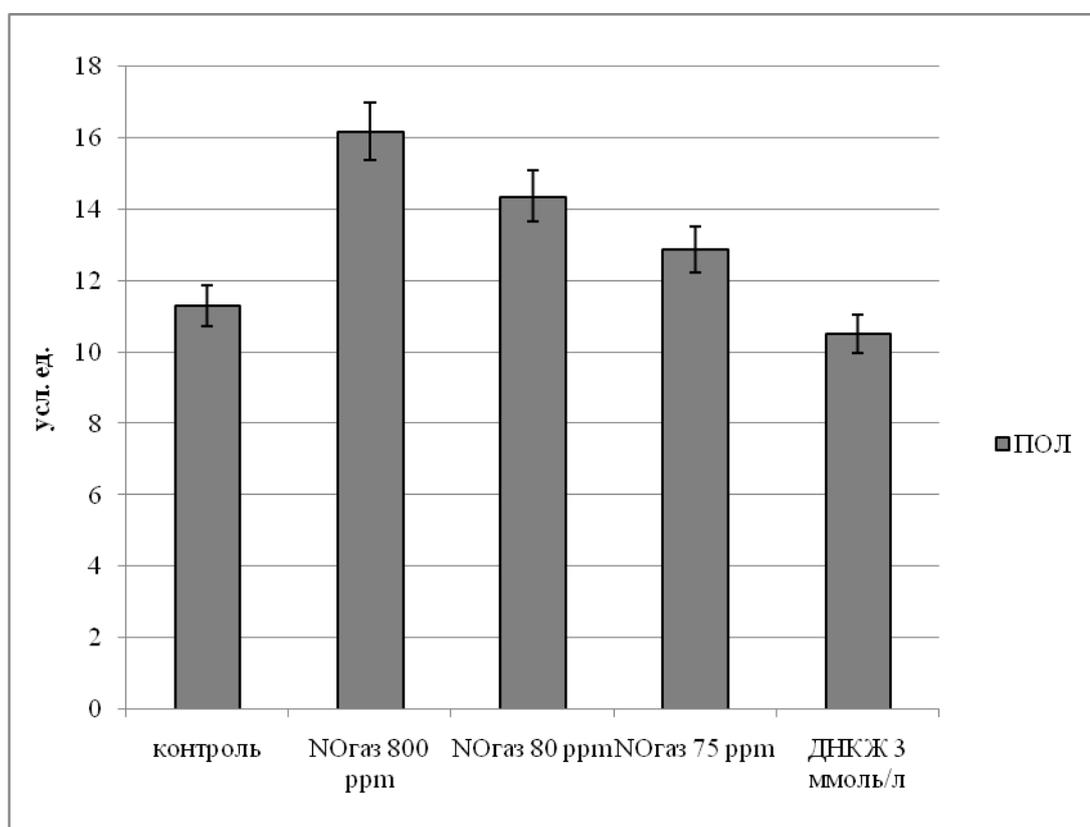


Рисунок 5 - Влияние оксида азота на интенсивность липопероксидации плазмы крови

Так, установлено, что, по параметрам биохемилюминесценции (рис. 5), интенсивность процессов липопероксидации в плазме крови при ее обработке газовым потоком от аппарата «Плазон» (концентрация NO – 800 ppm) существенно увеличивается (на 45%; $p < 0,05$ относительно интактного образца), что подтверждает ранее полученные данные

(Martusevich A.K. et al., 2013). В случае десятикратного разведения изучаемого газового потока выраженность сдвига светосуммы биохемилюминесценции плазмы крови снижается, однако последняя остается на достаточно высоких значениях (+27% по сравнению с интактным образцом; $p < 0,05$).

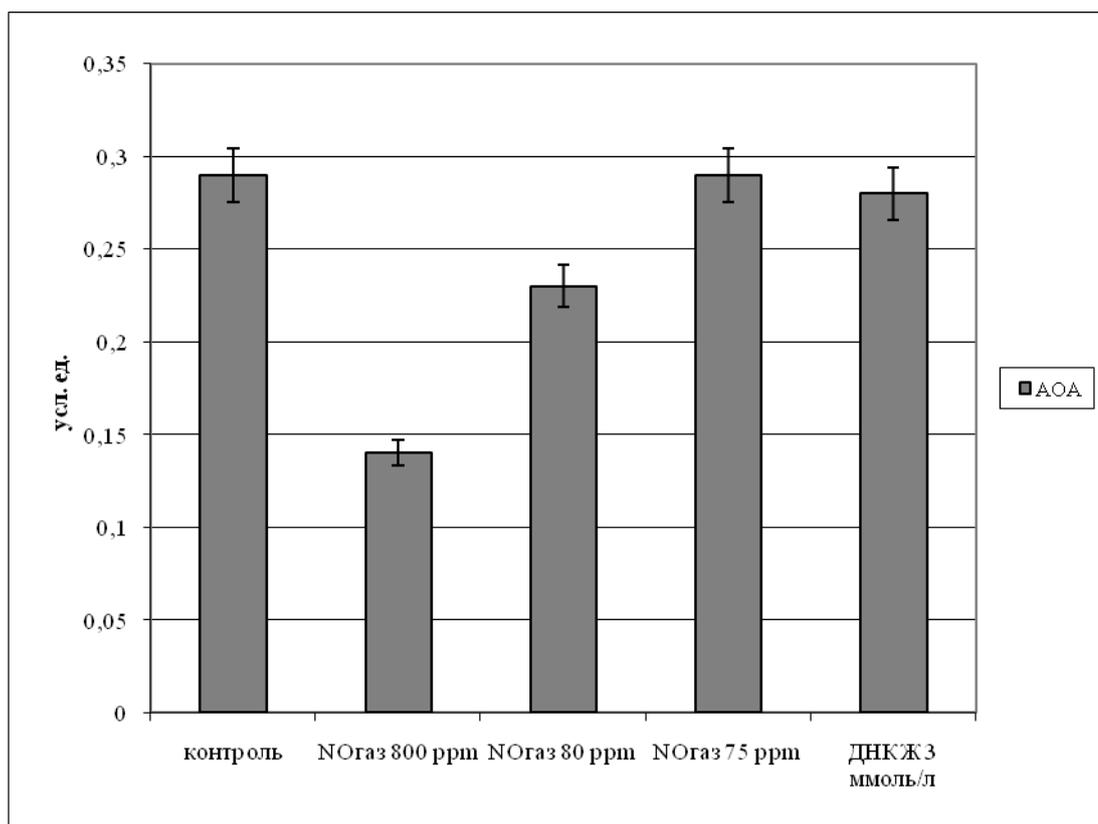


Рисунок 6 - Влияние оксида азота на общую антиоксидантную активность плазмы крови

Использование экспериментального аппарата для генерации NO, разработанного в РФЯЦ и создающего воздушную смесь с концентрацией соединения 75 ppm, что сопоставимо по количеству вводимого в биологическую жидкость оксида азота с десятикратным разведением газового потока от «Плазона» (80 ppm), обуславливает менее существенную активацию перекисного окисления липидов по сравнению с описанными ранее воздействиями. Показатель светосуммы хемилюминесценции в данном случае остается выше уровня контрольного

образца ($p < 0,05$ относительно образцов, обработанных исходным и разведенным потоком от аппарата «Плазон», и интактной порции крови).

Введение в кровь 0,05 мл водного раствора ДНКЖ, как донора NO, сопоставимо с количеством NO, попадающим в биологическую жидкость при воздействии разведенного газового потока от аппарата «Плазон» и экспериментального NO-генератора (по 9; 8 и 7,5 мкг оксида азота соответственно). Установлено, что применение ДНКЖ в указанной дозе, в отличие от них, приводит к умеренному снижению интенсивности процессов перекисного окисления липидов (на 7%, $p < 0,1$ по отношению к контролю).

Эта динамика прослеживалась и для общей антиоксидантной активности плазмы крови (рис. 6). Так, барботаж биожидкости исходным потоком «Плазона» уменьшает рассматриваемый параметр более чем в 2 раза относительно контрольного образца ($p < 0,05$), а его десятикратное разведение снижает уровень антиоксидантных резервов плазмы крови на 21% ($p < 0,05$). В то же время обработка крови газовым потоком от экспериментального NO-генератора и введение в нее раствора ДНКЖ не изменяли антиоксидантный потенциал биосреды.

Оценка уровня МДА, одного из стабильных продуктов липопероксидации, в плазме крови образцов позволила подтвердить выявленные на основе биохемилюминесцентного анализа тенденции (рис. 7). Показано, что барботаж биологической жидкости 800 ppm NO приводит к нарастанию значения показателя в 2,3 раза ($p < 0,05$ по сравнению с интактным образцом), а попытка уменьшить негативное действие данного потока разведением лишь умеренно снижает выраженность эффекта (нарастание концентрации МДА в 1,9 раза по отношению к контролю; $p < 0,05$). Напротив, обработка крови практически аналогичным количеством оксида азота при действии воздушной смеси от экспериментального NO-генератора (75 против 80 ppm) способствует

существенно меньшему градиенту уровня метаболита (увеличение в 1,6 раза; $p < 0,05$).

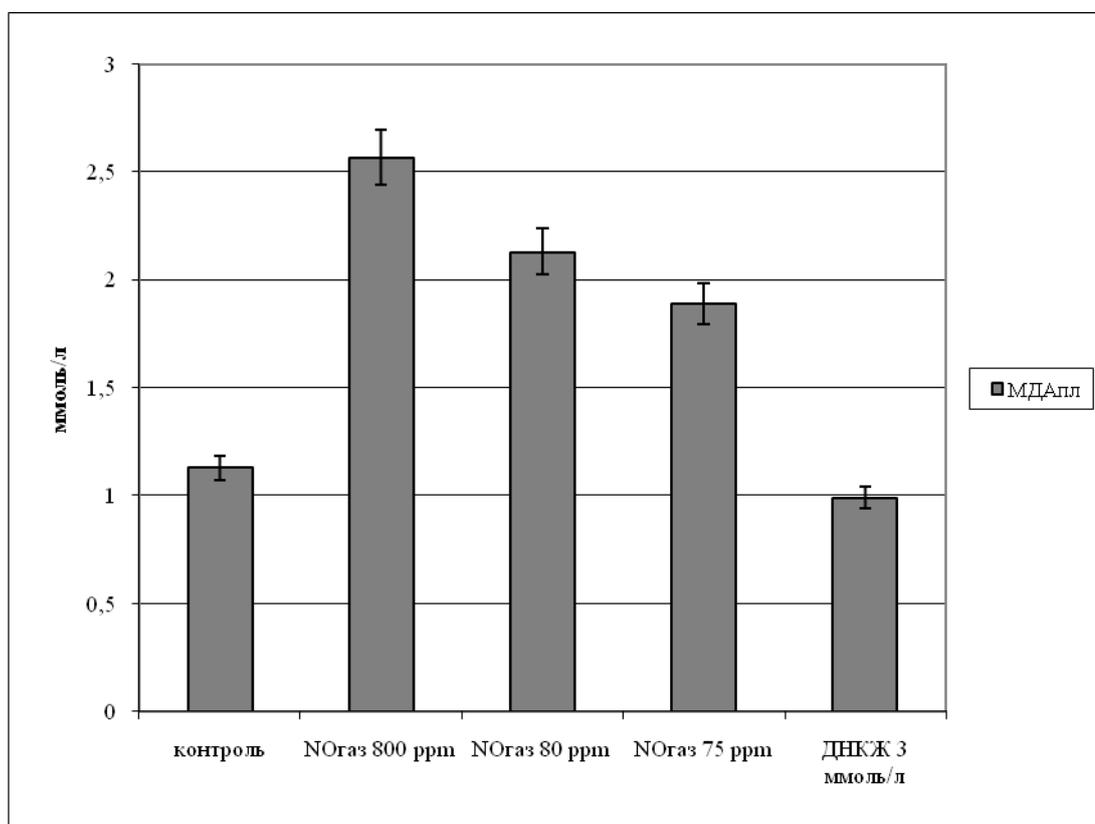


Рисунок 7 - Уровень малонового диальдегида плазмы крови при действии свободного и депонированного оксида азота

Интересная динамика концентрации МДА была зарегистрирована в отношении ДНКЖ. Установлено, что в этом случае значение показателя снижается на 13% относительно уровня интактного образца ($p < 0,05$), что косвенно может указывать на антиоксидантные свойства соединения.

Кроме показателей, непосредственно характеризующих состояние процессов липопероксидации, нами проведена оценка активности одного из основных компонентов ферментной антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазной системы, осуществляющей утилизацию супероксид-аноид-радикала (рис. 8). Установлено, что все варианты барботажа цельной крови NO-содержащими газовыми потоками приводят к ингибированию активности этой системы, однако степень выраженности

данного эффекта существенно варьирует. Так, обработка биологической жидкости наиболее «жестким» из изучаемых воздействий – потоком от «Плазона» (концентрация оксида азота – 800 ppm) – обуславливает угнетение супероксиддисмутазы в 1,64 раза относительно контрольного образца ($p < 0,05$), тогда как снижение уровня NO в нем до 80 ppm лишь в небольшой степени нивелирует данную тенденцию (уменьшение активности супероксиддисмутазы на 29% относительно значений, характерных для интактной крови; $p < 0,05$). Наименее существенно выявленный эффект реализуется при использовании в качестве газовой фазы потока от экспериментального NO-генератора. В этом случае активность супероксиддисмутазы уменьшается лишь на 19% по сравнению с контрольным образцом ($p < 0,05$).

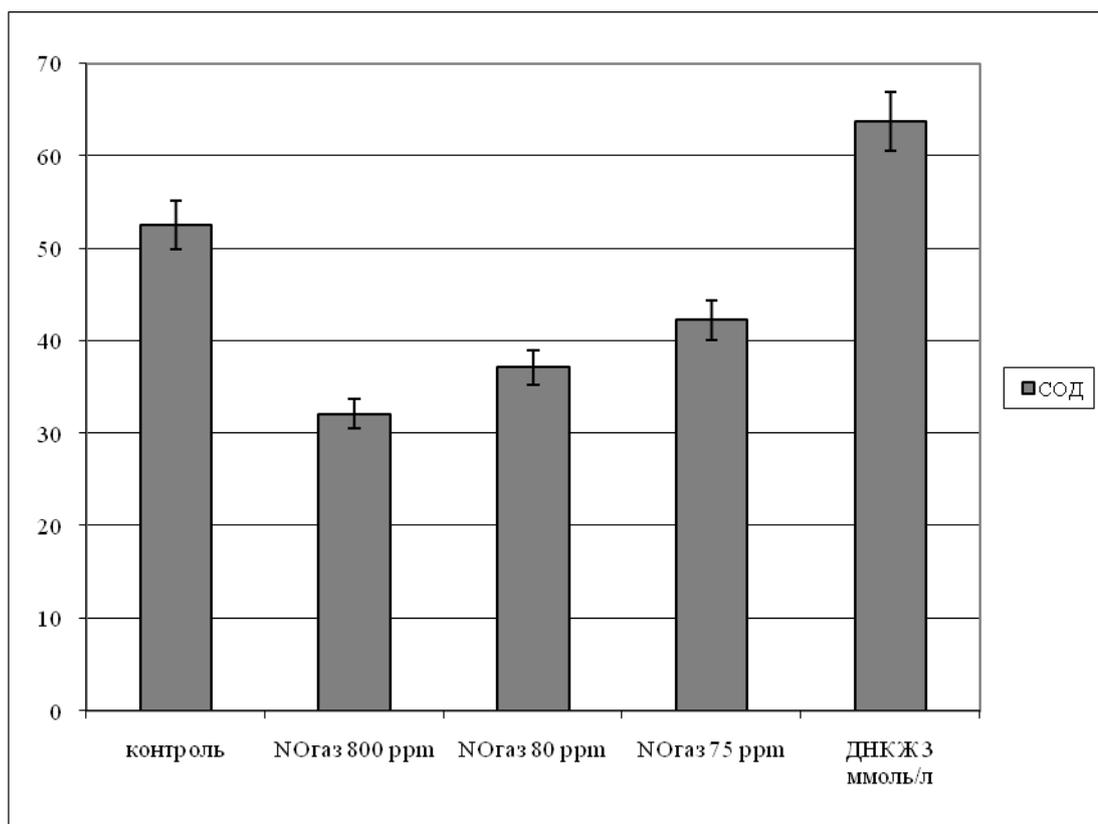


Рисунок 8 - Влияние оксида азота на активность супероксиддисмутазы эритроцитов

Принципиально иной характер изменения режима функционирования супероксиддисмутазной системы обнаружен при введении в кровь раствора ДНКЖ. Данное воздействие обусловило умеренную активацию фермента на 21% относительно интактного уровня ($p < 0,05$), что указывает на оптимизацию условий для обеспечения активности супероксиддисмутазной системы. Её повышение могло быть обусловлено антиоксидантными свойствами самого ДНКЖ. Как ранее показано, оксид азота, входящий в состав этих комплексов, способен реагировать в анионом супероксида с образованием пероксинитрита, сохраняющемся в составе ДНКЖ без выхода в окружающую среду (Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhenkov V.A. et al., 2008). Находясь в составе ДНКЖ, пероксинитрит может изомеризоваться в нитрат с последующим его выходом в среду. Тем самым устраняется появление в этой среде пероксинитрита, который в свободном состоянии после протонирования мог бы продуцировать цитотоксические агенты – гидроксильный радикал и двуокись азота. Что касается восстановленного глутатиона, который использовался при синтезе ДНКЖ и который мог бы вносить вклад в антиоксидантную активность препарата ДНКЖ (Костюк В.А., Потапович А.И., 2004), то, как следует из описания использованной методики этого синтеза (Ванин А.Ф. с соавт., 2013), в ходе этой процедуры глутатион переходил в его окисленную форму, не оказывающую антиоксидантного действия.

В наших предшествующих исследованиях показан дифференцированный характер ответа цельной крови человека на введение в нее оксида азота различными путями (в газовой или жидкой фазе), а также от различных источников (сертифицированный аппарат для создания NO-содержащей холодной плазмы «Плазон» и экспериментальный NO-генератор, разработанный в РФЯЦ) по параметрам энергетического метаболизма (Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., 2013). В данной работе были дополнительно

подтверждены представленные нами ранее сведения о негативных эффектах газового потока от «Плазона» в отношении изучаемой биологической жидкости (Мартусевич А.К. с соавт., 2012, 2013). Последние, по нашему мнению, связаны с присутствием в нем, помимо оксида азота, значительной концентрации активных форм кислорода, образующих при взаимодействии высокотоксичный пероксинитрит (Шумаев К.Б. с соавт., 2006; Zhang X., Li D., 2006; Szabo C., Ischiropoulos H., Radi R., 2007), о чем свидетельствуют результаты дополнительных изысканий (Мартусевич А.К., Перетягин С.П., Ванин А.Ф., 2012). В связи с этим, а также с необходимостью поиска оптимального способа управления уровнем NO, существенно изменяющимся при различных патологических состояниях (Титов В.Ю. с соавт., 2009, 2012; Онуфриев М.В., 2010; Hall C.N., Garthwaite J., 2009; Chazov E.I. et al., 2010), целесообразным является рассмотрение альтернативных путей введения в биосистемы *in vivo* экзогенного оксида азота. В этом направлении принципиально возможны 3 основных пути: использование максимально очищенного от присутствия активных форм кислорода NO-содержащего газового потока; применение депонированных форм оксида азота, обеспечивающих постепенное выделение соединения в свободном виде; оценка перспектив физических или химических стимуляторов эндогенного синтеза NO. Последний путь в настоящее время реализован, в частности, в форме аппарата «Орбита» (Островский В.Н., Никитюк С.М., Киричук В.Ф. с соавт., 2004), однако в этом случае, несмотря на имеющиеся в литературе сведения об его эффективности при различной патологии (Киричук В.Ф., Иванов А.Н., Антипова О.Н. с соавт., 2006), затруднительно дозировать количество дополнительно образующегося под влиянием электромагнитного поля оксида азота и, следовательно, сопоставлять с ним биологические эффекты.

Более предпочтительным представляется использование первых двух из указанных путей, которые и были изучены в рамках данного

исследования. Сравнительный анализ действия двух NO-генераторов, для которых были синхронизированы концентрации действующего соединения, позволил установить, что удаление из газовой смеси активных форм кислорода обеспечивает оптимизацию характера ее влияния на процессы липопероксидации как в плазме крови, так и в эритроцитах. Несмотря на то обстоятельство, что болюсное введение газообразного оксида азота во всех случаях способствует стимуляции свободно-радикальных реакций в биосистеме (нарастание светосуммы биохемилюминесценции плазмы крови, увеличение уровня МДА в плазме и эритроцитах), эффект газового потока от экспериментального аппарата, разработанного в РФЯЦ, можно признать тренирующим, т. к. при данном воздействии на фоне умеренной активации перекисного окисления липидов не происходит истощения антиоксидантного потенциала биожидкости. Напротив, применение высоких концентраций NO (800 ppm), сочетающихся в воздушной смеси с активными формами кислорода, в том числе озоном (Мартусевич А.К., Перетягин С.П., Ванин А.Ф., 2012), обуславливая развитие окислительного стресса в плазме крови и мембранах эритроцитов, дополнительно приводит к угнетению кислородотранспортной функции последних, способствуя образованию нитрозогемоглобина (Sanina N.A., Syrtsova L.A., Shkondina N.I. et al., 2007; He X., Azarov I., Jeffers A. et al., 2008).

Наиболее позитивный ответ про- и антиоксидантных систем крови был зарегистрирован нами при введении в биологическую жидкость водного раствора ДНКЖ, причем в этом случае количество активного агента (в пересчете на NO) было аналогичным десятикратному разведению газовых потоков, полученных от аппарата «Плазон» и экспериментального NO-генератора (9; 8 и 7,5 мкг соответственно). Данное воздействие приводило к умеренному ограничению интенсивности липопероксидации плазмы крови, причем минимальное увеличение концентрации МДА в ней свидетельствовало о проявлении ДНКЖ антиоксидантных свойств, а не

ингибировании процессов перекисного окисления, что подтверждают данные Л.Л. Гудкова с соавт. (2007).

Таким образом, на основании анализа динамики состояния про- и антиоксидантных систем крови продемонстрирована предпочтительность применения низких (менее 100 ppm) концентраций газообразного оксида азота и необходимость освобождения газового потока от примесей кислородсодержащих окислителей. В то же время депонированные формы NO, в том числе ДНКЖ с глутатионовыми лигандами, не только оказывают наиболее оптимальное действие на процессы липопероксидации в плазме крови, но и стимулируют, в отличие от газообразного NO-содержащего воздушного потока, усиление с супероксиддисмутазной активности эритроцитов.

Таким образом, проведенные исследования впервые позволили установить особенности реагирования про- и антиоксидантных систем крови в условиях *in vitro* на обработку монооксидом азота в свободной и депонированной (в составе естественных носителей соединения - ДНКЖ) форме. Они включают выраженное прооксидантное действие для газового потока от аппарата «Плазон», проявляющееся как в отношении плазмы крови, так и мембран эритроцитов и умеренно нивелирующееся при десятикратном разведении NO-содержащей смеси. Применение экспериментального генератора оксида азота демонстрирует минимальную прооксидантную активность в рассматриваемом биообъекте, а водный раствор ДНКЖ характеризуется умеренным антиоксидантным действием, реализующимся в плазме крови как ограничение процессов липопероксидации, а в эритроцитах – за счет повышения активности супероксиддисмутазной системы. Результаты экспериментов позволяют говорить о мембранопротекторном действии NO-содержащей воздушной смеси от экспериментального генератора, а также водного раствора ДНКЖ.

4.2 Влияние свободного и депонированного NO на энергетический метаболизм крови

Еще в 1989 г. В. Brune и E.G. Lapetina показали, что монооксид азота (NO) оказывает влияние на процесс рибозилирования некоего цитозольного белка с молекулярной массой 37 кДа, позднее идентифицированного как глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, ключевой фермент гликолиза (Dimmler S., Brune B., 1992; Mohr S., Hallak H., de Boitte A. et al., 1999). Этот эффект был подтвержден J. Zhang и S.H. Snyder (1992) на культуре нейрональных клеток, а в дальнейшем – и в отношении других клеточных пулов и иных ферментов (в частности, фосфофруктокиназы клеток островковых клеток поджелудочной железы и нейронов) [Tsuura Y., Shida H., Shinomura T. et al., 1999; Almeida A., Moncada S., Bolanos J.P., 2004]. Ряд работ посвящен участию оксида азота и NO-синтазы в адаптации к гипоксии и гипоперфузии тканей и даже к опухолевому процессу за счет модификации функционирования различных звеньев тканевого дыхания (Михайленко В.М., 2009; LeCras T.D., McMurthy I.F., 2001; Manukhina E.B., Downey H.F., Mallet R.T., 2006). Хотя механизм данного влияния до сих пор слабо изучен, эти и другие данные позволяют постулировать значимость NO в регуляции энергетического метаболизма (Stanley W.C., Recchia F.A., Lopaschuk G.D., 2005; Manukhina E.B., Downey H.F., Mallet R.T., 2006). Более того, имеют место противоречивые сведения о характере действия соединения на внутриклеточный транспорт глюкозы и энергетический обмен, в частности, на примере скелетной мышцы (Young M.E., Radda G.K., Leighton B., 1997; Stanley W.C., Recchia F.A., Lopaschuk G.D., 2005). Таким образом, данные литературы дают возможность заключить о наличии влияния оксида азота на энергетический метаболизм, однако его особенности пока остаются нераскрытыми. Ситуация дополнительно осложняется тем обстоятельством, что эксперименты по уточнению реализации биорегуляторной функции NO базируются лишь на косвенном влиянии на

его уровень/продукцию (Young M.E., Radda G.K., Leigton B., 1997; Almeida A., Moncada S., Bolanos J.P., 2004). С учетом того, что в организме и модельных биосистемах, используемых для проведения большинства соответствующих исследований (клеточные культуры) присутствует как ферментативный (путем активации NO-синтазы), так и неферментный синтез оксида азота (Stanley W.C., Recchia F.A., Lopaschuk G.D., 2005; Manukhina E.B., Downey H.F., Mallet R.T., 2006), а также может происходить его высвобождение из естественных депо (S-нитрозотиолы, динитрозильные комплексы железа [Ванин А.Ф., 2000, 2009]), подобный подход подчас приводит к получению противоречивых результатов. В то же время исследования непосредственного влияния NO на биосистемы единичны (Ванин А.Ф. с соавт., 2009; Giliano N.Ya. et al., 2011; Chazov E.I. et al., 2012).

