

На правах рукописи

Мартусевич  
Анастасия Анатольевна

# **Метаболические и гемодинамические эффекты синглетного кислорода**

03.03.01 – физиология  
03.01.04 - биохимия

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

Казань – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» и в Ассоциации российских озонотерапевтов

- Научный руководитель** доктор биологических наук, доцент  
**Дерюгина Анна Вячеславовна**
- Научный консультант** доктор медицинских наук, профессор  
**Перетягин Сергей Петрович**
- Официальные оппоненты** **Любин Николай Александрович**  
доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой морфологии, физиологии и патологии животных ФГБОУ ВО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина»
- Костяев Андрей Александрович**  
доктор биологических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУН «Кировский институт гематологии и переливания крови ФМБА России»
- Ведущая организация** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» (г. Санкт-Петербург)

Защита состоится «11» июня 2019г. в 9<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.02 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» (420029, г. Казань, Сибирский тракт, 35)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и на сайте <http://казветакадемия.рф>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 года и размещен на сайтах <https://vak.minobrnauki.gov.ru> и <http://казветакадемия.рф>

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Резиля Ахметовна Асрутдинова

## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

**Цель исследования:** комплексная оценка биологических эффектов синглетного кислорода.

### **Задачи работы:**

1. Исследовать характер влияния синглетного кислорода на метаболические, электрокинетические и кристаллогенные свойства крови в условиях *in vitro*.
2. Раскрыть особенности метаболических сдвигов крови и тканей при ингаляционном применении газового потока, исходно содержащего синглетный кислород.
3. Оценить характер влияния ингаляций синглетного кислорода на состояние системной гемодинамики крыс
4. Изучить особенности действия газового потока от генератора синглетного кислорода на параметры микроциркуляции здоровых животных.

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

В условиях *in vitro* особенностью действия на образцы крови газового потока, исходно содержащего синглетный кислород, служит антиоксидантный эффект, влияние на промежуточное звено энергетического метаболизма, стимуляция

ферментных детоксикационных систем, стабилизирующий эффект в отношении мембран эритроцитов и прокристаллогенная активность.

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

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

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

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Синглетный кислород оказывает модулирующее действие на биологические системы.

2. В условиях *in vitro* синглетный кислород дозозависимо стимулирует антиоксидантный потенциал крови, ее энергетический потенциал, повышает электрофоретическую подвижность эритроцитов и кристаллогенную активность плазмы.

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

**Степень достоверности и апробация результатов.** Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на IX Всеросс. научно-практ. конф. с междунар. участием «Озон, активные формы кислорода, оксид азота и высокоинтенсивные физические факторы в биологии и медицине» (Нижний Новгород, 2013), XXII Съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Волгоград, 2013), 8 Национ. научно-практ. конф. с междунар. участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 2014), Междунар. симпозиуме “Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology” (Kazan, 2014), Всеросс. научн. конф. «Механизмы устойчивости и адаптации биологических систем к природным и техногенным факторам» (Киров,

2015), X Всеросс. научно-практ. конф. с междунар. участием «Озон, активные формы кислорода, оксид азота и высокоинтенсивные физические факторы в биологии и медицине» (Нижний Новгород, 2016), IX Междунар. научн. конф. «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация и материалы будущего» (Иваново, 2016), X междунар. научн. конф. «Системный анализ в медицине (САМ-2016)» (Благовещенск, 2016), I российском кристаллографическом конгрессе «От конвергенции наук к природоподным технологиям» (Москва, 2016), XII Междунар. Пироговской науч. мед. конф. студентов и молодых ученых (Москва, 2017), Междунар. конф. «Термические поражения и их последствия» (Москва, 2017).

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

### **Публикация результатов исследования**

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

**Объем и структура диссертации.** Текст диссертации изложен на 171 странице, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований, заключения и списка литературы. Список литературы включает 167 источников, в том числе 84 - отечественных и 83 - зарубежных авторов. Диссертация содержит 4 таблицы и 53 рисунка.

## **2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **2.1 Материал и методы исследования**

Работа выполнена на кафедре физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского» и в Ассоциации российский озонотерапевтов.

Исследование включает 2 этапа:

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

*II. Оценка функционального состояния организма здоровых крыс при ингаляционном применении активных форм кислорода.* Эксперимент выполнен на 60 крысах-самцах линии Вистар. Было сформировано 4 группы животных равной численности: интактная группа (n=15), включающая животных, которым не выполняли никаких манипуляций; 3 экспериментальные группы (n=15 в каждой), животные из которых получали ингаляции синглетного кислорода (при мощности генератора 50 и 100 %) или кислородно-озоновой смеси (концентрация озона – 60 мкг/л). Для проведения ингаляций животных (по одному) помещали в эксикатор, в котором осуществляли подачу и отведение газовых смесей. Курс ингаляций включал 10 сеансов продолжительностью 10 мин. каждый, проводимых ежедневно. Структура всех проведенных исследований изложена в таблице 1.

В экспериментах использовали 2 источника активных форм кислорода:

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

2. Кислородно-озоновую смесь генерировали на озонаторе «Медозонс ВМ» (Россия). Использовали концентрации 500 мкг/л (in vitro) и 60 мкг/л (для ингаляции крыс).

Таблица 1 – Объем и этапы выполненных исследований

Исследуемые факторы	Методы оценки	Количество экспериментов / исследований	Оцениваемые параметры
<i>I этап. Оценка влияния активных форм кислорода на параметры крови in vitro</i>			
Кислород, озон-кислородная смесь ( $[O_3] = 500$ мкг/л), СК при мощности 50 и 100%	Биофизические (Fe-индуцированная биохемилюминесценция)	10 / 150	Интенсивность перекисного окисления липидов и антиоксидантная активность плазмы крови, перекисная резистентность эритроцитов
	Биохимические	20 / 400	Уровень малонового диальдегида и лактата в эритроцитах и плазме, активность лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакциях, активность супероксиддисмутазы и альдегиддегидрогеназы,
	Биофизические (микроэлектрофорез)	10 / 50	Электрофоретическая подвижность эритроцитов
	Биофизические (кристаллоскопия)	10 / 50	Индекс структурности, кристаллизуемость, степень деструкции фации, выраженность краевой зоны фаций
<i>II Этап. Оценка функционального состояния организма здоровых крыс при ингаляционном применении активных форм кислорода</i>			
Озон-кислородная смесь ( $[O_3] = 60$ мг/л), СК при мощности 50 и 100%	Биофизические, биохимические (аналогично III этапу)	4 группы по 15 крыс линии Вистар / 1740 (масса тела 200-250 г)	Аналогично III этапу (в крови и тканях животных)
	Гематологические		Содержание форменных элементов в крови
	Функциональные (лазерная доплеровская флуметрия)		Показатель микроциркуляции, показатель шунтирования, роль факторов регуляции
	Функциональные (оценка вариабельности сердечного ритма)		Стандартные параметры вариабельности сердечного ритма
<b>ИТОГО</b>		<b>70 экспериментов / 2390 исследований</b>	

Примечание: СК – синглетный кислород

## **Методы исследования**

### ***Биокристалломные методы исследования сыворотки крови.***

На предварительно обезжиренное, промытое и просушенное предметное стекло наносят полученные на предыдущем этапе образцы биоматериала в объеме 0,1-0,2 мл. Для получения фации производится дегидратация микропрепарата в естественных условиях (температура 18-20<sup>0</sup>С, влажность 50-70%). Для описания результата кристаллообразования биосубстратов применялась система критериев, исключая зависимость оценки от вида биоматериала и конкретных структур фации. Для кристаллограмм параметры включали индекс структурности (ИС); кристаллизуемость (Кр); степень деструкции фации (СДФ) и выраженность краевой белковой зоны (Кз).

