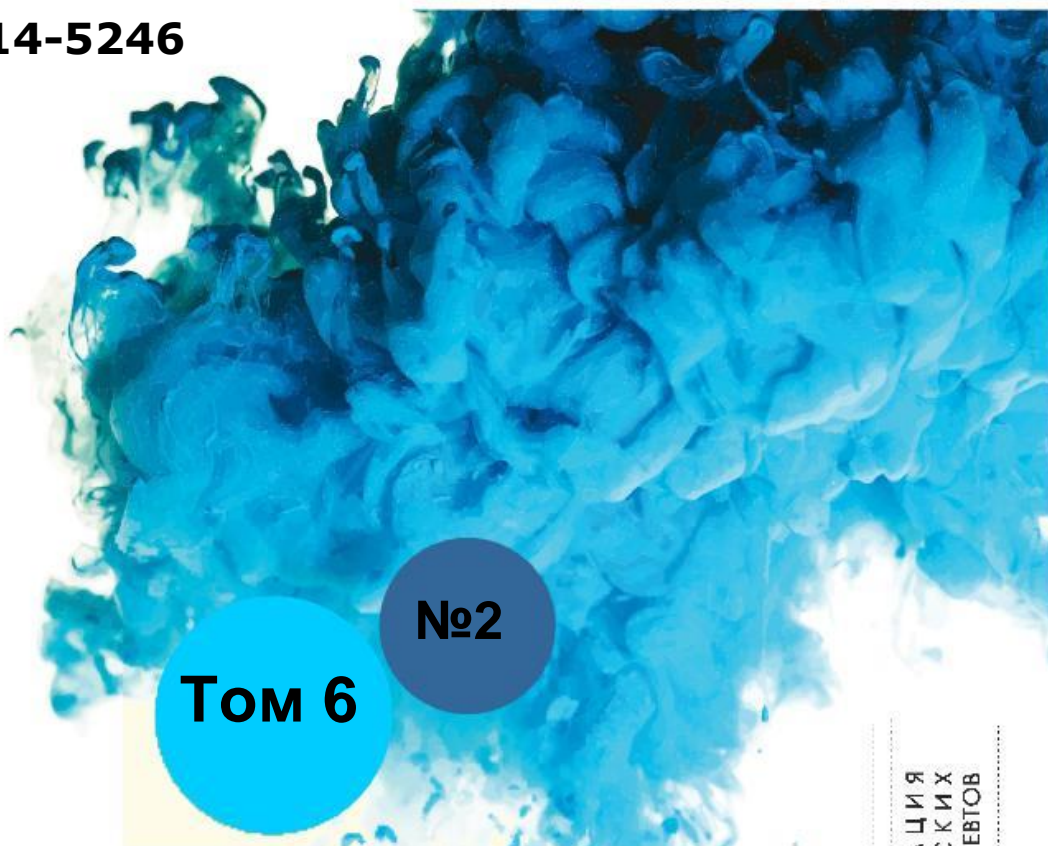
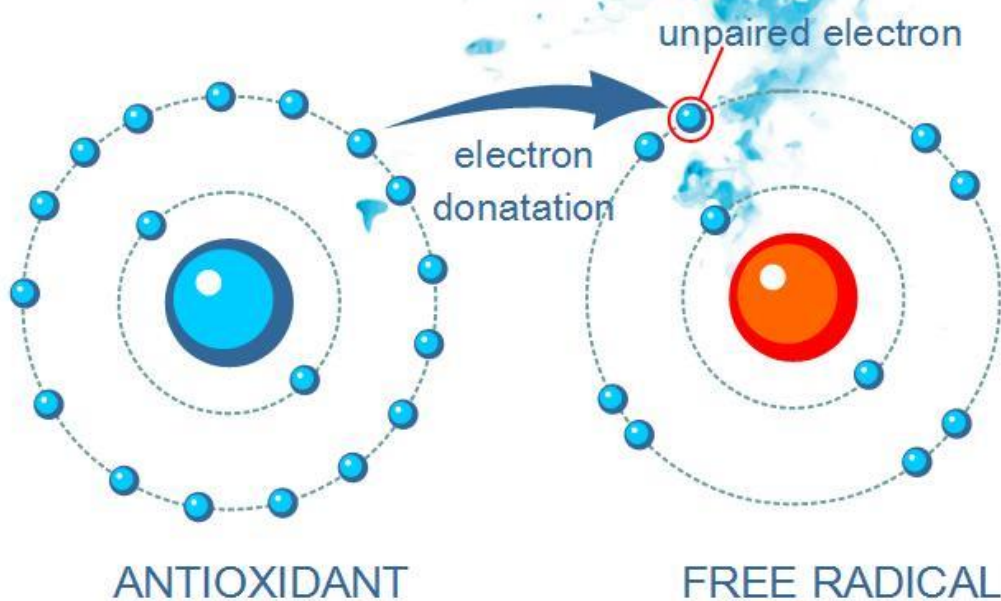


ISSN 2414-5246



Том 6

№2



АССОЦИАЦИЯ
РОССИЙСКИХ
ОЗОНОТЕРАПЕВТОВ



БИОРАДИКАЛЫ И
АНТИОКСИДАНТЫ

2019



**АССОЦИАЦИЯ
РОССИЙСКИХ
ОЗОНОТЕРАПЕВТОВ**

Гл. редактор – д.м.н., проф. С.П. Перетягин

Зам. гл. редактора – д.б.н. А.К. Мартусевич

Отв. секретарь – А.Г. Соловьева

Зав. ред. – А.А. Мартусевич

Международный редакционный совет:

Lamberto Re (Италия)

Gregorio Martinez-Sanchez (Италия)

Nurettin Luleci (Турция)

Renate Viebahn-Haensler (Германия)

С.А. Беляев (Германия)

А.Ф. Ванин (Россия)

В.В. Зинчук (Белоруссия)

А.Г. Куликов (Россия)

Е.И. Назаров (Украина)

И.Н. Попов (Германия)

В.Д. Селемир (Россия)

Р.Р. Фархутдинов (Россия)

Редакционная коллегия:

А.В. Алясова, д.м.н., проф. (Н.Новгород)

А.Н. Беляев, д.м.н., проф. (Саранск)

О.А. Биткина, д.м.н. (Н.Новгород)

Е.Л. Бойко, д.м.н., проф. (Иваново)

Г.А. Бояринов, д.м.н., проф. (Н.Новгород)

Н.Ю. Векслер, д.м.н. (Москва)

В.И. Гибалов, д.ф.-м.н., проф. (Москва)

Г.О. Гречканев, д.м.н., проф. (Н.Новгород)

С.В. Гусакова, д.б.н., проф. (Томск)

В.Т. Долгих, д.м.н., проф. (Омск)

Е.А. Дурново, д.м.н., проф. (Н.Новгород)

В.И. Инчина, д.м.н., проф. (Саранск)

В.И. Карелин, д.ф.-м.н., проф. (Саров)

Р.Г. Каримова, д.б.н., проф. (Казань)

К.Н. Конторщикова, д.б.н., проф. (Н.Новгород)

И.В. Кошелева, д.м.н. проф. (Москва)

П.П. Кузьмичев, д.м.н., проф. (Хабаровск)

Н.Б. Мельникова, д.х.н., проф. (Н.Новгород)

И.Я. Моисеева, д.м.н., проф. (Пенза)

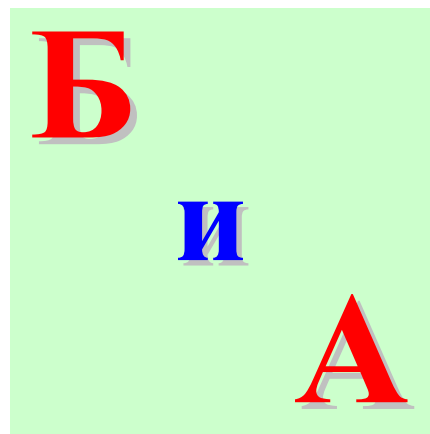
И.В. Мухина, д.б.н., проф. (Н.Новгород)

А.А. Тимошин, д.б.н. (Москва)

В.Ю. Титов, д.б.н., проф. (Москва)

К.Б. Шумаев, д.б.н. (Москва)

С.В.Якимов, д.м.н., проф. (Красноярск)



**Том 6, №2
2019**

Издание зарегистрировано
Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых
коммуникаций

Свидетельство о регистрации
средства массовой информации
Эл № ФС77-57345
от 17 марта 2014 г.

Учредитель – Ассоциация
российских озонотерапевтов

Адрес редакции:
603089, г. Н. Новгород,
ул. Б. Панина, д. 9

Телефоны:
8-920-297-99-89
8-910-391-79-98

e-mail: cryst-mart@yandex.ru
psp_aro@mail.ru

Internet: www.ozonotherapy.ru

Все права защищены. Любое
воспроизведение опубликованных
материалов без письменного
согласия редакции не допускается
При перепечатке ссылка на
журнал обязательна

Содержание**Content****ОБЗОРЫ****REVIEWS**

**Воробьева О.А., Павинская А.А.,
Кочубейник А.В., Пантелеев Д.А.,
Мельникова Н.Б.**

Наночастицы оксида цинка.
Антиоксидант или генератор АФК?

**5 Vorobyeva O.A., Pavinskaya A.A.,
Kochubeinik A.V., Pantelev D.A.,
Melnikova N.B.**

Nanoparticules of zink oxide. Antioxidant
or generator of reactive oxygen species?

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ**ORIGINAL ARTICLES**

**Гречканев Г.О., Касрашвили Т.В.,
Кlemente Аpумайта Х.М.,
Никишов Н.Н., Кокова Р.Р.,
Курмангулова И.М., Гулян Ж.И.**
Патогенетические аспекты пролапса
тазовых органов

**21 Grechkanev G.O., Kasrashvili T.V.,
Klemente Apumaita H.M., Nikishov
N.N., Kokova R.R., Kurmangulova
I.M., Gulyan Zh.I.**

Pathogenic aspects of pelvic organ
prolapse

**Иванова М.В., Шумаев К.Б.,
Дудылина А.Л., Мохов А.А.,
Рууге Э.К.**
Защитное действие природных
фенольных соединений при
окислении гомогената сердца крыс

**25 Ivanova M.V., Shumaev K.B.,
Dudylyna A.L., Mohov A.A.,
Ruuge E.K.**

Protective effect of natural phenolic
compounds in the oxidation of rat heart
homogenate

**Мартусевич А.К., Голыгина Е.С.,
Ковалева Л.К., Шумаев К.Б.**
Оценка влияния различных
источников и концентраций
монооксида азота на
кристаллогенные свойства
сыворотки крови in vitro

**38 Martusevich A.K., Golygina E.S.,
Kovaleva L.K., Shumaev K.B.**
Assessment of the effect of different
sources and concentrations of nitrogen
monoxide on the crystallogenic
properties of blood serum in vitro

**Соловьева А.Г., Сергиенко В.И.,
Перетягин С.П.**
Органоспецифические
антиоксидантные эффекты действия
динитрозильных комплексов железа
при ожоге в эксперименте

**47 Soloveva A.G., Sergienko V.I.,
Peretyagin S.P.**
The organ-specific antioxidant effects of
dinitrosyl iron complexes during the
burn in the experiment

**Соловьева А.Г., Перетягин С.П.,
Сергиенко В.И.**

Активность оксидоредуктаз крови при комбинированной термической травме под влиянием воздушно-плазменного потока, содержащего NO

**Перетягин С.П., Соловьева А.Г.,
Новиков А.В., Соколов С.А.,
Хрулёв С.Е., Диденко Н.В.,
Гречканёва О.В.**

Изменения биохимических показателей крови у пациентов с дорсо- и артропатиями под влиянием OZOTENS-терапии болевого синдрома

**58 Soloveva A.G., Peretyagin S.P.,
Sergienko V.I.**

The activity of oxidoreductases of blood during combined thermal injury under the influence of air-plasma flow containing no

**63 Peretyagin S.P., Soloveva A.G.,
Novikov A.V., Sokolov S.A.,
Hrulev S.E., Didenko N.V.,
Grechkaneva O.V.**

Changes of biochemical parameters of blood in patients with dorso- and arthropathy under the influence of ozotens-treatment of pain syndrome

Правила оформления статей

71 *Guidelines for authors*

ОБЗОРЫ

НАНОЧАСТИЦЫ ОКСИДА ЦИНКА.

АНТИОКСИДАНТ ИЛИ ГЕНЕРАТОР АФК?

О.А. Воробьева, А.А. Павинская, А.В. Кочубейник,

Д.А. Пантелеев, Н.Б. Мельникова

ФГБОУ ВО "Приволжский исследовательский медицинский университет"

Минздрава России, Нижний Новгород

Abstract

A dual role of zinc oxide nanoparticles was shown in the processes of oxidative stress. On the one hand, these nanoparticles are able to increase the generation of the reactive species (superoxide anion, hydroxyl radicals and hydrogen peroxide, nitric oxide, nitrosyl particles) when they act on bacterial or tumor cells, causing to a bactericidal effect, and (or) inducing apoptosis. Another function of zinc oxide nanoparticles is a direct or indirect effect on the antioxidant enzyme protection under oxidative stress. The general properties of zinc oxide nanoparticles are extremely high permeability, the ability to act as quantum dots or toxic drug delivery system. Zinc oxide nanoparticles also may be use for tumor diagnostics. The ability of zinc oxide nanoparticles to cause oxidative stress or to show antioxidant activity and its high permeability through cell membranes make these particles as promising pharmaceutical ingredient for use in theranostic, in antibacterial and antitumor therapy.

Key words: zinc oxide nanoparticles, oxidative stress, toxicity and antioxidant properties of zinc oxide nanoparticles, permeability of zinc oxide nanoparticles.

В обзоре показана двойственная роль наночастиц оксида цинка в процессах оксидативного стресса. С одной стороны, эти частицы способны усиливать генерацию активных форм кислорода (супероксидного аниона, гидроксильных радикалов и пероксида водорода, монооксида азота, нитрозильных частиц и др.) при действии на бактериальную или опухолевую клетки, обуславливая бактерицидный эффект и, (или) вызывая апоптоз. Другой функцией наночастиц оксида цинка является прямое или косвенное воздействие на систему антиоксидантной ферментной защиты в условиях оксидативного стресса. Общим свойством наночастиц оксида цинка на биосистему является экстремально высокая проницаемость наночастиц оксида цинка, их способность выступать в качестве квантовых точек, векторов доставки токсичных лекарственных веществ, а также выполнять роль диагностического агента. Способность наночастиц оксида цинка вызывать оксидативный стресс, либо проявлять антиоксидантную активность, его высокая проницаемость через мембраны клеток делают эти частицы

перспективными кандидатами для использования в терапии, в антибактериальной и противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: наночастицы оксида цинка, окислительный стресс, токсичность и антиоксидантные свойства наночастиц оксида цинка, проницаемость наночастиц оксида цинка

Цинк является важным эссенциальным элементом, необходимым для успешного роста многих внутренних органов, стабилизации клеточных мембран, модуляции мембраносвязанных ферментов и действия инсулина. Цинк входит в состав около 300 цинксодержащих или цинкзависимых ферментов. Его содержание в организме человека составляет приблизительно 2-3 г., он концентрируется в печени, органах зрения, волосах, костной ткани, предстательной железе и др. Этот элемент участвует как в синтезе, так и в действии гормонов, которые тесно связаны с метаболизмом в костной ткани, ингибируя остеокластогенез и стимулируя формирование остеобластной костной ткани [1].