Кроме того, принципиальной проблемой является определение физиологического уровня оксида азота в биологических системах (Hall C.N., Garthwaite J., 2009), а, следовательно, затруднителен адекватный выбор диапазона действующих доз NO для оценки их влияния на энергетический обмен и процессы клеточного дыхания (Мартусевич А.К. с соавт., 2012, 2013). Так, нашими предшествующими исследованиями удалось установить, что непосредственная обработка крови высокими дозами соединения (800 ppm) оказывает угнетающее действие на них, смещая функционирование лактатдегидрогеназы в сторону обратной реакции и приводя к накоплению лактата (Tatsumi T., Matoba S., Kawahara A. et al., 2000), однако для понимания механизмов этих сдвигов необходимы более детальные исследования.

В связи с этим, целью данного фрагмента исследования служил сравнительный анализ эффектов газообразного (свободного) и связанного (депонированного) оксида азота на параметры энергетического метаболизма эритроцитов *in vitro*.

Изучен характер реакции цельной консервированной крови на воздействие свободного и депонированного азота. Выполняли 2 серии экспериментов: в первой устанавливали характер действия на показатели энергетического обмена крови газообразного оксида азота, во второй – депонированного (в форме динитрозильных комплексов железа [ДНКЖ]).

Для проведения эксперимента в каждой из указанных серий кровь разделяли на 4 порции (интактную, на которую не оказывали воздействий, и 3 опытных, подвергшихся обработке). В первой серии производили прямой барботаж опытных образцов крови (5 мл) газообразным оксидом азота на трех имеющихся мощностях прибора – минимальной (min), средней (norm) и максимальной (max). Генерацию холодной плазмы, насыщенной оксидом азота (концентрация вещества в газовом потоке в выбранных условиях – 800 мкг/л), выполняли аппаратом «Плазон» (Россия). Экспозиция после воздействия составляла 3 минуты.

Во второй серии к трем опытным образцам крови добавляли 0,05; 0,1 и 0,2 мл. свежеполученного водного раствора ДНКЖ соответственно (концентрация соединения, определенная спектрофотометрически по известным молекулярным экстинкциям при длинах волны 310 и 360 нм., - 3 ммоль/л). Синтез ДНКЖ производили по методике А.Ф. Ванина с соавт. (2005). Экспозиция после введения соединения также составляла 3 минуты.

В гемолизате отмытых эритроцитов (1:40) определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в прямой и обратной реакциях по методу Г.А. Кочетова (1980) в нашей модификации (Мартусевич А.К. с соавт., 2013)]. Содержание белка устанавливали по модифицированному методу Лоури. Уровень лактата в плазме крови и эритроцитах определяли с помощью анализатора SuperGL Ambulance.

Для оценки направленности сдвигов энергетического метаболизма крови при действии выбранных физико-химических факторов использовали ряд специализированных коэффициентов: коэффициент

баланса энергетических реакций (КБЭР), коэффициент субстратной обеспеченности (КСО), нормализованный коэффициент субстратной обеспеченности ($КСО_{norm}$) [Соловьева А.Г., Зимин Ю.В., 2012].

Учитывая то обстоятельство, что наиболее изученным молекулярным механизмом действия оксида азота на биологические системы является модификация каталитических свойств ферментных систем, нами была проведена оценка активности ЛДГ в прямой и обратной реакциях (рис. 9 и 10). Установлено, что свободная и связанная формы NO оказывают на рассматриваемый фермент принципиально различное действие. Так, в отношении прямой реакции ЛДГ оксид азота, генерируемый при всех возможных мощностях аппарата «Плазон», способствует умеренному ингибированию активности энзима (на 15-35% по сравнению с контрольными значениями; $p < 0,05$), причем четкой зависимости между примененной мощностью прибора и выраженностью ингибирующего эффекта не выявлено (рис. 9).

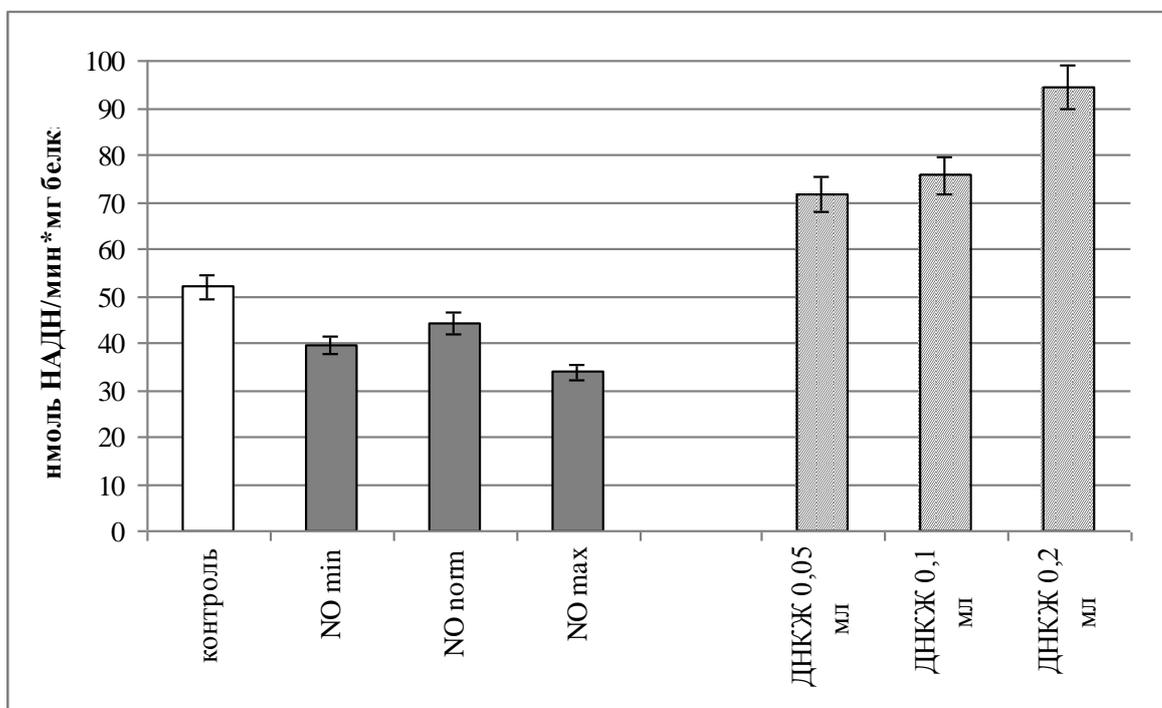


Рисунок 9 - Активность лактатдегидрогеназы эритроцитов в прямой реакции при воздействии источников оксида азота *in vitro*

Напротив, введение в цельную кровь человека депонированной формы оксида азота (ДНКЖ) приводит к существенной стимуляции каталитических свойств ЛДГ в прямой реакции (на 38; 45,4 и 81,7% относительно интактного образца для 0,05; 0,1 и 0,2 мл ДНКЖ соответственно; $p < 0,05$ для всех случаев). На наш взгляд, следует отметить, выраженную дозозависимость данной тенденции (уровень корреляции между количеством введенных ДНКЖ и активностью энзима в обратной реакции $r = +0,94$; $p < 0,01$).

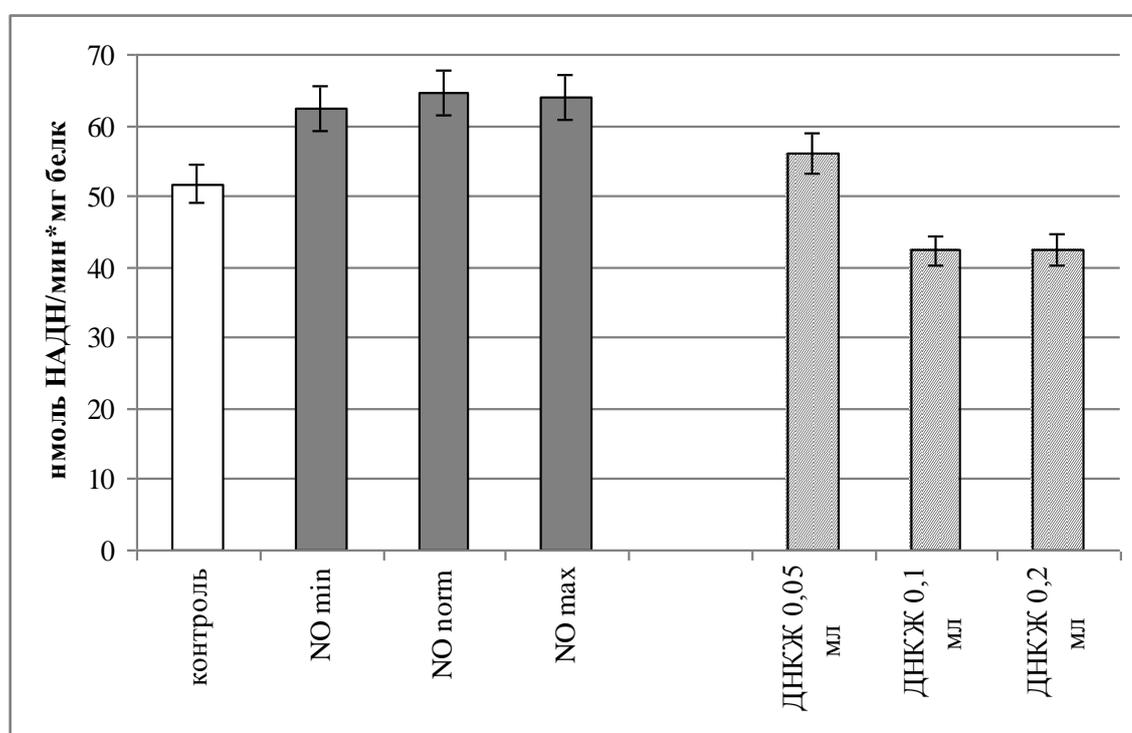


Рисунок 10 - Активность лактатдегидрогеназы эритроцитов в обратной реакции при воздействии источников оксида азота *in vitro*

Исследование активности ЛДГ в обратной реакции позволило продемонстрировать противоположную динамику: обработка биологической жидкости NO-содержащим газовым потоком стимулирует каталитические свойства фермента (рис. 10). При этом, как и в прямой реакции, значимой зависимости указанного параметра от мощности генератора не обнаружено. Так, при всех режимах работы аппарата

регистрировали прирост активности ЛДГ в обратной реакции на 20,7-24,8% относительно контрольного образца ($p < 0,05$). В то же время введение в образцы крови химического аналога естественной депонированной формы NO – ДНКЖ – не вызывало существенных сдвигов активности ЛДГ в обратной реакции только в случае использования минимальной дозы соединения 0,05 мл (0,15 мкмоль). При добавлении в биологическую жидкость больших количеств ДНКЖ наблюдали отчетливый ингибиторный эффект ($p < 0,05$).

Подобная динамика функционирования рассматриваемого фермента дает основание предполагать, что применение свободного оксида азота в концентрации 800 ppm оказывает ингибирующее влияние на данный компонент энергетического метаболизма, затрудняя протекание аэробного гликолиза, тогда как введение в биосреду депонированного NO приводит к развитию противоположного эффекта.

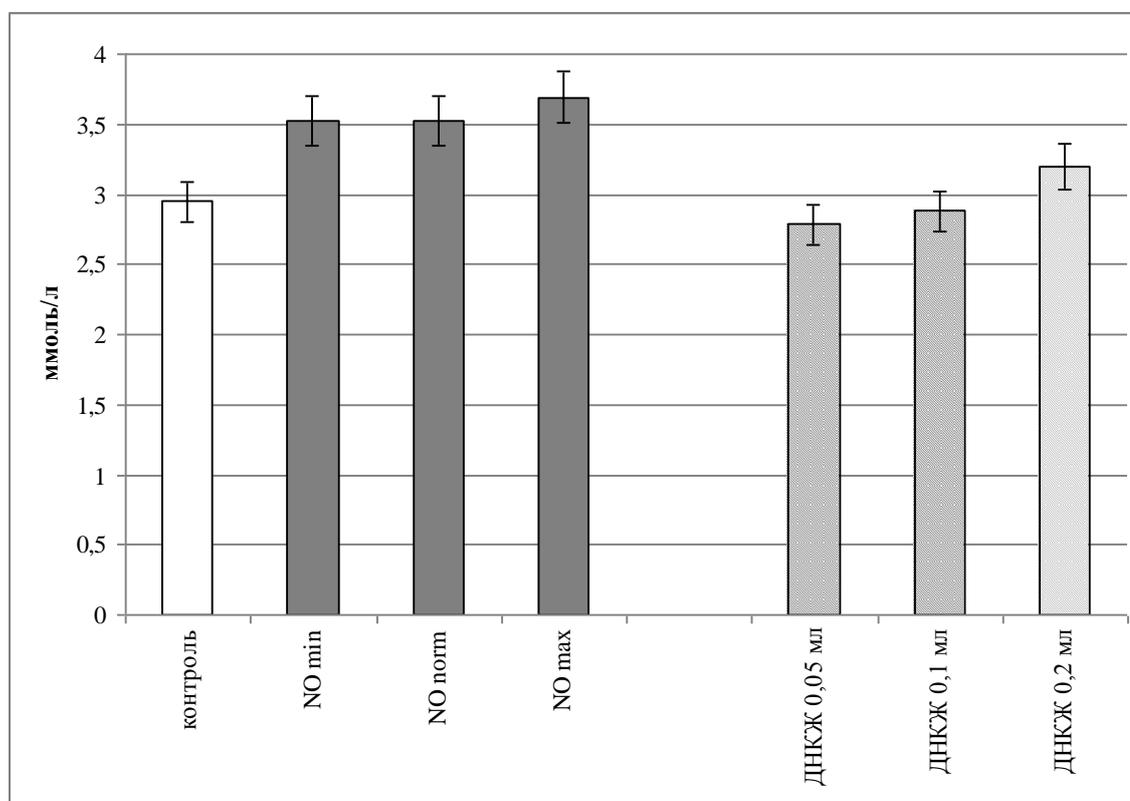


Рисунок 11 - Уровень лактата в эритроцитах при обработке крови связанным и свободным оксидом азота

Эти результаты подтверждаются данными оценки внутриэритроцитарного уровня одного из субстратов изучаемого фермента – лактата (рис. 11). Установлено, что прямой барботаж образцов цельной крови человека газообразным оксидом азота обеспечивает значимое нарастание лактата эритроцитов, причем выраженность сдвига уровня оцениваемого показателя практически не меняется относительно используемого режима NO-генератора. По нашему мнению, выявленное накопление лактата внутри эритроцитов служит в сочетании с данными по модификации каталитических свойств ЛДГ признаком формирующегося под влиянием высоких концентраций оксида азота энергодифицита, что подтверждает сведения литературы об ингибировании процессов энергопродукции в митохондриях при косвенной стимуляции синтеза NO (Tsuura Y., Shida H., Shinomura T. et al., 1998; Tatsumi T., Matoba S., Kawahara A. et al., 2000).

Нашими экспериментами показано, что воздействие депонированной формы оксида азота не оказывает столь значимого влияния на внутриэритроцитарную концентрацию лактата: его уровень существенно повышается лишь при введении в образцы крови максимального количества ДНКЖ (0,2 мл=0,6 мкмоль). В то же время имеет место прямая зависимость между значением указанного параметра и количеством естественного донора NO ($r=+0,93$; $p<0,01$).

Многообразие метаболических путей оксида азота, многие из которых в настоящее время расшифрованы, позволяет говорить о дуализме его молекулярно-клеточных и организменных эффектов. Это в полной мере отражают результаты проведенного исследования, указывающие на ключевую роль концентрации и химической формы соединения в плане развития его эффектов. Так, высокие концентрации свободного NO, кроме непосредственного повреждающего действия, обеспечивающегося преимущественно за счет синтеза пероксинитрита (Ванин А.Ф., 2000; LeCras T.D., McMurthy I.F., 2001; Stanley W.C., Recchia F.A., Lопасчук

G.D., 2005), ингибируют активность многих ферментных систем, в том числе относящихся к энергетическому метаболизму. Напротив, депонированные формы оксида азота (ДНКЖ), 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.

В целом, результаты эксперимента свидетельствуют о выраженном непосредственном действии оксида азота на энергетический метаболизм, направленность и значимость которого детерминированы количеством и формой воздействующего соединения.

4.3 Особенности действия динитрозильных комплексов железа на альдегиддегидрогеназу эритроцитов *in vitro*

В настоящее время к биологическим эффектам монооксида азота (NO) приковано внимание научной общественности, что обусловлено их плеiotропностью, а также значительной клинико-физиологической значимостью (Fung H.L., 2004; Chen Z. et al., 2005; Mayer B., Beretta M., 2008). Интересно, что до сих пор продолжают открываться новые механизмы и мишени действия данного соединения на биологические системы (Mayer B., Beretta M., 2008; Wenzl V.M., Beretta M., Griesberger M. et al., 2011; Lang B.S., Gorren A.C., Oberdorfer G. et al., 2012). К таковым, в частности, относится связь метаболизма оксида азота и ферментных систем детоксикации (DeMaster E.G. et al., 1997; de la Lande I.S., Stepien J.M., Philpott A.C. et al., 2004; Lang B.S. et al., 2012). В этом плане важны данные, полученные в последнее десятилетие преимущественно зарубежными исследователями относительно процессов биоактивации и

биотрансформации нитроглицерина и других органических нитратов (McDonald L.J., Moss J., 1993; Szabó C. et al., 1994). Установлено, что непосредственное участие в высвобождении молекулы монооксида азота из последних принимает альдегиддегидрогеназа (АлДГ), прежде всего – ее 2 (митохондриальная) фракция (Szabó C. et al., 1994; Ванин А.Ф., 2000, 2009; Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., 2013). В то же время остается неизвестным характер влияния самого NO на каталитическую активность указанного фермента, поэтому целью исследования являлось изучение действия оксида азота в свободной и связанной форме на активность АлДГ.

Изучен характер реакции цельной консервированной крови на воздействие свободного и депонированного азота. Выполняли 2 серии экспериментов: в первой устанавливали характер действия на показатели ферментных систем детоксикации крови газообразного оксида азота, во второй – депонированного (в форме динитрозильных комплексов железа [ДНКЖ]). Для проведения эксперимента в первой из указанных серий кровь разделяли на 5 порции (интактную, на которую не оказывали воздействий, и 4 опытных, подвергшихся обработке). В первой серии производили прямой барботаж образцов крови (5 мл) газообразным оксидом азота, генерированным при стандартной мощности аппаратом «Плазон» (концентрация NO – 800 ppm), а также экспериментальным аппаратом (NO-генератор) для синтеза оксида азота, созданным в РФЯЦ (при концентрациях 20, 50 и 100 ppm). Экспозиция после воздействия составляла 3 минуты.

Во второй серии к трем опытным образцам крови добавляли 0,05; 0,1 и 0,2 мл. свежеполученного водного раствора ДНКЖ соответственно (концентрация соединения, определенная спектрофотометрически по известным молекулярным экстинкциям при длинах волны 310 и 360 нм., - 3 ммоль/л). Синтез ДНКЖ производили по методике А.Ф. Ванина с соавт. (2005). Экспозиция после введения соединения также составляла 3 мин.

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

Проведенные эксперименты позволили установить, что различные варианты обработки крови оказывают неодинаковое влияние на активность эритроцитарной АлДГ (рис. 12). В частности, введение в образцы биологической жидкости оксида азота в свободной газообразной форме приводит к умеренному угнетению каталитических свойств фермента (на 10-15% относительно уровня нативной крови; $p < 0,05$ для всех случаев), причем эта тенденция не зависит от дозы воздействующего агента. Интересно, что данный эффект наблюдается вне зависимости и от особенностей генератора оксида азота. Он отмечается как в случае использования аппарата «Плазон», создающего высокие концентрации NO в сочетании с активными формами кислорода (Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Гавриленко И.А., 2000; Martusevich A.K. et al., 2013), так и при применении экспериментального генератора, образующего NO-содержащий воздушный поток без примесей с существенно более низкими (на 1-2 порядка) концентрациями изучаемого соединения.

По нашему мнению, это обусловлено неспецифическим ингибированием каталитических свойств энзима при насыщении биологической жидкости продуктом реакции – монооксидом азота. Наличие дозозависимости ответа, не прослеживаемое при оценке общей активности АлДГ, может быть выявлено при анализе кинетических характеристик фермента.

Эффекты, противоположные описанным выше, были обнаружены для депонированных форм оксида азота – динитрозильных комплексов железа, служащих естественными депо последнего (рис. 12). При воздействии на образцы крови человека растворов ДНКЖ при всех использованных концентрациях соединения наблюдали активацию АлДГ, однако степень выраженности этого влияния неодинакова (от 10 до 53% от

уровня, характерного для интактного образца биологической жидкости) и нелинейно зависит от количества введенного источника оксида азота. Так, при введении 0,15-0,3 мкмоль ДНКЖ регистрировали дозозависимую стимуляцию каталитических свойств энзима, что, по нашему мнению, связано с необходимостью утилизации экзогенного субстрата. Можно предположить, что этому дополнительно способствует потенциальное сходство органических нитратов как основных субстратов фермента и экзогенных нитрозильных комплексов железа, деструкция которых в организме частично может также обеспечиваться функционированием АлДГ.

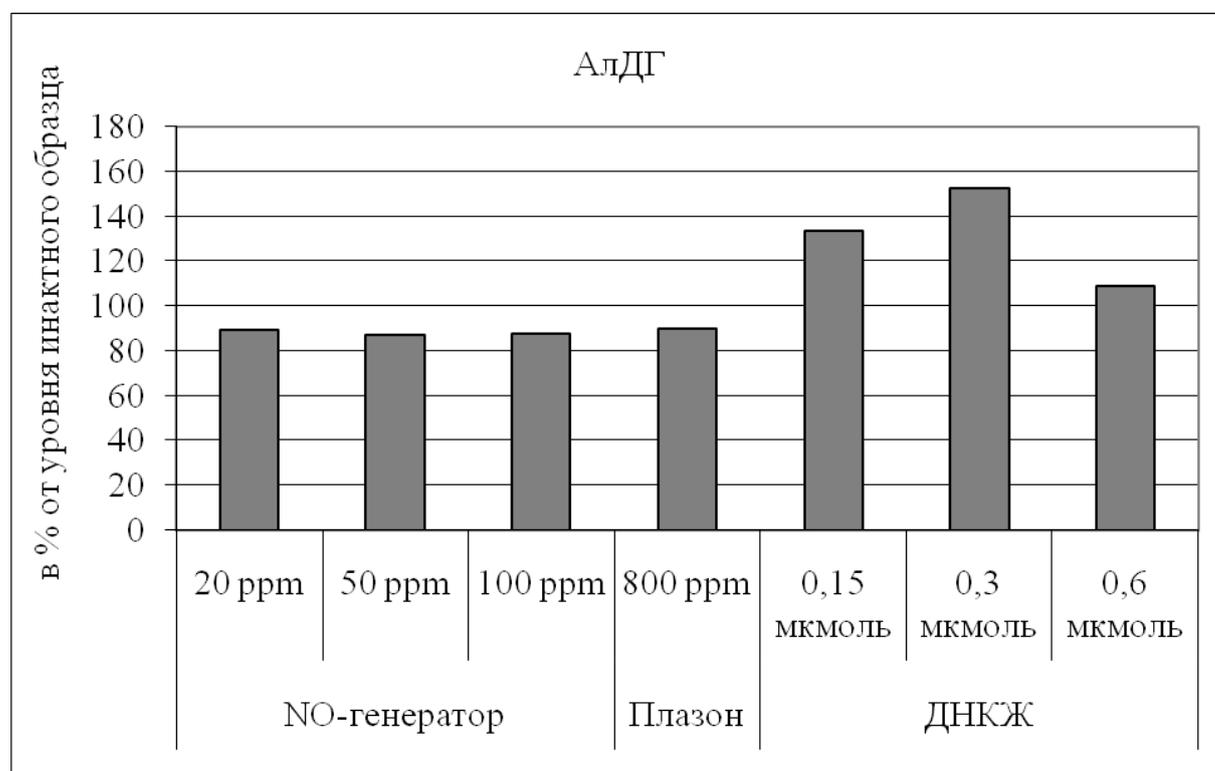


Рисунок 12 - Активность альдегиддегидрогеназы эритроцитов при действии свободного и депонированного оксида азота

Особого обсуждения, на наш взгляд, заслуживает снижение активирующего влияния ДНКЖ на каталитическую активность АлДГ при дальнейшем увеличении количества вводимого источника оксида азота. Эта тенденция может объясняться суммацией двух зависимых процессов:

выраженной «компенсаторной» стимуляцией функционирования энзима при поступлении значительного количества субстрата и, следовательно, быстрым накоплением продукта реакции (NO), ингибирующего активность АлДГ по механизму обратной связи аналогично сдвигам, наблюдающимся при обработке образцов крови газообразным оксидом азота.

На основании этого можно заключить, что в условиях *in vitro* форма поступления оксида азота имеет принципиальное значение для определения характера ответа крови 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. 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.

Таким образом, кровь человека чрезвычайно чувствительна к введению NO, что проявляется в возможностях регуляции оксидом азота ее детоксикационных механизмов.