***Исследование процессов липопероксидации на основании изучения биохемилюминесценции плазмы крови.*** Для оценки состояния про- и антиоксидантных систем использовали интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность антиоксидантной системы (АОА) в плазме крови на биохемилюминометре БХЛ-06 (Н. Новгород) с расчетом площади под кривой интенсивности, или полной светосуммы (ПОЛ), и тангенса угла максимального наклона кривой к оси времени (АОА).

### ***Биохимические и физико-химические методы исследования***

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

Гомогенаты готовили с использованием гомогенизатора ИКА Ultra Turrax (Германия).

***Оценка параметров энергетического метаболизма эритроцитов и гомогенатов тканей.*** В качестве маркера интенсивности энергетического метаболизма эритроцитов и гомогенатов тканей использовали активность ЛДГ, а о его направленности судили по соотношению последней в прямой (ЛДГпр) и обратной (ЛДГобр) реакциях. Активность ЛДГ определяли в гемолизате эритроцитов в дистиллированной воде (1:40 по объему) по методу Г.А. Кочетова (1980). Содержание белка устанавливали по методу Лоури. Уровни глюкозы и лактата в плазме и эритроцитах оценивали с помощью анализатора SuperGL Ambulance. Сдвиги энергетического метаболизма крови оценивали по коэффициенту баланса энергетических реакций (КБЭР) [Соловьева А.Г., Зимин Ю.В., 2011]. Кроме того, в донорской крови спектрофотометрически определяли активность альдегиддегидрогеназы (АлДГ) – по методу Б.М. Кершенгольца, Е.В. Серкиной (1981).

***Определение физико-химических показателей плазмы крови.*** Определяли рН, парциальное давление газов, концентрацию основных ионов плазмы и параметры кислотно-щелочного равновесия с помощью анализатора AVL-77 (Дания).

### ***Гематологические методы исследования***

Изучали динамику содержания эритроцитов и лейкоцитов, а также уровень гематокрита и концентрацию гемоглобина. Данные показатели регистрировали на гематологическом анализаторе «АВВОТТ Cell-Dyn 3700» (Великобритания).

***Изучение электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) методом микроэлектрофореза.*** Из образцов цельной крови эритроциты выделяли

трехкратным отмыванием 0,85 % раствором хлористого натрия с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об./мин. Измерение ЭФПЭ проводили методом микроэлектрофореза в модификации В.Н. Крылова, А.В. Дерюгиной (2011). Суспензию эритроцитов (0,1 %) помещали в 10 мМ трис-НСI буфер (рН=7,4) и фиксировали перемещение клеток при силе тока 8 мА. Величину ЭФПЭ определяли по формуле:  $U=S/TH$ , где S – расстояние, на которое перемещались клетки (мкм), T – время перемещения клеток на расстояние S (с), H – градиент потенциала (В).

### ***Методы изучения микроциркуляции и сердечного ритма***

Исследование проводили под комбинированным наркозом («золетил» + «ксила»).

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

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

Исследования с участием животных соответствовали Хельсинской декларации (2000). Эксперименты с использованием животных проводились с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (№86/609/ЕЕС, Страсбург, 1986). Содержание животных и экспериментальные вмешательства осуществляли согласно приказу Минздрава СССР №775 от 12.08.1977 г. Животных кормили натуральными кормами в соответствии с утвержденными нормами.

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

## **2.2 Результаты собственных исследований**

### **2.2.1 Исследование влияния потока синглетного кислорода на физико-химические показатели крови.**

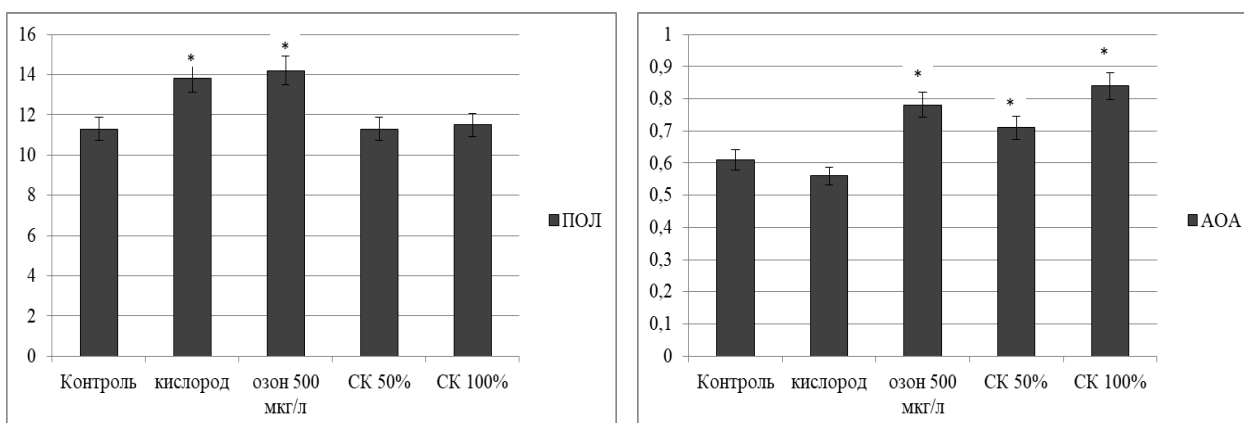
Рассмотрено действие синглетного кислорода и озона в концентрации 500 мкг/л на образцы крови *in vitro*. В первую очередь изучали эффекты активных форм кислорода в отношении состояния окислительного метаболизма, являющегося непосредственной «мишенью» для реализации их действия (рис. 1).

Установлено неодинаковое действие рассматриваемых факторов на изучаемые параметры окислительного метаболизма. Так, оксигенация и озонирование путем



воздействия на образцы крови низких концентраций озона (500 мкг/л) приводят к значимому нарастанию интенсивности процессов перекисного окисления липидов в плазме крови (на 22,1 и 25,7 % относительно контрольного уровня;  $p < 0,05$  для обоих случаев).

В то же время обработка биологической жидкости газовым потоком, исходно содержащим синглетный кислород, не вызывает существенных сдвигов светосуммы хемилюминесценции, причем эта особенность его действия не зависит от мощности генератора (рис. 1А). Иная динамика была зарегистрирована в отношении общей антиоксидантной активности плазмы крови (рис. 1Б). В частности, введение в образец биологической жидкости молекулярного кислорода обуславливает минимальное снижение антиоксидантного резерва биосреды, фиксируемое на уровне тенденции ( $p < 0,01$ ). Остальные воздействия способствовали повышению рассматриваемого параметра, однако выраженность этого сдвига зависела от вида активной формы кислорода и его концентрации. Так, низкая концентрация озона увеличивала общую антиоксидантную активность на 27,9 % ( $p < 0,05$ ). В целом, действие озono-кислородной смеси на окислительный метаболизм крови на основании биохемилюминесцентного исследования можно оценить как сбалансированное, так как имеет место пропорциональное повышение интенсивности процессов липопероксидации и антиоксидантного потенциала плазмы крови. Это подтверждает данные проведенных ранее исследований (Перетягин С.П. с соавт., 2012).