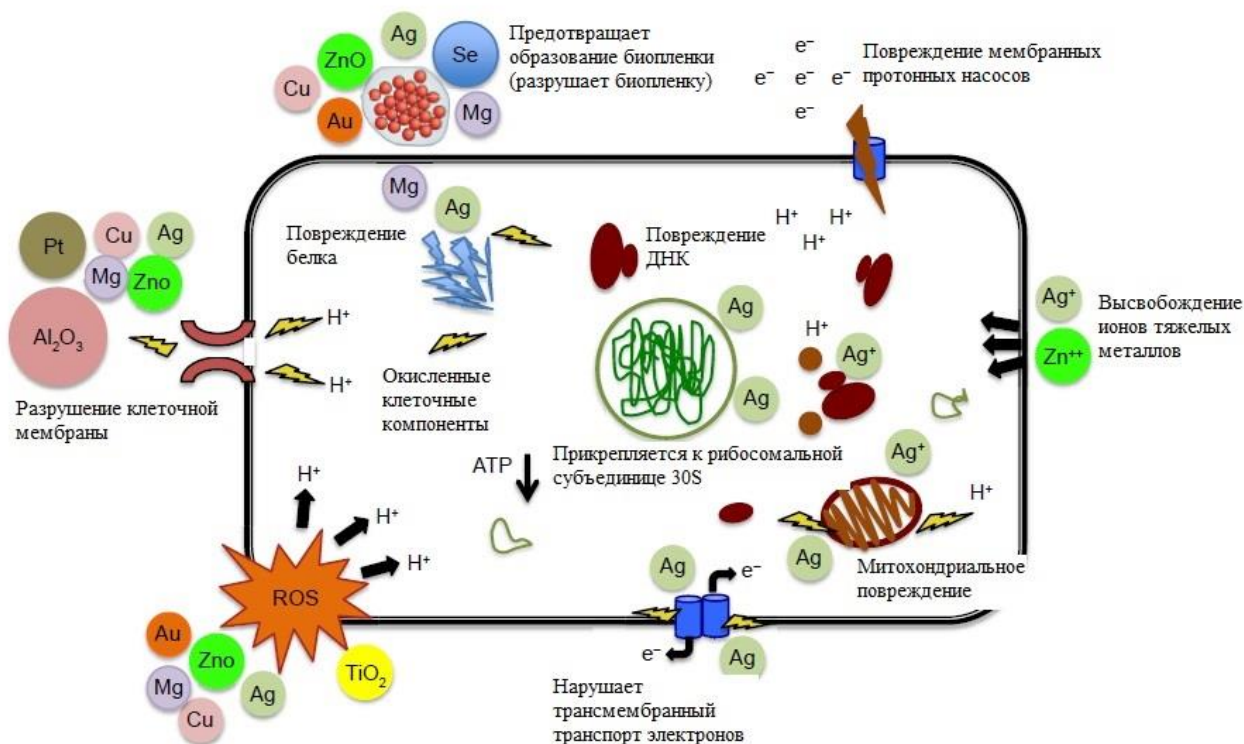


Рис. 1. Вероятные эффекты нанометаллов (действие на бактерии или опухолевые клетки) [7]

В последнее время препаратам цинка уделяется большое внимание, главным образом, как иммуномодулирующим и противовоспалительным лекарственным средствам в виде солей и оксида цинка. Вновь выявленные фармакологические свойства наночастиц оксида цинка существенно расширяют потенциальные возможности использования их в качестве новых перспективных препаратов. Наночастицы оксида цинка ZnO размером 10-50 нм, также, как и наночастицы серебра Ag⁰, золота Au⁰, проявляют высокий терапевтический потенциал при лечении различных заболеваний за счет своих антибактериальных,

противоопухолевых, иммуномодулирующих свойств [2-13]. Общая схема механизма действия наночастиц металлов представлена на рисунке 1. Наночастицы металлов, таких как селен, магний, золото, медь или оксид цинка, способны высвобождать ионы, которые предотвращают образование (или разрушают) биопленку, разрушают клеточную мембрану. Считают, что ионы металлов нарушают трансмембранный транспорт электронов, повреждают клеточные белки и мембранные протонные насосы, интеркалируют основания, нарушают передачу сигналов клетками, вызывают генерацию свободных радикалов. Следует особо подчеркнуть, что предполагаемый механизм относится только к ионам металлов, выделенных из наночастиц [7].

В последнее время интенсивно исследуются антиоксидантные свойства этих наночастиц, рассматривая их в качестве модификаторов биологических реакций, которые, напрямую не проявляя антиоксидантных эффектов, активируют многочисленные реакции антиоксидантной защиты организма [2].

В ряду упомянутых наночастиц особое место занимают наночастицы оксида цинка. Преимуществом наночастиц оксида цинка является следующее:

а) токсичность нано-ZnO намного ниже, чем у наночастиц серебра и золота [14-17];

б) стабильность наночастиц оксида цинка (способность к агрегации и укрупнению) выше;

в) ионы цинка имеют постоянную степень окисления и, в отличие от ионов серебра, не способны к диспропорционированию и изменению степени окисления под действием света;

г) серебро способно более интенсивно связываться с тиольными остатками белков, вызывая агирею [18-21].

Биологические эффекты наночастиц оксида цинка во многом определяются его необычными физико-химическими свойствами: высокой проницаемостью ионов цинка при их выделении из наночастиц, люминесценцией и другими фотохимическими эффектами, проявляемыми этими частицами, способностью выполнять функцию квантовых точек в различных системах [22].

Настоящий обзор посвящен свойствам наночастиц оксида цинка и их роли в модификации биологических реакций, приводящих к проявлению прооксидантных или антиоксидантных эффектов, а также в усилении генерации активных форм кислорода при бактерицидном воздействии.

В обзоре рассмотрены вопросы:

1) метаболизма и гомеостаза ионов цинка;

2) участия эндогенного цинка в антиоксидантной ферментной защите;

3) физико-химических особенностей наночастиц оксида цинка (проницаемость, способность выступать в качестве вектора доставки и квантовых точек);

4) роли наночастиц оксида цинка в усилении генерации активных форм кислорода при воздействии на бактериальную и опухолевую клетки;

5) антиоксидантного действия наночастиц оксида цинка как поглотителя свободных радикалов.

1. Метаболизм и гомеостаз цинка

Всасывание цинка происходит в кишечнике с помощью специфических белков, транспортирующих цинк, после чего он распределяется в организме человека. Поскольку цинк в значительной степени связан с белками – альбумином, аффинность к которому низкая, α -2-макроглобулином (А2М) и трансферрином с высокой аффинностью, свободный цинк редко встречается в сыворотке. Внутри клетки цинк в основном накапливается в специальных органеллах – цинкосомах (~50%) и ядре (~30–40%) [23, 24].

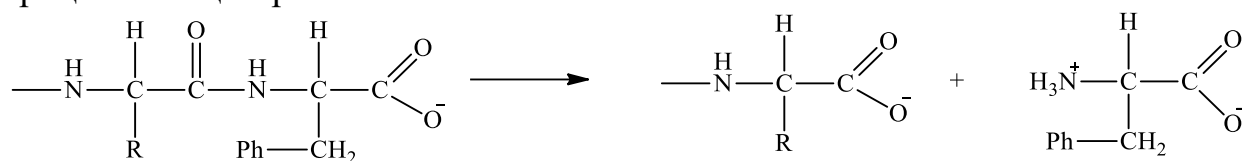
В 1957 году в цитоплазме были обнаружены специфические белки – металлотионеины (МТ), хелатирующие цинк. [Vallee V.L., 1979]. МТ способны связывать около 20% внутриклеточного цинка, что играет важную роль в его гомеостазе. Например, МТ-1 связывает до семи ионов цинка, что делает его особенно пригодным для использования в качестве цинкового буфера [25]. Для поддержания низких концентраций ионов цитозольных металлов и защиты от высоких концентраций цитотоксических металлов клетки, наряду с металл-связывающими белками, развивают механизмы компартиментализации и секвестрации цинка. Потребность клетки в свободном цинке обеспечивается за счет хранения цинка в цинкосомах или других органеллах, таких как эндоплазматическая сеть (ЭПС) или аппарат Гольджи [26]. Внутриклеточный баланс цинка между цитозолем и органеллами поддерживается за счет специфических транспортных белков, таких как импортеры или экспортеры цинка, или за счет мембранных каналов [Thomas R.C., 1991]. Содержание свободных цитозольных ионов цинка лежит в пределах пико- или наномолярных концентраций [25]. Временное и локальное увеличение концентрации цинка в цитоплазме за счет высвобождения из белка и органелл влияет на экспрессию генов, ферментативную активность и передачу сигналов клетками [26].

Распределение, транспорт и поддержание внутриклеточного уровня цинка контролируются 24 белками-транспортерами цинка и четырьмя металлотионеинами МТ (МТ1-4), действие которых взаимосвязано. МТ-1 и МТ-2 экспрессируются повсеместно в организме человека, играют важную роль в функции печени и почек и индуцируются различными стимулами, такими как ионы металлов, цитокины, глюкокортикостероиды и окислительный стресс, соответственно. Напротив, МТ-3 и МТ-4 экспрессируются специфически для клеток. МТ-3 преимущественно экспрессируется в центральной нервной системе, тогда как МТ-4 преимущественно обнаруживается в эпителиальной ткани. Экспрессия как МТ-3, так и МТ-4 строго контролируется, их изоформы выполняют различные функции в зависимости от локализации [27-29].

Переносчики цинка делятся на два основных семейства в соответствии с мембранной топологией: (1) семейство SLC39: Zrt-подобный (регулируемый цинком переносчик), Irt-подобный белок (регулируемый железом переносчик), ZIP, которые увеличивают цитоплазматический цинк и (2) семейство SLC30: 10 переносчиков цинка ZnT, которые понижают цитоплазматический цинк путем транспорта цинка либо из клетки, либо во внутриклеточные органеллы [26]. Для конкретной клеточной функции необходим определенный уровень цинка, который поддерживается переносчиками этого иона в различных типах клеток

организма человека, связывающими между собой наружную плазматическую мембрану и мембраны органелл, таких как митохондрии, аппарат Гольджи, лизосомы и ЭПС [30, 31]. Другие механизмы поддержания концентрации цинка: использование рецепторов и ионных каналов, отличных от ZIP или ZnT, которое зависит от разности потенциалов в кальциевых и других каналах различных рецепторов; диффузия цинка, связанного с аминокислотами. Однако эти механизмы [32] требуют более глубоких доказательств. Обнаружено, что цинк-зависимыми являются все классы ферментов – трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, оксидоредуктазы и лигазы [33].

Наиболее важными цинксодержащими ферментами являются: матриксные металлопротеиназы (ММП), карбоксипептидаза А, карбоангидраза. Карбоксипептидаза А катализирует гидролиз концевой пептидной связи в белках в процессе пищеварения:



В этом ферменте атом цинка тетраэдрически координирован двумя гистидиновыми атомами азота, карбоксильным атомом кислорода глутаминового остатка и молекулой воды. Координация цинка на I стадии происходит через карбонильную группу, которая поляризуется и на атоме углерода появляется положительный заряд, восприимчивый к нуклеофильной атаке. На II стадии происходит перегруппировка с переносом протона с участием группы OH от присоединенной воды и разрыв пептидной связи. Доказано, что конформация фермента способствует образованию гидрофобного «кармана» рядом с атомом цинка, который включает неполярную боковую цепь гидролизующего белка, и что белок занимает правильное положение благодаря образованию водородных связей с соответствующими группами фермента.

Вторым наиболее распространенным цинксодержащим ферментом является карбоангидраза – сферическая молекула содержит один атом цинка, расположенный в глубоком «кармане» белка, который содержит несколько молекул воды. Атом цинка тетраэдрически координирован тремя имидазольными атомами азота и молекулой H₂O. Цинковый фермент катализирует реакцию CO₂ + H₂O ⇌ HCO₃⁻ + H⁺. Координированная молекула H₂O ионизируется с образованием Zn-OH⁻, а нуклеофил OH⁻ затем реагирует с атомом углерода CO₂ с образованием HCO₃⁻. Это эквивалентно замене медленной гидратации CO₂ водой быстрой реакцией CO₂ + OH⁻ → HCO₃⁻. Данная реакция требует высокого значения pH. Таким образом, роль фермента заключается в создании подходящего окружения внутри белкового «кармана», способствующего диссоциации связанной молекулы H₂O при pH 7, степень диссоциации которой иначе была бы слишком низкой.

К важной функции цинка в белках можно отнести участие в распознавании последовательности оснований в ДНК и, следовательно, регуляции переноса генетической информации в ходе репликации ДНК. Эти белки, с так называемыми «цинковыми пальцами», содержат 9 или 10 ионов Zn²⁺, каждый из

которых, координируясь с четырьмя аминокислотами, стабилизирует выступающую складку («палец») белка. Белок обертывается вокруг двойной спирали ДНК, каждый из «пальцев» связывается с ДНК, при этом их расположение совпадает с последовательностью оснований в ДНК, что обеспечивает точное распознавание [24].

В настоящее время большое внимание уделяется матричным металлопротеиназам (ММП), относящихся к семейству цинкзависимых ферментов, контролирующих разложение соединительной ткани. Они включают коллагеназы, желатиназы и стромелизины и расщепляют коллагены, фибронектин и желатины. Эти ферменты могут инициировать рост опухоли, повышая подвижность соединительных тканей, в том числе, в кровеносных сосудах. Неправильная экспрессия ММП приводит к различным заболеваниям включая разложение хрящей и костей при ревматизме и остеоартрите; разложение и трансформирование тканей во время инвазивного роста опухоли и развитие кровеносных сосудов (ангиогенез) опухоли; деградацию белков, основанных на миелине, в гематоэнцефалическом барьере, за которым следует повреждение головного мозга; потерю прочности стенок аорты при аневризме; разложение ткани при язве желудка; распад соединительной ткани при пародонтозе.

Более того, физиологическое значение цинка было подтверждено исследованиями *in silico*, которые показали, что около 10% общего протеома человека потенциально могут связывать цинк. Связывание цинка может быть облегчено различными мотивами связывания, включая: (1) «цинковые пальцы»; (2) новые домены генов (RING); (3) домены LIM, состоящие из двух смежных доменов «цинкового пальца»; и (4) атипичные домены PHD, сходные с RING-пальцами [34]. Таким образом, взаимодействие цинка с белками является очень сложным. Протеом цинка состоит из двух основных групп, включающих ферменты и факторы транскрипции [35]. Цинк необходим не только для катализа ферментами, а также для поддержания структуры ферментов [23], когда внутриклеточные сигнальные пути к цинку труднодоступны, что влияет на созревание, дифференцировку и функцию клеток [36].

2. Эндогенный цинк – компонент антиоксидантной ферментной защиты

Повышенные внутриклеточные уровни цинка в иммунных клетках могут отравлять поглощенные патогены и действовать цитопротективно, нейтрализуя активные формы кислорода (АФК) и виды оксидов азота. В целом, гомеостаз цинка и сигналы цинка имеют решающее значение для противодействия воспалительным заболеваниям, а корреляция недоедания с тяжелыми воспалительными заболеваниями сопровождается длительными и тяжелыми формами гипоцинкемии в сыворотке крови. В литературе было высказано предположение, что гипоцинкемия сопровождается повышенными уровнями медиаторов воспаления, например, АФК, и антимикробными пептидами, такими как кальпротектин или матричные металлопротеазы (ММП), вызывая повреждение тканей, особенно в печени, легких и селезенке [37, 38]. В целом, клеточные функции, такие как внутриклеточное уничтожение вредных

патогенных микроорганизмов, выработка цитокинов, а также выработка АФК, зависят от уровня цинка и нарушаются из-за дефицита цинка.

Принято считать, что антиоксидантные свойства цинка определяются, главным образом, тем, что он является неотъемлемым компонентом антиоксидантных ферментов, и дефицит уровня цинка приводит к возникновению окислительного стресса [39].

Наиболее значимым по влиянию на оксидативный стресс является фермент – медь-цинк-супероксиддисмутаза (CuZn-СОД), который выполняет функцию удаления супероксид-аниона. Этот фермент обладает крайне высокой стабильностью. Так, CuZn-СОД, выделенный из мозга 3000-летней высушенной на воздухе мумии, сохранял свою активность и по своим иммунологическим свойствам был неотличим от свежесыделенного фермента [40]. CuZn-СОД катализирует дисмутацию супероксида, постоянно образующегося при аэробном метаболизме, в кислород и пероксид водорода. В организме человека ферменты, включающие медь и цинк, действуют синергетически и составляют единую антиоксидантную защиту, включающую в себя и третий элемент – селен. Именно по этой причине наиболее целесообразно изучать систему антиоксидантной защиты ферментами, оценивая активность глутатионпероксидазы, содержащей селен, и глутатионредуктазы, а также учитывать концентрацию глутатиона.

Роль цинка, не изменяющего степень окисления в редокс-защите от оксидативного стресса, является более сложной, чем меди, взаимодействующей по типу реакции Фентона. В данном контексте, цинк можно рассматривать как «косвенный» антиоксидант – модификатор биологических редокс-реакций. Антиоксидантное влияние цинка обусловлено, главным образом, способностью индуцировать стрессовую реакцию с точки зрения 1) стимуляции MTF-1-зависимой транскрипции и 2) активации чувствительных к стрессу сигнальных каскадов MAPK и PI3K/Akt. Кроме того, антиоксидантное действие цинка связывают со стабилизацией белковых тиолов (ферменты, «цинковые пальцы», металлотионеины) [40].

К потенциальному механизму антиоксидантного действия цинка можно отнести антагонизм окислительно-восстановительных переходных металлов, таких как железо или медь, и предотвращение окисления сульфгидрильных групп в белках. Тиольные группы стабилизируются цинком, что и защищает фермент или другой протеин от инактивации, вызванной оксидативным стрессом. Действие цинка, как антиоксиданта, в случае металлотионеинов, заключается в регуляции их метаболизма. В свою очередь, дефицит цинка приводит к снижению защиты сульфгидрильных групп и увеличению продукции активных форм кислорода (АФК), чрезмерные уровни могут действовать как прооксиданты, вызывая снижение уровня CuZn-СОД и других важнейших металлоферментов в эритроцитах. В целом, биохимическое исследование многих заболеваний, например, сахарного диабета, подтвердило, что оптимальный уровень цинка является необходимым условием для поддержания окислительного метаболизма в норме [41].

3. Физико-химические свойства наночастиц оксида цинка, используемых в медицине

ZnO является полупроводником n-типа с большой энергией связи экситонов (60 мэВ), большой шириной запрещенной зоны 3,37 эВ при комнатной температуре, оптимальным размером боровского экситона 2,34 нм, что позволяет им выступать в качестве квантовых точек (КТ). Наночастицы оксида цинка проявляют эффект аномального поглощения света, характеристикой которого является появление полосы поглощения в области 360 нм электронного спектра. Это свойство часто используется исследователями для доказательства размеров наночастиц оксида цинка при коллоидно-химическом синтезе [14, 42].