4.4 Изменения некоторых физико-химических параметров плазмы крови при действии естественного донора оксида азота

Многочисленными исследованиями ряда научных коллективов, руководимых или курируемых проф. А.Ф. Ваниным (2000, 2009) показано, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) служат естественными депо монооксида азота. Также установлено, что экзогенное введение данного соединения обладает различными фармакологическими эффектами (в частности, способствует развитию обратимой вазодилатации [Vanin A.F., Chazov E.I., 2011]). В то же время молекулярно-клеточные

механизмы действия ДНКЖ на биологические системы изучены недостаточно полно. Так, малочисленны сведения относительно характера их влияния на физико-химические показатели крови. Поэтому целью работы служило изучение эффекта динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) на некоторые физико-химические параметры цельной крови человека *in vitro*.

Произведена оценка действия водных растворов ДНКЖ на цельную консервированную кровь здоровых доноров. Для этого в образцы крови (5 мл) вводили различные количества водного раствора ДНКЖ (концентрация вещества – 3 ммоль/л; вводимый объем – 0,05; 0,1 и 0,2 мл). Синтез ДНКЖ производили по методике А.Ф. Ванина с соавт. (2005). Концентрацию ДНКЖ в растворе оценивали спектрофотометрически, учитывая известный коэффициент молярной экстинкции соединения при длинах волны 310 и 360 нм. Экспозиция после воздействия составляла 3 минуты. Контролем выступал образец, на который не оказывали никаких воздействий. В плазме крови обработанных ДНКЖ и контрольных образцов с помощью автоматического анализатора AVL-77 определяли рН, парциальное давление газов, концентрацию основных ионов плазмы и параметры кислотно-щелочного равновесия.

Установлено, что обработка цельной крови человека водными растворами динитрозильных комплексов железа приводит к нарастанию рН данной биологической жидкости, причем указанный эффект носит дозозависимый характер (рис. 13). Так, введение минимальной дозы ДНКЖ (0,15 мкг) способствует незначительному увеличению рассматриваемого параметра (на 0,08 ед.; $p < 0,1$). Насыщение образцов крови более высокими дозами донора NO обуславливает дозозависимый прирост рН, достигая уровня статистической значимости и составляя при применении максимальной дозы (0,6 мкг) соединения +0,143 ед. ($p < 0,05$).

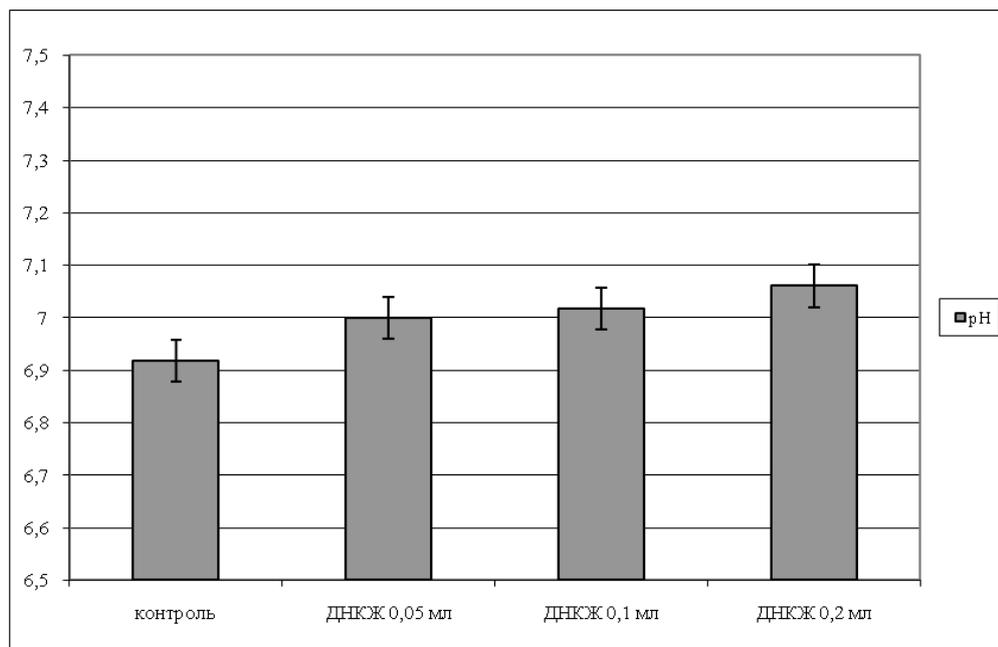


Рисунок 13 - Уровень рН крови при действии различных количеств динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ)

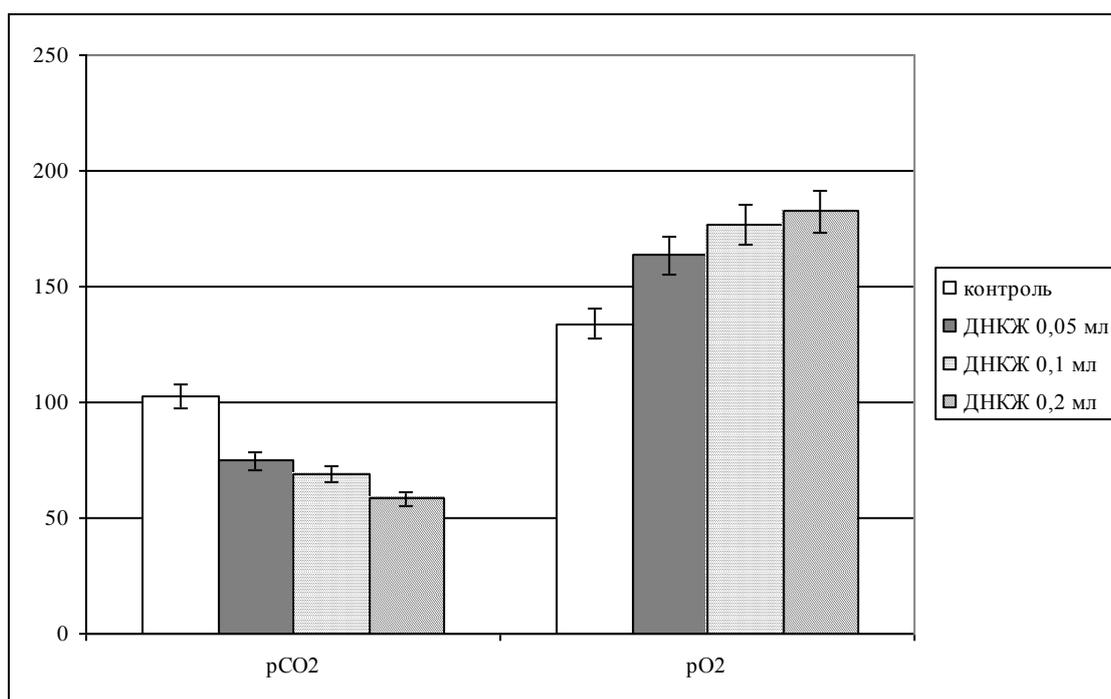


Рисунок 14 - Парциальное давление кислорода и углекислого газа в крови при введении в нее различных доз динитрозильных комплексов железа

На основании проведенных исследований также выявлено, что введение в биологическую жидкость водных растворов ДНКЖ приводит к сдвигам парциального давления кислорода и углекислого газа (рис. 14). Так, установлено дозозависимое снижение парциального давления CO_2 , причем этому способствует введение донора NO во всех изученных дозах. Интерес представляет тот факт, что в отношении рассматриваемого параметра влияние дозы ДНКЖ минимально.

Параллельно указанной тенденции наблюдали нарастание парциального давления кислорода, динамика которого демонстрировала сильную прямую корреляционную связь с количеством вводимых ДНКЖ ($r=+0,88$; $p<0,01$). С учетом того обстоятельства, что в образцы крови вводили не газообразный NO-содержащий поток, а водный раствор донора оксида азота, можно предположить, что обнаруженное позитивное влияние рассматриваемого соединения на газовый состав крови преимущественно обусловлен активацией кислородной емкости крови.

Таким образом, экспериментальные исследования позволили установить наличия выраженного действия ДНКЖ на физико-химические свойства и газовый состав крови. Оно включает умеренное смещение pH 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 отношении изученных физико-химических параметров крови человека.

4.5 Оценка особенностей действия динитрозильных комплексов железа на кристаллогенные свойства сыворотки крови *in vitro*

В настоящее время убедительно показано, что монооксид азота (NO) – один из основных мессенджеров межклеточной сигнализации – способен оказывать многочисленные биологические эффекты (Vanin A.F., 2009). Однако до сих пор существует определенный «разрыв» между данными о

клинической значимости изменений уровня рассматриваемого метаболита в биосредах и результатами модельных экспериментов по оценке его физико-химических свойств. Это связано с малочисленностью исследований, посвященных действию NO на организм здоровых и имеющих различную патологию животных, а также на биосистемы, в том числе культуры клеток, изолированные биологические жидкости и др.

В связи с вышеуказанным, нами начата систематическая работа по сравнительной оценке метаболических эффектов монооксида азота в свободном и депонированном виде. В том числе проведен анализ влияния NO на окислительный и энергетический метаболизм и состояние некоторых детоксикационных ферментов крови. Опубликованы также результаты исследований действия высоких доз свободного NO (газовый поток с концентрацией соединения 800 ppm) на кристаллогенные свойства сыворотки крови (Мартусевич А.К., Перетягин С.П., 2013). В них продемонстрировано, что указанное воздействие вызывает достаточно специфическую модификацию дегидратационной структуризации биологической жидкости с формированием одной или нескольких дополнительных полос в краевой зоне микропрепарата. Данный феномен может быть объяснен образованием в плазме крови значимой фракции нитрозилированных белков, о чем свидетельствует повышение в ней концентрации 3-нитротирозина (Martusevich A.K. et al., 2014), известного маркера нитрозативного стресса (van der Vliet et al., 1997).

С другой стороны, как в отечественной, так и в зарубежной литературе отсутствуют сведения о характере действия низких доз оксида азота, обладающих, согласно результатам предшествующих изысканий нашего коллектива (Мартусевич А.К. с соавт., 2013, 2015), более благоприятным влиянием на метаболизм крови. В связи с этим целью данной работы явился сравнительный анализ влияния различных форм NO на характер дегидратационной структуризации образцов сыворотки крови человека.

Материалом исследования служили образцы крови 30 практически здоровых людей-доноров. Изучен характер реакции цельной консервированной крови на воздействие свободного и депонированного оксида азота. Для проведения эксперимента кровь разделяли на 8 порций (интактную, на которую не оказывали воздействий, и 7 опытных, подвергшихся обработке). Объем каждой порции составлял 5 мл.

Производили прямой барботаж шести опытных образцов крови газообразным оксидом азота, генерированным аппаратом «Плазон» при стандартной мощности (концентрация NO – 800 ppm) и десятикратно разведенным потоком от данного прибора (80 ppm), а также экспериментальным аппаратом (NO-генератор) для синтеза оксида азота, созданным в РФЯЦ [Карелин В.И. с соавт., 2013] (при концентрациях 20, 50, 75 и 100 ppm). Время барботирования - 3 мин., экспозиция после воздействия – 5 мин.

В седьмой опытный образец крови добавляли 0,1 мл. свежеполученного водного раствора ДНКЖ (концентрация соединения, определенная спектрофотометрически по известным экстинкциям при длинах волны 310 и 360 нм., - 3 ммоль/л). Синтез ДНКЖ производили по методике А.Ф. Ванина (2009). Экспозиция после введения соединения также составляла 5 мин.

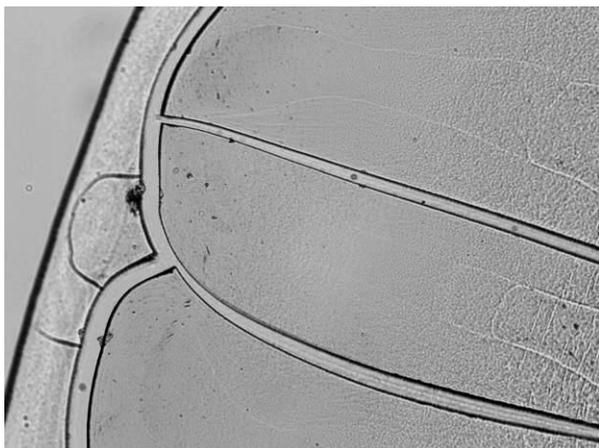
По завершении экспозиции производили центрифугирование всех образцов при 1500 об/мин в течение 15 мин. Полученную сыворотку крови в объеме 100 мкл. наносили на предметное стекло и приготавливали микропрепараты высушенной биологической жидкости в соответствии с методом кристаллоскопии, позволяющим оценивать собственную кристаллогенную активность биосреды (Мартусевич А.К., 2012). Высушенные микропрепараты оценивали морфологически (путем описания особенностей структуризации высушенного образца биологической жидкости) и визуаметрически (с применением собственной системы параметров) [Мартусевич А.К., Гришина А.А., 2009]. Основными

визуаметрическими показателями, оцениваемыми в балльной шкале, служили кристаллизуемость (отражает количественную сторону кристаллизации – плотность кристаллических элементов в фации), индекс структурности (характеризует сложность структуропостроения), степень деструкции фации (представляет собой индикатор качественной стороны процесса – правильности образования структур) и выраженность краевой зоны микропрепарата.

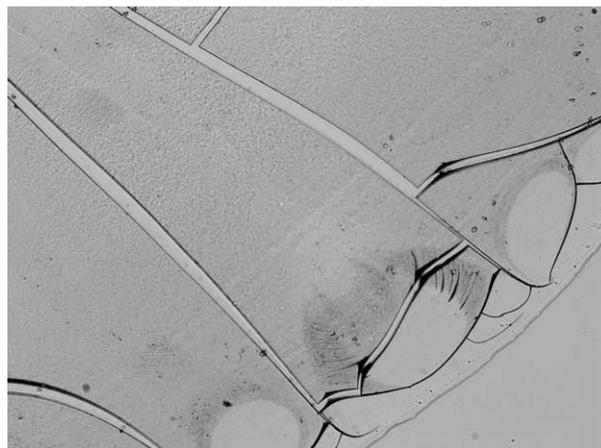
Морфологически для контрольного (без каких-либо воздействий) микропрепарата высушенной биологической жидкости был характерен типичный физиологический рисунок фации с умеренными признаками кристаллизации в центральной зоне и многочисленными регулярными аркообразными разломами в краевой зоне (рис. 15А). В то же время некоторые признаки белкового дисбаланса имели место и в этом случае. В частности, обнаруживалась относительно малая ширина краевой зоны, формируемой протеиновым компонентом биологической жидкости, причем в этой части препарата присутствовали неоднородности текстуры.

Наиболее низкая из использованных концентраций газообразного оксида азота (20 ppm) способствовала умеренной оптимизации кристаллоскопической картины биосубстрата (рис. 15Б). Это проявлялось в формировании регулярных центростремительных разломов, имеющих сопоставимую глубину и длину. Кроме того, следует обратить особое внимание на существенное расширение радиуса краевой зоны в целом. С учетом того, что именно в данной части образца могут происходить наиболее значимые преобразования (Шабалин В.Н., Шатохина С.Н., 2001; Рапис Е.Г., 2003), связанные с возможностью нитрозилирования белков под воздействием свободного оксида азота (van der Vliet et al., 1997), подобные сдвиги нужно однозначно трактовать как позитивные.

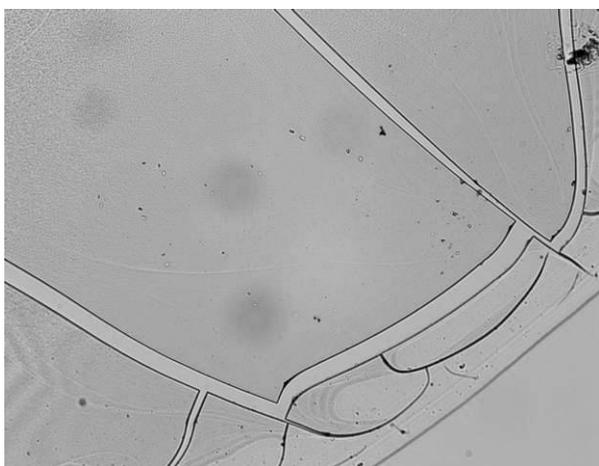
Нарастание действующей концентрации оксида азота до 50 ppm обуславливает дальнейшую трансформацию результата дегидратационной структуризации сыворотки крови (рис. 15В).



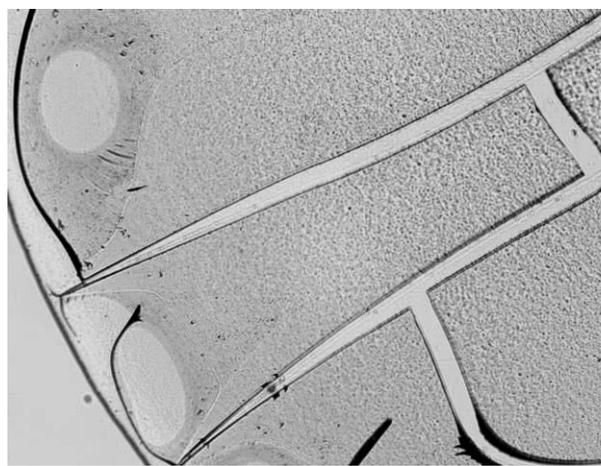
А. Контрольный образец



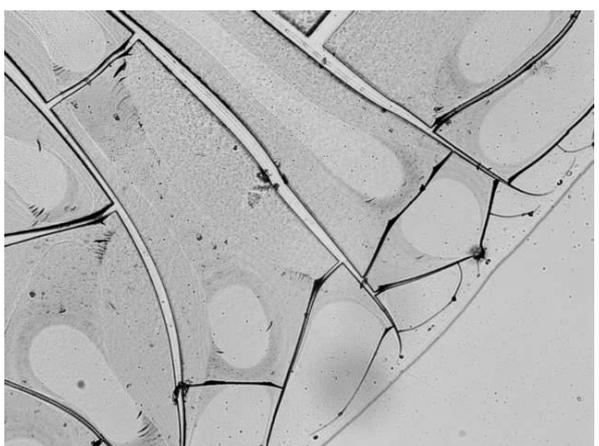
Б. Обработка крови газообразным NO в концентрации 20 ppm



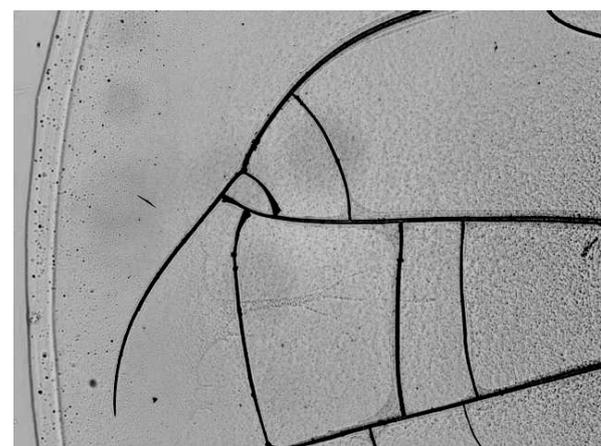
В. Обработка крови газообразным NO в концентрации 50 ppm



Г. Обработка крови газообразным NO в концентрации 75 ppm



Д. Обработка крови газообразным NO в концентрации 100 ppm



Е. Обработка крови газообразным NO в концентрации 800 ppm

Рисунок 15 - Картины кристаллизации образцов сыворотки крови при ее обработке различными дозами газообразного оксида азота

В этих образцах наблюдали умеренное обеднение кристаллического компонента фации с одновременным сужением краевой зоны микропрепарата, сопоставимым с выявленным в контрольном образце высушенной биологической жидкости.

Более высокие концентрации NO (75 и 100 ppm) хотя и способствовали оптимизации сети разломов картины (в случае воздействия 100 ppm оксида азота – с формированием дугообразных разломов), стимулировали непосредственное кристаллообразование в центральной и промежуточной зонах фации, а также обеспечивали относительную неоднородность текстуры образца. Следует подчеркнуть умеренную тенденцию к хаотизации «дополнительных» разломов краевой зоны микропрепарата, соединяющих основные между собой. В то же время формирования выраженной полосы, характерной для действия высоких концентраций изучаемого соединения (800 ppm) [Мартусевич А.К., Перетягин С.П., 2013], не происходит при действии ни одной из использованных в данном исследовании концентраций оксида азота. Это служит косвенным отражением отсутствия нитрозилирующего эффекта в отношении белковых компонентов плазмы крови и, следовательно, возникновения нитрозилирующего стресса (Шумаев К.Б. с соавт., 2006).

Морфологическое описание особенностей структуризации сыворотки крови позволило установить, что обработка крови высокими дозами NO (800 ppm) приводит к образованию в краевой зоне микропрепарата рельефной полосы, отчетливо выступающей над поверхностью образца (рис. 15Е). Данная полоса обнаруживается как при собственной кристаллизации биожидкости, так и при сокристаллизации с изотоническим базисным веществом – 0,9% раствором хлорида натрия. Происхождение данной полосы рассматривается нами на основании общих представлений о физико-химической природе процессов, происходящих в высыхающей капле (Шабалин В.Н. с соавт., 2002; Рапис Е.Г., 2003; Яхно

Т.А. с соавт., 2003; Мартусевич А.К., 2012). Согласно сформировавшемуся в литературе мнению краевая зона является местом сосредоточения белковых макромолекул, входящих в состав дегидратируемой биосреды (Шабалин В.Н. с соавт., 2002; Рапис Е.Г., 2003). В условиях обработки цельной крови NO в газовой фазе, учитывая его концентрацию (800 мкг/л), может происходить нитрозилирование белков (Мартусевич А.К., Перетягин С.П., 2013).

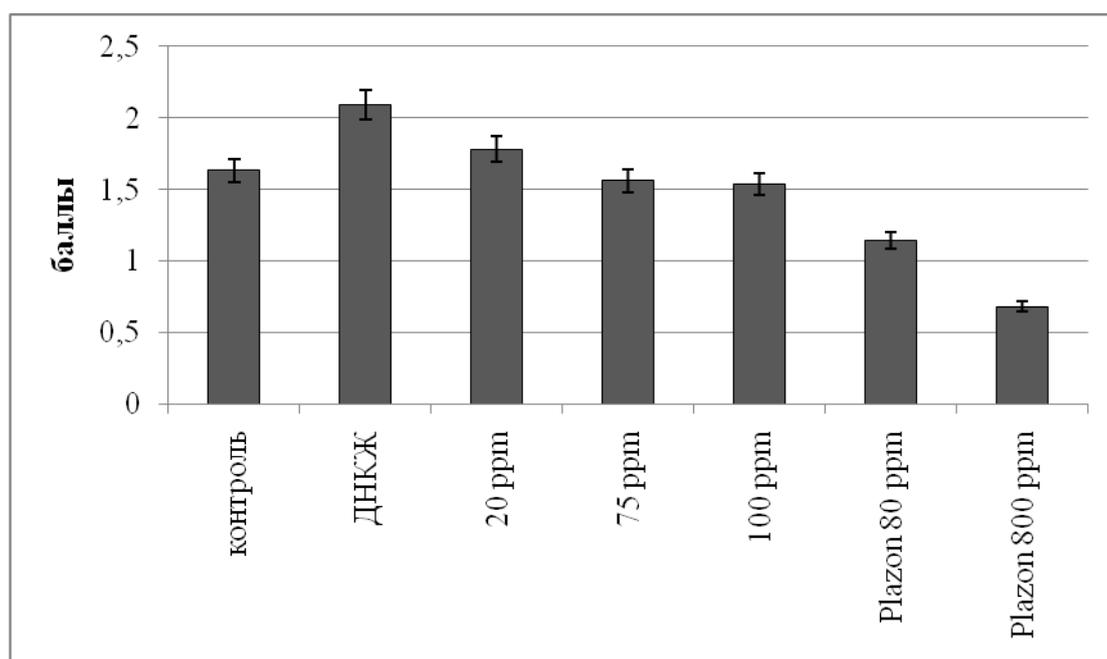


Рисунок 16 - Уровень кристаллизуемости образцов сыворотки крови при обработке различными формами оксида азота (ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами)

Наиболее выраженной прокристаллогенной активностью обладает водный раствор ДНКЖ, при введении которого в биологическую жидкость наблюдали как стимуляцию образования одиночно-кристаллических и дендритных структур в целом, так и их усложнение. Следует отметить, что в этом случае большинство элементов имеют правильную конфигурацию.

В целом, на основании морфологической оценки кристаллограмм установлено, что ДНКЖ способствуют максимальному повышению кристаллогенной активности сыворотки крови, а газообразный оксид азота

обладает стимулирующим действием на нее, обратно пропорциональным примененной концентрации соединения. Особо среди последней группы воздействий следует выделить газовый поток от аппарата «Плазон», трансформирующий кристаллоскопическую картину биологической жидкости не только количественно, но и качественно (с выраженным нарастанием деструктивных изменений элементов образца).