А. Интенсивность липопероксидации

Б. Общая антиоксидантная активность

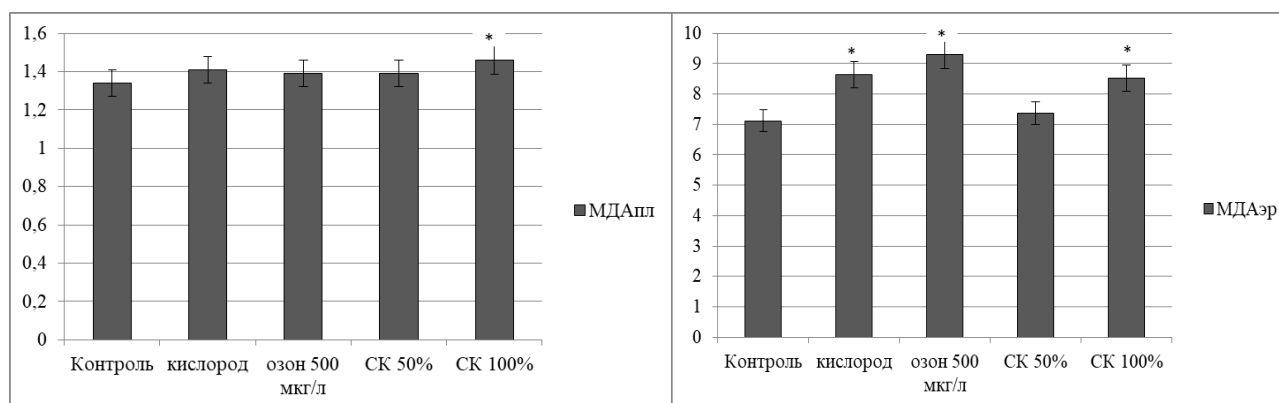
Рисунок 1 - Перекисное окисление липидов и антиоксидантная активность в плазме крови после обработки активными формами кислорода *in vitro* (\* -  $p < 0,05$ )

Обработка крови здоровых людей газовой смесью, содержащей синглетный кислород, инициирует ярко выраженное дозозависимое действие на антиоксидантный потенциал биологической жидкости. Так, если использование половинной мощности генератора обуславливает увеличение антиоксидантных свойств биосреды только на 16,4 % ( $p < 0,05$  по сравнению с контрольным образцом), то барботаж крови газовым потоком при 100 % мощности аппарата приводит к повышению значения показателя уже на 37,7 % по отношению к интактному уровню ( $p < 0,05$ ).

Нами произведена оценка состояния процессов липопероксидации в мембранах эритроцитов. Установлено, что наиболее существенно увеличивает перекисную резистентность эритроцитов оксигенация образцов крови (на 30,6 % относительно интактного образца;  $p < 0,05$ ), что вполне сочетается с результатами

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

В качестве дополнительного критерия состояния окислительного метаболизма крови нами использован уровень одного из наиболее широко информативных показателей интенсивности процессов перекисного окисления липидов – концентрации малонового диальдегида в плазме крови и эритроцитах (рис. 2). Установлено, что все изучаемые воздействия не оказывают существенного влияния на плазменный уровень рассматриваемого показателя, увеличиваясь по завершении обработки образцов биологической жидкости не более чем на 10 % относительно интактных значений. При этом в наибольшей степени возрастает концентрация метаболита в плазме крови при введении в биосреду газового потока от генератора синглетного кислорода при применении его 100 % мощности (на 9 % относительно интактного образца;  $p < 0,05$ ).



*А. Уровень в плазме*

*Б. Уровень в эритроцитах*

Рисунок 2 - Концентрация малонового диальдегида в плазме крови и эритроцитах при воздействии активных форм кислорода *in vitro* (\* -  $p < 0,05$ )

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

При применении 50 % мощности генератора синглетного кислорода не отмечали стимуляции перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов, тогда как использование 100 % мощности аппарата обуславливало значимое увеличение концентрации малонового диальдегида в них (на 19,7 % по сравнению с интактным образцом крови;  $p < 0,05$ ).

Выявлено, что исследуемые активные формы кислорода оказывают неодинаковое влияние на каталитические свойства одного из основных антиоксидантных ферментов - супероксиддисмутазы эритроцитов (рис. 3). Так, оксигенация крови инициирует угнетение активности данного фермента (на 33,7 % относительно контрольного образца;  $p < 0,05$ ), а обработка его низкой концентрацией озона практически не изменяет ее. Введение в биожидкость синглетного кислорода, образованного при 50 % мощности аппарата приводит к нарастанию активности супероксиддисмутазы на 15,6 % ( $p < 0,05$ ). Увеличение мощности генератора до 100 % приводит к более выраженной стимуляции параметра (+32,1 % к интактному уровню;  $p < 0,05$ ), что свидетельствует об активации антиоксидантной системы крови, превалирующей над инициацией липопероксидации, при действии данной активной формы кислорода.

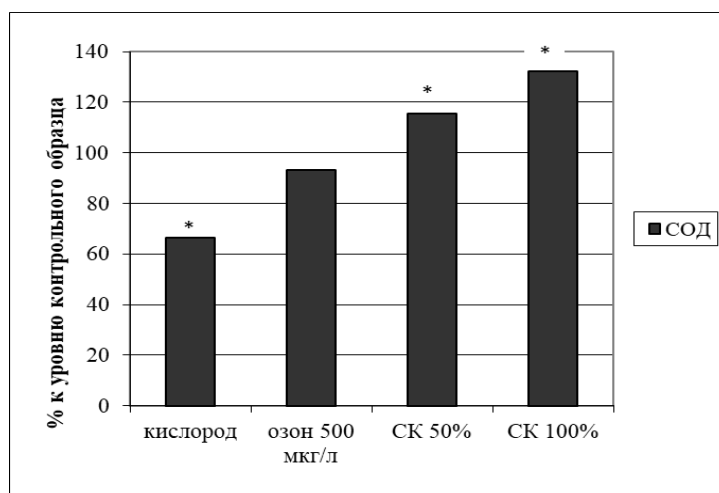


Рисунок 3 - Активность супероксиддисмутазы эритроцитов при действии различных активных форм кислорода *in vitro* (в % к уровню интактного образца, принятого за 100%; \* -  $p < 0,05$ )

Таким образом, эксперименты *in vitro* позволяют сделать вывод о наличии у синглетно-кислородной газовой смеси антиоксидантных свойств, причем приведенный эффект является дозозависимым.

Установлено, что все изученные активные формы кислорода (АФК) обуславливают нарастание активности ЛДГ в прямой реакции в сочетании с умеренным угнетением обратной. В то же время выраженность этого эффекта для различных факторов существенно варьирует. В частности, кислород и низкие дозы озона (500 мкг/л) преимущественно оказывают ингибирующее влияние на обратную реакцию ЛДГ ( $p < 0,05$ ), тогда как обе изучаемые концентрации СК значимо и позитивно модифицируют режим функционирования ЛДГ, повышая активность фермента в прямой реакции и снижая ее – в обратной ( $p < 0,05$ ). Следует отметить, что эти сдвиги в большей степени обеспечиваются активацией прямой реакции. Важно, что указанные процессы сопряжены с изменением внутриэритроцитарной концентрации лактата, существенно уменьшающейся при действии всех изучаемых АФК ( $p < 0,05$  для всех случаев). Это обусловлено повышенным расходом лактата в условиях данного варианта активации ЛДГ.

Интерес представляет тот факт, что под влиянием всех изучаемых АФК происходит снижение уровня глюкозы в эритроцитах (на 65-75 % относительно значений, характерных для крови, с которой не проводили никаких манипуляций;

$p < 0,05$ ), хотя плазменная концентрация соединения практически не изменяется. По нашему мнению, это может быть обусловлено его повышенной утилизацией в энергетическом обмене, стимулированном изучаемыми окислителями.