Свойства оксида цинка, такие как электрические, например, диэлектрическая проницаемость, способность к люминесценции также зависят от размера частиц [43]. Чем меньше размер наночастицы, тем более явно будут выражены свойства квантовых точек у наночастиц оксида цинка. Как правило, наночастицы оксида цинка, способные выступать в качестве квантовых точек, в настоящее время получают путем коллоидно-химического синтеза, формируя наносферы, наностержни, нанотрубки, наноцветы, наноленты и т.д. [43, 44].

Способность наночастиц оксида цинка выступать в качестве квантовых точек в настоящее время открывает широкие возможности использования их в диагностике серьезных заболеваний, в том числе онкологических [42].

Другим важным применением наночастиц оксида цинка в медицине, благодаря их уникальной проницаемости, является транспортная функция. Наночастицы оксида цинка способны не только выступать в качестве вектора доставки токсичных цитостатиков (например, доксорубицина), но и оказывать синергетическую противоопухолевую активность, за счет усиления генерации АФК под воздействием квантовых точек оксида цинка [22].

4. Роль наночастиц оксида цинка в усилении генерации активных форм кислорода при воздействии на бактериальную и опухолевую клетки

Цитостатическое действие препаратов с традиционными цитостатиками и наночастицами оксида цинка, наиболее изучено на примере доксорубицина, паклитаксела [42, 46]. В ряде работ продемонстрировано практическое отсутствие токсичности наночастиц оксида цинка на кровоток в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [22, 38]. Эксперименты также показали, что комбинации химиотерапии и фототермической терапии существенно увеличивают эффективность лечения рака [47].

Повышение индукции генерации активных форм кислорода, таких как гидроксильные радикалы, супероксидные анионы и пероксид водорода, под действием наночастиц оксида цинка является основой его бактерицидного действия. В целом, антибактериальная активность заключается в разрушении клеточной стенки бактерии за счет усиления перекисного окисления липидов, разрушении биопленки, образованной микроорганизмами, ингибировании репликации ДНК бактерии. Наиболее полно бактерицидные свойства наночастиц оксида цинка исследуются индийскими учеными [41, 48-50]. Предполагаемый механизм бактерицидного действия наночастиц оксида цинка,

продемонстрированный в работе авторов [44], на примере наночастиц, полученных методом «зеленого» синтеза, представлен на рисунке 2.

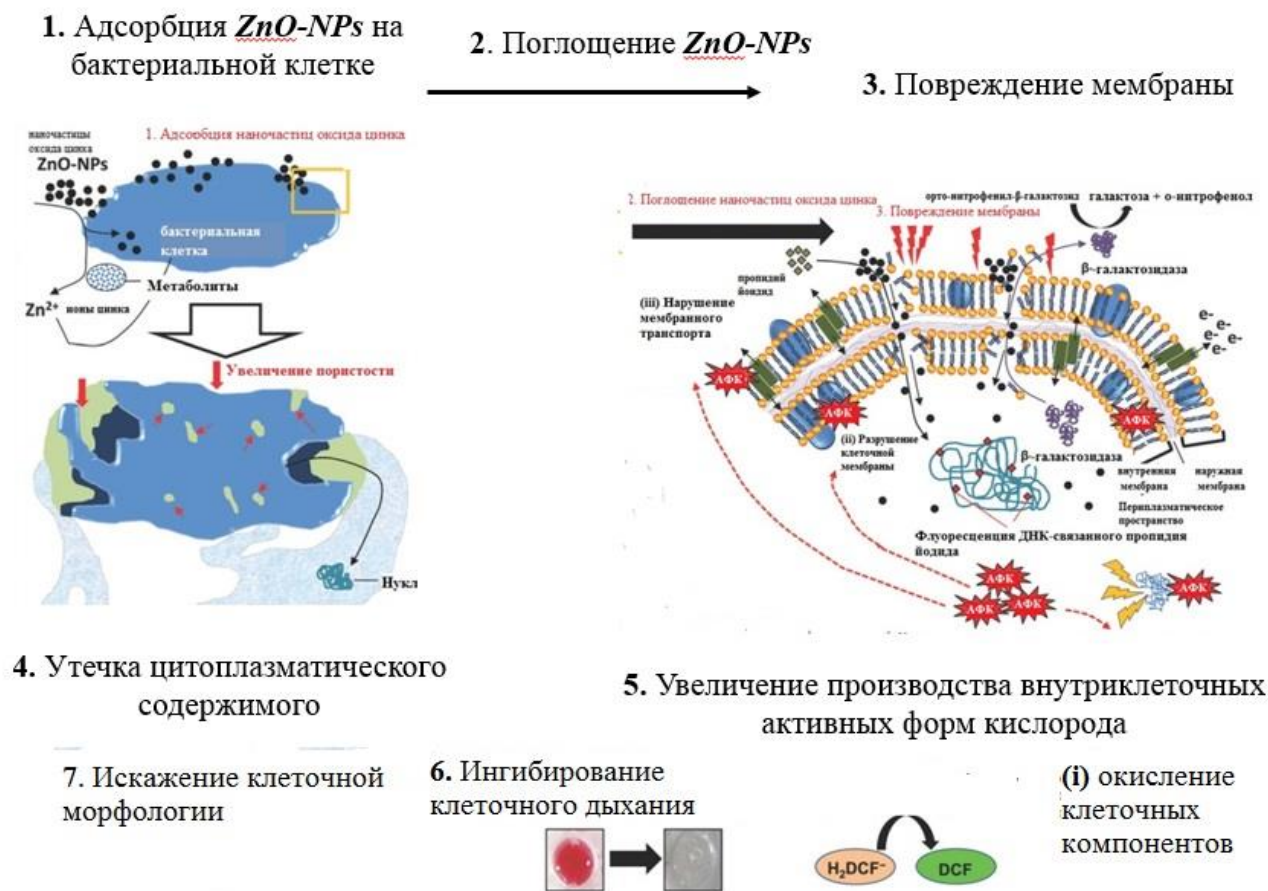


Рис. 2. Иллюстрация бактерицидного действия наночастиц оксида цинка, полученных методом «зеленого» синтеза [44]

Наночастицы были получены с использованием простого и экологичного метода биосинтеза с использованием недорогого предшественника экстракта листьев *Azadirachta Indica* и нитрата цинка [46]. Наночастицы оксида цинка были охарактеризованы с использованием электронной (УФ-видимой), ИК-спектроскопии, рентгенофазового анализа, электронной микроскопии и анализа дзета-потенциала (ζ -потенциал). Полученный первичный размер составлял 26,3 нм и $33,5 \pm 6,5$ нм, тогда как было обнаружено, что вторичный размер составляет $287 \pm 5,2$ нм с ζ -потенциалом $-32,8 \pm 1,8$ мВ, что указывает на физико-коллоидный характер наночастиц оксида цинка. Кристалличность и сферическая морфология сохранялись в процессе агломерации частиц.

ИК-спектральные исследования подтвердили содержание функциональных групп природных соединений на поверхности наночастиц оксида цинка, полученных «зеленым» синтезом в присутствии экстрактов листьев растений, например, *A. Indica*. Функционализация наночастиц оксида цинка обуславливала их гидрофильный характер, что делает эти частицы более устойчивыми в водной среде во времени. Антибактериальная и антибиотическая активность наночастиц оксида цинка была значимой: минимальная концентрация ингибирования (MIC) и минимальная бактерицидная концентрация (MBC) в отношении наиболее

частых клинических бактерий *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* варьировались от 0,5 до 1,0 (MIC) / 0,0 / 1 (MIC) / 1 мл⁻¹ (MBC). Растворение наночастиц оксида цинка с переходом в ионы Zn²⁺ в питательной среде увеличивалось в результате взаимодействия с бактериальной поверхностью и метаболитами. Значительное поверхностное связывание наночастиц оксида цинка с последующим внутриклеточным поглощением нарушало морфологию клеток и вызывало заметное повреждение клеточной мембраны. Прерванная кинетика роста бактерий, потеря клеточного дыхания, усиление продукции внутриклеточных АФК и утечка цитоплазматического содержимого однозначно свидетельствовало о сильном взаимодействии наночастиц оксида цинка с внешней поверхностью клетки и внутриклеточными компонентами, что в конечном итоге приводило к гибели клеток и разрушению биопленок. В целом, результаты этих ученых показывают перспективность экологичного способа получения наночастиц оксида цинка в качестве эффективных наноантибиотиков [46].

На способность наночастиц оксида цинка генерировать активные формы кислорода (супероксид-анион, гидроксил радикал) и на его дзета-потенциал большое влияние оказывает рН водных растворов. Исходные наночастицы оксида цинка несут отрицательный заряд на своей поверхности, что обусловлено частичным связыванием атомов кислорода. Авторы полагают, что при более низком рН протоны из окружающей среды переносятся на поверхность частиц, что приводит к положительно заряженной поверхности ZnOH₂⁺ (рисунок 3). На границе раздела ультрамикрорекристалла полупроводникового ZnO один протон компенсирует избыточный электронный заряд оксида цинка, а второй протон – создает избыточный положительный заряд [43].

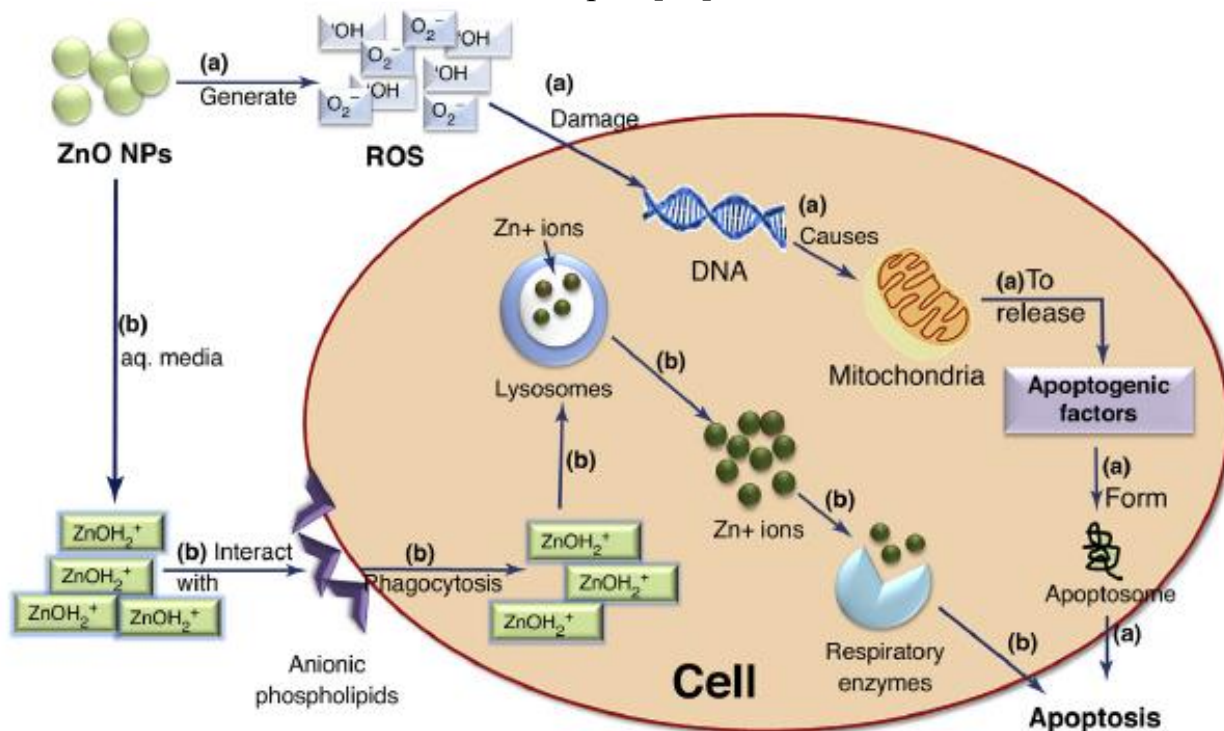


Рис. 3. Механизм действия наночастиц оксида цинка на апоптоз и влияние рН на ионное состояние поверхности наночастиц оксида цинка [43]

В работе высказано предположение, что эти положительные частицы взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфолипидами на внешней мембране клетки, в результате чего наночастицы поглощаются клеткой. В кислых лизосомах наночастицы оксида цинка растворяются и высвобождают ионы цинка, которые ингибируют действие дыхательных ферментов, вследствие чего происходит апоптоз.

Влияние наночастиц оксида цинка на цито- и генотоксичность печени (L02) и почек (HEK293) на клеточном уровне было исследовано в работе [51]. В работе выявлено, что главным звеном цито- и генотоксичности является оксидативный стресс, вызываемый наночастицами. Маркерами оксидативного стресса считались изменения концентраций следующих ферментов: малонового диальдегида (МДА), глутатиона (ГЛ) и супероксиддисмутазы (СОД). В этих экспериментах отмечено резкое увеличение МДА (в 4 раза), снижение ГЛ (30-85%) и СОД (почти в 4 раза) при 24-часовом воздействии [51].

В работе авторов [52] с использованием маркеров оксидативного стресса ГЛ и МДА также показано влияние наночастиц оксида цинка на гибель *E.coli*, обусловленную оксидативным стрессом: наблюдалось увеличение уровня МДА, снижение ГЛ (на 40-50%) [52].

Методом ДНК-комет был показан генотоксический эффект наночастиц оксида цинка, вызванный оксидативным стрессом на примере исследования пресноводной улитки *Lymnaea luteola* [53]. Общим свойством, подтверждающим токсичность наночастиц оксида цинка, являлось уменьшение ГЛ (в 3 раза) и повышение уровня МДА (в 2,5 раза). Однако в этом исследовании было показано, что активность каталазы в пищеварительной железе улитки существенно возрастала (в 1,5-2 раза), а активность глутатионпероксидазы была значительно снижена (в 1,5 раза) в зависимости от дозы и времени воздействия.

В обзоре [22] обобщены результаты и высказаны предположения о молекулярном механизме действия наночастиц оксида цинка на генотоксичность. Авторами подтверждено влияние оксидативного стресса, вызванного наночастицами, на повреждение ДНК опухолевых клеток.

В работе [54] авторы при исследовании инфицирования *Eimeria papillata* в тонкой кишке кроме маркеров МДА (увеличение) и ГЛ (снижение) использовали в качестве маркера оксидативного стресса уровень монооксида азота, который существенно увеличивался под действием наночастиц оксида цинка.

С другой стороны, в ряде работ, в которых напрямую исследуется антирадикальная активность наночастиц оксида цинка, была показана способность поглощать стабильные радикалы DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) [55-58].

Способность наночастиц оксида цинка выступать как в качестве компонента, генерирующего активные формы кислорода, так и ингибировать процесс окисления за счет поглощения свободных радикалов, может быть использована для создания новых лекарственных средств, сочетающих антиоксидантный потенциал и антибактериальную эффективность. Примером такого подхода является модификация поверхности наночастиц оксида цинка природным антиоксидантом – кофеиновой кислотой. Авторы предлагают новый

наноматериал на основе оксида цинка, ковалентно связанного с кофеиновой кислотой, частицы которого имеют размер порядка 20 нм и обладают высоким сродством к клеткам. Прививка молекулы кофеиновой кислоты на поверхность наночастиц оксида цинка проводилась обработкой плазмой с микродиэлектрическим барьерным разрядом [59]. С использованием катионного радикала ABTS+ авторы показали высокую антиоксидантную и антибактериальную активность в отношении грамотрицательных и грамположительных штаммов, включая три штамма MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*).

Таким образом, использование различных стратегий модификации поверхности наночастиц оксида цинка позволяет создавать многофункциональные наночастицы с улучшенными свойствами коллоидных наносистем и биосовместимостью.

Заключение

Анализ литературных данных за последние годы выявил двоякую функцию наночастиц оксида цинка в процессах оксидативного стресса. В процессах прямого воздействия на бактериальную или опухолевую клетки наночастицы способны усиливать генерацию активных форм кислорода (супероксидный анион, гидроксильные радикалы и образование перекиси водорода, NO и нитрозильные частицы).

Ионы цинка, образующиеся из наночастиц, проявляют прямое или косвенное воздействие на систему антиоксидантной ферментной защиты. При этом роль ионов цинка не ограничивается влиянием на антиоксидантную функцию CuZn-СОД по нейтрализации супероксиданиона. Антиоксидантное действие цинка обусловлено его стабилизацией белковых тиолов (ферменты, «цинковые пальцы», металлотioneины), которые защищают фермент или другой протеин от инактивации, вызванной оксидативным стрессом.

Способность наночастиц оксида цинка вызывать оксидативный стресс, либо проявлять антиоксидантную активность, его высокая проницаемость через мембраны клеток делают эти частицы перспективными кандидатами для использования в антибактериальной и противоопухолевой терапии и в тераностике в качестве квантовых точек.