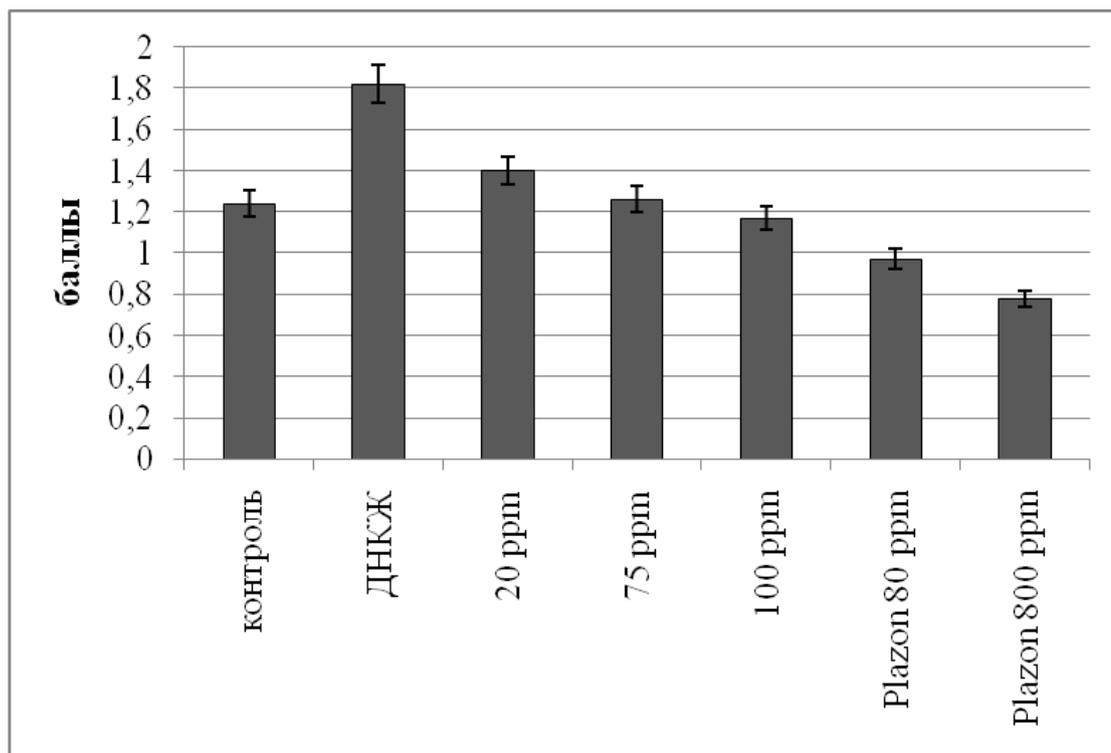


Рисунок 17 - Индекс структурности кристаллоскопических фаций сыворотки крови при обработке различными формами оксида азота (ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами)

Выявленные с помощью визуального анализа микропрепаратов сыворотки крови тенденции, характеризующие дозозависимость его действия, были подтверждены результатами анализа кристаллогенных свойств сыворотки крови с использованием полуколичественных параметров (рис. 16 и 17). Так, при обработке образцов биологической жидкости газовым потоком от аппарата «Плазон» имеет место отчетливое

ингибирование собственной кристаллизации биосреды, что проявляется в значимом снижении как кристаллизуемости, так индекса структурности кристаллограмм ($p < 0,05$ для обоих случаев). Это косвенно подтверждает ранее показанные нами негативные эффекты данного газового потока (Мартусевич А.К., Перетягин С.П., Ванин А.Ф., 2012; Мартусевич А.К. с соавт., 2013). Десятикратное разведение последнего воздухом снижает выраженность указанного эффекта, однако оба показателя не достигают уровня контрольного образца ($p < 0,05$). Напротив, при воздействии газового потока от другого генератора, содержащего аналогичное количество оксида азота (75 против 80 ppm) без примеси активных форм кислорода, прежде всего – озона, результат кристаллизации практически не отличается от фаций интактной биологической жидкости. Это позволяет предположить, что ингибирование структуризации, наблюдаемое при обработке крови потоком от «Плазона», определяется не только концентрацией NO, но и образованием пероксинитрита, оказывающего негативное влияние на конформацию и структуру макромолекул плазмы крови.

С учетом приведенных выше данных интересным представляется стимулирующее действие низких концентраций оксида азота (20 ppm) без примесей активных форм кислорода на кристаллизацию сыворотки крови, что четко просматривается как морфологически, так на основании оценки визуаметрических параметров, в частности – кристаллизуемости и индекса структурности (рис. 16 и 17). В большей степени усиливает кристаллогенную активность биосреды введение водного раствора ДНКЖ. По-видимому, подобный эффект обусловлен присутствием в составе комплекса атомов железа, высвобождаемых при частичном его разрушении, имеющем место при попадании в образцы крови (Шумаев К.Б. с соавт., 2004; Vanin A.F., 2009). Этот тезис косвенно подтверждается тем, что сульфат железа (II) применяется многими исследователями в качестве базисного соединения для выполнения тизиграфического теста

именно вследствие его способности к комплексообразованию (Каликштейн Д.Б. с соавт., 1990; Тарусинов Г.А. с соавт., 1994; Daems W.F., 1964). Кроме того, полученный эффект может быть связан с частичным высвобождением из комплекса небольших количеств NO и NO⁺ (Vanin A.F. et al., 2015), имитирующих действие низких концентраций свободного экзогенного оксида азота на кристаллогенную активность биологической системы. Следует подчеркнуть, что ион нитрозония (NO⁺) дополнительно обладает способностью к нитрозилированию белковых макромолекул плазмы крови (Vanin A.F. et al., 2015), что также оказывает модулирующее влияние на кристаллогенез последней

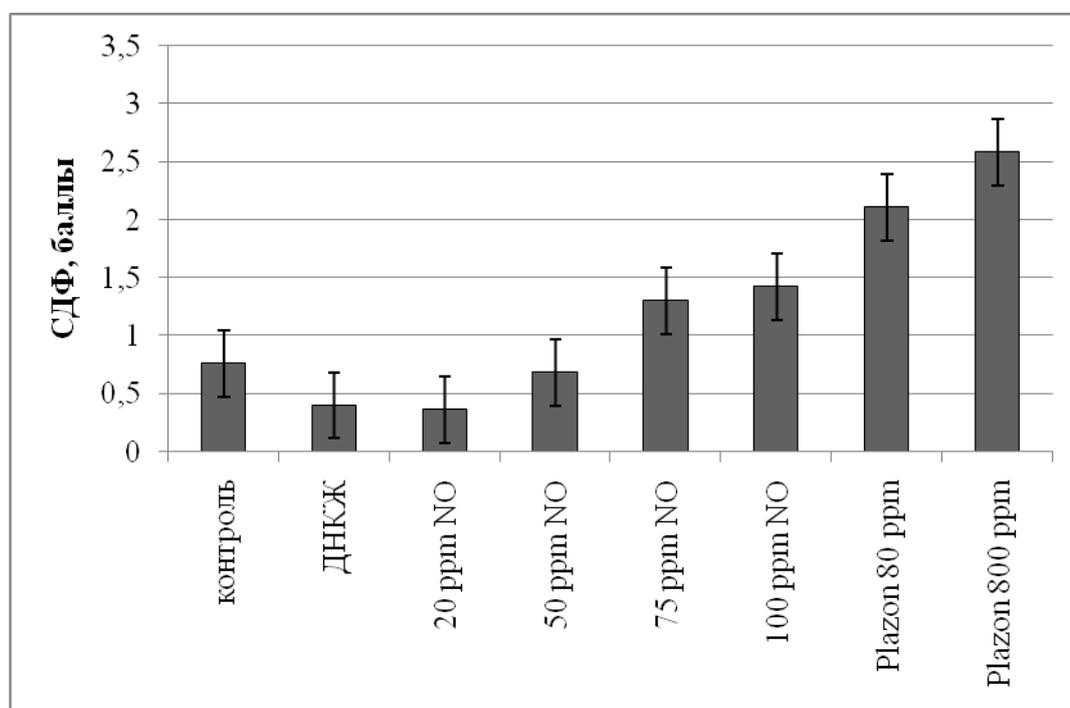


Рисунок 18 - Степень деструкции элементов высушенных образцов сыворотки крови при ее обработке различными дозами газообразного оксида азота

Установлено, что минимальная среди использованных концентраций оксида азота (20 ppm) снижает выраженность деструктивных изменений кристаллов с $0,76 \pm 0,15$ балла до $0,36 \pm 0,14$ балла ($p < 0,01$; рис. 18). Повышение концентрации приводит к дозозависимому нарастанию

параметра, практически выходящему на плато при воздействии на образцы цельной крови 75 ppm NO. Следует подчеркнуть, что даже наиболее высокая концентрация оксида азота (100 ppm) не вызывает значительного увеличения значения степени деструкции фации, остающейся в пределах 1,5 баллов.

Анализ сформированности краевой зоны микропрепарата высушенной биологической жидкости при действии различных концентраций оксида азота также продемонстрировал двухфазную зависимость (рис. 19). Так, выявленные на основании морфологической оценки кристаллограмм сыворотки крови особенности краевой зоны фации выразились при визуаметрии в повышении значения параметра (с $1,10 \pm 0,12$ до $1,65 \pm 0,14$ балла при концентрации NO 20 ppm; $p < 0,05$).

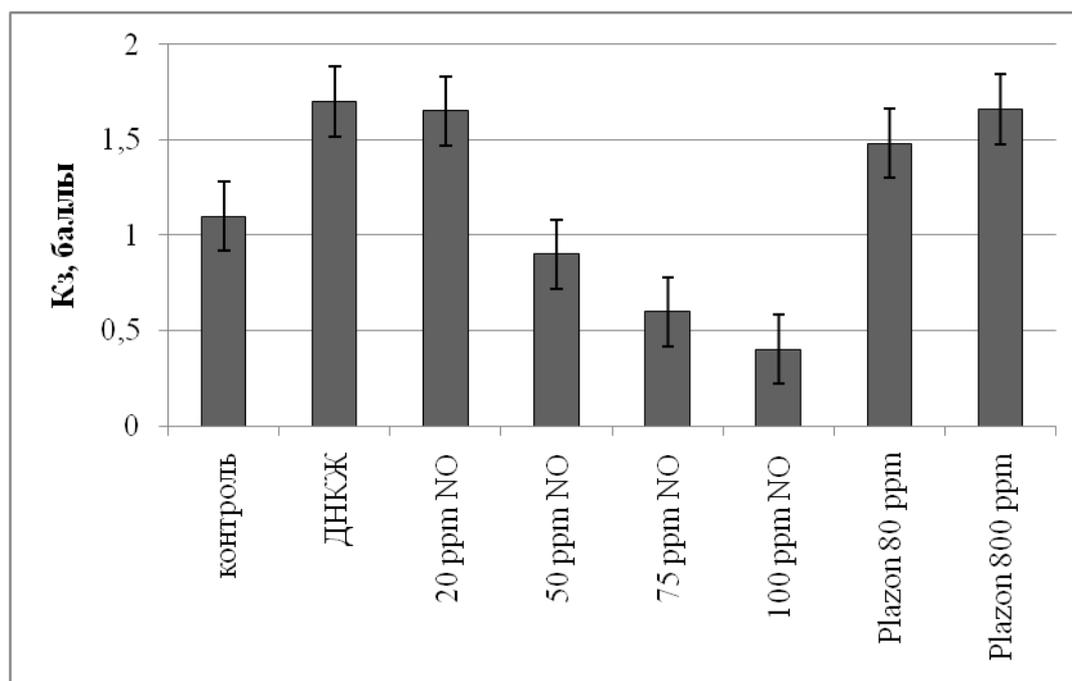


Рисунок 19 - Выраженность краевой зоны образцов сыворотки крови при ее обработке различными дозами газообразного оксида азота

Дальнейшее увеличение воздействующей дозы оксида азота приводило к резкому сужению краевой зоны с соответствующим падением уровня показателя, достигающим максимума ($0,41 \pm 0,12$ балла) при

барботаже образцов крови наивысшей из использованных концентраций соединения (100 ppm). Важно отметить, что наиболее значимые изменения, обнаруживаемые при действии газового потока от аппарата «Плазон», также проявляются в краевой зоне фации в форме особой дополнительной полосы. В целом, результаты исследования подтверждают исходные предположения о превалирующем влиянии газообразного оксида азота на белковую фракцию плазмы крови здоровых доноров при обработке *in vitro*.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов позволили установить, что результат влияния монооксида азота на кристаллогенные свойства сыворотки крови 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 глутатионовыми лигандами.

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.

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

4.6. Оценка взаимосвязи ответа метаболических и физико-химических показателей крови в формировании ответа на введение динитрозильных комплексов железа

В предшествующих разделах главы показано, что при введении динитрозильных комплексов происходит существенное изменение уровня

параметров окислительного и энергетического метаболизма, а также каталитической активности альдегиддегидрогеназы эритроцитов и кристаллогенных свойств плазмы крови. С другой стороны, указанная динамика отдельных метаболических, физико-химических и кристаллоскопических параметров представляется компонентами единого метаболического ответа биологической жидкости на стимуляцию донором оксида азота. Для изучения системности наблюдаемых сдвигов нами был проведен корреляционный анализ между данными показателями и результатами критериальной оценки фаций биосубстрата (рис. 20-22).

Выявлено, что между параметрами, характеризующими состояние про- и антиоксидантных систем, и визуаметрическими параметрами кристаллограмм существуют многочисленные корреляционные зависимости. Так, интенсивность липопероксидации сопряжена со всеми основными кристаллоскопическими критериями, в особенности – с выраженностью краевой белковой зоны и степенью деструкции фации ($r=0,58$ и $0,46$ соответственно; $p<0,05$).

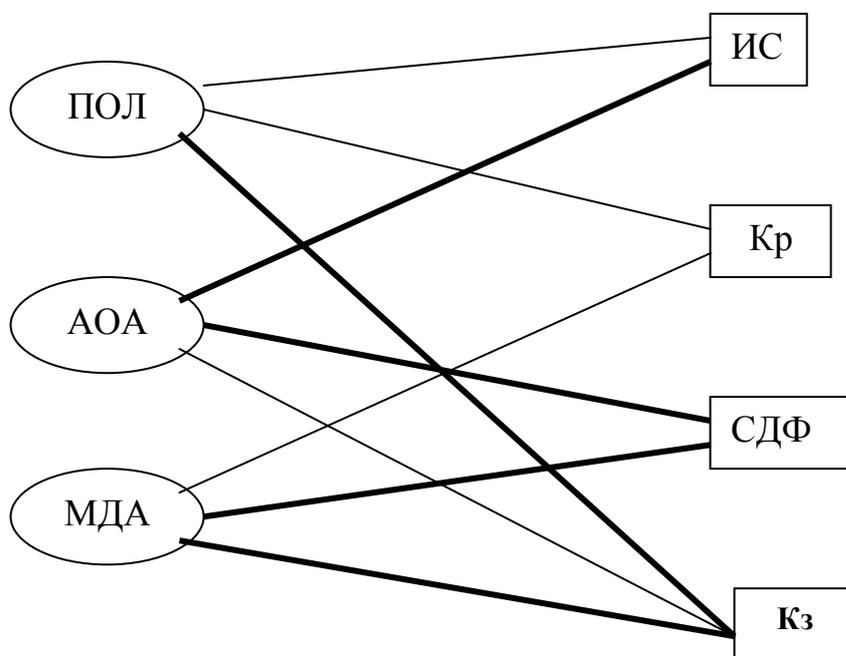


Рисунок 20 - Взаимосвязь показателей окислительного метаболизма крови и его кристаллогенных свойств (тонкие линии – слабые корреляции, толстые линии – корреляции средней и высокой силы)

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 (рис. 20). В частности, общая антиоксидантная активность коррелировала с индексом структурности и степенью деструкции фации (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 (рис. 21), который обнаруживал слабое, но статистически значимое сопряжение со всеми основными критериями кристаллоскопического теста ($p<0,05$).

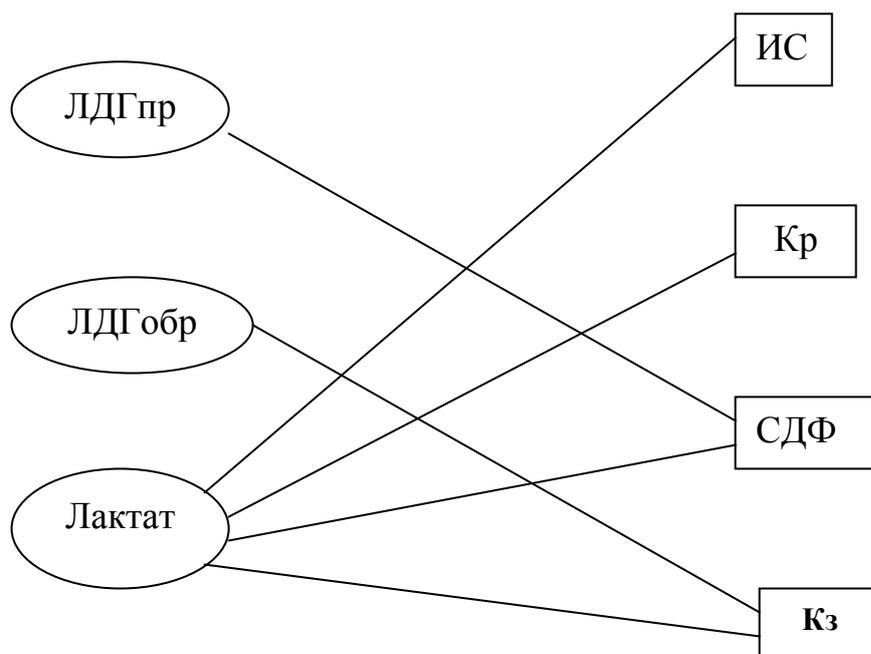


Рисунок 21 - Взаимосвязь показателей энергетического метаболизма крови и его кристаллогенных свойств (тонкие линии – слабые корреляции, толстые линии – корреляции средней и высокой силы)

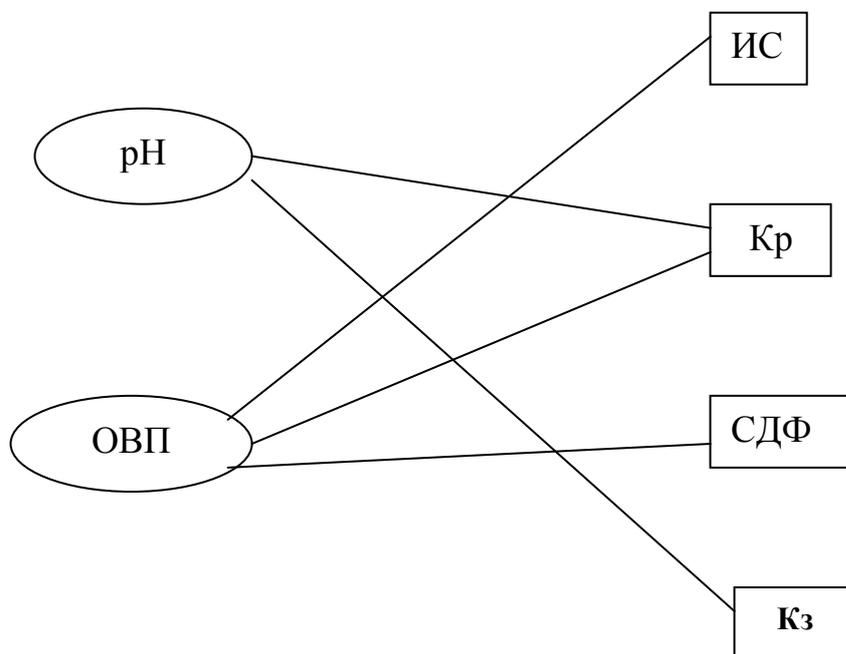


Рисунок 22 - Взаимосвязь некоторых физико-химических показателей крови и его кристаллогенных свойств (тонкие линии – слабые корреляции, толстые линии – корреляции средней и высокой силы)

Во второй группе показателей максимально связанным с параметрами дегидратационной структуризации оказался окислительно-восстановительный потенциал плазмы (рис. 22). 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.

4.7 Оценка дозозависимости действия динитрозильных комплексов железа на баланс про- и антиоксидантных систем крови животных

Наши экспериментальные данные, полученные в исследованиях *in vitro*, а также сведения, опубликованные другими авторами (Шумаев К.Б. с соавт., 2004, 2006; Тимошин А.А. с соавт., 2009; Ванин А.Ф. с соавт., 2016), дают основание полагать наличие у динитрозильных комплексов железа выраженных антиоксидантных свойств. Эта гипотеза была подтверждена нами при моделировании окислительного стресса *in vitro* (путем введения в образцы биологической жидкости озонированного физиологического раствора в высокой концентрации) и *in vivo* (при моделировании термической травмы у крыс). Указанные результаты не вошли в данную работу, имеющую физиологическую направленность, однако однозначно свидетельствуют об антиоксидантной активности рассматриваемого соединения.

Первым компонентом анализа метаболического статуса крови крыс и характера влияния на него внутрибрюшинного введения ДНКЖ с глутатионовыми лигандами явилась оценка баланса про- и антиоксидантных систем плазмы. Согласно полученным результатам, инфузии здоровым животным физиологического раствора, не содержащем изучаемого вещества, не оказывают значимого действия как на интенсивность перекисного окисления липидов в плазме крови, так и на ее общую антиоксидантную активность (рис. 23). Напротив, все используемые дозы физиологического донора оксида азота модифицировали уровень указанных параметров. В частности, интенсивность липопероксидации демонстрировала выраженную, но нелинейную зависимость от концентрации вводимых ДНКЖ. Так, при введении животным минимальной дозы соединения (1 мл 0,15 мМ раствора) не наблюдали значимых отклонений показателя.

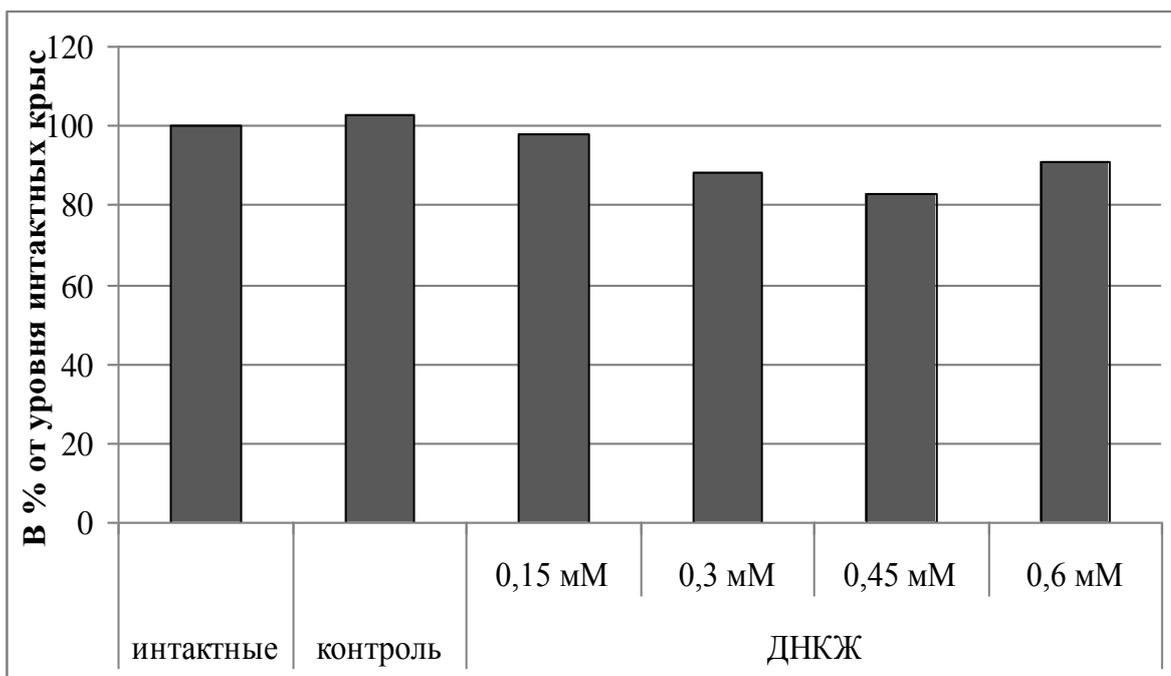


Рисунок 23 - Интенсивность процессов липопероксидации в плазме крови крыс в зависимости от количества введенного раствора динитрозильных комплексов железа

В случае увеличения концентрации вещества в растворе (0,3 мМ и выше) отмечали снижение интенсивности процессов липопероксидации, достигающее минимума при проведении курса инфузий 0,45 мМ раствора ДНКЖ ($p < 0,05$ для всех концентраций соединения). Дальнейшее увеличение дозы вводимого донора NO оказывает менее выраженное действие на уровень параметра, что может быть обусловлено формированием избытка вещества за счет частичного разрушений комплексов с высвобождением оксида азота и трансформацией последнего в пероксинитрит, один из наиболее сильных окислителей-биорадикалов.

Сонаправлена изменениям перекисного окисления липидов и динамика общей антиоксидантной активности плазмы крови (рис. 24). В частности, не наблюдали существенных сдвигов показателя у крыс, получавших инфузии только физиологического раствора, тогда как при добавлении в него ДНКЖ в любой из изученных концентраций отмечали нарастание значения указанного параметра. В наименьшей степени данная

тенденция была выражена для минимальной дозы соединения (0,15 мМ), однако сохранялся нелинейный характер дозозависимости. Так, в диапазоне 0,15-0,45 мМ ДНКЖ регистрировали прогрессивное увеличение общей антиоксидантной активности плазмы: для концентраций 0,15; 0,30 и 0,45 мМ оно составило 1,08; 1,24 и 1,31 раза соответственно ($p < 0,1$ – для наименьшей концентрации и $p < 0,05$ – для остальных).