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

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

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

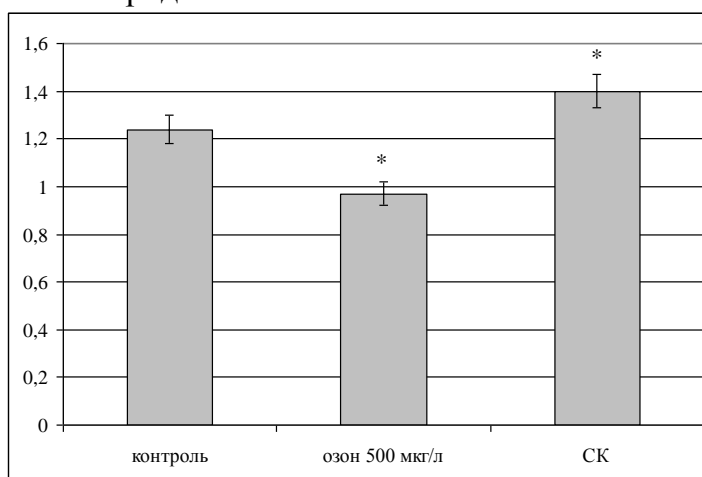


Рисунок 4 - Электрофоретическая подвижность эритроцитов (мкм·см·В<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>) при действии активных форм кислорода (\* -  $p < 0,05$ )

Ранее нашими исследованиями и работами других авторов было показано, что электрофоретическая подвижность эритроцитов (ЭФПЭ), являющаяся количественной мерой их электрокинетического потенциала, может рассматриваться как неспецифический индикатор состояния эритрона и его реакции на изменения гомеостаза и внешние воздействия на организм (Крылов В.Н. с соавт., 2005, 2009, 2015; Дерюгина А.В. с соавт., 2013, 2015). В то

же время относительно АФК подобные сведения имеются для озона, причем они приводятся только в единичных публикациях (Симулис И.С. с соавт., 2014).

Установлено, что изучаемые экзогенные биорадикалы оказывают неодинаковое влияние на ЭФПЭ крови человека. Так, озон и синглетный кислород изменяют данный показатель, однако эти сдвиги разнонаправлены (рис. 4). В частности, барботирование крови озono-кислородной смесью с концентрацией озона 500 мкг/л, что соответствует низким терапевтическим дозам (Перетягин С.П. с соавт., 2009), инициирует существенное снижение значения параметра (на 22 %;  $p < 0,05$  по сравнению с контрольным образцом), тогда как обработка биологической жидкости синглетно-кислородной газовой смесью вызывает умеренное повышение уровня ЭФПЭ (на 13 % относительно контроля;  $p < 0,05$ ). Это обусловлено тем обстоятельством, что даже небольшие количества озона, введенные в биосреду, обеспечивают стимуляцию процессов липопероксидации (Перетягин С.П. с соавт., 2012), приводя к структурным перестройкам мембраны эритроцитов и, следовательно, изменению их электрокинетического потенциала.

Обнаружено, что обе активных формы кислорода оказывают модулирующее воздействие на кристаллогенные свойства биожидкости, причем этот эффект специфичен для озono-кислородной смеси и газового потока, исходно содержащего синглетный кислород (рис. 5). Так, по основному количественному параметру кристаллизации биосреды – кристаллизуемости – для изучаемых факторов зарегистрирована единая тенденция, заключающаяся в увеличении плотности кристаллических элементов. В то же время выраженность данной тенденции неодинакова: в большей степени она проявляется для синглетного кислорода, чем для озono-кислородной смеси (+54,0 и +37,8 % относительно контрольного образца соответственно;  $p < 0,05$  для обоих воздействий).

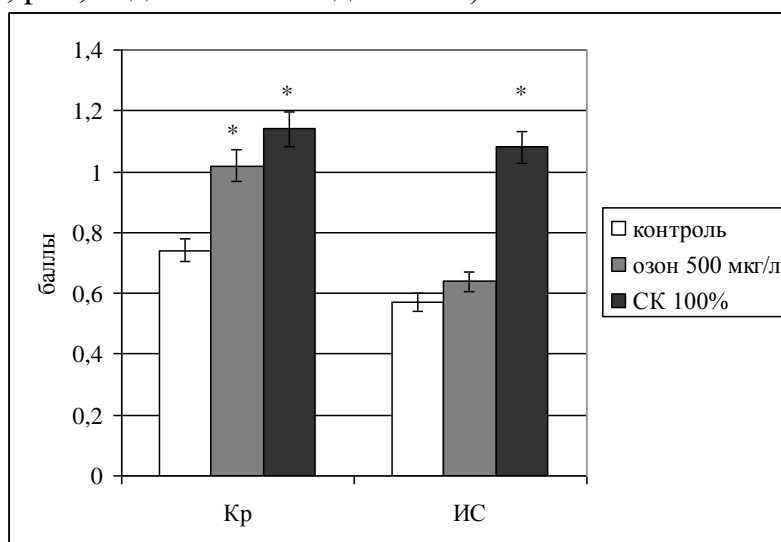


Рисунок 5 - Влияние озона и синглетного кислорода на уровень кристаллизуемости (Кр) и индекса структурности (ИС) в фациях плазмы крови при обработке *in vitro* (\* -  $p < 0,05$ )

Специфичность ответа плазмы крови на обработку различными источниками радикалов реализуется и в отношении индекса структурности, который характеризует сложность морфологии формирующихся кристаллических фигур (рис. 5). Выявлено, что обработка биожидкости озono-кислородной смесью не способствует усложнению структурных элементов, тогда как применение газового

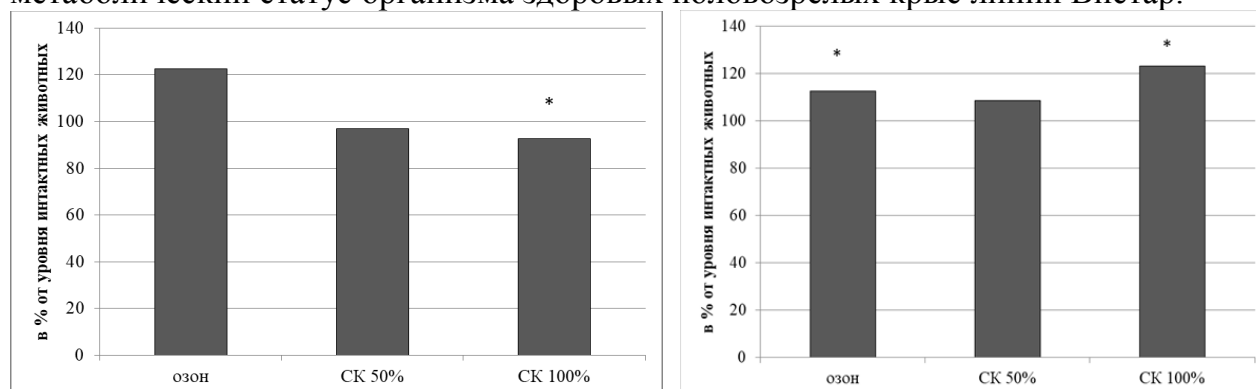
потока от генератора синглетного кислорода обеспечивает значительное повышение уровня параметра (на 89,5 % по сравнению с контрольным образцом;  $p < 0,05$ ). Морфологически эти сдвиги реализуются как обнаружение в микропрепаратах биосреды единичных дендритных элементов, отсутствующих в контрольных фациях.