Список литературы

1. Yamaguchi, M. Zinc stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF- κ B activation / M. Yamaguchi, MN. Weitzmann // Mol Cell Biochem. 2011. 355(1-2). P. 179-186.
2. Negahdary, M. The antioxidant effects of silver, gold, and zinc oxide nanoparticles on male mice in *in vivo* condition / M. Negahdary, R. Chelongar, S. Zadeh, M. Ajdary // Advanced Biomedical Research. 2015. 4, 69. P. 1-5.
3. Abdulrahman, N. Antimicrobial activity of zinc oxide, titanium dioxide and silver nanoparticles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates / N. Abdulrahman, Z. Nssaif // Tikrit Journal of Pure Science. 2016. 21(3). P. 49-53.
4. McNamara, K. Nanoparticles in biomedical applications / K. McNamara, Syed A. M. Tofail // Advances in Physics. 2016. 2, 1. P. 54-88.

5. Heera, P. Nanoparticle characterization and application: an overview / P. Heera, S. Shanmugam // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2015. 4(8). P. 379-386.
6. Chhour, P. Gold nanoparticles for biomedical applications: synthesis and in vitro evaluation / P. Chhour, R. Cheheltani, B. Benardo // Nanomaterials in Pharmacology, Methods in Pharmacology and Toxicology. 2016. P. 87-111.
7. Hemeg, H. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy / H. Hemeg // International Journal of Nanomedicine. 2017. P. 8211-8225.
8. Zewde, B. A review of stabilized silver nanoparticles – synthesis, biological properties, characterization, and potential areas of applications / B. Zewde, A. Ambaye, J. Stubbs, D. Raghavan // JSM Nanotechno Nanomed. 2016. 4 (2). P 1-14.
9. Jiang, J. The advancing of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications / J. Jiang, J. Pi, J. Cai // Bioinorganic Chemistry and Applications. 2018. P. 1-18.
10. Hajipour, M. J. Antibacterial properties of nanoparticles / M. J. Hajipour, K. M. Fromm, A. Ashkarran, D. Jimenez de Aberasturi // Trends in Biotechnology. 2012. 30(10). P. 499-511.
11. Jesline, A. Antimicrobial activity of zinc and titanium dioxide nanoparticles against biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / A. Jesline, Neetu P. John, P. M. Narayanan, C. Vani, Sevanan Murugan // Appl Nanosci. 2015. 5. P. 157-162.
12. Han, C. Recent developments in the use of nanoparticles for treatment of biofilms / C. Han, N. Romero, S. Fischer, J. Dookran, A. Berger, A. Doiron // Nanotechnol Reviews. 6(5). 2017. P. 1-46.
13. Mohammad J. Hajipour, Katharina M. Fromm. Antibacterial properties of nanoparticles / Mohammad J. Hajipour, Katharina M. Fromm, Ali Akbar Ashkarran, Dorleta Jimenez de Aberasturi, Idoia Ruiz de Larramendi, Teofilo Rojo, Vahid Serpooshan, Wolfgang J. Parak, Morteza Mahmoudi // Trends in Biotechnology. 2012. 30, 10. P. 499-511.
14. Berube, B. Characteristics and classification of nanoparticles: expert Delphi survey / D. Berube, C. Cummings, M. Cacciatore, D. Scheufele, J. Kalin // Nanotoxicology. 2011. 5 (2). P. 236-243.
15. Bahadar, H. Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models / H. Bahadar, F. Maqbool, K. Niaz, M. Abdollahi // Iranian Biomedical Journal. 2016. 20 (1). P. 1-11.
16. Zoroddu, M. Toxicity of nanoparticles / M. Zoroddu, S. Medici, A. Ledda, V. Nurchi // Bentham Science Publishers. 2014. 21, 33. P. 3837-3853.
17. Marinda van Pomeran. A novel experimental and modelling strategy for nanoparticle toxicity testing enabling the use of small quantities / Marinda van Pomeran, Willie J. G. M. Peijnenburg, Nadja R. Brun, Martina G. Vijver // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2017. 14, 1348. P. 1-14.
18. Xi-Feng, Zhang. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications and therapeutic approaches / Xi-Feng Zhang, Zhi-Guo Liu, Wei Shen, Sangiliyandi Gurunathan // Int. J. Mol. Sci. 2016. 17, 1534. P. 1-34.
19. Wei, L. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications / L. Wei, J. Lu, H. Xu, A. Patel, G. Chen // Drug Discov Today. 2015. 20 (5). P. 595-601.

20. Jaybhaye, S. Anti-microbial activity of Ag NPssynthesized from waste vegetable fibers / S. Jaybhaye // *Int. J. Mater.Today: Proc.* 2A (9). 2015. P. 4323-4327.
21. Ghotaslou, R. The in vitro effects of silver nanoparticles on bacterial biofilms / R. Ghotaslou, Z. Bahari, A. Aliloo, P. Gholizadeh, B. Eshlaghi // *Microbiol Biotech Food Sci.* 2017. 6(4). P. 1077-1080.
22. Scherzad, A. Molecular Mechanisms of Zinc Oxide Nanoparticle-Induced Genotoxicity Short Running Title: Genotoxicity of ZnO NPs / A. Scherzad, T. Meyer, N. Kleinsasser, S. Hackenberg // *Materials.* 2017. 10, 1427. P. 1-19.
23. Vallee, BL. The biochemical basis of zinc physiology/ BL. Vallee, KH. Falchuk// *Physiol Rev.* 1993. 73(1). P. 79-118.
24. Beyersmann, D. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells/ D. Beyersmann, H. Haase// *Biometals.* 2001. 14(3-4). P. 331-341.
25. Colvin, RA. Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis/ RA. Colvin, WR. Holmes, CP. Fontaine, W. Maret// *Metallomics.* 2010. 2(5). P. 306-317.
26. Krezel, A., Maret, W. The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 2016. 611, P. 3–19.
27. Vasak, M.; Meloni, G. Mammalian metallothionein-3: New functional and structural insights. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, P. 1117.
28. Sutherland, D.E.; Stillman, M.J. The “magic numbers” of metallothionein. *Metallomics Integr. Biomet. Sci.* 2011, 3, P. 444–463.
29. Kimura, T., Kambe, T. The functions of metallothionein and ZIP and ZnT transporters: An overview and perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 336.
30. Fukada, T.; Kambe, T. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics Integr. Biomet. Sci.* 2011, 3, P. 662–674.
31. Fukada, T.; Kambe, T. *Zinc Signals in Cellular Functions and Disorders*; Springer: Tokyo, Japan, 2014.
32. Vallee, BL. The metallobiochemistry of zinc enzymes/ BL. Vallee, A. Galdes// *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1984. 56. P. 283-430.
33. McCall, KA. Function and mechanism of zinc metalloenzymes/ KA. McCall, C. Huang, CA. Fierke// *J Nutr.* 2000. 130(5). P. 1437-1446.
34. Andreini, C. Zinc through the three domains of life/ C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato// *J Proteome Res.* 2006. 5(11). P. 3173-3178.
35. Andreini, C. A bioinformatics view of zinc enzymes/ C. Andreini, I. Bertini// *J. Inorg. Biochem.* 2012. 111. P. 150-156.
36. Haase, H. Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells/ H. Haase, L. Rink// *Annu Rev Nutr.* 2009. 29. P. 133-152.
37. Wessels, I. Zinc dyshomeostasis during polymicrobial sepsis in mice involves zinc transporter ZIP14 and can be overcome by zinc supplementation/ I. Wessels, R.J. Cousins// *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2015. 309. P. 768-778.
38. Wessels, I. Zinc deficiency induces production of the proinflammatory cytokines IL-1 and TNFA in promyeloid cells via epigenetic and redox-dependent mechanisms/ I. Wessels, H. Haase, G. Engelhardt, L. Rink, P. Uciechowski// *J. Nutr. Biochem.* 2013. 24, P. 289–297.

39. Snehal Chandrashekhar Taru, Rashmi Bhalchandra Jawade1, Omkumar Nemichand Baghele, Vishnudas Dwarkadas Bhandari, Gauri Mahesh Ugale. Magnesium and Zinc Levels in Individuals Having Generalized Chronic Periodontitis. Journal of the International Clinical Dental Research Organization, 2017.

40. Klotz, L. O. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress / L. O. Klotz, K. D. Kroncke, D. Buchczyk, H. Sies // The Journal of Nutrition. 2003. P. 1-4 p.

41. Agrawal P, Arora S, Singh B, Manamalli A, Dolia PB. Association of macrovascular complications of type 2 diabetes mellitus with serum magnesium levels. Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev 2011; 5: 41-4.

42. Martinez-Carmona, M. ZnO Nanostructures for drug delivery and theranostic applications / M. Martinez-Carmona, Y. Gun'ko, M. Vallet-Regi // Nanomaterials. 2018. 8, 268. P. 1-27.

43. Mishra, M.H, Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications / A. Ekielski, S. Talegaonkar, V. Bhuvaneshwar // Drug Discovery Today. 2017. 22, 12. P. 1825-1834.

44. Ahmed, B. Bacterial toxicity of biomimetic green zinc oxide nanoantibiotic: insights into ZnONP uptake and nanocolloid–bacteria interface / B. Ahmed, B. Solanki, A. Zaidi, M. Khan, J. Musarrat // The Royal Society of Chemistry. 2019. P. 1–16.

45. Banoee, M. ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* / S. Seif, Z. Nazari, P. Jafari-Fesharaki, H. Shahverdi, A. Moballeg, A. Shahverdi // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2010. 93B (2). P. 557-561.

46. Singh, A. Eco-Friendly Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles for Rayon Pulp / A. Singh, B. Gaud, H. Narayan, R. Kurkure, S. Jaybhaye // Nulistica. 2018. P. 76-80.

47. Bhowmik, D. A potential medicinal importance of zinc in human health and chronic disease / D. Bhowmik, K. Chiranjib, K. Sampath // Int J Pharm Biomed Sci. 2010. 1(1). P. 5-11.

48. Choudhury, S.R. Zinc oxide nanoparticles-induced reactive oxygen species promotes multimodal cyto- and epigenetic toxicity / S. R. Choudhury, J. Ordaz, Chiao-Ling Lo, Nur P. Damayanti, F. Zhou, J. Irudayaraj // Toxicological sciences. 2017. 156, 1. P. 261-274.

49. Raajshree R, K. Evaluation of the antityrosinase and antioxidant potential of zinc oxide nanoparticles synthesized from the brown seaweed-turbinaria conoides / Khoushika Raajshree R, Brindha Durairaj // International Journal of Applied Pharmaceutics. 2017. 9, 5. P. 116-120.

50. Burman, U. Effect of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant system of chickpea seedlings / U. Burman, M. Saini, P. Kumar // Toxicological & Environmental Chemistry. 2013. P. 37-41.

51. Guan, R. Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles / T. Kang, F. Lu, Zh. Zhang, H. Shen, M. Liu // Nanoscale Research Letters. 2012. 7, 602. P. 1-7.

52. Kumar, A. Engineered ZnO and TiO₂ nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli* / A. Kumar, Alok K.

Pandey, Shashi S. Singh, R. Shanker, A. Dhawan // *Free Radical Biology & Medicine*. 2011. 51. P. 1872-1881.

53. Ali, D. Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L. *Aquat* / S. Alarifi, S. Kumar, M. Ahamed, M. Siddiqui // *Toxicol*. 2012. 124. P. 83-90.

54. Dkhil, M. Anticoccidial and antioxidant activities of zinc oxide nanoparticles on *Eimeria papillata*-induced infection in the jejunum / Mohamed Dkhil, Saleh Al-Quraishy, Rizwan Wahab // *International Journal of Nanomedicine*, 2015. 10. P. 1961-1968

55. Nand Singh, B. Biosynthesis of stable antioxidant ZnO nanoparticles by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids / B. Nand Singh, A. K. Singh Rawat, W. Khan, A. H. Naqvi, B. Singh // *PLoS ONE*. 2014. 9, 9. P. 1-12.

56. Das, D. Synthesis of ZnO nanoparticles and evaluation of antioxidant and cytotoxic activity / B. C. Nath, P. Phukon, A. Kalita, S. K. Dolui // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013. №111. P. 556-560.

57. Sorena, S. Evaluation of antibacterial and antioxidant potential of the zinc oxide nanoparticles synthesized by aqueous and polyol method / S. Sorena, S. Kumarb, S. Mishraa, S. K. Verma Purnendu Parhia // *Microbial Pathogenesis*. 2018. 119. P. 145-151.

58. Siregar, T. M. Characteristics and Free Radical Scavenging Activity of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles Derived from Extract of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) / T. M. Siregar, A. H. Cahyana, dan R. J. Gunawan // *Reaktor*. 2017. 17 (3). P. 144-150.

59. Choi, K-H. Antioxidant Potential and Antibacterial Efficiency of Caffeic Acid-Functionalized ZnO Nanoparticles / K-H Choi, K. Chang Nam, S-Y Lee, G. Cho, J-S. Jung, Ho-Joong Kim, Bong Joo Park // *Nanomaterials*. 2017. 7, 148. P. 1-11.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОЛАПСА ТАЗОВЫХ ОРГАНОВ

Г.О. Гречканев¹, Т.В. Касрашвили², Х.М. Клементе Апумайта³,
Н.Н. Никишов⁴, Р.Р. Кокова¹, И.М. Курмангулова¹, Ж.И. Гулян¹

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет»
Минздрава России, Нижний Новгород

²Медицинский центр «КайКлиник», Нижний Новгород

³ФГБОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

⁴Медицинский институт ФГБОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта», Калининград

Abstract

The article presents data on the state of antioxidant protection in patients with pelvic organ prolapse of the initial stages. On the basis of the revealed insufficiency of antioxidant defense components the conclusion of possible role of this link of pathogenesis in the development of pathology of this group of patients is made.

Key words: pelvic organ prolapse, antioxidant protection

В статье представлены данные о состоянии антиоксидантной защиты у больных с пролапсом тазовых органов начальных стадий. На основании выявленной недостаточности компонентов антиоксидантной защиты сделан вывод возможной роли этого звена патогенеза в развитии патологии данной группы пациенток.

Ключевые слова: пролапс тазовых органов, антиоксидантная защита

Пролапс тазовых органов является одной из наиболее актуальных гинекологических заболеваний во всем мире, от 3 до 70% женщин разного возраста страдают этим недугом и цифры по заболеваемости пролапсом со временем лишь увеличиваются [1].

Патогенез ПТО является многокомпонентным [2]. С одной стороны факторы, предрасполагающие в возникновению пролапса гениталий известны (собственно беременность, травмы мягких родовых путей, быстрые роды, стимуляция родовой деятельности, применение различных акушерских пособий в родах, ручное обследование полости послеродовой матки, наложение щипцов, извлечение последующей головки при тазовом предлежании плода, домашние роды, крупный плод), с другой взгляды на их роль в патогенезе заболевания достаточно противоречивы (по некоторым данным [3], частота пролапса у

женщин с родами через естественные родовые пути и путем операции кесарева сечения в анамнезе не отличаются). В связи с этим ведется поиск более тонких и сложных механизмов реализации ПТО. Установлена роль генетических особенностей, определяющих тип коллагена в фасциях промежности и связочном аппарате [4, 5]. Давно показано наличие микроциркуляторных расстройств в тканях тазового дна [6] и неврологических причин патологии [7].

Известны универсальные патогенетические механизмы развития разноплановых патологий в виде ослабления антиоксидантной защиты и развития перекисного стресса, нарушающих мембранные и околосмембранные процессы в различных органах и тканях, в т.ч. женской репродуктивной системы [8, 9, 10, 11].

Цель работы: определить состояние антиоксидантной системы защиты (АОСЗ) у больных пролапсом тазовых органов начальных стадий (опущение матки и стенок влагалища I-II степеней).

Материал и методы исследования

Было обследовано 40 женщин в возрасте от 42 до 48 лет (средний возраст составил 46,2 года), которые были разделены на две равные группы. Первую группу составили 20 женщин без соматической или гинекологической патологии, служивших контролем. Во вторую группу вошли 20 пациенток с диагнозом «опущение матки и стенок влагалища I – II степеней».

Всем пациенткам проводилось изучение состояния антиоксидантной системы крови, для чего определяли уровень активности ферментов супероксиддисмутазы и каталазы в крови. Активность каталазы определяли спектрофотометрически по убыли перекиси водорода в среде, супероксиддисмутазы – в тесте с нитросиним тетразолием, единицы измерения – Ед./г Нв в мин.