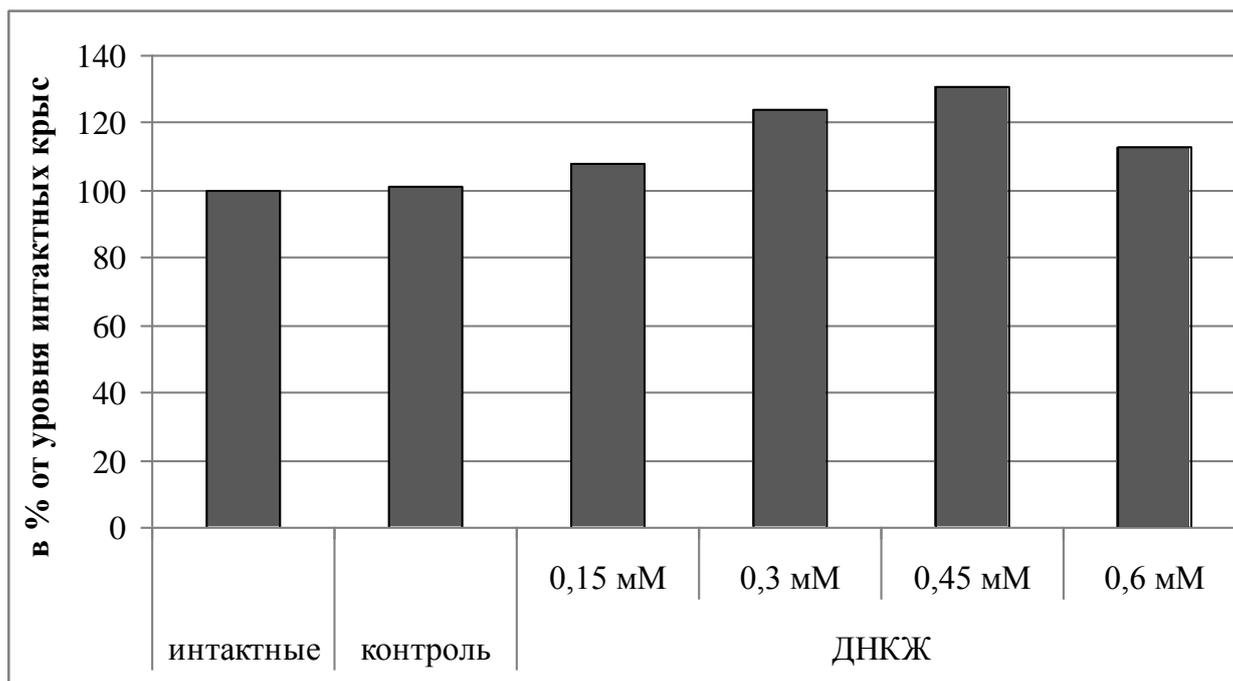


Рисунок 24 - Общая антиоксидантная активность плазмы крови крыс в зависимости от количества введенного раствора динитрозильных комплексов железа

Дальнейшее нарастание количества вводимого соединения (до 0,6 мМ) обеспечивало обратный эффект: общая антиоксидантная активность в этом случае возрастала лишь на 13% относительно здоровых животных ($p < 0,05$). По нашему мнению, механизм этих сдвигов аналогичен представленному для модификации процессов липопероксидации рассматриваемым донором оксида азота.

Результаты биохемилюминесцентного анализа, характеризующие компоненты окислительного метаболизма, были дополнительно

верифицированы путем оценки концентрации стабильного продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) в плазме крови животных сформированных групп (рис. 25).

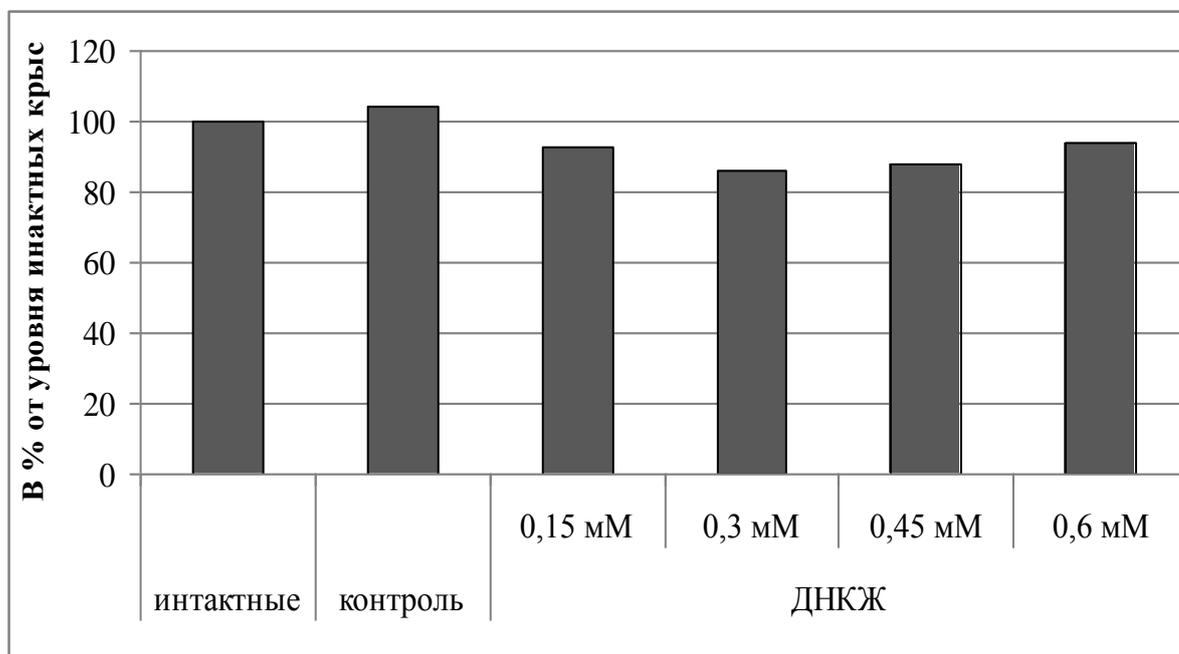


Рисунок 25 - Уровень малонового диальдегида в плазме крови животных при введении им растворов с различной концентрацией динитрозильных комплексов железа

В частности, по данному параметру не выявлено существенной динамики у крыс, получавших инъекции только физиологического раствора. Также незначительные сдвиги показателя были зафиксированы в группе животных, которым вводили минимальную концентрацию ДНКЖ (-4%; $p > 0,1$). В то же время двукратное увеличение действующей концентрации соединения (до 0,3 мМ) существенно усиливает степень снижения уровня малонового диальдегида в плазме крови (-14%; $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми особями). Аналогичная динамика отмечена и при использовании концентрации 0,45 мМ (-12%; $p < 0,05$). При этом дальнейшее увеличение дозы ДНКЖ (до четырехкратной минимальной)

способствовало менее выраженному падению уровня изучаемого конечного метаболита перекисного окисления липидов (-7%; $p < 0,05$).

В целом, проведенные исследования позволяют заключить о наличии антиоксидантного эффекта у глутатион-содержащих ДНКЖ, 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).

4.8 Влияние физиологического донора NO на некоторые параметры энергетического метаболизма и ферментных детоксикационных систем крови крыс

Вторым компонентом мультифакторного действия динитрозильных комплексов железа, впервые продемонстрированным в исследованиях нашего коллектива и частично изложенным для экспериментов *in vitro* в главе 3 настоящей работы, является стимуляция данным соединением энергетического обмена эритроцитов. Следовательно, логично проведение оценки реализации данного эффекта в опытах *in vivo*.

Для мониторинга энерготропного действия ДНКЖ нами применено исследование промежуточного этапа энергетического метаболизма, основанное на изучении активности лактатдегидрогеназы эритроцитов в прямой и обратной реакции, а также текущего уровня лактата в данных клетках крови. Установлено, что инъектирование животных физиологическим раствором, не содержащим изучаемого соединения, не вызывает значимых сдвигов активности фермента ни в прямой, ни в обратной реакциях, так и не способствует изменению эритроцитарной концентрации лактата (рис. 26-28). Напротив, курс внутрибрюшинного введения ДНКЖ обеспечивает отчетливую динамику указанных показателей, причем она, аналогично влиянию вещества на окислительный метаболизм крови, является нелинейной.

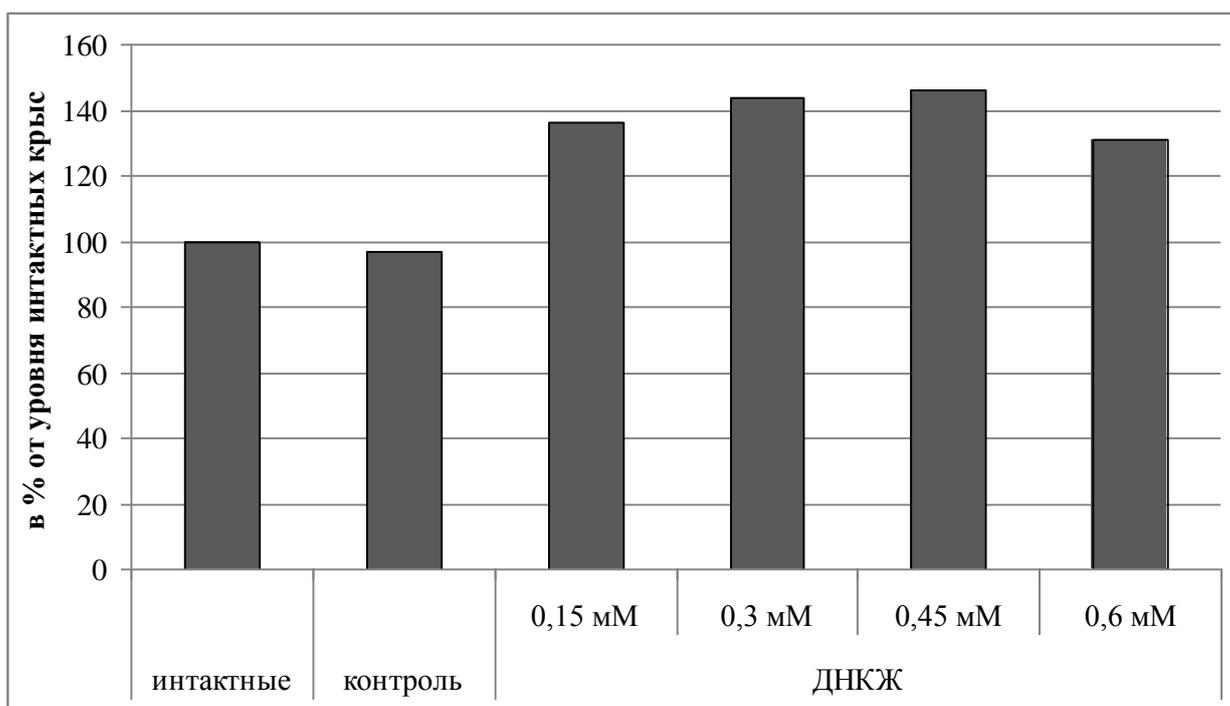


Рисунок 26 - Активность лактатдегидрогеназы эритроцитов в прямой реакции при введении крысам различных доз динитрозильных комплексов железа

В соответствии с полученными экспериментальными данными (рис. 26), активность лактатдегидрогеназы в прямой реакции при использовании наименьшей из изучаемых концентраций ДНКЖ (0,15 мМ) возрастает на 36% относительно интактных животных ($p < 0,05$), а при введении физиологического раствора, содержащего 0,3 и 0,45 мМ соединения, повышается более выражено и примерно в равной степени (на 44 и 46% по сравнению с крысами, которым не проводили никаких манипуляций; $p < 0,05$ для обеих групп). В то же время дальнейшее нарастание действующей концентрации ДНКЖ способствует менее существенной, но значимой стимуляции каталитических свойств энзима (+31%; $p < 0,05$). Эту динамику, по нашему мнению, следует рассматривать как позитивную, т.к. активация прямой реакции фермента способствует увеличению продукции пирувата – первичного субстрата цикла Кребса.

Также выявлено, что в отношении обратной реакции лактатдегидрогеназы эритроцитов изучаемое вещество оказывает ингибирующее действие (рис. 27). При этом все изучаемые дозы ДНКЖ оказывают сопоставимое действие на активность фермента, снижая ее на 15-22% относительно уровня интактных и инъецированным физиологическим раствором животных ($p < 0,05$ для всех случаев). Следует отметить, что и для обратной реакции энзима наиболее выраженное снижение имело место при концентрации соединения 0,45 мМ, а кривая дозозависимости сохраняла двухфазный характер.

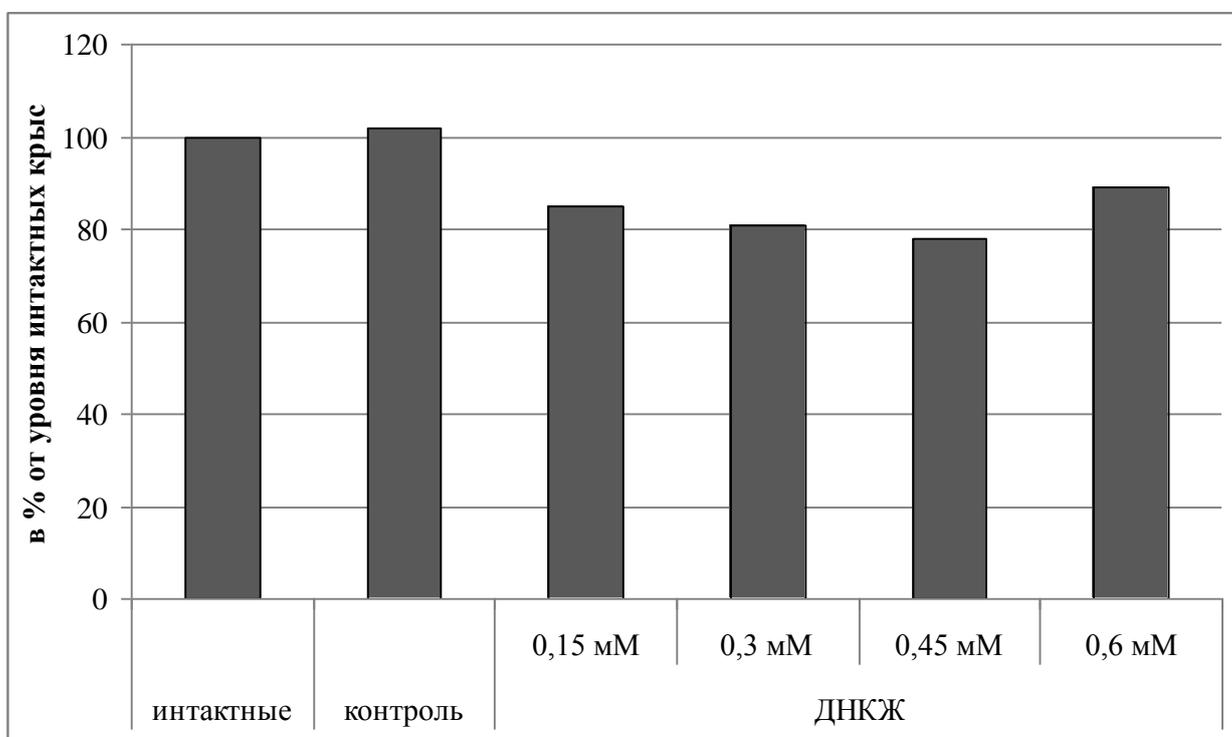


Рисунок 27 - Активность лактатдегидрогеназы эритроцитов в обратной реакции при введении крысам различных доз динитрозильных комплексов железа

Пропорциональным изменениям активности лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакциях была динамика эритроцитарного уровня лактата (рис. 28).

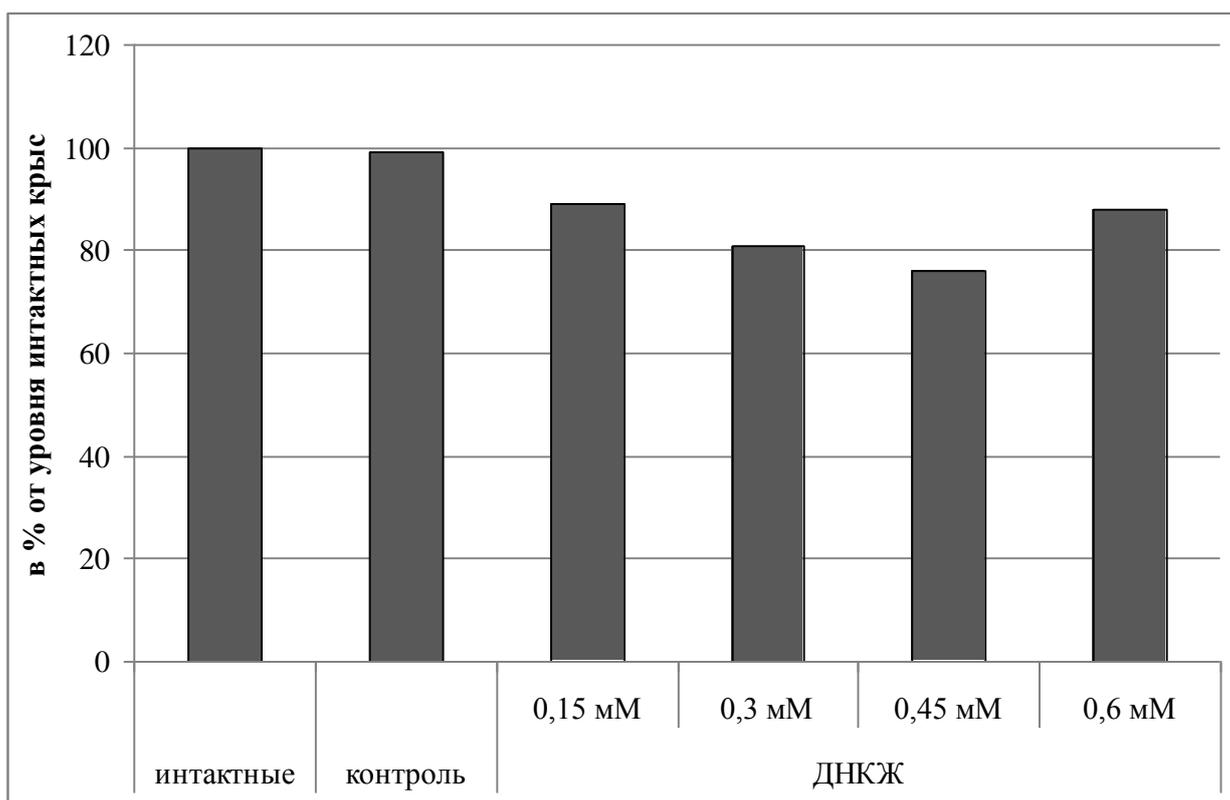


Рисунок 28 - Уровень лактата в эритроцитах при введении крысам различных доз динитрозильных комплексов железа

Установлено, что данный параметр, не изменяющийся у контрольно инъецированных животных, демонстрирует выраженную тенденцию к снижению у крыс, получавших физиологический раствор, содержащий ДНКЖ (рис. 28). Важно подчеркнуть, что наименее существенные сдвиги уровня лактата в эритроцитах наблюдали при введении животным 0,15 и 0,6 мМ изучаемого вещества (-11 и -12% относительно интактных крыс; $p < 0,05$ для обоих случаев). Напротив, максимальное снижение значения показателя регистрировали при использовании 0,3- и 0,45-миллимолярных растворов соединения, составляющее 19 и 24% по сравнению с животными, которым не проводили манипуляций ($p < 0,05$ для обеих групп). Приведенная динамика указывает на оптимальность этих двух концентраций ДНКЖ для стимуляции промежуточной стадии энергетического метаболизма клеток крови, в частности, эритроцитов, что просматривается как по модификации каталитических свойств

лактатдегидрогеназы, так и по уровню одного из ее субстратов – лактата, известного маркера гипоксических состояний клеток, тканей и организма в целом.

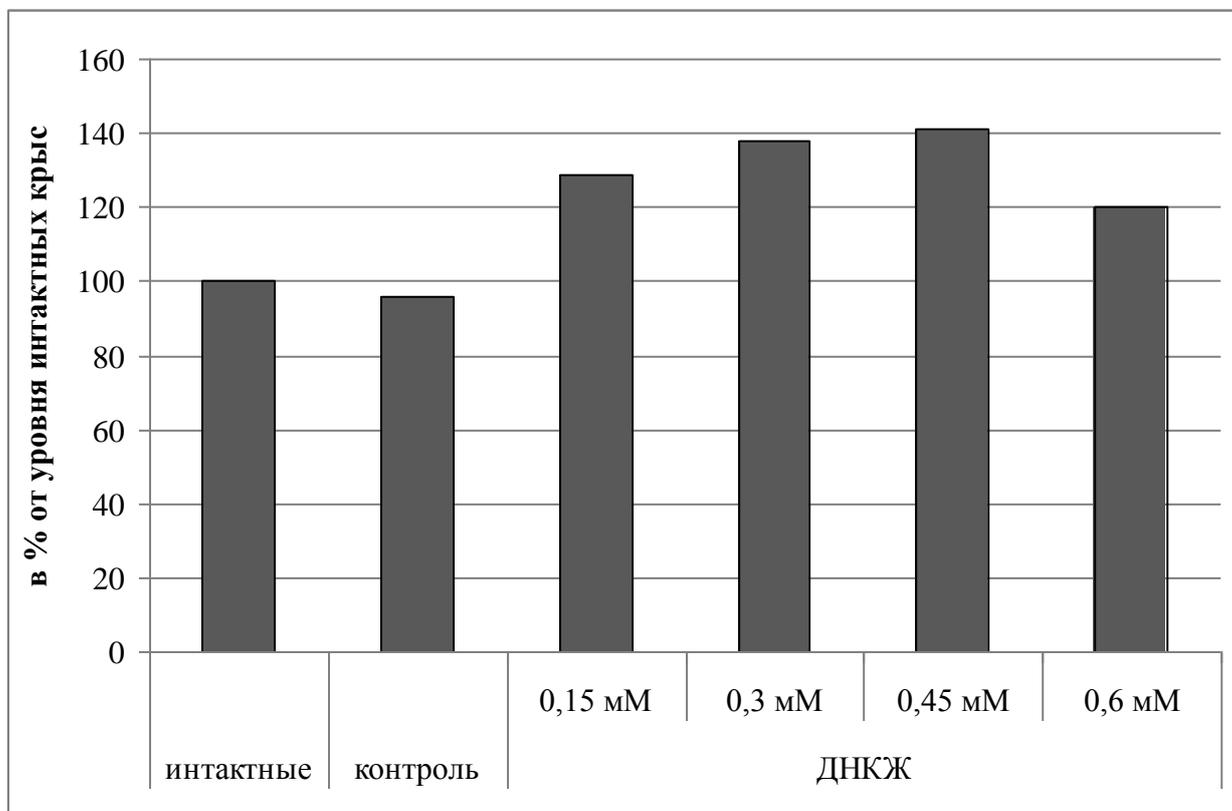


Рисунок 29 - Активность альдегиддегидрогеназы эритроцитов при введении крысам различных доз динитрозильных комплексов железа

Также представляет интерес исследование влияния ДНКЖ на каталитическую активность альдегиддегидрогеназы эритроцитов, т.к., во-первых, данный фермент характеризует состояние ферментной системы детоксикации крови и, во-вторых, является единственным катализатором, принимающим участие в биодegradации органических нитратов до монооксида азота, физиологической депонированной формой которого в организме и служат ДНКЖ. На основании проведенных нами исследований выявлено, что введение рассматриваемого соединения провоцирует умеренную активацию каталитических свойств фермента (рис. 29). Как и в отношении окислительного и энергетического метаболизма

крови, наиболее значительные сдвиги параметра обнаруживаются при использовании водного раствора ДНКЖ в концентрации 0,3 и 0,45 мМ, что проявляется в нарастании активности альдегиддегидрогеназы на 38 и 41% относительно интактных животных ($p < 0,05$ для обеих групп). При этом наименее существенный ответ энзима (+20%; $p < 0,05$) наблюдали при введении наиболее высокой концентрации соединения (0,6 мМ), что может быть обусловлено постепенным формированием избытка свободного NO в плазме крови животных и развитием субстратного ингибирования активности фермента. Об этом дополнительно свидетельствует тот факт, что применение минимальной концентрации ДНКЖ (0,15 мМ) способствовало более существенной стимуляции альдегиддегидрогеназы ($p < 0,05$ по сравнению с интактными животными и крысами, получавшими вещество в концентрации 0,6 мМ).

В целом, ДНКЖ как депонированная форма оксида азота оказывает выраженное активирующее действие на состояние альдегиддегидрогеназы эритроцитов, причем наиболее значительным эффектом обладают более низкие дозы соединения (прежде всего – в диапазоне 0,3-0,45 мМ).

4.9 Кристаллогенная активность сыворотки крови крыс в динамике применения депонированной формы оксида азота

Известно, что способность биологического субстрата к дегидратационной структуризации – одна из интегральных характеристик его компонентного состава и физико-химических свойств (Савина Л.В., 1992, 1999; Мартусевич А.К. с соавт., 2000-2015; Шабалин В.Н., Шатохина С.Н., 2001, 2004; Рапис Е.Г., 2003). При этом кристаллоскопическое исследование информативно для физиологических и патологических состояний как в отношении организма человека (Савина Л.В., 1999; Кидалов В.Н., Хадарцев А.А., 2009), так и животных (Громова И.П., 2005; Ковалева Л.К., 2014). Следовательно, изучение кристаллогенных свойств биологических жидкостей может отображать и влияние оксида азота и его

производных на биосистемы *in vitro* и *in vivo*, однако подобные данные в литературе отсутствуют. Нашим исследовательским коллективом впервые было показано, что обработка газообразным NO в высокой концентрации негативно трансформирует результат кристаллизации образцов сыворотки крови человека преимущественно за счет стимуляции нитрозилирования белковых макромолекул (Мартусевич А.К., Перетягин С.П., 2013), тогда как в экспериментах *in vivo* подобные эффекты ранее не изучались. Поэтому целью данного фрагмента работы, изложенного в этом и следующем разделах диссертации, явилась оценка влияния инъекций различных концентраций ДНКЖ на собственную и инициированную кристаллизацию сыворотки крови крыс.