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

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

### 2.2.2 Оценка метаболических и гемодинамических эффектов активных форм кислорода при их ингаляционном применении

На третьем этапе работы был выполнен сравнительный анализ особенностей влияния ингаляций синглетного кислорода и озона на функционально-метаболический статус организма здоровых половозрелых крыс линии Вистар.



*А. Интенсивность липопероксидации*

*Б. Антиоксидантная активность*

Рисунок 6 - Интенсивность липопероксидации и общая антиоксидантная активность в плазме крови крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (\* -  $p < 0,05$  по отношению к интактным животным; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100 %)

Проведенные исследования позволили комплексно охарактеризовать состояние окислительного метаболизма крови и тканей крыс при ингаляционном применении активных форм кислорода. Так, на основании данных биохемилюминесцентного анализа установлено, что изучаемые воздействие

оказывают неодинаковое влияние на интенсивность процессов перекисного окисления липидов в плазме крови животных (рис. 5А). В частности, ингаляции озono-кислородной смеси существенно стимулируют их (на 22,7 % относительно интактной группы;  $p < 0,05$ ), тогда как использование синглетного кислорода либо не изменяет данный показатель (при мощности генератора 50 %), либо умеренно его снижает (на 7,3 % при 100 % мощности прибора;  $p < 0,05$  по сравнению со здоровыми животными).

Напротив, в отношении общей антиоксидантной активности плазмы крови все исследуемые ингаляционные воздействия демонстрируют единую динамику изменения (рис. 6Б). Так, курс ингаляций озono-кислородной смеси способствует статистически значимой активации антиоксидантного потенциала плазмы крови (на 12,5 % относительно интактных крыс;  $p < 0,05$ ), что частично компенсирует прооксидантный эффект рассматриваемого фактора, проявляющийся в сдвигах интенсивности липопероксидации. Ингаляции синглетно-кислородной смеси при мощности генератора 50 % не оказывают значимого влияния на общую антиоксидантную активность биологической жидкости, тогда как использование полной мощности прибора демонстрирует наиболее существенному повышению антиокислительной способности плазмы крови крыс (на 23,1 % по сравнению с животными интактной группы;  $p < 0,05$ ). Это в совокупности с ингибирующим действием данного фактора на интенсивность свободнорадикальных процессов в ней указывает на антиоксидантные свойства ингаляций синглетного кислорода при 100 % мощности генератора.

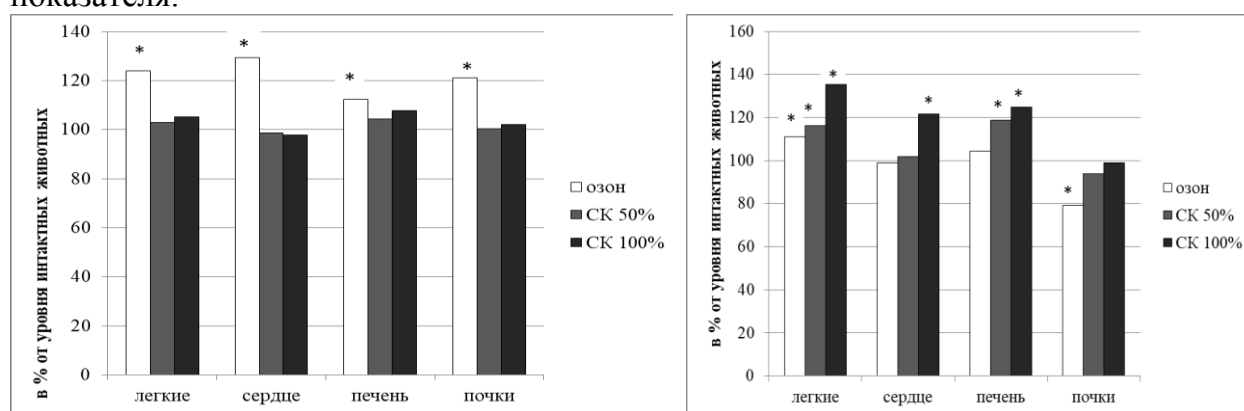
Выявлено, что изучаемые агенты оказывают разнонаправленное влияние и на концентрацию малонового диальдегида в плазме крови и эритроцитах. Так, проведение курса ингаляций озона обеспечивает существенное нарастание значения параметра в плазме крови (на 41,7 % по сравнению с крысами интактной группы;  $p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

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

Установлено, что активность супероксиддисмутазы эритроцитов значимо ингибируется по окончании курса ингаляционного применения озono-кислородной смеси (на 17,8 % относительно крыс интактной группы;  $p < 0,05$ ). Напротив, использование синглетно-кислородной газовой смеси обеспечивало активацию каталитических свойств энзима, зависящую от мощности генератора. Так, при применении половинной мощности эти сдвиги были зафиксированы на уровне тенденции (возрастание на 8,7 %;  $p < 0,1$ ), тогда как полная мощность прибора

способствовала существенному увеличению активности супероксиддисмутазы (на 57,3 % по сравнению с животными, включенными в интактную группу;  $p < 0,05$ ).

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



*А. Интенсивность липопероксидации*

*Б. Антиоксидантная активность*

Рисунок 7 - Интенсивность липопероксидации и антиоксидантная активность в тканях органов крыс при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (\* -  $p < 0,05$  по отношению к интактным животным; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100 %)

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

В гомогенатах сердца существенные сдвиги общей антиоксидантной активности были зарегистрированы только по завершении курса ингаляций синглетно-кислородной газовой смеси, образованной при 100 % мощности прибора



(увеличение в 1,22 раза по сравнению с крысами, с которыми не проводили никаких дополнительных манипуляций;  $p < 0,05$ ). В гомогенатах печени крыс стимуляцию антиоксидантного потенциала наблюдали только при применении синглетно-кислородной смеси. Фиксировали увеличение значения параметра на 18,6 и 24,8 % при мощностях генератора 50 и 100 % соответственно ( $p < 0,05$  для обоих случаев), что свидетельствует о дозозависимости выявленного эффекта. Следует отметить, что использование озono-кислородной смеси не оказывало существенного действия на рассматриваемый показатель.

Обратную динамику наблюдали при изучении общей антиоксидантной активности гомогенатов почек крыс. В этом органе статистически значимые сдвиги регистрировали только по завершении курса ингаляций озono-кислородной смеси, для которых было характерно снижение уровня показателя на 20,7 % относительно животных интактной группы ( $p < 0,05$ ).

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

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

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

Выявлено, что под влиянием курса ингаляций озono-кислородной смеси происходит увеличение уровня лактата плазмы на 34,8 % по сравнению с крысами интактной группы ( $p < 0,05$ ), что объясняется превалированием обратной реакции лактатдегидрогеназы над прямой в этом случае.

Проведение курса воздействия синглетно-кислородной смеси, инициируя активацию прямой реакции лактатдегидрогеназы, обеспечивает утилизацию в ней лактата, что приводит к снижению его плазменной концентрации. При использовании 50% мощности прибора наблюдали лишь умеренное снижение концентрации метаболита в плазме крови по сравнению с животными интактной

группы (на 8,5 %;  $p < 0,05$ ), тогда как при применении полной мощности аппарата (100 %) указанная тенденция выражена более существенно ( $-15,3$  %;  $p < 0,05$ ).

Известно, что уровень гликемии является результирующей состоянием энергетического метаболизма крови и тканей (Halliwell B.; Gutteridge J.M.C., 1999; Genestra M., 2007). Нашими исследованиями показано, что применение курсов ингаляций озono-кислородной и синглетно-кислородной газовых смесей (при полной мощности генератора) способствует снижению уровня глюкозы в плазме крови на 17,4 и 24,7 % относительно крыс интактной группы соответственно ( $p < 0,05$  для обоих случаев). В то же время проведение ингаляций синглетно-кислородной смеси при использовании половинной мощности аппарата не вызывает значимых изменений уровня глюкозы в плазме крови.