Статистическая обработка данных клинических и лабораторных исследований проводилась методами вариационной статистики с использованием пакета МЕДСТ, программы Статистика 6,0. Достоверность различия признаков устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента, за достоверные признавали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

При наличии ПТО уровень каталазы у больных (рис. 1) составил - $437,5 \pm 14,2$ Ед./г Нв в мин, что оказалось в 1,27 раза ниже по сравнению со здоровыми женщинами, где активность данного фермента была на уровне $553,8 \pm 11,6$ Ед./г Нв в мин ($p < 0,05$). Аналогичные результаты были получены и при исследовании СОД (рис. 2), уровень которой у больных с начальной стадией пролапса составил $510, 3 \pm 8,8$ Ед./г Нв в мин, что ниже по сравнению со здоровыми женщинами в 1,28 раза, в I группе СОД составила $657,0 \pm 12,4$ Ед./г Нв в мин. ($p < 0,05$)

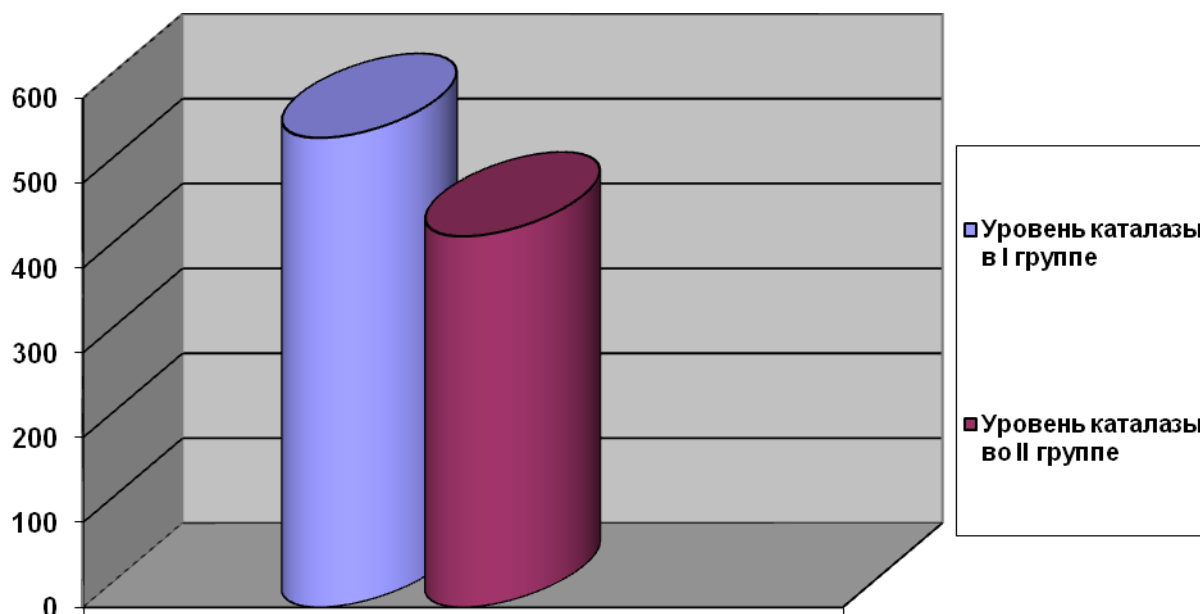


Рис. 1. Активность каталазы (Ед/г Нв в мин) у здоровых женщин (I группа) и пациенток с пролапсом тазовых органов начальных стадий (II группа)

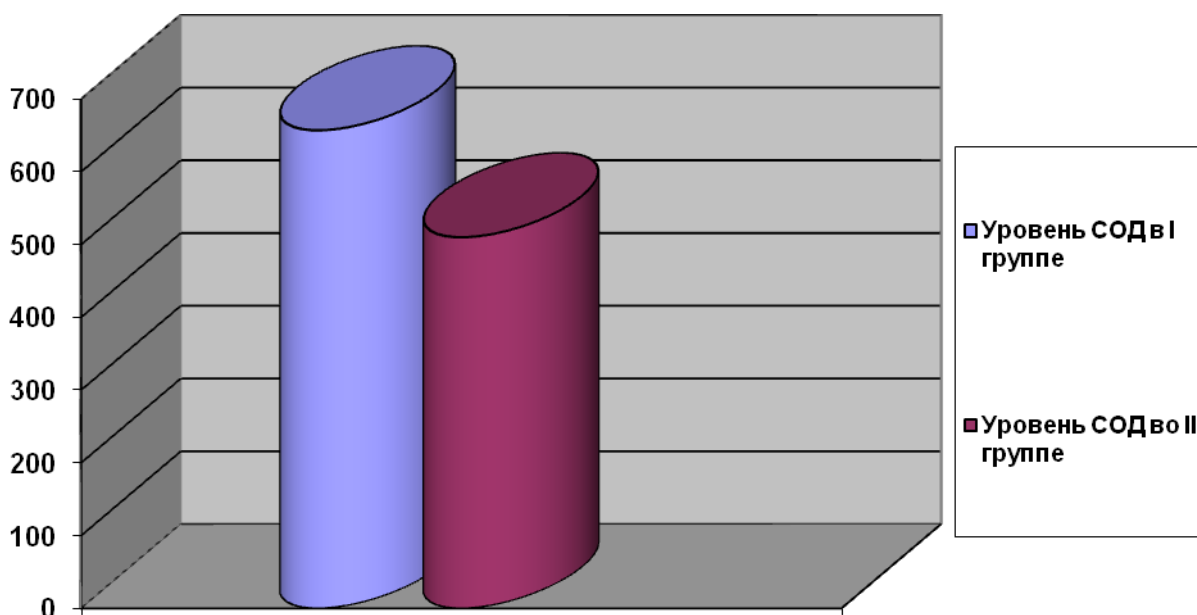


Рис. 2. Активность супероксиддисмутазы (Ед/г Нв в мин) у здоровых женщин (I группа) и пациенток с пролапсом тазовых органов начальных стадий (II группа)

Полученные нами данные имеют предварительный характер, однако они согласуются с результатами других работ, которые отражают роль ослабления антиокислительного потенциала в организме в развитии неконтролируемой липопероксидации, имеющей следствием широкий спектр патологических состояний, от воспалительных до опухолевых [7-11]. Исследование будет продолжено.

Список литературы

1. Гвоздев М.Ю., Тупикина Н.В., Касян Г.Р. и др. Пропалс тазовых органов в клинической практике врача-уролога: Методические рекомендации № 3. М., 2016. 52 с.
2. Чечнева М.А., Барто Р.А., Будыкина Т.С. и др. Современные представления о патогенезе, диагностике и способах коррекции пролапса гениталий и его осложнений (обзор литературы) // Патогенез. 2014. №4. С. 4-9.
3. Deval B., Rafii A., Poilpot S. et al. Prolapse in the young woman: study of risk, factors // Gynaec. Obstet. Fertil. 2002. № 9(30). P. 673 -676.
4. Камоева С.В., Савченко Т.Н., Иванова А.В. и др. Современные генетические аспекты пролапса тазовых органов у женщин // Акуш., гин. и репродукция. 2013. Т. 7. № 1. С.17- 21.
5. Meijerink A.M., van Rijssel R.H. Tissue composition of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse // Gynecol Obstet Invest. 2013. №75 (1). P.21-27.
6. Смольнова Т.Ю., Адамян Л.В., Сидоров В.В. Особенности микроциркуляции при опущении и выпадении внутренних половых органов у женщин репродуктивного возраста // Акушерство и гинекология. 2007. №1. С.39-44.
7. Petros P. The Female Pelvic Floor. Function, Dysfunction and Management According to the Integral Theory. Petros P. – N.-Y.: Springer, 2007. 260p.
8. Гречканев Г.О., Мотовилова Т.М., Гаревская Ю.А. Антиоксидантная терапия - важнейший компонент патогенетического лечения воспалительных заболеваний // Врач. 2015. № 3. С. 54-58.
9. Лысенко М.А., Дубинина В.Г., Носенко Е.Н. Окислительная дисрегуляция у женщин репродуктивного возраста с эпителиальными цистаденомами яичников // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 2. С. 77.
10. Гречканев Г.О., Мотовилова Т.М., Никишов Н.Н. и др. Роль Перекисного стресса в патогенезе хронического эндометрита и возможности его коррекции // Медицинский альманах. 2018. № 1 (52). С. 133-137.
11. Кузнецова И.В. Роль окислительного стресса и антиоксидантной защиты в репродукции человека // Акушерство и гинекология. 2016. № 3. С. 116-121.

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРИРОДНЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ОКИСЛЕНИИ ГОМОГЕНАТА СЕРДЦА КРЫС

М.В. Иванова¹, К.Б. Шумаев^{1,3}, А.Л. Дудылина^{1,2}, А.А. Мохов², Э.К. Рууге^{1,2}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии»

Минздрава России, Москва

²Физический факультет Московского государственного университета имени

М.В.Ломоносова, Москва

³Институт биохимии им. А.Н.Баха ФГУ Федеральный исследовательский центр

«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва

Abstract

In a model system containing rat heart homogenate and lipid soluble oxidation initiator cumene hydroperoxide, the antioxidant effects of six plant phenolic compounds of various structures including flavonols quercetin and rutin, hydroxycinnamic acids caffeic acid and *p*-coumaric acid, stilbene resveratrol and *o*-methoxyphenol curcumin were studied. Among the compounds studied, quercetin, curcumin and resveratrol prevented the formation of secondary products of lipid peroxidation (TBA-reactive products) most effectively. The efficacy of rutin and caffeic acid was significantly lower, and *p*-coumaric acid in the chosen concentration range (10-100 μ M) had no effect on LPO in the homogenate. It can be assumed that the antioxidant effect of the phenolic compounds studied is mainly due to their hydrophobicity, the amount and arrangement of hydroxyl groups in the molecule, and the ability to chelate ions of iron and other transition metals.

Key words: phenolic compounds, flavonoids, rat heart homogenate, oxidation, TBA reactive products

В модельной системе, содержащей гомогенат сердца крыс и липофильный инициатор окисления - гидропероксид кумола, исследовано антиоксидантное действие шести растительных фенольных соединений различной структуры, включая флавонолы кверцетин и рутин, оксикоричные кислоты кофейную и *пара*-кумаровую, стильбен ресвератрол и *орто*-метоксифенол куркумин. Среди исследованных соединений кверцетин, куркумин и ресвератрол наиболее эффективно предотвращали образование вторичных продуктов перекисного окисления (ТБК-реактивных продуктов). Эффективность рутина и кофейной кислоты была существенно ниже, а *пара*-кумаровая кислота в выбранном диапазоне концентраций (10-100 мкМ) не влияла на процессы перекисного окисления в гомогенате. Можно предположить, что антиоксидантное действие

исследованных фенольных соединений обусловлено главным образом их гидрофобностью, количеством и расположением гидроксильных групп в молекуле, а также способностью хелатировать ионы железа и других переходных металлов.

Ключевые слова: фенольные соединения, флавоноиды, гомогенат сердца крыс, перекисное окисление, свободные радикалы, ТБК-реактивные продукты

Известно, что патогенез многих заболеваний сердечно-сосудистой системы связан с развитием окислительного стресса, при котором в кардиомиоцитах происходит перекисное окисление липидов (ПОЛ), повреждение ядерной и митохондриальной ДНК, модификация и инактивация белков. В эти процессы, приводящие к апоптозу и некрозу кардиомиоцитов, вовлечены активные формы кислорода (АФК), а также электрофильные продукты ПОЛ, в том числе альдегиды и кетоны [Radovanovic S. et al., 2008; Azevedo P.S. et al., 2016; Sheeran F.L., Pepe S., 2016; Mattera R. et al., 2017]. Известно, что фенольные антиоксиданты противостоят токсичному действию АФК и регулируют физиологические защитные системы [Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 2015; Mattera R. et al., 2017]. Многочисленные исследования показали, что диеты, обогащенные растительными фенолами, снижают вероятность возникновения многих заболеваний, связанных с окислительным стрессом [Rice-Evans C.A. et al., 1996; Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 2015; Mattera R. et al., 2017]. Вместе с тем, роль растительных фенолов в защите миокарда от повреждающего действия АФК, до сих пор остается предметом дискуссии [Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 2015; Mattera R. et al., 2017; Dudylyna A.L. et al., 2018].

В различных модельных системах *in vitro* и *in vivo* продемонстрировано, что основными механизмами антиоксидантного действия фенольных соединений являются: (1) перехват свободных радикалов с образованием менее реакционноспособных феноксильных радикалов и (2) связывание ионов металлов переменной валентности, и тем самым снижение продукции свободных радикалов по механизму Фентона [Rice-Evans C.A. et al., 1996; Mura F. et al., 2014]. Кофейная кислота и метаболиты полифенолов, благодаря электрофильным свойствам, активируют экспрессию генов, которые участвуют в ответе на окислительный стресс, в частности генов, регулируемых транскрипционным фактором Nrf2 и антиоксидант/электрофил-респонсивным элементом (ARE/EpRE: antioxidant responsive element/electrophile responsive element) [Procházková D. et al., 2011; Sirota R. et al., 2015; Hussain T. et al., 2017; Mattera R. et al., 2017]. Считают также, что антиоксидантные свойства флавоноидов могут быть связаны с ингибированием ксантиноксидазы, НАДФН-оксидазы и некоторых других оксидаз [Procházková D. et al., 2011].

Целью нашей работы было сравнительное исследование антиоксидантной активности нескольких имеющих различную химическую структуру природных фенольных соединений (кверцетина, рутина, ресвератрола, *para*-кумаровой кислоты, кофейной кислоты, куркумина) в условиях, моделирующих свободнорадикальное окисление в тканях сердца. Эксперименты проводили на гомогенатах сердца экспериментальных животных (крыс), в качестве инициатора

окисления использовали гидропероксид кумола. Оценку ПОЛ проводили по накоплению соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивных продуктов). К таким продуктам в первую очередь относится малоновый диальдегид (МДА) [Esterbauer H., Cheeseman K.H., 1990]. В то же время при окислительной деградации ненасыщенных ацилов липидов наряду с МДА образуются и другие карбонильные соединения (алкенали, гидроксиалкенали, алкадиенали), реагирующие с ТБК [Esterbauer H., Cheeseman K.H., 1990; Esterbauer H. et al., 1991; De Zwart L.L. et al., 1999]. Важно, что эти карбонильные продукты ПОЛ обладают электрофильными свойствами и могут модифицировать различные биополимеры, а также участвовать в регуляторных процессах и развитии ряда патологических состояний [Ayala A., et al., 2014].

Материалы и методы исследования

Реагенты: KCl, K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , KOH, ЭДТА, АДФ, NERES, ТБК, ВНТ (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол), гидропероксид кумола (2-гидроксипропан-2-илбензол), сукцинат (Na соль), авертин (трибромэтанол), 2-метил-2-бутанол, а также все фенольные соединения (кверцетин, рутин, ресвератрол, *пара*-кумаровая кислота, кофейная кислота, куркумин) получены от «Sigma-Aldrich» (США), ТХУ от «Реахима» (Россия), этанол от «Merck» (Германия). Гидропероксид кумола разводили в этаноле, авертин в 2-метил-2-бутаноле, остальные растворы готовили на дистиллированной воде.

Для получения гомогената сердца использовали крыс линии Wistar. Животных (250-300 г) наркотизировали авертином (250 мг/кг веса), сердце извлекали, промывали охлажденной средой гомогенизации (150 мМ KCl, 20 мМ NERES, pH 7,4), далее все процедуры проводили при 0-4°C. Сердце измельчали ножницами, пропускали через сито из нержавеющей стали (диаметр отверстий 0,8 мм), гомогенизировали 3-4 мин при соотношении ткань/среда 1:8. Крупные частицы осаждали центрифугированием гомогената 10 мин при 600 g (центрифуга К-24, ГДР). Концентрацию белка определяли по методу Лоури. Полученные гомогенаты хранили в жидком азоте.

Окисление гомогената (0,4 мг белка/мл) проводили в условиях интенсивного перемешивания при комнатной температуре в стеклянных пробирках (d=25 мм, h=80 мм). Среда инкубирования: 0,15 М KCl и 20 мМ K,Na-фосфатный буфер, pH 7,4. Конечная концентрация инициатора окисления, гидропероксида кумола, была 1,6 мМ [Несмеянов А.Н., Несмеянов Н.А., 1969]. Окисление гомогенатов запускали после 20 мин инкубации с исследуемыми фенольными соединениями.

Как уже отмечалось выше, в ходе ПОЛ, кроме МДА, образуются и другие карбонильные соединения, реагирующие с ТБК, однако коэффициенты экстинкции формирующихся при этом комплексов существенно меньше, чем у комплекса ТБК-МДА [Esterbauer H., Cheeseman K.H., 1990]. МДА (и другие ТБК-реактивные продукты) определяли по методу описанному в работе [Ohkawa H. et al., 1979] с незначительными модификациями: отбирали по 1 мл смеси сразу после введения гидропероксида кумола, затем через 20 и 40 мин после начала окисления, к отобраным образцам добавляли 1 мл 20% ТХУ, 1 мл 0,67% раствора ТБК и 10 мкл 5 мМ ВНТ. Далее образцы перемешивали на вортексе, 45

мин выдерживали в кипящей водяной бане, после чего охлаждали и центрифугировали 5 мин при 3000 g. В надосадке измеряли оптическую плотность при $\lambda=532$ (максимум поглощения триметинового комплекса ТБК-МДА), в качестве базовой линии использовали поглощение при $\lambda=580$ нм. Концентрацию МДА вычисляли, используя коэффициент молярной экстинкции для комплекса ТБК-МДА $\varepsilon=1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [Sinnhuber R.O., Yu T.C., 1958]. Измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV 260 (Япония). Эффективность антиоксидантного действия тестируемых фенолов оценивали по уменьшению образования ТБК-реактивных продуктов в пробах, выраженной в процентах ингибирования окисления по отношению к контролю: $([\text{МДА}]_{\text{проба}} - [\text{МДА}]_{\text{контроль}}) \cdot 100 / [\text{МДА}]_{\text{контроль}}$, где проба – гомогенат, окисленный в присутствии тестируемых соединений, а контроль – в отсутствие.