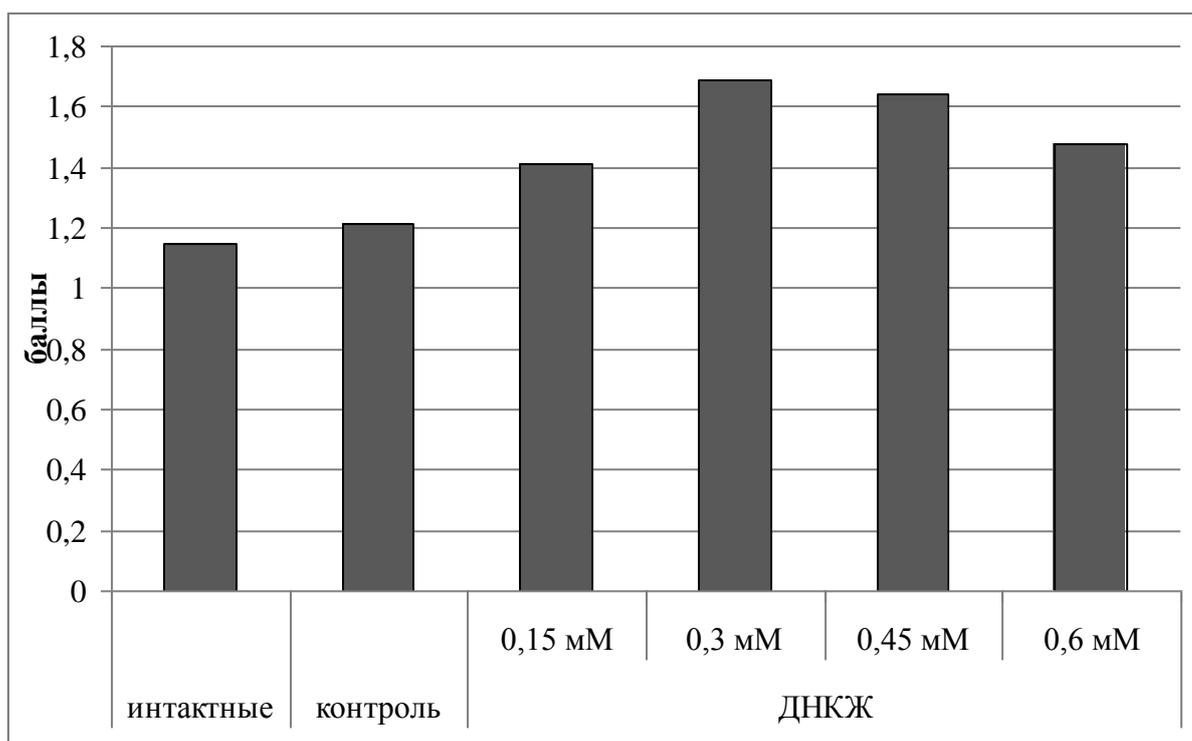


Рисунок 30 - Влияние инъекций динитрозильных комплексов железа на индекс структурности фаций сыворотки крови крыс

Изучение данного эффекта было выполнено нами путем анализа образцов сыворотки крови крыс сформированных групп с использованием специальной системы полуколичественных критериев, характеризующих

процессы структуризации жидкой биосистемы как с количественных, так и с качественных позиций (Мартусевич А.К., Гришина А.А., 2009).

Установлено, что введение животным физиологического раствора, не содержащего естественного донора оксида азота, не оказывало значимого воздействия на параметры собственной кристаллизации биологической жидкости (рис. 30-33). 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.

Максимальное нарастание индекса структурности определялось при введении крысам физиологического раствора, включающего 0,3 мМ ДНКЖ (рис. 30). 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.

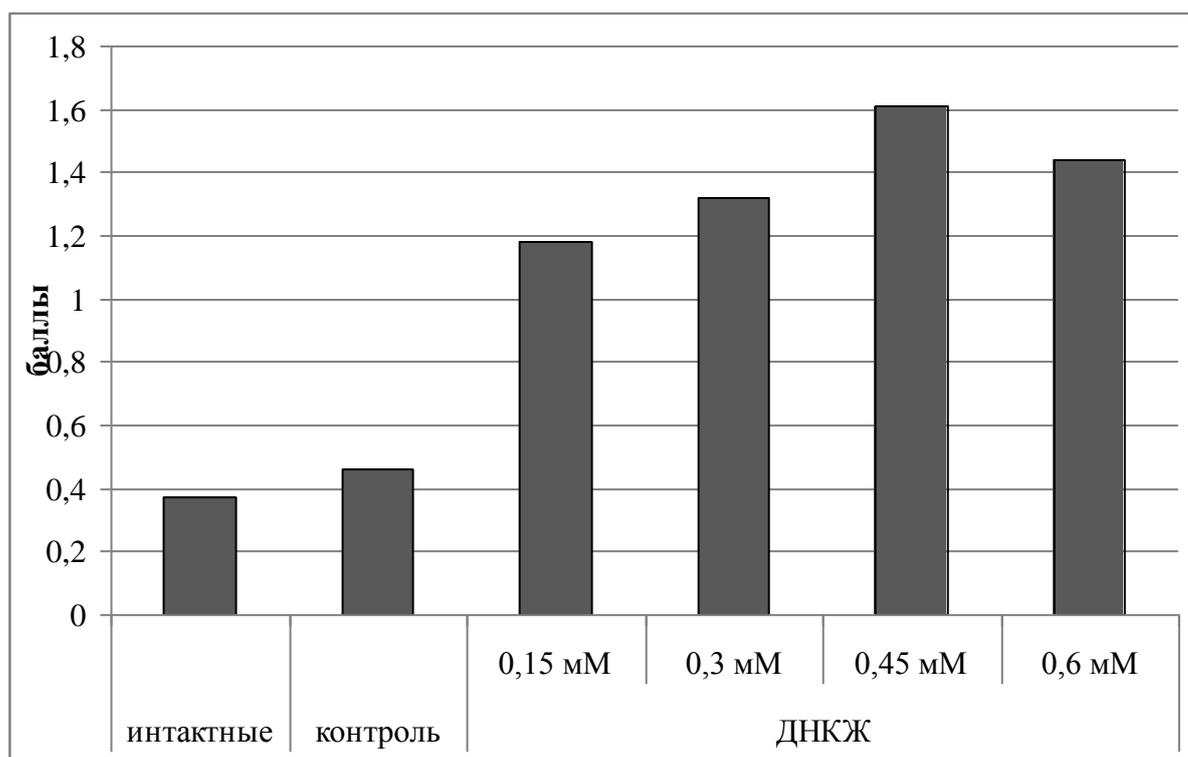


Рисунок 31 - Влияние инъекций динитрозильных комплексов железа на кристаллизуемость фаций сыворотки крови крыс

Сходная динамика изменения была зафиксирована и в отношении кристаллизуемости фаций сыворотки крови – основного количественного критерия оценки собственной кристаллизации последней (рис. 31). 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).

Единственной монотонной зависимостью для изученных концентраций физиологического донора оксида азота является его влияние на степень деструкции кристаллоскопических фаций (рис. 32). 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).

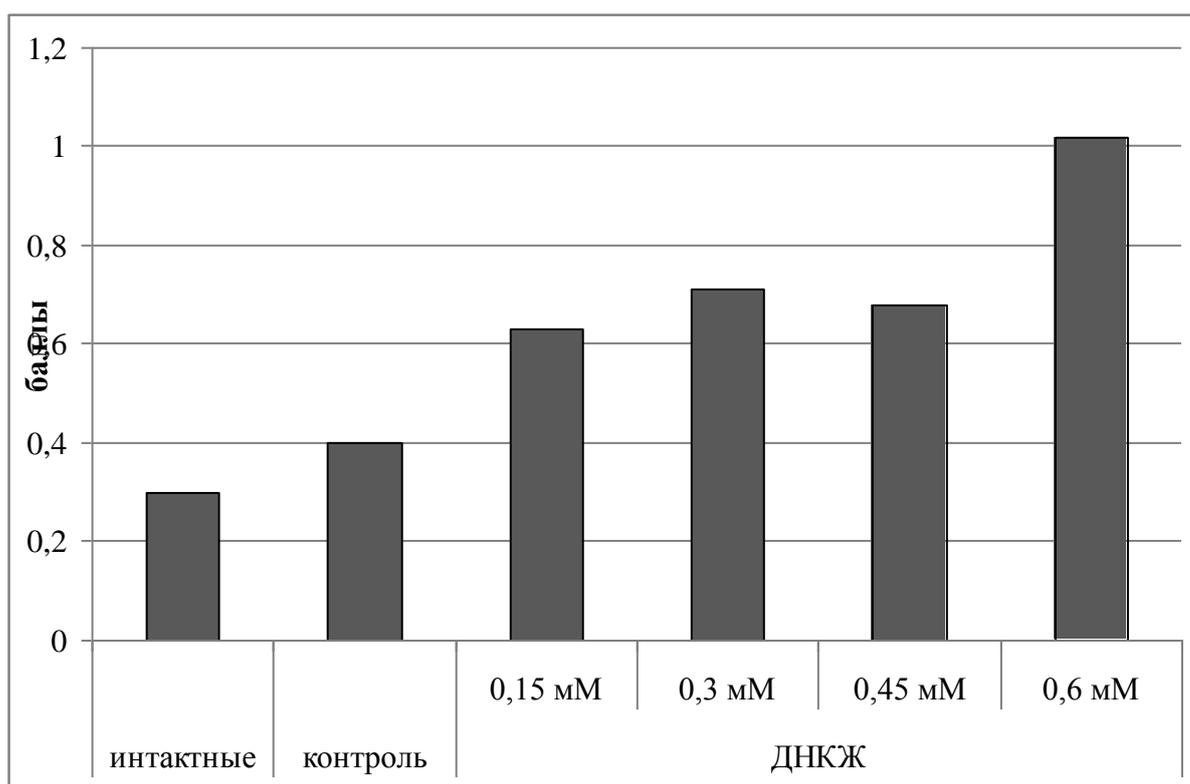


Рисунок 32 - Влияние инъекций динитрозильных комплексов железа на степень деструкции фаций сыворотки крови крыс

Однотипность выявлена нами и для выраженности краевой белковой зоны микропрепарата при действии различных концентраций ДНКЖ (рис. 33). 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.

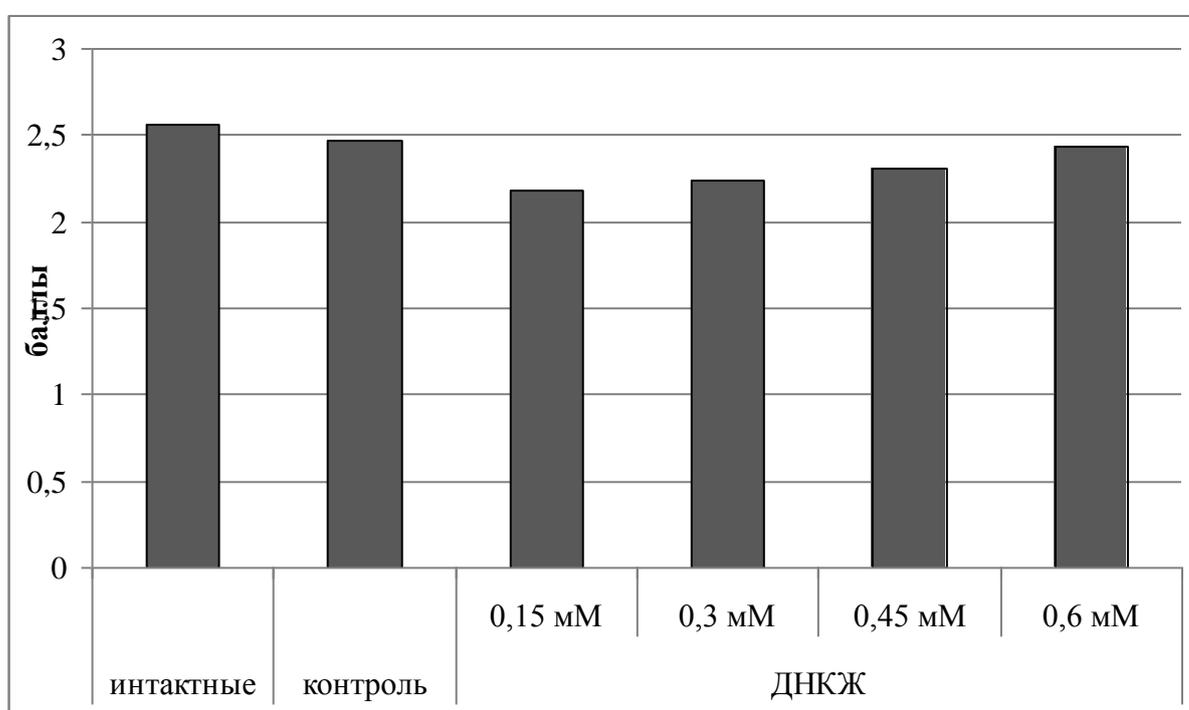


Рисунок 33 - Влияние инъекций динитрозильных комплексов железа на выраженность краевой зоны в фациях сыворотки крови крыс

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.

4.10 Исследование инициаторного потенциала сыворотки крови животных при введении раствора динитрозильных комплексов железа

Вторым неотъемлемым компонентом анализа характера влияния ДНКЖ на особенности дегидратационной структуризации сыворотки крови крыс явилось исследование инициаторного потенциала последней (рис. 34-37)

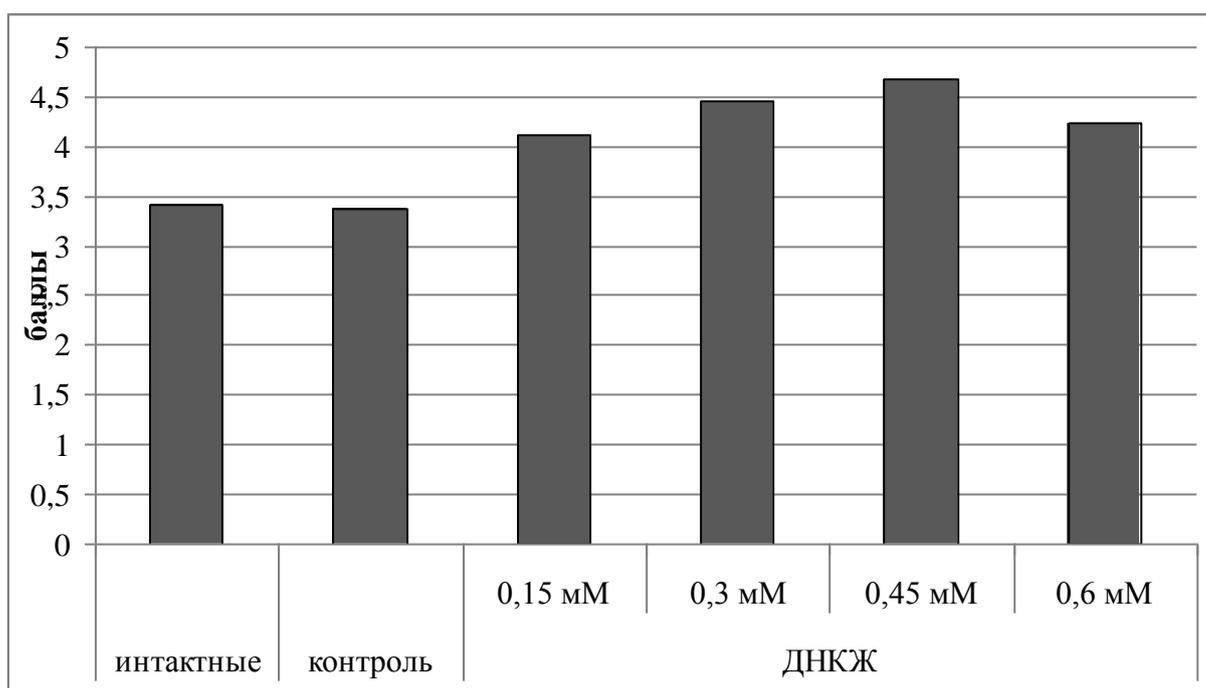


Рисунок 34 - Тезиграфический индекс образцов сыворотки крови крыс при внутрибрюшинном введении тиолсодержащих динитрозильных комплексов железа

Обнаружено, что по основному количественному параметру описания результата тезиграфического теста – тезиграфическому индексу – различия наблюдаются при всех использованных режимах NO-стимуляции (рис. 34). Так, для животных интактной и контрольной групп значения показателя лежали в пределах 3,5 баллов, что свидетельствует максимально лишь о двухкратном инициаторном потенциале биосреды (количество структурных элементов в образце-сокристаллизате не более чем в 2 раза

превышает их число в контрольном образце базисного вещества). Напротив, при введении ДНКЖ наблюдали выраженное увеличение значения тезиграфического индекса, указывающее на существенное повышение инициаторного потенциала биологической жидкости крыс данных групп ($p < 0,05$ для всех случаев). Наиболее значимые отклонения регистрировали при применении ДНКЖ в концентрации 0,45 мМ.

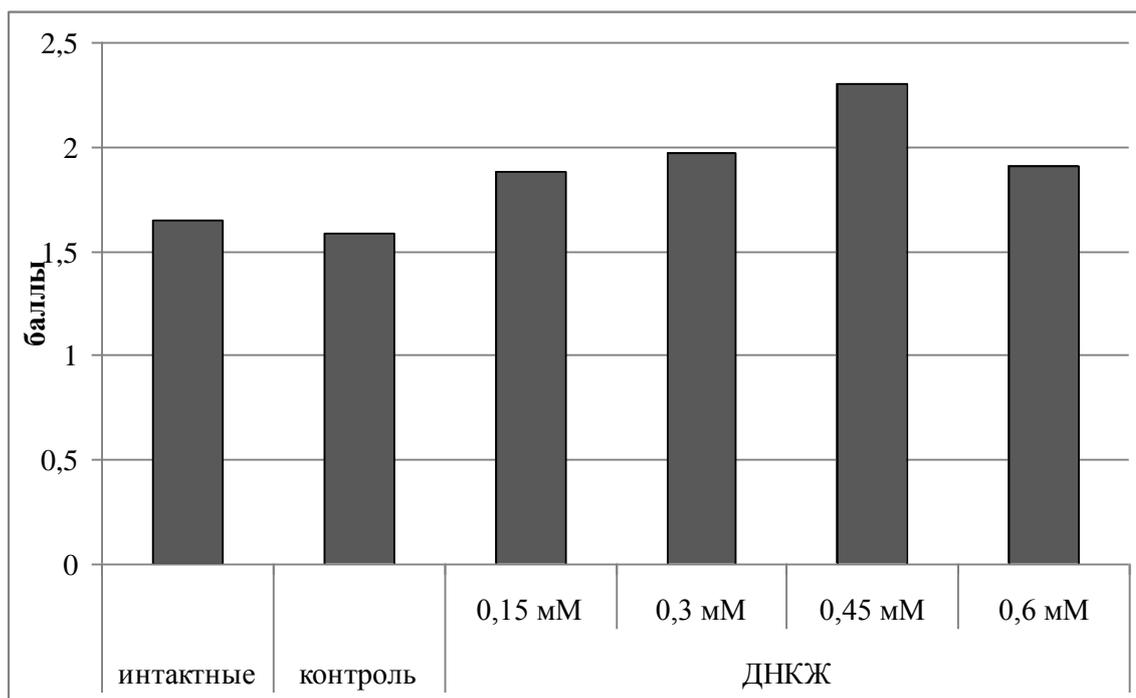


Рисунок 35 - Кристалличность в тезиграфических фациях сыворотки крови крыс при внутрибрюшинном введении тиолсодержащих динитрозильных комплексов железа

Кристалличность тезиграмм, характеризующая сложность построения элементов и аналогичная по своей сущности индексу структурности кристаллограммы, полностью подтверждала тенденции к активации инициированного кристаллогенеза, обнаруженные по тезиграфическому индексу, у животных, получавших инъекции ДНКЖ (рис. 35). Аналогичным был и экстремум данной параболической зависимости, соответствующий концентрации 0,45 мМ. Следует подчеркнуть, что при всех использованных дозах соединения по кристалличности отмечены

статистически значимые отклонения от уровня, зафиксированного как для крыс интактной, так и контрольной групп ($p < 0,05$ для обоих случаев).

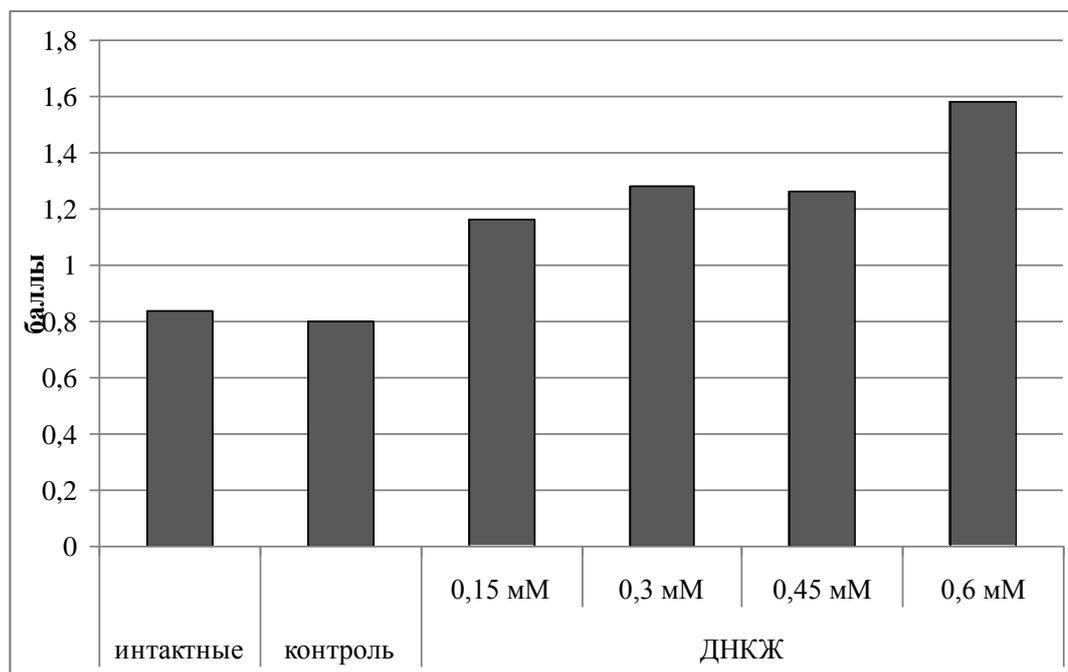


Рисунок 36 - Выраженность деструкции элементов в тезиграфических фациях сыворотки крови крыс при внутрибрюшинном введении тиолсодержащих динитрозильных комплексов железа

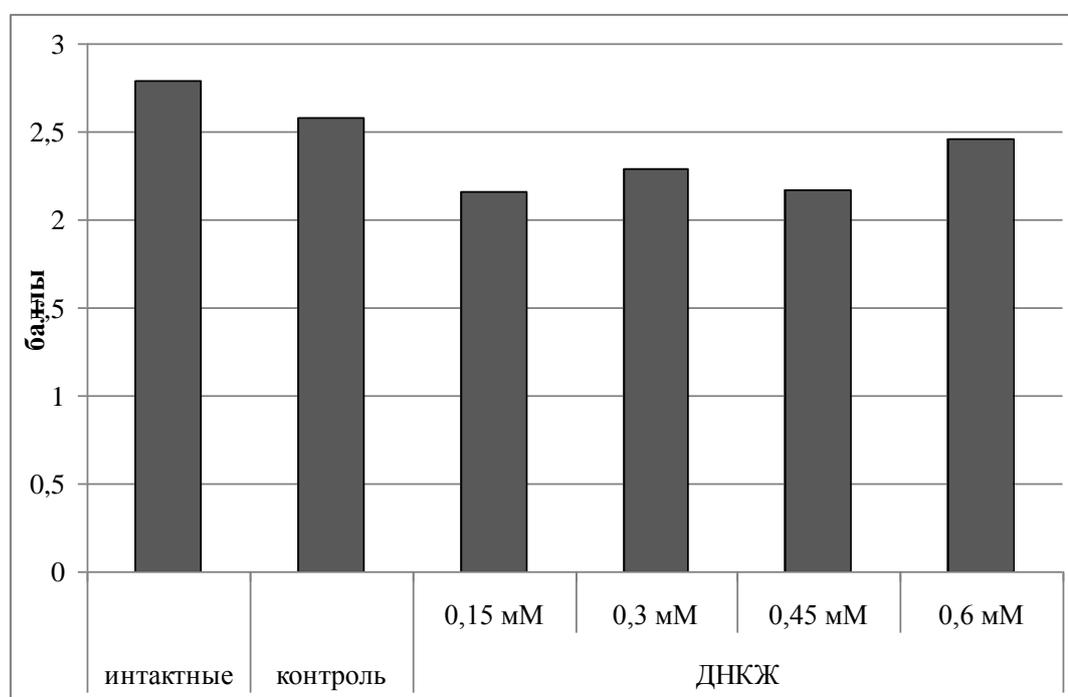


Рисунок 37 - Выраженность краевой зоны в тезиграфических фациях сыворотки крови крыс при внутрибрюшинном введении тиолсодержащих динитрозильных комплексов железа

Относительно монотонной и прямой, как и в случае кристаллоскопического исследования, была зависимость между вводимой концентрацией ДНКЖ и степень деструкции элементов тезиграммы, причем различия наблюдали при всех режимах ($p < 0,05$; рис. 36).

Аналогично алгоритму, примененному при оценке кристаллограмм, для тезиграфических микропрепаратов нами проведен анализ выраженности краевой зоны образцов сыворотки крови крыс сформированных групп (рис. 37). Данный параметр, характеризующий белковый компонент биологической жидкости, находящийся в нативном состоянии, не отличался от физиологического уровня, представленного интактными животными, лишь у представителей контрольной группы. У всех крыс, получавших инъекции донора оксида азота, наблюдали умеренное снижение указанного параметра (на 5-15% относительно значений, вычисленных для интактных животных), что потенциально свидетельствовало о незначительных конформационных модификациях белков под влиянием изучаемого воздействия и могло быть обусловлено сменой глутатионовых на белковые лиганды в ДНКЖ.

Таким образом, результаты тезиокристаллоскопической оценки образцов сыворотки крови животных после проведения курса инъекций ДНКЖ в различной концентрации четко указывают 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. Также не выявлено признаков токсического влияние изучаемого агента.

4.11 Характер трансформации физико-химических показателей крови при действии естественного донора оксида азота

Последним компонентом анализа влияния ДНКЖ на параметры физико-химического гомеостаза крови крыс служила оценка модификации показателей кислотно-щелочного равновесия и парциальное давление

основных газов (рис. 38-40). Установлено, что изучаемое соединение дозозависимо снижает рН крови животных, причем имеет место обратная зависимость (рис. 38). 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.