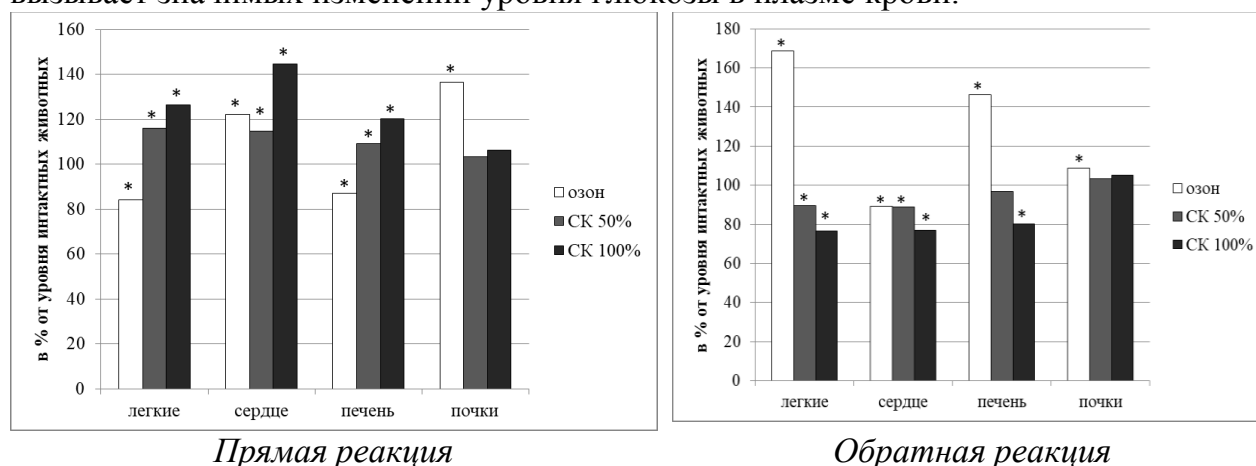


Рисунок 8 - Активность лактатдегидрогеназы тканей крыс в прямой и обратной реакциях при проведении курса ингаляций активных форм кислорода (\* - по отношению к интактным животным  $p < 0,05$ ; данные приведены в % от уровня, выявленного для интактных крыс, принятого за 100 %)

Выявлено, что рассматриваемые активные формы кислорода оказывают разнонаправленное влияние на активность лактатдегидрогеназы тканей крыс в прямой реакции (рис. 8). В частности, в гомогенатах легких применение озono-кислородной смеси способствует снижению уровня параметра на 15,8 % относительно животных интактной группы ( $p < 0,05$ ), в то время как воздействие интермедиатов синглетного кислорода на легочную ткань сопровождается возрастанием прямой реакции фермента в ней, причем эта тенденция дозозависима. Так, использование 50 % мощности генератора повышает активность энзима на 16% по сравнению с крысами, с которыми не производили никаких манипуляций ( $p < 0,05$ ), при 100 % мощности прибора – на 26,5 % соответственно ( $p < 0,05$ ).

В гомогенатах сердца активность лактатдегидрогеназы в прямой реакции возрастала при всех тестируемых воздействиях, однако выраженность данного эффекта существенно варьировала. Так, курсы ингаляций озono-кислородной смеси и синглетно-кислородной газовой смеси (при 50 % мощности генератора) примерно в равной степени стимулировали каталитические свойства фермента в прямой реакции (на 22,2 и 14,8 % относительно интактных крыс соответственно;  $p < 0,05$  для обоих факторов), тогда как применение синглетно-кислородной смеси при полной мощности аппарата демонстрировало более отчетливое активирующее действие на прямую реакцию лактатдегидрогеназы (+44,6 %;  $p < 0,05$ ). Характер модификации каталитических свойств рассматриваемого энзима в гомогенатах печени был в целом сопоставим с описанным для образцов ткани легких, однако

амплитуда сдвигов показателя в данном органе была несколько ниже, чем в последних. Наконец, особая динамика активности изучаемого фермента энергетического метаболизма была зарегистрирована в образцах ткани почек. Установлено, что в гомогенатах ткани указанного органа существенное изменение значения параметра по сравнению с интактными животными имело место лишь при использовании для ингаляций озono-кислородной смеси (на 36,4 %;  $p < 0,05$ ).

Вариабельность действия различных активных форм кислорода на каталитические свойства лактатдегидрогеназы в обратной реакции также определялась их типом. Так, в ткани легких активность фермента в обратной реакции существенно возрастала (на 68,7 % относительно интактных животных;  $p < 0,05$ ). Напротив, при действии синглетно-кислородной газовой смеси каталитические свойства энзима в обратной реакции умеренно ингибируются (на 10,5 и 23,5 % при 50 и 100 % мощностях генератора соответственно;  $p < 0,05$  для обоих случаев). Подобные, но меньшие по модулю изменения зафиксированы в ткани печени, что аналогично сдвигам, установленным для прямой реакции фермента в данном органе. Кроме того, единая тенденция к угнетению каталитических свойств лактатдегидрогеназы в обратной реакции отмечена при действии рассматриваемых активных форм кислорода в гомогенатах ткани сердца. При этом наиболее значительное снижение выявлено при действии синглетно-кислородной смеси, образованной при полной мощности аппарата (на 23,2 % относительно интактных животных;  $p < 0,05$ ). Остальные воздействия были менее значимы и сопоставимы по интенсивности ингибирующего эффекта. Таким образом, активные формы кислорода при ингаляционном применении оказывают неодинаковое влияние на состояние энергетического обмена в тканях животных, причем синглетно-кислородная газовая смесь обладает стимулирующим действием на него, тогда как озono-кислородная смесь активизирует энергетический обмен в сердце и почках, угнетая его в легких и печени.

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

Кроме того, в рамках третьего этапа исследования изучены особенности модификации электрокинетического потенциала эритроцитов крыс при системном воздействии АФК. Нами обнаружено, что проведение курса ингаляций озона способствует значительному снижению ЭФПЭ (на 30 % относительно контрольной группы;  $p < 0,01$ ), что согласуется с результатами эксперимента *in vitro*. Напротив, проведение ингаляций синглетного кислорода обеспечивает стимуляцию подвижности эритроцитов, причем использование 100 % мощности генератора данной активной формы кислорода приводило к достаточно существенному

смещению уровня параметра (+13 %;  $p < 0,05$  по сравнению с интактными животными), тогда как при использовании 50 % режима наблюдали сохранение физиологического уровня электрофоретической подвижности эритроцитов.

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

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

### 3 Заключение

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

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

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

3. При ингаляционном применении синглетного кислорода, по параметрам окислительного и энергетического метаболизма наблюдали тканеспецифичный ответ. Его особенности при действии 100 % мощности генератора включают выраженное повышение антиоксидантной активности в ткани легких, сердца и печени (на 35,2; 22,0 и 24,8 % соответственно). Кроме того, после курса ингаляций синглетного кислорода в данном режиме фиксировали активацию прямой реакции

лактатдегидрогеназы на 26,5; 44,6 и 36,4 % и ингибирование обратной реакции фермента на 23,5; 23,2 и 19,9 % в гомогенатах легких, сердца и печени соответственно.