Статистическая обработка. Эксперименты с каждой концентрацией исследуемых веществ проводили в 3-5 повторах. Для экспериментальных групп вычисляли среднее арифметическое и стандартное отклонение концентрации ТБК-реактивных продуктов, и процента ингибирования окисления гомогената. Для сравнения средних значений использовали однофакторный дисперсионный анализ с применением критерия Даннета для оценки достоверности отличий между группами, различия между группами считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Структурные формулы исследованных фенольных соединений представлены на рисунке 1. Диапазон концентраций фенолов (10-100 мкМ) был подобран исходя из данных работы [Silberberg M., et al. 2005]. В этой статье показано, что при введении в рацион крыс в течение трех недель кверцетина в дозах 45-47 мг/день концентрация флавоноида и его метаболитов в плазме крови достигала $61,2 \pm 4,5$ мкМ. В печени животных концентрация кверцетина составляла $16,3 \pm 3,0$ мкмоль/кг ткани [Silberberg M., et al. 2005]. В наших экспериментах перекисное окисление гомогената сердца инициировалось гидрофобным гидропероксидом кумола, при гомолизе которого образуются алкоксильные (RO^{\bullet}) и гидроксильный (OH^{\bullet}) радикалы [Несмеянов А.Н., Несмеянов Н.А., 1969]. В этих условиях в основном происходит окисление ненасыщенных жирных кислот липидов, однако реакции свободных радикалов с другими биологическими молекулами (аминокислотами и нуклеиновыми кислотами), также приводят к образованию ТБК-реактивных продуктов [Cheeseman K.H. et al. 1988].

Данные о влиянии тестируемых фенолов на образование ТБК-реактивных продуктов при окислении гомогенатов миокарда представлены на рисунках 2-4. На рисунке 2 показаны типичные спектры комплексов ТБК с продуктами, образующимися при окислении гомогената в присутствии кверцетина.

Характерные кривые накопления МДА при окислении гомогената миокарда в присутствии 10, 20, 50 и 100 мкМ кверцетина, ресвератрола и кофейной кислоты представлены на рисунке 3.

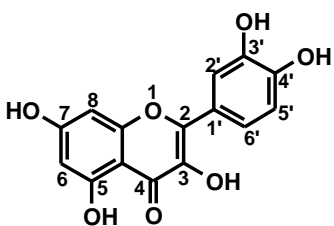
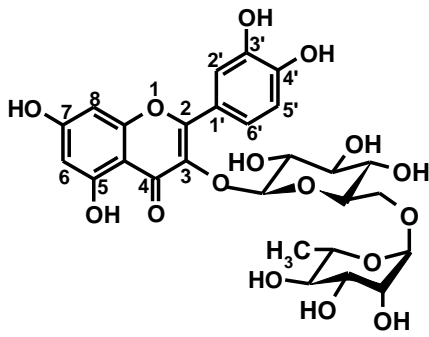
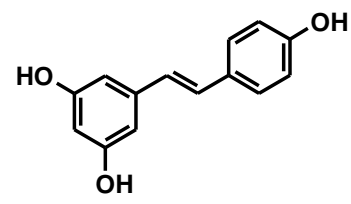
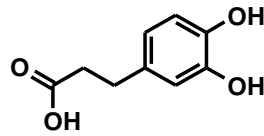
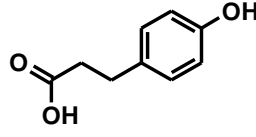
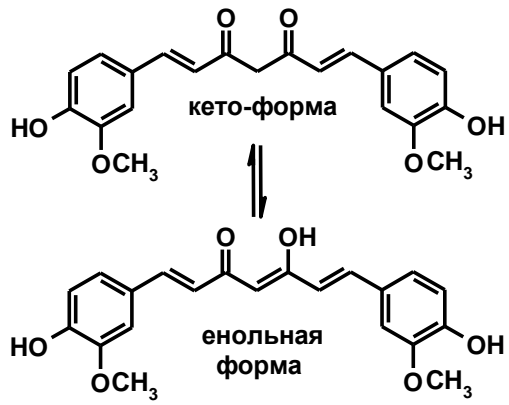
Соединение		Структурная формула
	Кверцетин	
Флавонолы	Рутин	
Стильбены	Ресвератрол	
Оксикоричные кислоты	Кофейная кислота	
	<i>para</i> -Кумаровая кислота	
<i>орто</i> -Метоксифенолы	Куркумин	

Рис. 1. Структурные формулы исследуемых фенольных соединений

Из рисунков 2 и 3 видно, что в данной модели окисления концентрация ТБК-реактивных продуктов увеличивалась со временем только в первые 20 минут после добавления гидропероксида кумола, а в следующие 20 мин накопление вторичных продуктов ПОЛ прекращалось (различие между средними

значениями в точках 20 и 40 мин не было достоверным). Поэтому для оценки эффективности исследуемых соединений использовали данные о накоплении ТБК-реактивных продуктов за 20 мин окисления.

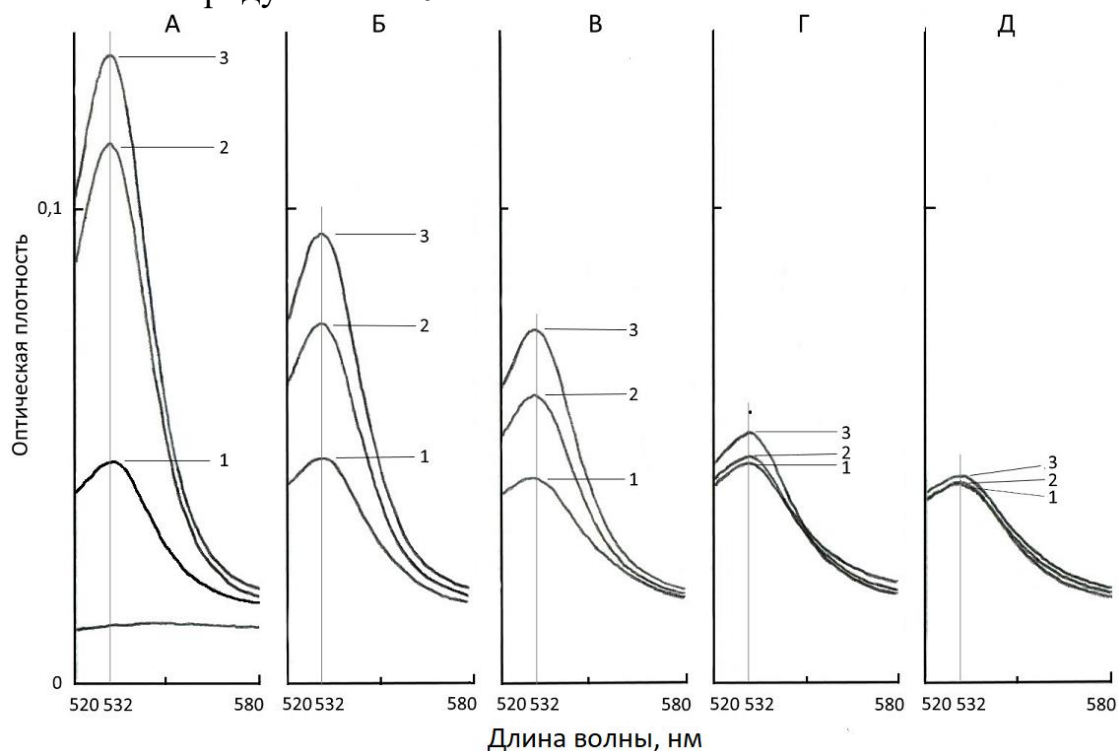


Рис. 2. Характерные спектры поглощения продуктов реакции ТБК с карбонильными соединениями, образующимися при окислении гомогената сердца в присутствии различных концентраций кверцетина: (А) – контроль, в отсутствие флавоноида, (Б) – в присутствии 10 мкМ, (В) - 20 мкМ, (Г) - 50 мкМ и (Д) – 100 мкМ кверцетина в среде инкубирования, где кривые 1, 2, 3 – спектры ТБК-реактивных продуктов в 0, 20, 40 мин окисления, соответственно

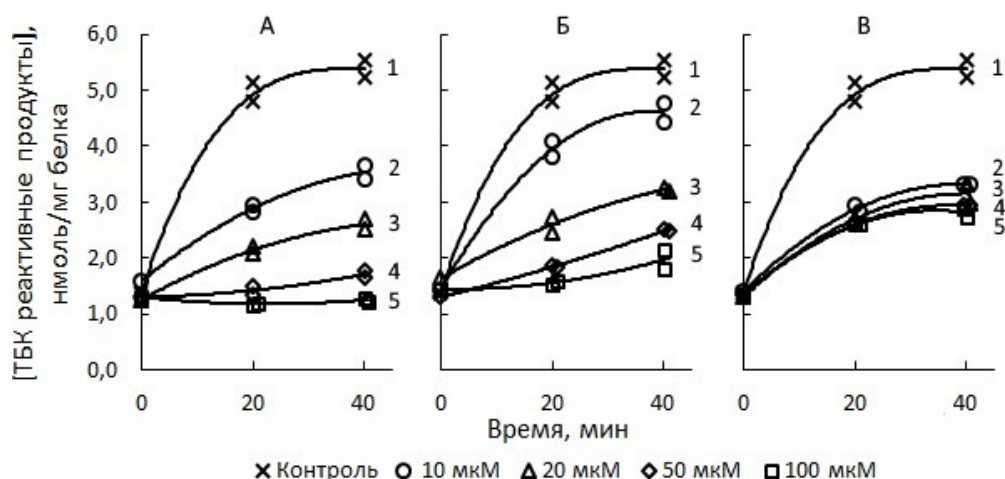


Рис. 3. Влияние различных концентраций кверцетина (А), ресвератрола (Б) и кофейной кислоты (В) на кинетику накопления ТБК-реактивных продуктов в ходе перекисного окисления гомогената сердца. Кривая (x) – контроль без антиоксиданта, кривые (o), (Δ), (◇) и (□) – 10, 20, 50 и 100 мкМ фенольного соединения, соответственно

Данные об ингибировании перекисного окисления липидов гомогената сердца исследуемыми веществами в концентрациях 10, 20, 50 и 100 мкМ приведены на диаграммах на рисунке 4. Видно, что наибольшим антиоксидантным действием в используемой нами модели окисления обладали кверцетин, куркумин и ресвератрол, в концентрации 100 мкМ они ингибировали окисление на 67-76%. Кофейная кислота и рутин были менее эффективны – в концентрации 100 мкМ они снижали уровень ТБК-реактивных продуктов на 34-40%. В концентрациях 10-100 мкМ *para*-кумаровая кислота не оказывала достоверного влияния на окисление гомогената.

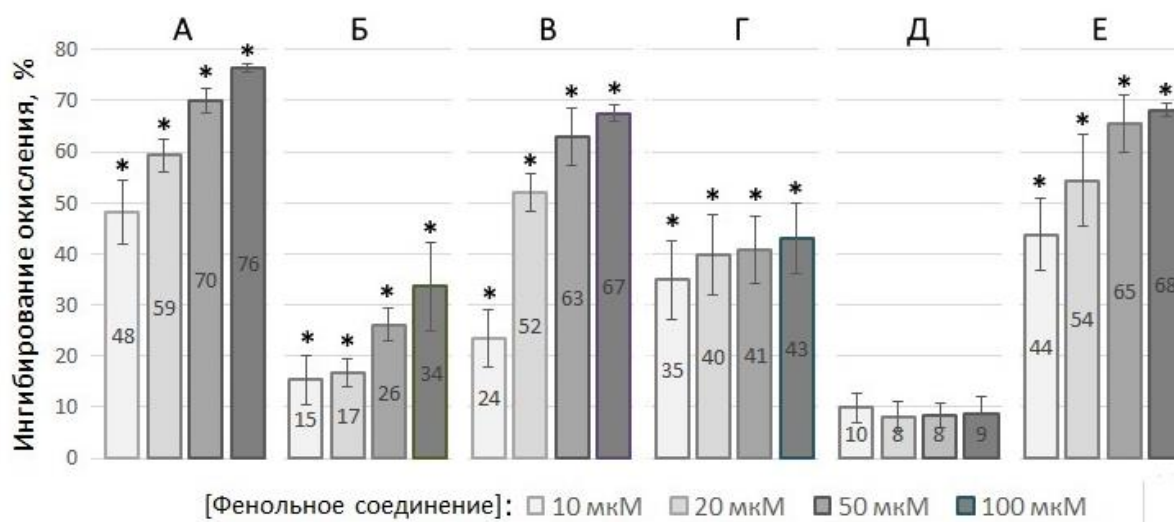
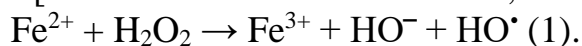


Рис. 4. Ингибирование окисления гомогенатов сердца под действием: (А) – кверцетина, (Б) - рутина, (В) - ресвератрола, (Г) – кофейной кислоты, (Д) – *para*-кумаровой кислоты, (Е) – куркумина. Ингибирование образования ТБК-реактивных продуктов выражено в процентах от контроля. Данные представлены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение ($n=3\div 5$). Группы, в которых выявлено достоверное снижение образования ТБК-реактивных продуктов*. В контрольных образцах концентрация ТБК-реактивных продуктов после 20 мин окисления составляла $4,69 \pm 0,45$ нмоль/мг белка

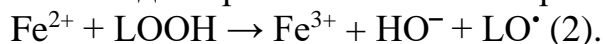
Исследованию антиоксидантного действия фенольных соединений, а также анализу зависимости этого действия от физико-химических свойств и структуры молекул посвящено большое число работ [Rice-Evans C.A. et al., 1996; Villaño D. et al., 2005; Guo M., et al., 2007; Fernandez-Panchon M.S., et al., 2008; Procházková D. et al., 2011; Priyadarsini K.I., 2013; Mura F. et al., 2014; Slavova-Kazakova A.K., et al., 2015; Mattera R. et al., 2017]. Известно, что антиоксидантная активность фенолов определяется их способностью отдавать атом водорода или электрон, в результате чего образуется стабильный феноксильный радикал, неспаренный электрон которого делокализован по ароматической структуре [Fernandez-Panchon M.S., et al., 2008; Echeverría J., et al., 2017]. Этот механизм позволяет фенольным антиоксидантам перехватывать свободные радикалы, образующиеся в цепных реакциях ПОЛ, что приводит к прерыванию этих реакций. Также известно, что антирадикальная активность фенольных соединений зависит от количества и расположения гидроксильных групп [Rice-Evans C.A. et al. 1996; Fernandez-

Panchon M.S. et al., 2008]. В частности, поскольку 3-гидроксигруппа С-кольца рутина гликозилирована (рис. 2), антирадикальная активность этого флавонола ниже, чем у кверцетина [Villaño D. et al., 2005]. Гидроксильные группы в *орто*-положении бензольного кольца участвуют в делокализации электрона и повышают стабильность феноксильного радикала. Считается, что благодаря этому кверцетин и кофейная кислота, содержащие *орто*-диоксibenзол (катехольную группу), более эффективно перехватывают пероксильные радикалы, чем другие полифенолы [Villaño D. et al., 2005]. Известно, что у оксикоричных кислот увеличение числа свободных гидроксигрупп в ароматическом кольце коррелирует с более высокой антиоксидантной активностью [Mura F. et al., 2014; Villaño D. et al., 2005]. И в наших экспериментах *пара*-кумаровая кислота, имеющая одну гидроксильную группу, практически не ингибирует окисление гомогената сердца. Исследование метоксипроизводных ресвератрола показало [Stivala L.A. et al., 2001], что антиоксидантная и антирадикальная активность этого полифенола обусловлена синэргичным действием гидроксильных групп, причём основной вклад вносит 4'-гидроксигруппа. Кроме того, важную роль играет присутствие в молекуле ресвератрола сопряженной полиеновой структуры, которая обеспечивает делокализацию электрона феноксильного радикала на двух ароматических кольцах. Эффективность куркумина как ингибитора свободнорадикального окисления сравнима с флавоноидами, и главным образом, определяется фенольными гидроксильными группами [Choudhury A.K. et al., 2015].