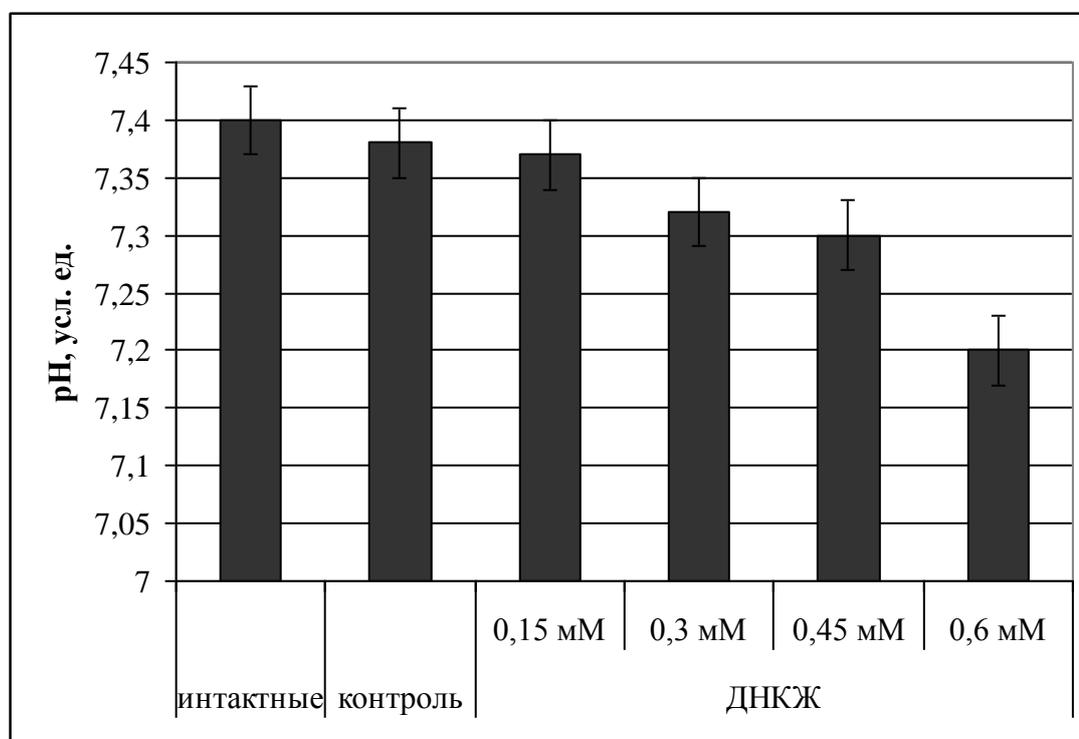


Рисунок 38 - Динамика рН крови крыс при введении различных концентраций физиологического донора оксида азота

Параллельно описанному выше уменьшению уровня рН крови, нарастание действующей концентрации физиологического донора оксида азота обеспечивало пропорциональное повышение окислительно-восстановительного потенциала крови (рис. 38). 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; $p < 0,05$).

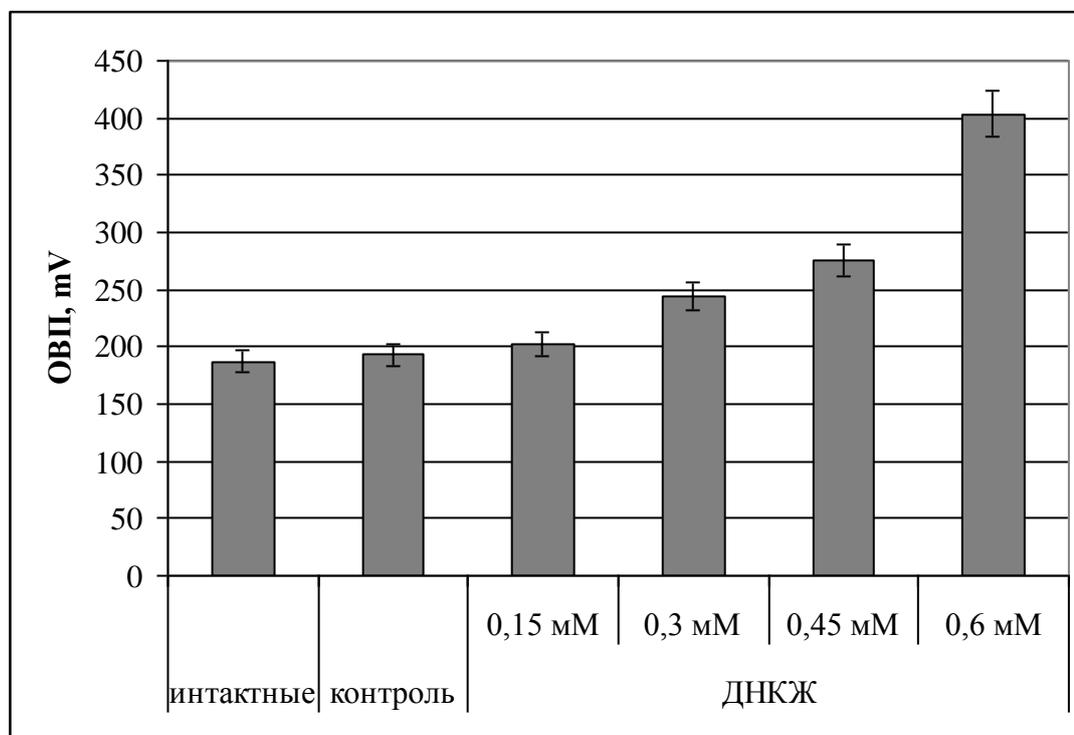


Рисунок 39 - Уровень окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) крови крыс при введении различных концентраций физиологического донора оксида азота

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.

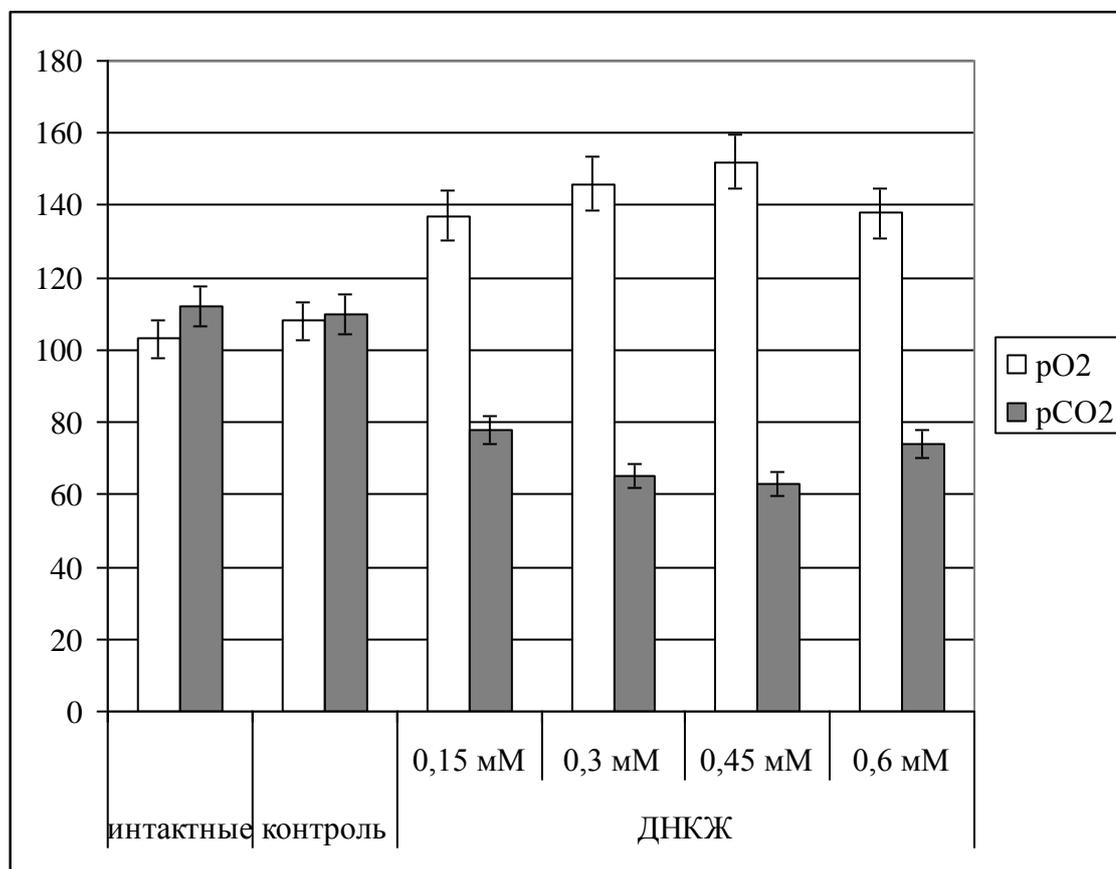


Рисунок 40 - Парциальное давление газов крови у крыс при введении различных концентраций физиологического донора оксида азота

(pO₂ – парциальное давление кислорода, pCO₂ – парциальное давление углекислого газа)

Характеризуя динамику газового состава крови крыс после курса инъекций ДНКЖ, следует отметить положительные сдвиги, включающие отчетливое нарастание парциального давления кислорода на фоне снижения pCO₂ (рис. 40). 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.

4.12 Оценка сопряженности сдвигов биохимических и кристаллоскопических параметров крови в реакции на введение динитрозильных комплексов железа

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 (рис. 41А). 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).

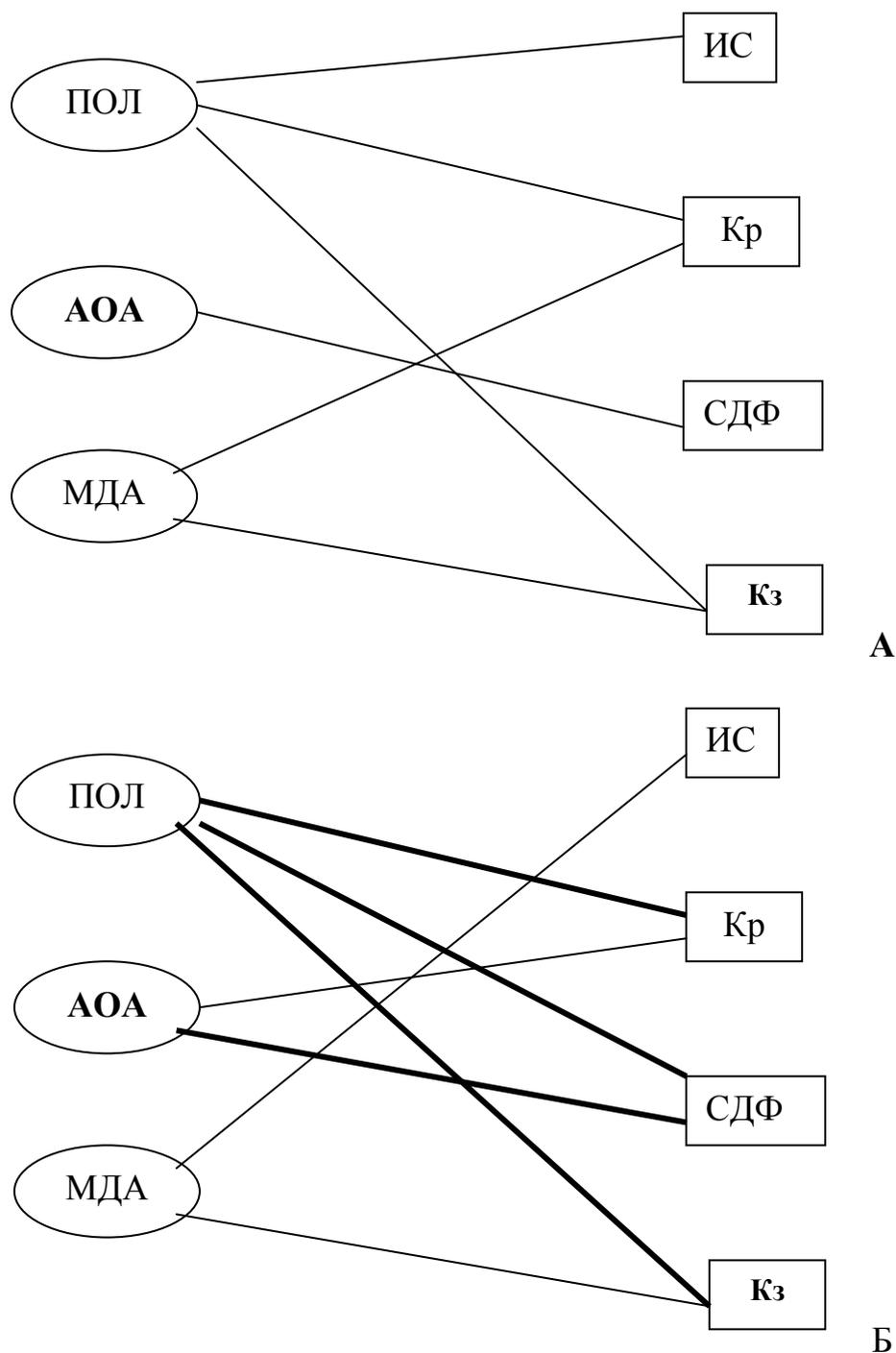


Рисунок 41- Результаты корреляционного анализа сопряженности параметров окислительного метаболизма и кристаллогенных свойств сыворотки крови в зависимости от введенной дозы донора оксида азота

А – крысы, получавшие ДНКЖ в концентрации 0,3 мМ

Б – крысы, получавшие ДНКЖ в концентрации 0,6 мМ

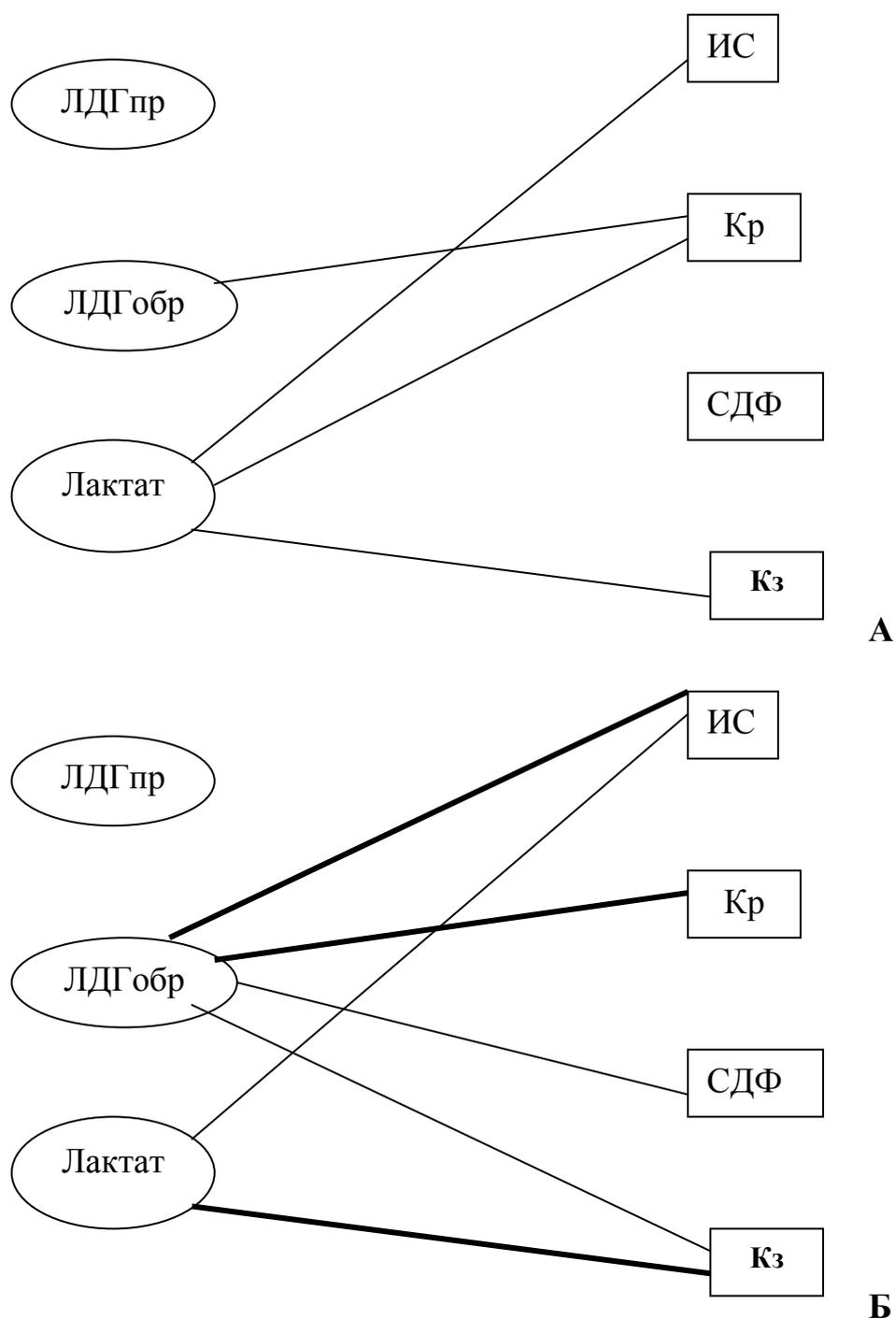


Рисунок 42 - Результаты корреляционного анализа сопряженности параметров окислительного метаболизма и кристаллогенных свойств сыворотки крови в зависимости от введенной дозы донора оксида азота

А – крысы, получавшие ДНКЖ в концентрации 0,3 мМ

Б – крысы, получавшие ДНКЖ в концентрации 0,6 мМ

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 (рис. 41Б).

В частности, уровень корреляционной связи интенсивности липопероксидации с кристаллизруемостью, 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 нарастанию значений соответствующих коэффициентов корреляций. Подобное состояние, по-видимому, следует трактовать как напряжение адаптационных систем крови.

Аналогичные тенденции имели место и в отношении энергетического метаболизма эритроцитов (рис. 43). 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.

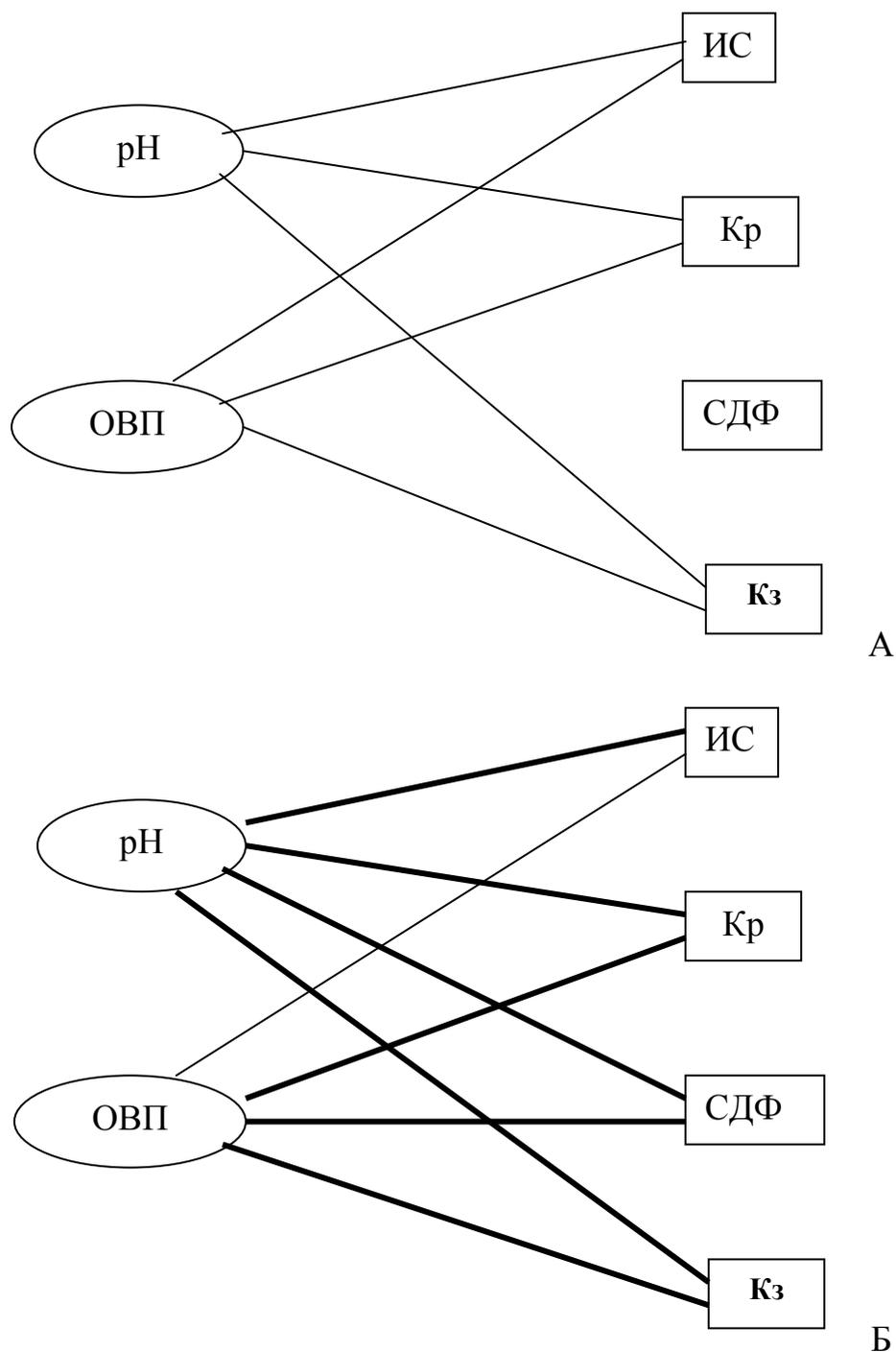


Рисунок 43 - Результаты корреляционного анализа сопряженности физико-химических параметров крови и кристаллогенных свойств сыворотки крови в зависимости от введенной дозы донора оксида азота

А – крысы, получавшие ДНКЖ в концентрации 0,3 мМ

Б – крысы, получавшие ДНКЖ в концентрации 0,6 мМ

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).

Также показательным является сопоставление уровня сопряженности физико-химических параметров крови (рН и окислительно-восстановительного потенциала плазмы) с кристаллоскопическими показателями (рис. 43). 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, кристаллизуемостью 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, 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.

5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 al., 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 (Vorodulin 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.Н. 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, целью которой являлось уточнение характера влияния ДНКЖ с глутатионовыми лигандами на метаболические и физико-химические параметры крови.

Исследование имело двухэтапную структуру, причем на первом этапе производили оценку воздействия соединения на показатели окислительного и энергетического метаболизма крови, ее наиболее общие физико-химические параметры и кристаллогенные свойства *in vitro*. Важно отметить, что первый раздел (*in vitro*) был выполнен на образцах изолированной, стабилизированной крови человека, т.к. это позволяло проводить с ними необходимые манипуляции. Напротив, известно, что кровь крыс обладает крайне высокой скоростью свертывания, что существенно затрудняет использование ее для осуществления экспериментов *in vitro* даже при использовании веществ-консервантов.

В рамках второго этапа данной диссертационной работы рассматривали действие тиол-содержащих ДНКЖ на приведенную совокупность показателей крови здоровых животных (крыс линии Вистар). Для оценки этих эффектов животным проводили десятидневный курс внутрибрюшинного введения рассматриваемого соединения, причем изучали в сравнительном аспекте особенности влияния 4 различных концентраций ДНКЖ (0,15; 0,30; 0,45 и 0,60 мМ) при одинаковом объеме используемого носителя – физиологического раствора (1 мл). Сопоставляли динамику всех регистрируемых критериев до начала и по завершении полного курса процедур.

Согласно принятой методологии исследования состояние окислительного метаболизма изучали по параметрам биохемилюминесцентного теста - светосумме хемилюминесценции (отражает интенсивность перекисного окисления липидов в плазме крови) и тангенсу угла 2α (служит индикатором общей антиоксидантной активности биосубстрата), а также концентрации малонового диальдегида в плазме крови человека и животных – одного из конечных метаболитов процессов липопреоксидации.

Влияние ДНКЖ на энергетический обмен оценивали путем мониторинга промежуточного звена данного компонента метаболизма – каталитических свойств лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакциях, а также ее субстрата – лактата.

Особый интерес представляло уточнение состояния альдегиддегидрогеназы эритроцитов при рассматриваемом варианте системной NO-стимуляции. Это обусловлено двумя основными факторами. Во-первых, указанный фермент служит одним из наиболее значимых компонентов ферментной детоксикационной системы крови, и, во-вторых, он в последние годы рассматривается как единственный катализатор биодegradации нитратов *in vivo* (Мартусевич А.К. с соавт., 2014; Fung H.L., 2004; Mayer B., Beretta M., 2008). Следует отметить, что этот вопрос имеет непосредственное отношение к такой важной научно-практической проблеме, как формирование и прогрессирование резистентности к нитровазодилаторам (Szabó C. et al., 1994; de la Lande I.S., Stepien J.M., Philpott A.C. et al. 2004), механизм которой, как и молекулярные аспекты действия NO на каталитические свойства альдегиддегидрогеназы в целом (Мартусевич А.К. с соавт., 2014), изучены минимально (DeMaster E.G. et al., 1997).

В качестве инновационной лабораторной технологии в оценке биологического действия ДНКЖ на гомеостаз биожидкости была использована ее способность к дегидратационной структуризации – одна

из интегральных характеристик его компонентного состава и физико-химических свойств (Савина Л.В., 1992, 1999; Мартусевич А.К. с соавт., 2000-2015; Шабалин В.Н., Шатохина С.Н., 2001, 2004; Рапис Е.Г., 2003). Ранее убедительно показано, что кристаллоскопическое исследование информативно для физиологических и патологических состояний как в отношении организма человека (Савина Л.В., 1999; Кидалов В.Н., Хадарцев А.А., 2009; Мартусевич А.К., 2012, 2013), так и животных (Громова И.П., 2005; Ковалева Л.К., 2014). Следовательно, изучение кристаллогенных свойств биологических жидкостей может отображать и влияние оксида азота и его производных на биосистемы *in vitro* и *in vivo*, однако подобные данные в литературе отсутствуют. Нашим исследовательским коллективом впервые было показано, что обработка газообразным NO в высокой концентрации негативно трансформирует результат кристаллизации образцов сыворотки крови человека преимущественно за счет стимуляции нитрозилирования белковых макромолекул (Мартусевич А.К., Перетягин С.П., 2013), тогда как в экспериментах *in vivo* подобные эффекты ранее не изучались. Поэтому целью данного фрагмента работы, изложенного в этом и следующем разделах диссертации, явилась оценка влияния инъекций различных концентраций ДНКЖ на собственную и инициированную кристаллизацию сыворотки крови крыс.