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

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

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

(\* - публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ; # - публикации в изданиях, индексируемых в базах цитирования *Web of Science* и *Scopus*)

1. Крылов, В.Н. Изменение электрофоретической подвижности эритроцитов и липидного спектра их мембран при различных стрессовых воздействиях / В.Н. Крылов, А.В. Дерюгина, А.А. Гришина (Мартусевич) // Гематология и трансфузиология. – 2010. - №3. – С. 40-43. \* #

2. Перетягин, С.П. Лабораторные животные в экспериментальной медицине / С.П. Перетягин, А.К. Мартусевич, А.А. Гришина (Мартусевич), А.Г. Соловьева, Ю.В. Зимин. - Нижний Новгород: ФГУ «ННИИТО» МЗСР РФ, 2011. – 300 с.

3. Мартусевич, А.А. Влияние синглетного кислорода на про- и антиоксидантную активность плазмы крови *in vitro* / А.А. Мартусевич // Тез. докл. VI конф. молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем». – Иваново. – 2011. – С. 88.

4. Мартусевич, А.А. Молекулярные и клеточные механизмы действия синглетного кислорода на биосистемы / А.А. Мартусевич, С.П. Перетягин, А.К. Мартусевич // Современные технологии в медицине. – 2012. - №2. – С. 128-134. \* #

5. Мартусевич, А.К. Оценка вариабельности сердечного ритма при проведении курсовой ингаляционной озонотерапии в эксперименте / А.К. Мартусевич, А.А. Мартусевич, С.П. Перетягин, Л.В. Ошевский, П.В. Перетягин // Вестник физиотерапии и курортологии. – 2012. – Т. 17, №5. – С. 31-32.

6. Мартусевич, А.А. Влияние ингаляций озono-кислородной смеси на показатели красной крови в эксперименте / А.А. Мартусевич // Вестник физиотерапии и курортологии. – 2012. – Т. 17, №5. – С. 30-31.

7. Перетягин, С.П. Оценка эффекта различных доз озона на процессы липопероксидации и кислородообеспечение крови *in vitro* / С.П. Перетягин, К.Н. Конторщикова, А.А. Мартусевич // Медицинский альманах. – 2012. - №2. – С. 101-104. \*

8. Перетягин, С.П. Изучение некоторых дозозависимых эффектов озона в отношении процессов липопероксидации и антиоксидантной системы крови и печени крыс / С.П. Перетягин, С.Ю. Большухин, А.А. Мартусевич, А.К. Мартусевич // Медицина и образование в Сибири (электронный журнал). – 2012. - №6. URL: [http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text\\_full.php?id=880](http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=880). \*

9. Мартусевич, А.А. Влияние ингаляций синглетного кислорода на состояние про- и антиоксидантных систем крови и энергетический метаболизм / А.А. Мартусевич, А.Г. Соловьева, А.К. Мартусевич // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156, №7. – С. 51-53. \* #

10. Мартусевич, А.А. Влияние активных форм кислорода на состояние энергетического обмена в крови и тканях животных / А.А. Мартусевич, А.Г. Соловьева, А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин // Медицинский альманах. – 2013. - №3. – С. 64-65. \*

11. Перетягин, С.П. Влияние ингаляций активными формами кислорода на про- и антиоксидантный баланс в легких экспериментальных животных / С.П. Перетягин, О.В. Костина, А.А. Мартусевич, Н.В. Диденко // Медицинский альманах. – 2013. - №3. – С. 65-67. \*
12. Мартусевич, А.А. Особенности действия синглетного кислорода и озона на процессы липопероксидации и антиоксидантную систему крови и тканей крыс / А.А. Мартусевич, А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99, №9. – С. 1057-1066. \*#
13. Мартусевич, А.К. Изучение влияния некоторых активных форм кислорода на физико-химические показатели крови / А.К. Мартусевич, А.А. Мартусевич, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин // Биофизика. – 2014. – Т. 59, вып. 2. – С. 369-372. \*#
14. Soloveva, A.G. Research of the energy metabolism parameters in rats when inhaled by reactive oxygen species / A.G. Soloveva, A.A. Martusevich, A.K. Martusevich, S.P. Peretyagin // International Journal of Applied and Fundamental Research. – 2014. – №1 – URL: [www.science-sd.com/456-24494](http://www.science-sd.com/456-24494) (02.04.2014).
15. Martusevich, A.A. Effects of ozone and singlet oxygen inhalations to oxidative metabolism in rats / A.A. Martusevich, S.P. Peretyagin, A.K. Martusevich // Revista Espaniola de Ozonoterapia. – 2014. – Vol. 4, N 3. – P. 76.
16. Martusevich, A.K. Functional and metabolic effects of nitric oxide and reactive oxygen species inhalations / A.K. Martusevich, S.P. Peretyagin, A.A. Martusevich, A.G. Soloveva, P.V. Peretyagin // Proc. of Intern. Symp. “Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology”. – Kazan, Russia. – 21-23 September 2014. – P. 44-45.
17. Мартусевич, А.А. Влияние синглетного кислорода на антиоксидантную активность плазмы крови *in vitro* и *in vivo* / А.А. Мартусевич // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2014. – Т. 1, №1. – С. 55-58.
18. Мартусевич, А.К. Молекулярные O<sub>2</sub> биосенсоры: теоретические и прикладные аспекты / А.К. Мартусевич, А.Г. Самodelкин, А.А. Мартусевич, А.Г. Соловьева // Фундаментальные исследования. - 2014. - №12. – С. 1926-1932. \*
19. Martusevich, A.A. Comparative study of action of ozone and singlet oxygen on blood oxidative metabolism *in vitro* / A.A. Martusevich, A.K. Martusevich, S.P. Peretyagin // Book of abstracts of 22nd World Congress & Exhibition “Ozone and Advanced Oxidation. Leading-edge science and technologies”. - 28 June — 3 July 2015. - Barcelona, Spain. - P. 37.
20. Дерюгина, А.В. Влияние хронического стресса на электрокинетические свойства и окислительный метаболизм эритроцитов / А.В. Дерюгина, А.А. Мартусевич, Е.А. Антипенко, Т.А. Веселова // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2015. – Т. 2, №2. – С. 26-35.
21. Мартусевич, А.А. Исследование действия источников активных форм кислорода на физико-химические свойства воды / А.А. Мартусевич, Л.К. Ковалева // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2015. – Т. 2, №2. – С. 48-51.
22. Дерюгина, А.В. Молекулярно-клеточные механизмы реализации стресс-реакции организма / А.В. Дерюгина, А.А. Мартусевич, Т.А. Веселова // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2015. - №3. – С. 58-63. \*
23. Martusevich, A.K. Comparative study of action of ozone and singlet oxygen on blood oxidative metabolism *in vitro* / A.K. Martusevich, A.A. Martusevich, A.V. Derugina, L.K. Kovaleva // Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences. Section. B: Biological Sciences. – 2015. – Vol. 5, N4. – P. 4058-4046. \*#
24. Мартусевич, А.А. Анализ газового потока, генерируемого аппаратом для синглетно-кислородной терапии / А.А. Мартусевич, Р.Л. Веснин, А.К. Мартусевич, А.А. Алалыкин // Мат. докл. V Съезда биофизиков России. – Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета. – 2015. – Т. 2. – С. 101.
25. Мартусевич, А.А. Динамика некоторых гематологических показателей при ингаляциях активными формами кислорода / А.А. Мартусевич, А.В. Дерюгина, Л.К.