Другим антиоксидантным механизмом, характерным для полифенолов, является связывание ионов переходных металлов, в первую очередь, ионов железа, с образованием редокс неактивных комплексов [Rice-Evans C.A. et al., 1996]. Формирование этих комплексов снижает скорость реакции Фентона (реакция 1), в которой продуцируется такой сильный окислитель как гидроксильный радикал [Fernandez-Panchon M.S. et al., 2008]:



Кроме того, хелатирование ионов Fe^{2+} ингибирует образование алкоксильных радикалов липидов при гомолизе липопероксидов (реакция 2):



Исследуемые нами фенольные соединения содержат различные группы, способные принимать участие в связывании ионов железа [Guo M., et al., 2007]. У флавонола кверцетина это гидроксильные группы в *орто*-положении кольца В (катехольная группа), гидроксигруппы в 3-м и 5-м положениях колец С и А, соответственно, а также карбонильная группа в 4-м положении кольца С (рис. 1). Эти, содержащие кислород, группы наиболее эффективно связывают ионы Fe^{2+} [Guo M., et al., 2007]. Вместе с тем, катехольная группа участвует в образовании комплексов Fe^{3+} с кверцетином [Engelmann M.D., et al., 2005]. Все три участка кверцетина, связывающие железо, способны хелатировать катионы железа в физиологических условиях, кажущиеся константы связывания Fe^{2+} равны 10^6 - 10^7 M^{-1} (для комплексов 1:1) и 10^{10} - 10^{12} M^{-2} (для комплексов 1:2) при pH 7,2 в К-фосфатном буфере [Guo M., et al., 2007]. Таким образом, кверцетин связывает Fe^{2+} , сильнее, чем хорошо известный Fe^{2+} -хелатор на основе азота феррозин

(1,2,4-триазин). Куркумин является β -дикетоном (рис. 1), который образует комплексы с $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Cu^{2+} и Mn^{2+} [Borsari M. et al., 2002; Priyadarsini K.I., 2013]. Куркумину свойственна кето-енольная таутомерия, причем его енольная форма имеет полиеновую сопряженную структуру (рис. 1). Считается, что образование этой структуры в сочетании с енольной группой позволяет куркумину хелатировать ионы переходных металлов с очень высокими константами связывания, например, логарифм константы связывания Fe^{3+} равен 29,1 [Priyadarsini K.I., 2013], он так же высок, как у известного хелатора железа дефероксамина. В то же время, сопряженная полиеновая структура участвует в стабилизации феноксильных радикалов куркумина [Slavova-Kazakova A.K., et al., 2015]. Интересно, что комплексы куркумина с медью и марганцем способны утилизировать супероксидный радикал, имитируя супероксиддисмутазу [Priyadarsini K.I., 2013], таким образом, антиоксидантное действие комплексов куркумина может быть обусловлено не только подавлением реакций фентоновского типа.

Вместе с тем, полифенолы могут проявлять и прооксидантные свойства, которые обусловлены автоокислением этих соединений, катализируемым ионами металлов переменной валентности [Procházková D. et al., 2011]. Предполагают, что при этом образуется супероксидный анион-радикал, а восстановление ионов Fe^{3+} и Cu^{2+} стимулирует реакцию Фентона. У флавоноидов прооксидантный эффект зависел от их концентрации [Procházková D. et al., 2011]. Так, кверцетин, госсипол и мерицетин в микромолярных концентрациях ингибируют индуцируемое ионами железа ПОЛ, однако в концентрации 100 мкМ эти полифенолы существенно усиливают продукцию гидроксильного радикала. Тем не менее, в наших экспериментах кверцетин в концентрации 100 мкМ действует как антиоксидант.

Следует отметить, что способность полифенолов хелатировать ионы железа может влиять на метаболизм такой важной регуляторной молекулы как оксид азота. Действительно, эти соединения влияют на стабильность важных метаболитов оксида азота (NO) – динитрозильных комплексов железа (данные не приведены). Важно, что эти комплексы проявляют антиоксидантные свойства, в том числе при окисления гомогената миокарда [Гудков Л.Л. с соавт., 2007]. С другой стороны, фенольные антиоксиданты перехватывают пероксинитрит [Procházková D. et al., 2011; Priyadarsini K.I., 2013]. Таким образом, влияние полифенолов на процессы свободнорадикального окисления в биомолекул может быть опосредовано их взаимодействием метаболитами NO.

Липофильность антиоксидантов является важнейшим фактором, который определяет их эффективность в гидрофобном окружении. Известно, что после образования комплексов с катионами железа липофильность флавоноидов увеличивается в несколько раз [Engelmann M.D., et al., 2005]. Одним из показателей, характеризующих липофильность молекул в смешанных (гидрофильно-липофильных) системах является коэффициент распределения в стандартной системе октанол-вода (P). В Таблице 1 представлены данные по липофильности тестируемых фенольных соединений, полученные как для системы октанол-вода (LogP), так и для более физиологической системы

буферный раствор с рН 7,4 - октанол (LogD). Из коэффициентов распределения, представленных в таблице 1 следует, что в физиологических условиях растворимость в гидрофобной среде кверцетина, ресвератрола и куркумина в несколько десятков раз больше растворимости в водных растворах.

Липофильность кофейной кислоты намного ниже, чем у кверцетина, ресвератрола и куркумина, но она все же примерно в 10 раз лучше растворяется в гидрофобной среде, чем в водных растворах. Вместе с тем, исходя из известных значений LogD, наименее липофильными среди исследованных соединений являются *пара*-кумаровая кислота и рутин. Можно предположить, что в используемой нами модельной системе эффективное ингибирование перекисного окисления под действием кверцетина, ресвератрола и куркумина связано с высокой липофильностью этих соединений.

Таблица 1. Литературные данные, характеризующие липофильность тестируемых растительных фенолов, приведены логарифмы коэффициентов распределения этих соединений в гидрофильно-липофильных системах

Соединение	LogP	LogD
Кверцетин	1,55 ± 0,56 [Echeverría J., et al., 2017] 2,08 ± 0,57 [Zillich O.V. et al., 2013]	2,26 [Moridani M.Y. et al, 2002] 2,8 ± 0,1 [Zillich O.V. et al., 2013] 0,93 ± 0,06 [Erlejman A.G. et al., 2004]
Рутин	- 0,12 ± 0,07 [Zillich O.V. et al., 2013]	- 0,55 ± 0,07 [Zillich O.V. et al., 2013]
Ресвератрол	2,65 ± 0,63 [Zillich O.V. et al., 2013] 2,57–2,83 [Rastija V. Medić-Sarić M., 2009]	2,7 ± 0,1 [Zillich O.V. et al., 2013] 1,87 [Moridani M.Y. et al, 2002]
Кофейная кислота	0,98–1,67 [Rastija V., Medić-Sarić M., 2009]	1,24 [Moridani M.Y. et al, 2002]
<i>пара</i> -Кумаровая кислота	1,79 [Human Metabolome Database (HMDB)]	- 0,34 ± 0,02 [Erlejman A.G. et al., 2004]
Куркумин	2,3–2,6 [Priyadarsini K.I., 2013]	

LogP – логарифм коэффициента распределения в стандартной системе 1-октанол - вода. LogD – логарифм коэффициента распределения в системе 1-октанол – буферный раствор с рН 7,4. pK_1 – отрицательный десятичный логарифм первой константы диссоциации.

Заключение

Исследовано влияние фенолов на окисление гомогената тканей сердца, инициированное гидропероксидом кумола. Растительные фенольные соединения различных групп – *орто*-метоксифенол куркумин, флавонолы кверцетин и рутин, стильбен ресвератрол – показывают высокую антиоксидантную активность. Из исследованных оксикоричных кислот кофейная кислота, но не *пара*-кумаровая кислота, также в значительной степени подавляет окисление. Мы полагаем, что

антиоксидантное действие растительных фенолов связано как с их антирадикальными свойствами и доступностью этих соединений в липидной фазе, так и со способностью фенолов предотвращать вовлечение в процессы перекисного окисления катионов переходных металлов, т.е. с подавлением реакций фентоновского типа. Вместе с тем, растительные фенольные соединения могут участвовать в электрофильной регуляции, не только благодаря собственным электрофильным свойствам, но также снижая концентрацию продуктов свободнорадикального окисления (МДА и других карбонильных соединений).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ: гранты № 18-015-00125 и 19-015-00444.

Список литературы

1. Гудков Л.Л., Шумаев К.Б., Каленникова Е.И., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. Антиоксидантное и прооксидантное действие доноров и метаболитов оксида азота // *Биофизика*. 2007. Т. 52, №3. С. 503-508.
2. Несмеянов А.Н., Несмеянов Н.А. Начала органической химии. М.: Химия, 1969. Кн.1. 624с.
3. Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal // *Oxid. Med. Cell Longev*. 2014. Vol. 2014, ID 360438.
4. Azevedo P.S., Polegato B.F., Minicucci M.F., Paiva S.A. R., Zornoff L.A.M. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment // *Arq. Bras. Cardiol*. 2016. Vol. 106, №1. P. 62-69.
5. Borsari M., Ferrari E., Grandi R., Saladini M. Curcuminoids as potential new iron-chelating agents: spectroscopic, polarographic and potentiometric study on their Fe(III) complexing ability // *Inorganica Chim. Acta*. 2002. Vol. 328, №1. P. 61-68.
6. Cheeseman K.H., Beavis A., Esterbauer H. Hydroxyl-radical-induced iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose. Quantitative determination of malondialdehyde // *Biochem. J*. 1988. Vol. 252. P. 649-653.
7. Choudhury A.K., Raja S., Mahapatra S., Nagabhusanam K., Majeed M. Synthesis and evaluation of the anti-oxidant capacity of curcumin glucuronides, the major curcumin metabolites // *Antioxidants*. 2015. Vol. 4. P. 750-767.
8. De Zwart L.L., Meerman J.H.N., Commandeur J.N.M., Vermeulen N.P.E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans // *Free Rad. Biol. Med*. 1999. Vol. 26, №½. P. 202-226.
9. Dudylyna A.L., Ivanova M.V., Shumaev K.B., Ruuge E.K. Superoxide Formation in Cardiac Mitochondria and Effect of Phenolic Antioxidants // *Cell Biochem. Biophys*. 2019. Vol. 77, №1. P. 99-107.
10. Echeverría J., Opazo J., Mendoza L., Urzúa A., Wilkens M. Structure-Activity and Lipophilicity Relationships of Selected Antibacterial Natural Flavones and Flavanones of Chilean Flora // *Molecules*. 2017. Vol. 22, №4. P. e608.
11. Engelmann M.D., Hutcheson R., Cheng I.F. Stability of ferric complexes with 3-hydroxyflavone (flavonol), 5,7-dihydroxyflavone (chrysin), and 3',4'-dihydroxyflavone // *J. Agric. Food Chem*. 2005. Vol. 53, №8. P. 2953-2960.

12. Erlejtman A.G., Verstraeten S.V., Fraga C.G., Oteiza P.I. The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects // *Free Radic. Res.* 2004. Vol. 38, №12. P. 1311-1320.
13. Esterbauer H., Cheeseman K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal // *Methods in Enzymology.* 1990. Vol. 186. P. 407-421.
14. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes // *Free Rad. Biol. Med.* 1991. Vol. 11. P. 81-128.
15. Fernandez-Pancho M.S., Villano D., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From In Vitro Results to In Vivo Evidence // *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2008. Vol. 48. P. 649–671.
16. Guo M., Perez C., Wei Y., Rapoza E., Su G., Bou-Abdallah F., Chasteen N.D. Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bioeffects // *Dalton Trans.* 2007. Vol. 43. P. 4951–4961.
17. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 5-th Edition. Oxford: Oxford University Press, 2015. 944 p.
18. Hussain T., Tan B., Liu G., Murtaza G., Rahu N., Saleem M., Yin Y. Modulatory Mechanism of Polyphenols and Nrf2 Signaling Pathway in LPS Challenged Pregnancy Disorders // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017. Vol. 2017. ID 8254289.
19. Mattera R., Benvenuto M., Giganti M.G., Tresoldi I., Pluchinotta F.R., Bergante S., Tettamanti G., Masuelli L., Manzari V., Modesti A., Bei R. Effects of Polyphenols on Oxidative Stress-Mediated Injury in Cardiomyocytes // *Nutrients.* 2017. Vol. 9. P. 523.
20. Moridani M.Y., Galati G., O'Brien P.J. Comparative quantitative structure toxicity relationships for flavonoids evaluated in isolated rat hepatocytes and HeLa tumor cells // *Chem. Biol. Interact.* 2002. Vol. 139. N. P. 251-264.
21. Mura F., Silva T., Castro C., Borges F., Zuñiga M.C., Morales J., Olea-Azar C. New insights into the antioxidant activity of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic systems: Spectroscopic, electrochemistry, and cellular studies // *Free Rad. Res.* 2014. Vol. 8, №12. P. 1473–1484.
22. Ohkawa H., Ohidhi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal. Biochem.* 1979. Vol. 95. P. 351-358.
23. Priyadarsini K.I. Chemical and Structural Features Influencing the Biological Activity of Curcumin // *Curr. Pharm. Des.* 2013. Vol. 19, №11. P. 2093-2100.
24. Procházková D., Boušová I., Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids // *Fitoterapia.* 2011. Vol. 82, №4. P. 513-523.
25. Radovanovic S., Krotin M., Simic D.V., Mimic-Oka J., Savic-Radojevic A., Pljesa-Ercegovac M., Matic M., Ninkovic N., Ivanovic B., Simic T. Markers of oxidative damage in chronic heart failure: role in disease progression. // *Redox Rep.* 2008. Vol. 13, №3. P.109-116.
26. Rastija V., Medić-Sarić M. QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols // *Eur. J. Med. Chem.* 2009. Vol. 44, №1. P. 400-408.

27. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganaga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids // *Free Radical Biol. Med.* 1996. Vol. 20. P. 933–956.

28. Sheeran F.L., Pepe S. Posttranslational modifications and dysfunction of mitochondrial enzymes in human heart failure // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2016. Vol. 311. P. E449–E460.

29. Silberberg M., Morand C., Manach C., Scalbert A., Remesy A.C. Co-administration of quercetin and catechin in rats alters their absorption but not their metabolism // *Life Sci.* 2005. Vol. 77. P. 3156–3167.

30. Sinnhuber R.O., Yu T.C. 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. Quantitative determination of malonaldehyde // *Food Technol.* 1958. Vol. 12, №1. P. 9-13.

31. Sirota R., Gibson D., Kohen R. The role of the catecholic and the electrophilic moieties of caffeic acid in Nrf2/Keap1 pathway activation in ovarian carcinoma cell lines // *Redox Biology.* 2015. Vol. 4. P. 48–59.

32. Stivala L.A., Savio M., Carafoli F., Perucca P., Bianchi L., Maga G., Forti L., Pagnoni U.M., Albinì A., Prosperì E., Vannini V. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol // *J Biol Chem.* 2001. Vol. 276, №25. P. 22586-22594.

33. Slavova-Kazakova A.K., Angelova S.E., Veprintsev T.L., Denev P., Fabbri D., Dettori M. A., Kratchanova M., Naumov V.V., Trofimov A.V., Vasil'ev R.F., Delogu G., Kancheva V.D. Antioxidant potential of curcumin-related compounds studied by chemiluminescence kinetics, chain-breaking efficiencies, scavenging activity (ORAC) and DFT calculate // *Beilstein J. Org. Chem.* 2015. Vol. 11. P. 1398–1411.

34. Villaño D., Fernández-Pachón M.S., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro // *Analytica Chimica Acta.* 2005. Vol. 538. P. 391–398.

35. Zillich O.V., Schweiggert-Weisza U., Hasenkopfa K., Eisnera P., Kerschb M. Antioxidant activity, lipophilicity and extractability of polyphenols from pig skin – development of analytical methods for skin permeation studies // *Biomed. Chromatogr.* 2013. Vol. 27. P. 1444–1451.

36. Human Metabolome Database (HMDB). URL. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0002035> (дата обращения 15.01.2018).

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ И КОНЦЕНТРАЦИЙ МОНООКСИДА АЗОТА НА КРИСТАЛЛОГЕННЫЕ СВОЙСТВА СЫВОРОТКИ КРОВИ IN VITRO

А.К. Мартусевич¹, Е.С. Гольгина^{1,3}, Л.К. Ковалева², К.Б. Шумаев⁴

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет»

Минздрава России, Нижний Новгород

²ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»

Минздрава России, Краснодар

⁴ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

³ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский
государственный университет», Нижний Новгород

Abstract

The aim of the work was to study the crystallogenic properties of blood under the influence of different concentrations of gaseous and bound nitric oxide in vitro. The experiment was performed on whole blood samples (n=20), divided into 6 portions (one intact and five experimental). Direct bubbling of four blood samples with NO-containing gas generated by the Plazon device (NO concentration – 800 ppm) and an experimental device for the synthesis of nitric oxide (20, 50 and 100 ppm) were performed for treatment. In the fifth experimental blood sample 0.1 ml. solution of dinitrosyl iron complex was added. All the samples were tested on crystallogenic properties of blood serum by the teziocrystalloscopy method. It was found that the effect of nitric oxide on the crystallogenic properties of blood serum is determined by its form (free or bound), as well as the current concentration.

Key words: nitric oxide, dinitrosyl iron complexes, blood, crystallogenic properties, biocrystallogics

Целью работы являлось провести исследование кристаллогенных свойств крови in vitro при воздействии различных концентраций газообразного и депонированного оксида азота. Эксперимент выполнен на образцах цельной крови (n=20), разделяемых на 6 порций (интактную и 5 опытных, подвергавшихся обработке). Для обработки производили прямой барботаж четырех опытных образцов крови газообразным оксидом азота, генерируемым аппаратом «Плазон» (концентрация NO – 800 ppm), а также экспериментальным аппаратом для синтеза оксида азота (концентрация NO -20, 50 и 100 ppm). В пятый опытный образец крови добавляли 0,1 мл. раствора динитрозильного комплекса железа. Для всех образцов производили изучение кристаллогенных свойств сыворотки крови методом тезиокристаллоскопии. Установлено, что влияние оксида азота на кристаллогенные свойства сыворотки крови

определяется его формой (свободная или депонированная), а также действующей концентрацией.