Изучение данного эффекта было выполнено нами путем анализа образцов сыворотки крови крыс сформированных групп с использованием специальной системы полуколичественных критериев, характеризующих процессы структуризации жидкой биосистемы как с количественных, так и с качественных позиций (Мартусевич А.К., Гришина А.А., 2009).

Наконец, для получения интегральных представлений о сопряженности сдвигов метаболических, физико-химических и кристаллоскопических характеристик крови, вызываемых введением ДНКЖ непосредственно в биологическую жидкость *in vitro* и

возникающих в результате курса инъекций содержащего их физиологического раствора был использован корреляционный анализ.

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

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. 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.

Кроме того, проведенные экспериментальные исследования позволили установить наличия выраженного действия ДНКЖ на физико-химические свойства и газовый состав крови. Оно включает умеренное смещение pH 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 отношении 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 глутатионовыми лигандами.

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.

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

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 фации (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.

Согласно дизайну выполненного исследования, 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, 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).

Вторым компонентом мультифакторного системного действия динитрозильных комплексов железа, впервые продемонстрированным в исследованиях нашего коллектива и частично изложенным для экспериментов *in vitro* в главе 3 настоящей работы, 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, так и по уровню одного из ее субстратов – лактата, 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, причем наиболее значительным эффектом обладают более низкие дозы соединения (прежде всего – в диапазоне 0,3-0,45 мМ).

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.

Максимальное нарастание индекса структурности определялось при введении крысам физиологического раствора, включающего 0,3 мМ ДНКЖ. 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. 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).

Единственной монотонной зависимостью для изученных концентраций физиологического донора оксида азота является его влияние на степень деструкции кристаллоскопических фаций. 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. 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 тизиграфическое исследование с использованием 0,9% раствора хлорида натрия в качестве базисного вещества, результаты которого было аналогичны полученным при кристаллоскопическом анализе образцов сыворотки крови крыс.

Таким образом, тизиокристаллоскопическая 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 биождикости, 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 нарастанию значений 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).

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, кристаллизуемостью 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. 44), что положительно характеризует адаптивные резервы организма в целом (широкий диапазон «метаболической адаптации»).



Рисунок 44 - Системные механизмы ответа организма на введение различных доз донора оксида азота

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.

На основании результатов проведенных исследований сделаны следующие выводы:

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 тизоикристаллоскопической 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Баскаков, М.Б. Ионные механизмы действия газотрансмиттеров на сократительную активность сосудистых гладких мышц / М.Б. Баскаков, С.В. Гусакова, А.С. Желудева с соавт. // Известия высших учебных заведений. Физика. - 2013. - Т. 56. - №4–2. - С. 73–78.
3. Барер, Г.М. Кристаллографический метод изучения слюны / Г.М. Барер, А.Б. Денисов. - М.: ФГОУ «ВУНМЦ Росздрава», 2008. - 240 с.
4. Белова, А.В. Микрорентгенооптическое обнаружение некоторых производных барбитуровой кислоты при судебно-медицинских исследованиях / А.В. Белова // Судебно-медицинская экспертиза. - 1960.- №2. - С. 37-45.
5. Бочкарева, Н.В. Нужна ли метаболическая реабилитация больным с гиперпластическими процессами и раком эндометрия на фоне метаболического синдрома? / Н.В. Бочкарева, Л.А. Коломиец, А.Л. Чернышова // Сибирский онкологический журнал. - 2010. - №5. - С. 71-77.
6. Бритова, А.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на процессы кристаллообразования / А.А. Бритова, В.Ю. Романюк // Лазерная медицина. - 2007. – Т. 11. - №1. - С. 26-29.
7. Бузоверя, М.Э. Морфометрический анализ фаций сыворотки крови / М.Э. Бузоверя с соавт. // Клиническая лабораторная диагностика. 2003. - №9. - С. 22-23.
8. Буйлин, В.А. Низкоинтенсивные лазеры в терапии различных заболеваний / В.А. Буйлин, С.В. Москвин. - М.: ТОО «Фирма «Техника», 2005. - 176 с.
9. Ванин, А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях / А.Ф. Ванин // Вестник РАМН. - 2000. - №4. - С. 3-5.

10. Ванин А.Ф., Лозинский В.И., Капелько В.И. Полимерная композиция для создания стабилизированной формы динитрозильного комплекса железа и метод синтеза этой формы. Патент РФ №2291880 от 01.12.2005 г.

11. Ванин, А.Ф., Механизм адаптации сосудистой системы к хроническому изменению уровня оксида азота в организме / А.Ф. Ванин, Е.Б. Манухина, И.Ю. Малышев с соавт. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2006. - №12. - С. 626-630.

12. Ванин, А.Ф. Выявление и оценка депо NO в организме бодрствующей крысы / А.Ф. Ванин, Е.Б. Манухина, И.Ю. Малышев с соавт. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2003. - №7. - С. 32-36.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

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

18. 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.
19. Воробьев, А.В. Исследование метаболического статуса при ожоговой болезни / А.В. Воробьев, А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева с соавт. // Вестник неотложной и восстановительной медицины. - 2008. - Т.3. - №9. - С. 338-341.
20. 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.
21. Гольдзон, М.А. Влияние тяжелой термической травмы на сократимость и метаболизм сердца / М.А. Гольдзон, В.Т. Долгих // Общая реаниматология. - 2011. - Т. VII. - №1. - С. 11-14.
22. Граник, В.Г. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств / В.Г. Граник, Н.Б. Григорьев. - М.: Вузовская книга, 2004. - 360 с.
23. Гречко, В.Н. Фото-озонотерапия в хирургии / В.Н. Гречко, А.В. Воробьев. - Н.Новгород: Пламя, 2008. - 168 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. Ефименко, Н.А. Воздушно-плазменные потоки и NO-терапия – новая технология в клинической практике военных лечебно-профилактических учреждений / Н.А. Ефименко, В.И. Хрупкин, Л.А. Марахонич с соавт. // Военно-медицинский журнал. - 2005. - № 5. - С. 51-54.
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. Залеский, М.Г. Физико-химическая интерпретация результатов исследования литогенной мочи с помощью диагностикума «Литос-система» / М.Г. Залеский, В.Л. Эмануэль // Клиническая лабораторная диагностика. - 2005. - №12. - С. 19-23.
31. Илларионов, В.Е. Основы лазерной терапии / В.Е. Илларионов - М.: Респект, 1992. - 122с.
32. Казимирко, В.К. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия / В.К. Казимирко, В.И. Мальцев, В.Ю. Бутылин, Н.И. Горобец. - К.: Морион, 2004.
33. Каликштейн, Д.Б. Значение тизиграфического метода исследования мочи / Д.Б. Каликштейн, Л.А. Мороз, В.Л. Черняков // Лабораторное дело. - 1981. - №2. - С. 79-81.
34. Карелин, В.И. Плазмохимическая установка для NO-терапии / В.И. Карелин, С.Н. Буранов, О.А. Пименов с соавт. // Медиаль. - 2013. - №4. - С. 46.
35. 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.
36. Ковалев, И.В. Влияние нитропрусида натрия на мембранный потенциал и механическое напряжение гладкомышечных клеток аорты

крысы / И.В. Ковалев, М.Б. Баскаков, А.А. Панов с соавт. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 1997. - Т. 83. - №7. - С. 70–76.

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

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

39. Лапитан, Д.Г. Медико-физические аспекты стимуляции микроциркуляции крови оксидом азота при лечении заболеваний ЛОР-органов / Д.Г. Лапитан с соавт. // Медицинская физика. - 2012. - №1. - С. 61-68.

40. Липатов, К.В. Применение газового потока, содержащего оксид азота (NO-терапия) в комплексном лечении гнойных ран / К.В. Липатов, М.А. Сопромадзе, А.Б. Шехтер с соавт. // Хирургия. - 2002. - №2. - С. 41-43.

41. Ловиц, Т.Е. Показание нового способа испытания соли / Т.Е. Ловиц // Технологический журнал. - 1804. - Т. 1. - №3. - С. 27-41.

42. Мазур, Н.А. Роль нитратов в лечении кардиологических больных в соответствии с принципами доказательной медицины и рекомендации по их практическому применению / Н.А. Мазур // Кардиология. - 2005. - №8. - С. 92–96.

43. Мартусевич, А.К. Биокристаллизация: гносеология, методология, информативность / А.К. Мартусевич. - Киров: Типография Вятской ГСХА, 2008. - 150 с.

44. Мартусевич, А.К. Информационная физико-биохимическая теория кристаллизации как отражение морфологии биологических жидкостей / А.К. Мартусевич // Бюллетень сибирской медицины. - 2005. - Т. 4. - С. 185.

45. Мартусевич, А.К. Основы биокристалломики. Теория, методология, методы / А.К. Мартусевич. - LAP LAMBERT Academic Publishing, 2011. - 200 с.
46. Мартусевич А.К. Процесс структурной самоорганизации биологических жидкостей при дегидратации: системный анализ / А.К. Мартусевич // Информатика и системы управления. - 2010. - №2. - С. 31-34.
47. Мартусевич, А.К. Физиология и патология кристаллостаза: общая парадигма и перспективы изучения / А.К. Мартусевич с соавт. // Вестник Нижегородского университета им Н.И. Лобачевского. - 2010. - №1. - С. 135-139.
48. 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.
49. 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.
50. Мартусевич, А.К. Исследование продуктов от терапевтического аппарата для получения NO-содержащей холодной плазмы / А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин, А.Ф. Ванин // Медицинская физика. - 2012. - № 4. - С. 80-86.
51. Мартусевич, А.К. Метаболические аспекты ожогового эндотоксикоза / А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин, И.Е. Погодин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2009. - №1. – С. 30-32.
52. Мартусевич, А.К. Экспериментальное изучение некоторых системных эффектов ингаляций оксида азота / А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин, А.Г. Соловьева с соавт. // Биофизика. - 2016. - Т. 61. - Вып. 1. - С. 165-171.

53. 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.
54. Мартусевич, А.К. Влияние ингаляций оксида азота на каталитические свойства альдегиддегидрогеназы эритроцитов у здоровых и имеющих термическую травму животных / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева // Ученые записки Орловского государственного университета. - 2014. - №7. - С. 248-249.
55. 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.
56. 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.
57. Мартусевич, А.К. Особенности функционально-метаболической адаптации организма в условиях травматического стресса / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, А.А. Мартусевич, П.В. Перетягин // Медицинский альманах. - 2012. - № 5. - С. 175-178.
58. Мартусевич, А.К. Влияние различных форм оксида азота на свойства альдегиддегидрогеназы эритроцитов / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2014. - № 11. - С. 60-65.
59. 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.

60. Мартусевич, А. К. Влияние NO-содержащего газового потока на некоторые параметры энергетического метаболизма эритроцитов / А. К. Мартусевич, А. Г. Соловьева, С. П. Перетягин с соавт. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2014. - Т. 158. - №7. - С. 40-42.
61. Мартусевич, А.К. Влияние различных концентраций оксида азота (NO) на интенсивность процессов липопероксидации в плазме крови *in vitro* / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин с соавт. // Медицинский альманах. - 2013. - №3. - С. 76-77.
62. 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. - №6. - С. 1173-1179.
63. Мартусевич, А.К. Анализ влияния оксида азота на физико-химические параметры крови *in vitro* / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин, Н.В. Диденко // Врач-аспирант. - 2013. - № 2. - С. 218-222.
64. 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.
65. Марцевич, С.Ю. Современные взгляды на терапию нитратами больных ишемической болезнью сердца / С.Ю. Марцевич // Сердце. - 2003. - Т. 8. - №2. - С. 88–90.
66. Машковский, М.Д. Лекарства XX века./ М.Д. Машковский / М.: Новая волна. - 1998.
67. 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.

68. Михайленко, В. М. Изменения энергетического статуса опухолевых клеток при действии экзогенных оксидов азота. / В. М. Михайленко // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – С.137-138.
69. Михин, И.В. Ожоги и отморожения. / И.В. Михин, Ю.В. Кухтенко / Волгоград: Изд-во ВолГМУ, - 2012. - 87 с.
70. 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.
71. Назаренко, Г.И. Лабораторные методы диагностики неотложных состояний./ Г.И. Назаренко, А.А. Кишкун / М.: Медицина. - 2002. - 566 с.
72. Никольская, М.Н. Обнаружение сульфаниламидных препаратов методом кристаллизации в тонком слое / М.Н. Никольская, В.Г. Гандель, В.А. Попков // Аптечное дело. - 1965. - №4. - С. 13-14.
73. Новицкий, В.В. Физиология и патофизиология эритроцита. / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая / Томск: Изд-во ТГУ, - 2004. - 202 с.
74. Островский, В.Н. Комплексное лечение ожоговых ран терагерцовыми волнами молекулярного спектра оксида азота / В.Н. Островский, С.М. Никитюк, В.Ф. Киричук, А.П. Креницкий с соавт. // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2004. – № 11. - С. 55-61.
75. Парамонов, Б.А. Ожоги. / Б.А. Парамонов, Я.О. Порембский, В.Г. Яблонский //Руководство для врачей. - 2000 – 142с.
76. 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.
77. 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.

78. Плаксина, Г.В. Клиническое значение кристаллографического и кристаллоскопического метода исследования мочи / Г.В. Плаксина с соавт. // Клиническая лабораторная диагностика. - 1999. - №10. - С. 34.

79. Попова, С.Н. Физическая реабилитация. / С.Н. Попова / Ростов-на-Дону: Изд-во «Феникс», 2004. - 608 с.

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

81. Рапис, Е.Г. Микросталлооптический способ использования стекловидного тела человека и животных в норме и при гемофтальме / Е.Г. Рапис // Вестник офтальмологии. - 1976. - №4. - С. 62-67.

82. 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.

83. Реутов, В.П. Оксид азота (NO) и цикл NO в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты / В.П. Реутов, В.Е. Охотин, А.В. Шуклин с соавт.// Успехи физиологических наук. - 2007. - Т. 38. - № 4. - С. 39–58.

84. Реутов, В.П.. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, В.Е. Охотин, Н.С. Косицын /М.: Наука, - 1998.

85. Рихванов, Л.П. Биоминерализация в организме человека и животных. / Л.П. Рихванов с соавт./ Томск: Изд. дом «Тандем Арт». - 2004. - 498 с.

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

87. 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.
88. Синглетно-кислородная терапия. Научно-методическое пособие / Под ред. И.З. Самосюк, Л.И. Фисенко. - Киев, 2007. - 228 с.
89. 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.
90. 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.
91. 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.
92. Соловьева, А.Г. Системный анализ метаболического профиля крови пациентов с термической травмой / А.Г. Соловьева, А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин, Н.В. Диденко // Вестник РАМН. - 2014. - №1-2. - С. 22-25.
93. Судаков, К.В. Нормальная физиология. Курс физиологии функциональных систем. / К.В. Судаков с соавт. // Медицинское информационное агенство. - 1999.
94. Тарасевич, Ю.Ю. Механизмы и модели дегидратационной самоорганизации биологических жидкостей / Ю.Ю. Тарасевич // Успехи физических наук. - 2004. - Т. 174. - №7. - С. 779-790.
95. Тарасевич, Ю.Ю. Влияние режима испарения на пространственное перераспределение компонентов в испаряющейся капле жидкости на твердой горизонтальной подложке / Ю.Ю. Тарасевич, О.П.

Исакова, В.В. Кондухов, А.В. Савицкая // Журнал технической физики. - 2010. - Т. 80. - Вып. 5. - С. 45-53.

96. Тарусинов, Г.А. Кристаллографическое исследование мочи в диагностике и дифференциальной диагностике диффузных заболеваний соединительной ткани у детей / Г.А. Тарусинов // Педиатрия. - 1994. - №1. - С. 55-57.

97. Тахер, М.А. Ассад Судебно-медицинская диагностика прижизненного повешения по кристаллографической структуре биологических жидкостей: автореф. ... канд. мед. наук. Киев, - 1995. - 16 с.

98. Тимошин, А.А. Оценка уровня оксида азота в тканях органов крыс и его изменение при длительной ингаляции воздуха с повышенным содержанием оксида азота / А.А. Тимошин с соавт. // Доклады РАН. - 2009. - Т. 425. - С. 110-113.

99. Титов, В.Ю. Может ли суммарное содержание нитрита и нитрата служить показателем интенсивности синтеза оксида азота (NO) в тканях организма? / В.Ю. Титов с соавт. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2012. - Т. 153.- №6. - С. 816-819.

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

101. Ушакова Т.А. Адаптивные реакции у тяжелообожженных в условиях интенсивной терапии. Автореф. дис. ... д.м.н. М., - 2008. - 56 с.

102. Чухман Т.П. Кристаллографическое исследование слезной жидкости при воспалительных заболеваниях глаз: автореф. ... дисс. канд. мед. наук. Самара, - 2000. - 20 с.

103. Шабалин, В.Н. Морфология жидких сред глаза (новая теория инволютивного катарактогенеза). / В.Н. Шабалин с соавт. / М.: Медицина, - 2004. - 244 с.

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

105. 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.
106. 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.
107. Шумаев, К.Б. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа / К.Б. Шумаев, Н.Э. Петрова, И.В. Заббарова с соавт. // Биохимия. - 2004. - Т.69. - № 5. - С.699-705.
108. Шумаев, К.Б. Механизм ингибирования свободнорадикального окисления β -каротина S-нитрозоглутатионом и динитрозильными комплексами железа / К.Б. умаев, Э.К. Рууге, В.З. Ланкин с соавт. // Докл. РАН. - 2001. - Т. 379. - № 5. - С.702-704.
109. 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.
110. 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.
111. Almeida, A. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway / A. Almeida, S. Moncada, J.P. Bolanos // Nat. Cell Biol. - 2004. - N6. - P. 45-51.
112. 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.
113. Barrachina M.D., Panés J., Esplugues J.V. // Curr. Pharm. Des. - 2001. - Vol. 7, №1. - P. 31-48.

114. Borodulin, R.R. A simple protocol for the synthesis of dinitrosyl iron complexes with glutathione: EPR, optical, chromatographic and biological characterization of reaction products / R.R. Borodulin, L.N. Kubrina, V.O. Shvydkiy et al. // Nitric oxide. - 2013. - Vol. 35. - P. 110-115.
115. Briviba, K. Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems / K. Briviba, I.O. Klorz, H. Sics // Biol. Chem. - 1997. - Vol. 378. - P. 1259-1265.
116. Brune, B. Activation of cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents / B. Brune, E.G. Lapetina // J. Biol. Chem. - 1989. - Vol. 264. - P. 8455-8458.
117. Chazov, E.I. Hypotensive effect of Oxacom containing a dinitrosyl iron complex with glutathione. Animal studies and clinical trials on healthy volunteers / E.I. Chazov, O.V. Rodnenkov, A.V. Zorin et al // Nitric Oxide Biol. Chem. - 2012. - Vol. 26. - P. 148-156.
118. 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.
119. Chen, Z. An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation / Z. Chen, M.W. Foster, J. Zhang, L. Mao, H.A. Rockman, T. Kawamoto et al. // PNAS. - 2005. - Vol. 102. - N 34. - P. 12159-12164.
120. Cominacini L., Pasini A. F., Garbin U. et al. // JACC. - 2003. - Vol. 42. - №10. - P. 1838–1844.
121. 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.
122. 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.

123. Dimmeler, S. Nitric oxide causes ADP-ribosylation and inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase / S. Dimmeler, F. Lottspeich, B. Brune // *J. Biol. Chem.* - 1992. - Vol. 267. - P. 16771-16774.
124. Fung, H.L. Biochemical mechanism of nitroglycerin action and tolerance: is this old mystery solved? / H.L. Fung // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 2004. - Vol. 44. - P. 67-85.
125. Giliano, N.Y. et al. Dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands and apoptosis: studies with HeLa cells / N.Y. Giliano et al. // *Nitric Oxide Biol. Chem.* - 2011. - Vol. 24. - P. 151-159.
126. Godoy, L. S-Nitrosogluthathione reductase activity of amphioxus ADH3: insights into the nitric oxide metabolism / L. Godoy, R. Gonzalez-Duarte, R. Albalat // *Int. J. Biol. Sci.* - 2006. - Vol. 2. - N 3. - P. 117-124.
127. 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.
128. 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.
129. Gryglewsky, R. J. Nitric Oxide. Basic Research and Clinical / R. J. Gryglewsky, P. Minuz / Application, IOS Press, Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington, - 2001.
130. Hall, C. N. What is the real physiological NO concentration in vivo? / C. N. Hall, J. Garthwaite // *Nitric Oxide Biol. Chem.* - 2009. - Vol. 12. - P. 92-103.
131. Ignarro, L.J. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical / L.J. Ignarro, R.E. Byrns, G.M. Buga, Wood K.S. // *Circulation Research.* - 1987. - Vol. 61. - P. 866-879.

132. 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.
133. Kincella, J.P. Early inhaled nitric oxide therapy in premature newborns with respiratory failure / J.P. Kincella /// New England Journal. - 2006. - Vol. 355. - P. 354-364.
134. 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.
135. Kumar, P. Use of inhaled nitric oxide in preterm infants / P. Kumar et al. // Pediatrics. - 2014. - T. 133. - № 1. - C. 164-170.
136. Lang, B.S. Vascular bioactivation of nitroglycerin by aldehyde dehydrogenase-2: reaction intermediates revealed by crystallography and mass spectrometry / B.S. Lang, A.C. Gorren, G. Oberdorfer et al. // J. Biol. Chem. - 2012. - Vol. 287. - № 45. - P. 38124-38134.
137. LeCras, T.D. Nitric oxide production in hypoxic lung / T.D. LeCras, I.F. McMurthy // Am. J. Physiol. - 2001. - Vol. 280. - № 4. - P. 1575-1582.
138. Lee, S. Role of nitric oxide in the regulation of superoxide dismutase and prostaglandin $F_{2\alpha}$ production in bovine luteal endothelial cells / S. Lee, T.J. Acosta, Y. Nakagawa, K. Okuda // J. Reprod. Dev. - 2010. - Vol. 56. - № 4. - P. 454-459.
139. Lubart R., Malik Z., Rochkind S., Fisher T. // Laser Theor. - 1990. - Vol. 2. - №1. - P. 65–68.
140. 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.
141. Martusevich, A.K. Estimation of some molecular effects of gaseous nitrogen oxide on human blood in vitro / A.K. Martusevich, S.P. Peretyagin, A.G. Soloveva, A.F. Vanin // Biophysics. - 2013. - Vol. 58. - № 5. - P. 689-692.

142. 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.
143. 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.
144. Mathisen, D.J. Inhaled nitric oxide for adult respiratory distress syndrome after pulmonary resection / D.J. Mathisen, E.Y. Kuo, C. Hahn et al.// Ann. Thor. Surg. - 1998. - Vol. 66. - P. 1894-1902.
145. Mathisen, D.J. Inhaled nitric oxide for adult respiratory distress syndrome after pulmonary resection / D.J. Mathisen, E.Y. Kuo, C. Hahn et al. // The Annals of Thoracic Surgery. - 1998. - Vol. 66. - P. 1894-1902.
146. Mayer, B. The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate tolerance: news, views and troubles / B. Mayer, M. Beretta // British Journal of Pharmacology. - 2008. - Vol. 155. - P. 170-184.
147. McDonald, L.J. Pleiotropic effects of nitric oxide on ADP-ribosylation, covalent binding of NAD, and catalytic activity of glyceraldehyde-3-phosphate and aldehyde dehydrogenases / L.J. McDonald, J. Moss // Trans. Assoc. Am. Physicians. - 1993. - Vol. 106. - P. 155-161.
148. Mohr, S. Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase / S. Mohr, H. Hallak, de A. Boitte et al.// J. Biol. Chem. - 1999. - Vol. 274. - P. 9427-9430.
149. Moncada S., Radomski M.W., Palmer R.M.J. // Biochem. Pharmacol. - 1988. - Vol. 37. - P. 2495-2501.
150. Murad, F. The role of nitric oxide in modulating guanylyl cyclase / F. Murad // Neurotransmission. - 1994. - Vol. 10. - P. 1-4.

151. Nitric Oxide. Basic Research and Clinical Application / Ed. R.J. Gryglewsky, P. Minuz. Amsterdam; Berlin; Oxford; Tokyo; Washington: IOS Press, DC, - 2001.
152. 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.
153. 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.
154. 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.
155. 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.
156. 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.
157. 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.
158. 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.
159. 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.

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

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

162. 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.

163. 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.

164. 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,.

165. 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.

166. 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.

167. Tsou, P.-S. Differential metabolism of organic nitrates by aldehyde dehydrogenase 1a1 and 2: substrate selectivity, enzyme inactivation, and active cysteine sites / P.-S. Tsou, N.A. Page, S.G. Lee et al.// *The AAPS Journal*. - 2011. - Vol. 13. - 4. - P. 548-555.

168. Tsuura, Y. Endogenous nitric oxide inhibits glucose-induced insulin secretion by suppression of phosphofructokinase activity in pancreatic islets / Y.

Tsuura, H. Shida, T. Shinomura et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1998. - Vol. 252. - P. 34-38.

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

170. van der Vliet, A. et al. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity / A. van der Vliet et al. // *J. Biol. Chem.* - 1997. - Vol. 272. - P. 7617-7625.

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

172. 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.

173. Vanin, A.F. Prospects of designing 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.

174. Wenzl, V.M. Site-directed mutagenesis of aldehyde dehydrogenase-2 suggests three distinct pathways of nitroglycerin biotransformation / V.M. Wenzl, M. Beretta, M. Griesberger et al. // *Molec. Pharm.* - 2011. - Vol. 80. - 2. - P. 258-266.

175. 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.

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

177. Young, M.E. Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro / M.E. Young, G.K. Radda, B. Leighton // *Biochem. J.* - 1997. - Vol. 322. - P. 223-228.