- Ковалева, А.К. Мартусевич // Международный научно-исследовательский журнал. – 2015. - №10, Ч. 3. – С. 104-105. \*
26. Мартусевич, А.А. Экспериментальное изучение состояния системы глутатиона крови при различных стрессирующих воздействиях / А.А. Мартусевич, А.В. Дерюгина // Биорадикалы и антиоксиданты. - 2015. - Том 2, №3. - С. 38-44.
27. Мартусевич, А.К. Влияние длительного курса ингаляций синглетного кислорода на кристаллогенные свойства сыворотки крови / А.К. Мартусевич, Л.К. Ковалева, А.А. Мартусевич, А.П. Макаров // Врач-аспирант. – 2015. – №6.1. – С. 186-191. \*
28. Мартусевич, А.К. Экспериментальная оценка состояния микроциркуляции при ингаляциях озона и синглетного кислорода / А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин, А.А. Мартусевич // Тез. докл. VI Всеросс. с междунар. участием школы-конференции «Физиология кровообращения». – Москва. – 2016. – С. 98-99.
29. Мартусевич, А.К. Кристаллоскопическая оценка реадaptивного потенциала ингаляций синглетного кислорода в послеожоговой метаболической реабилитации / А.К. Мартусевич, А.В. Разумовский, Л.К. Ковалева, А.А. Мартусевич // Врач-аспирант. – 2016. - №2.1. – С. 194-200. \*
30. Мартусевич, А.К. Влияние ингаляций активных форм кислорода на состояние системной и локальной гемодинамики крыс / А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин, А.А. Мартусевич, П.В. Перетягин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 161, №5. – С. 572-575. \*#
31. Martusevich, A.A. Functional state of rat's erythrocytes under different stress conditions / A.A. Martusevich, A.V. Deryugina, A.K. Martusevich // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2016. - Vol. 12, №3. - P. 5-11. \*
32. Martusevich, A.K. Biocrystallomics methods in estimation of the action of different stress factors / A.K. Martusevich, A.A. Martusevich, L.K. Kovaleva // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2016. - Vol. 12, №3. - P. 12-17. \*
33. Мартусевич, А.К. Влияние ингаляций синглетного кислорода на состояние микроциркуляции у здоровых крыс / А.К. Мартусевич, П.В. Перетягин, А.А. Мартусевич, С.П. Перетягин // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2016. – Т. 3, №3. – С. 72-74.
34. Мартусевич, А.К. Изучение влияния ингаляций активных форм кислорода на состояние микроциркуляции у крыс / А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин, А.А. Мартусевич, П.В. Перетягин // Лазерная медицина. – 2016. – Т. 20, №3. – С. 106. \*
35. Разумовский, А.В. Сопоставление реабилитационного потенциала ингаляций активных форм кислорода и оксида азота / А.В. Разумовский, А.К. Мартусевич, А.А. Мартусевич // Успехи современной науки и образования. – 2016. - №11, Т. 6. – С. 138-140\*
36. Мартусевич, А.К. Кристаллоскопический мониторинг эффективности метаболической реабилитации, осуществляемой с применением активных форм кислорода и азота / А.К. Мартусевич, А.В. Разумовский, Л.К. Ковалева, А.А. Мартусевич // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т. 16, №4. – С. 107-108. \*
37. Разумовский, А.В. Экспериментальная оценка проадаптивных эффектов ингаляций синглетного кислорода / А.В. Разумовский, А.К. Мартусевич, А.А. Мартусевич, С.П. Перетягин, А.В. Дмитроченков // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2016. №4. Публикация 7-7. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2016-4/7-7.pdf> \*
38. Мартусевич, А.А. Оценка модулирующего эффекта активных форм кислорода в отношении процессов липопероксидации плазмы крови / А.А. Мартусевич, А.К. Мартусевич, А.В. Дерюгина // Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке». – 2016. – Т. 18, №12. – С. 28-31.
39. Дерюгина, А.В. Электрофоретическая подвижность эритроцитов при воспалении / А.В. Дерюгина, А.А. Мартусевич, Ю.Н. Хламова, С.С. Куваева, Н.Ю. Тарасова, А.К. Мартусевич // Вятский медицинский вестник. – 2016. - №4. – С. 57-60. \*

40. Мартусевич, А.К. Особенности адаптации эритроцитов крыс к длительному воздействию низких доз оксида азота / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, А.А. Мартусевич // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. - №1. - С. 114-119. \*

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

42. Мартусевич, А.К. Сравнительная оценка влияния длительного курса ингаляций оксида азота и активных форм кислорода на кристаллогенные свойства сыворотки крови крыс / А.К. Мартусевич, А.А. Мартусевич, Л.К. Ковалева // Биофизика. – 2017. – Т. 62, №4. – С. 753-759. \*#

43. Martusevich, A.A. The influence of different stress conditions on some parameters of erythrocyte oxidative metabolism / A.A. Martusevich, A.V. Deryugina, A.K. Martusevich // International Journal Of Applied And Fundamental Research. – 2017. – № 3 – URL: [www.science-sd.com/471-25233](http://www.science-sd.com/471-25233)

44. Мартусевич, А.К. Лазерная доплерометрия в оценке реакции микроциркуляции на продолжительное ингаляционное применение оксида азота / А.К. Мартусевич, П.В. Перетягин, А.А. Мартусевич, С.П. Перетягин // Биофизика. – 2017. – Т. 62, №5. – С. 1036-1040. \*#

45. Martusevich, A.K. Bioregulatory and sanogenic effects of dinitrosyl iron complexes with glutathione ligands at experimental thermal trauma / A.K. Martusevich, A.G. Soloveva, A.A. Martusevich // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2017. – Vol. 41, Suppl. – P. 82. \*#

46. Мартусевич, А.К. Исследование продуктов, генерируемых аппаратом для синглетно-кислородной терапии / А.К. Мартусевич, А.А. Мартусевич, Р.Л. Веснин, А.А. Алалыкин // Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология. – 2017. – Т. 7, №3. – С. 27-38. \*#

47. Мартусевич, А.А. Влияние ингаляций синглетного кислорода на кристаллогенные свойства сыворотки крови крыс с экспериментальной термической травмой / А.А. Мартусевич, А.К. Мартусевич, П.В. Перетягин // Сб. тез. II Всерос. молодежной конф. «Проблемы и достижения химии кислород- и азотсодержащих биологически активных соединений». – Уфа: РИЦ БашГУ. – 15-18 ноября 2017 г. - С. 180-182.

48. Мартусевич, А.К. Биомедицина оксида азота (NO): функционально-метаболические аспекты / А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин, А.Г. Самоделькин, А.Г. Соловьева, А.А. Мартусевич, М.Н. Иващенко. - Нижний Новгород: ФГБОУ ВО «Нижегородская ГСХА», 2017. – 261 с.

49. Мартусевич, А.К. Изучение влияния динитрозильных комплексов железа на некоторые физико-химические свойства сыворотки крови крыс / А.К. Мартусевич, Л.К. Ковалева, А.А. Мартусевич // Микроэлементы в медицине. – 2017. – Т. 18, №4. – С.18-21.\*

50. Мартусевич, А.А. Экспериментальная оценка действия оксида азота на электрокинетические свойства мембран эритроцитов / А.А. Мартусевич, А.В. Дерюгина // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2017. – Т. 4, №4. – С. 33-39.

51. Мартусевич А.А. Сравнительное исследование некоторых гематологических показателей здоровых крыс в динамике ингаляций синглетного кислорода и озона / А.А. Мартусевич // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2018. – Т. 5, №1. – С. 40-46.

52. Кузнецова, В.Л. Сравнительная оценка биохимических показателей сыворотки крови после хронического и субхронического воздействия синглетного кислорода / В.Л. Кузнецова, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин, О.В. Костина, М.В. Преснякова, А.А. Мартусевич // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 4.; URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=27749>\*