Ключевые слова: оксид азота, динитрозильные комплексы железа, кровь, кристаллогенные свойства, биокристалломика

В настоящее время к биологическим эффектам монооксида азота (NO) приковано внимание научной общественности, что обусловлено их плейотропностью, а также значительной клинико-физиологической значимостью [1, 4, 5, 8]. Ранее было показано, что NO способен влиять на окислительный и энергетический метаболизм [5-6, 9] и состояние некоторых детоксикационных ферментов крови [6], а также изменять кристаллогенные свойства сыворотки крови, находясь в достаточно высокой концентрации [3]. Однако в целом исследования в обсуждаемой области немногочисленны. Кроме того, ни отечественными, ни зарубежными авторами не были получены сведения о характере действия на кристаллогенные свойства низких доз оксида азота, обладающих, согласно предположениям упомянутых авторов, более благоприятным влиянием на метаболизм крови.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на образцах цельной крови, полученной на Нижегородской областной станции переливания крови (г. Нижний Новгород) от практически здоровых доноров (n=20).

Изучался характер реакции цельной консервированной крови на воздействие двух форм оксида азота:

- свободного (в составе газовых смесей);
- депонированного (в составе глутатион-содержащих динитрозильных комплексов железа).

Для проведения эксперимента каждый образец крови разделяли на 6 порций (интактную, на которую не оказывали воздействий, и 5 опытных, подвергавшихся обработке). Объем каждой порции составлял 5 мл.

Для обработки производили прямой барботаж четырех опытных образцов крови газообразным оксидом азота, генерируемым аппаратом «Плазон» при стандартной мощности (концентрация NO – 800 ppm), а также экспериментальным аппаратом (“NO-генератор”) для синтеза оксида азота, созданным в Российском федеральном ядерном центре - Всероссийском НИИ экспериментальной физики [2]. Используемые концентрации в этом случае составляли 20, 50 и 100 ppm.

Время барботирования - 3 мин., экспозиция после воздействия – 5 мин.

Динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами (ДНКЖ) синтезировали по методике А.Ф. Ванина (2009, 2011) [7, 10]. Концентрация соединения в физиологическом растворе, определяемая спектрофотометрически по известной экстинкции при длинах волны 310 и 360 нм, составляла 3,1 ммоль/л.

По завершении экспозиции производили центрифугирование всех образцов при 1500 об/мин в течение 15 мин.

В образцах производили сравнительное изучение кристаллогенных свойств сыворотки крови методом тезиокристаллоскопии.

Полученные данные были обработаны статистически в программном пакете Statistica 6.1 for Windows.

Результаты и обсуждение

Описание дегидратированных образцов плазмы крови производили морфологически и с применением системы визуаметрических параметров, характеризующих качественные и количественные стороны процесса кристаллизации биосреды (кристаллизуемость, индекс структурности, степень деструкции фации, выраженность краевой зоны).

Для контрольного 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. 1А).

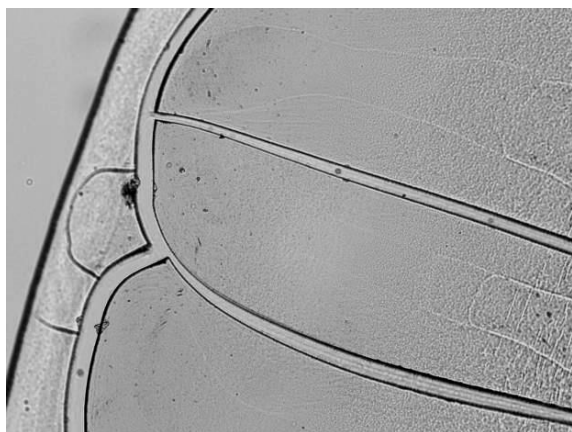
Концентрация оксида азота 20 ppm способствовала умеренной оптимизации кристаллоскопической картины биосубстрата (рис. 1 Б). Это проявлялось в формировании регулярных центростремительных разломов, расширение радиуса краевой зоны.

При увеличении концентрации оксида азота до 50 ppm наблюдали умеренное обеднение кристаллического компонента фации с одновременным сужением краевой зоны микропрепарата, сопоставимым с выявленным в контрольном образце высушенной биологической жидкости (рис. 1В).

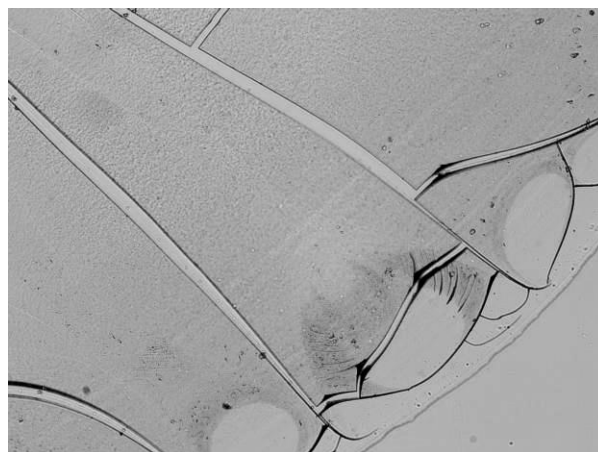
Использование самой высокой концентрации NO от экспериментального NO-генератора» РФЯЦ (100 ppm) способствовала оптимизации сети разломов картины (с формированием дугообразных разломов), стимулировала непосредственное кристаллообразование в центральной и промежуточной зонах фации, а также обеспечивала относительную неоднородность текстуры образца (рис. 1Г). Кроме того, наблюдалась тенденция к хаотизации «дополнительных» разломов краевой зоны микропрепарата, соединяющих основные между собой.

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, в которой конденсируются нитрозилированные белки (рис. 1Д).

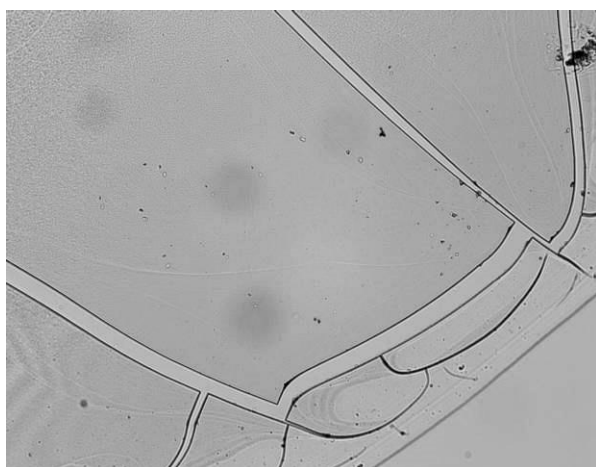
Наиболее выраженной прокристаллогенной активностью обладает водный раствор ДНКЖ, при введении которого в биологическую жидкость наблюдали как стимуляцию образования одиночно-кристаллических и дендритных структур в целом, так и их усложнение. Следует отметить, что в этом случае большинство элементов имеют правильную конфигурацию (рис. 1Е).



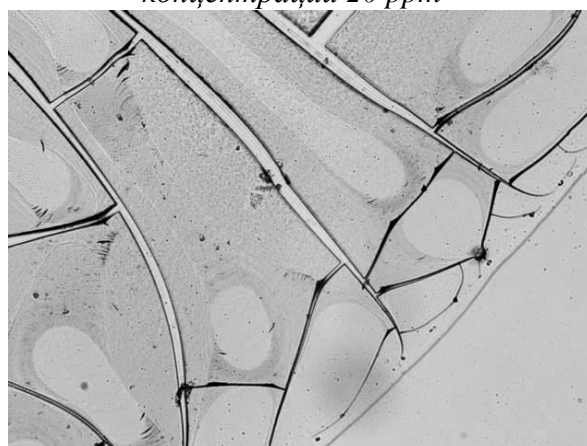
А. Контрольный образец



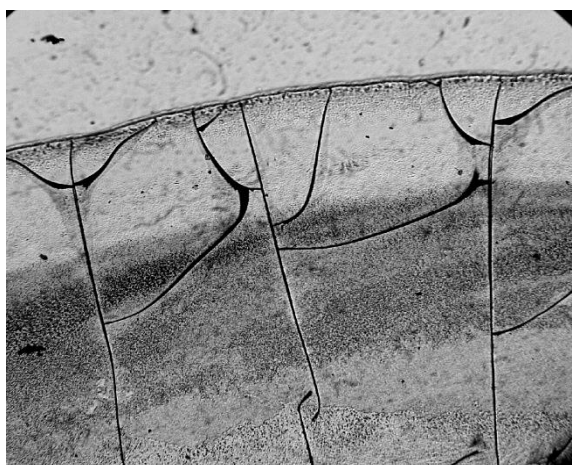
Б. Обработка крови газообразным NO в концентрации 20 ppm



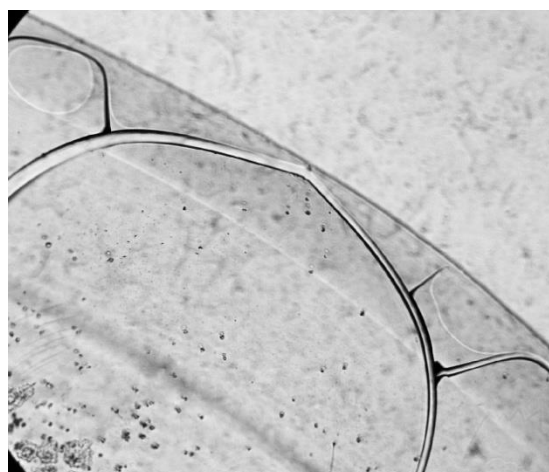
В. Обработка крови газообразным NO в концентрации 50 ppm



Г. Обработка крови газообразным NO в концентрации 100 ppm



Д. Обработка крови газообразным NO в концентрации 800 ppm



Е. Обработка крови ДНКЖ (3 ммоль/л)

Рис. 1. Картины кристаллизации образцов плазмы крови при ее обработке различными формами и концентрациями оксида азота

Выявленные с помощью морфологического описания микропрепаратов сыворотки крови тенденции, характеризующие дозозависимость действия концентраций NO, были подтверждены результатами анализа кристаллогенных

свойств сыворотки крови с использованием визуаметрических параметров. 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). При воздействии газового потока от другого генератора (100 ppm) результат кристаллизации практически не отличается от фаций интактной биологической жидкости (рис. 2 и 3).

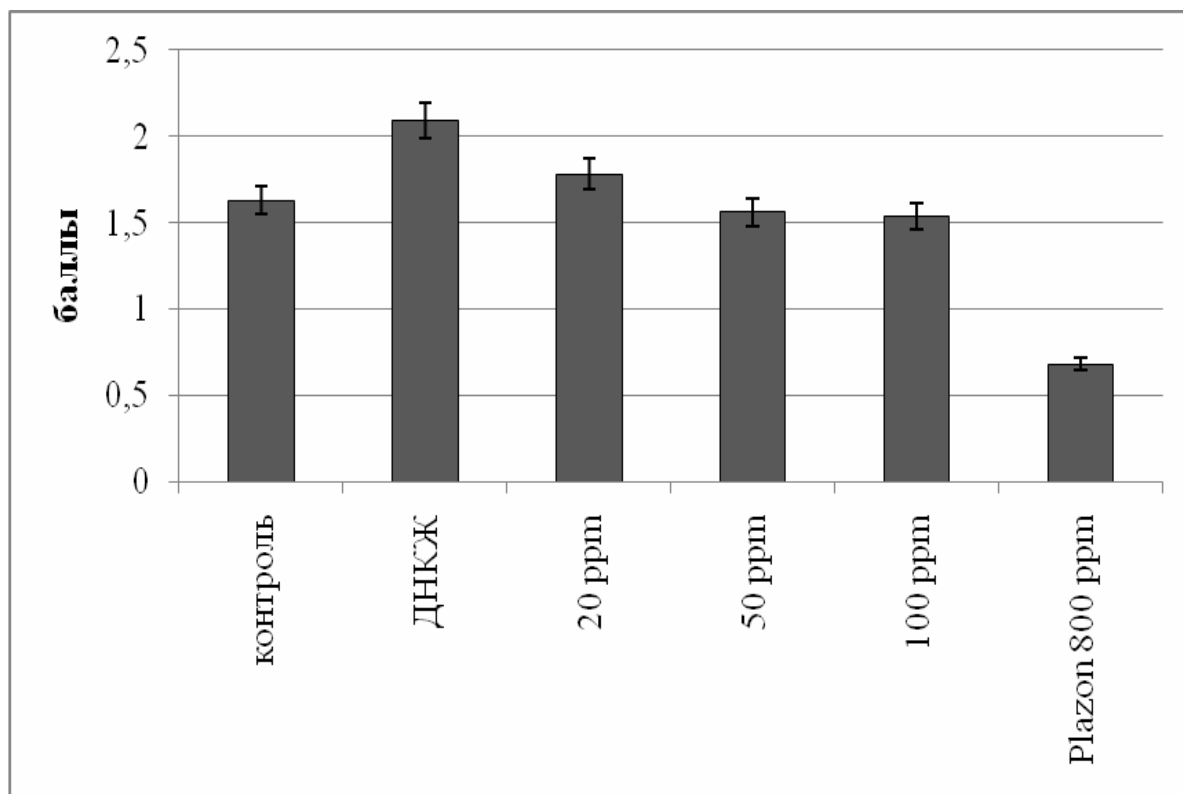


Рис. 2. Уровень кристаллизуемости плазмы крови при ее обработке различными формами и концентрациями оксида азота

При барботировании крови наиболее низкими концентрациями оксида азота (50 и 20 ppm), наблюдается стимулирующее действие на кристаллизацию плазмы крови, что четко просматривается как морфологически, так на основании оценки визуаметрических параметров, в частности – кристаллизуемости и индекса структурности (рис. 2 и 3).

Введение в кровь водного раствора ДНКЖ в большей степени усиливает кристаллогенную активность биосреды.

Наиболее четко негативные и позитивные эффекты наблюдаются на примере СДФ, она возрастает практически до максимальных величин (с $0,75 \pm 0,15$ балла до $2,6 \pm 0,15$ балла, $p < 0,05$) в случае использования Плазона. Наиболее оптимальные значения, то есть минимальная деструкция наблюдается в случае использования ДНКЖ и самых низких концентраций NO. При этом, минимальная среди использованных концентраций оксида азота (20 ppm)

снижает выраженность деструктивных изменений кристаллов с $0,75 \pm 0,15$ балла до $0,36 \pm 0,14$ балла ($p < 0,05$; рис. 4).

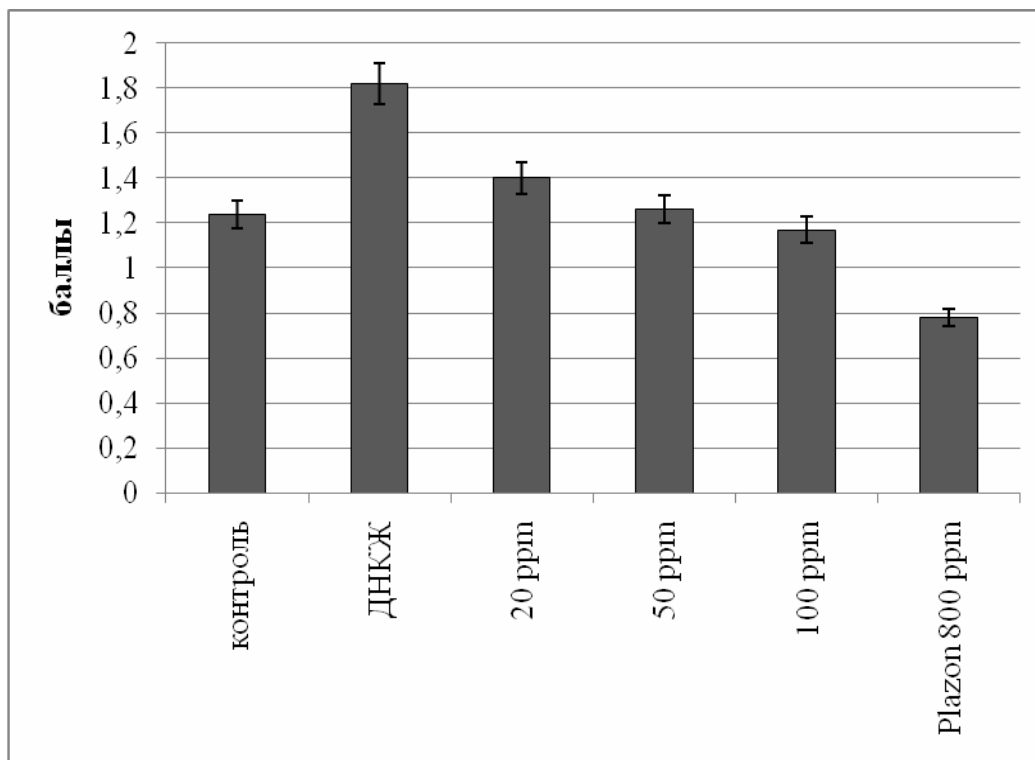


Рис. 3. Индекс структурности плазмы крови при ее обработке различными формами и концентрациями оксида азота

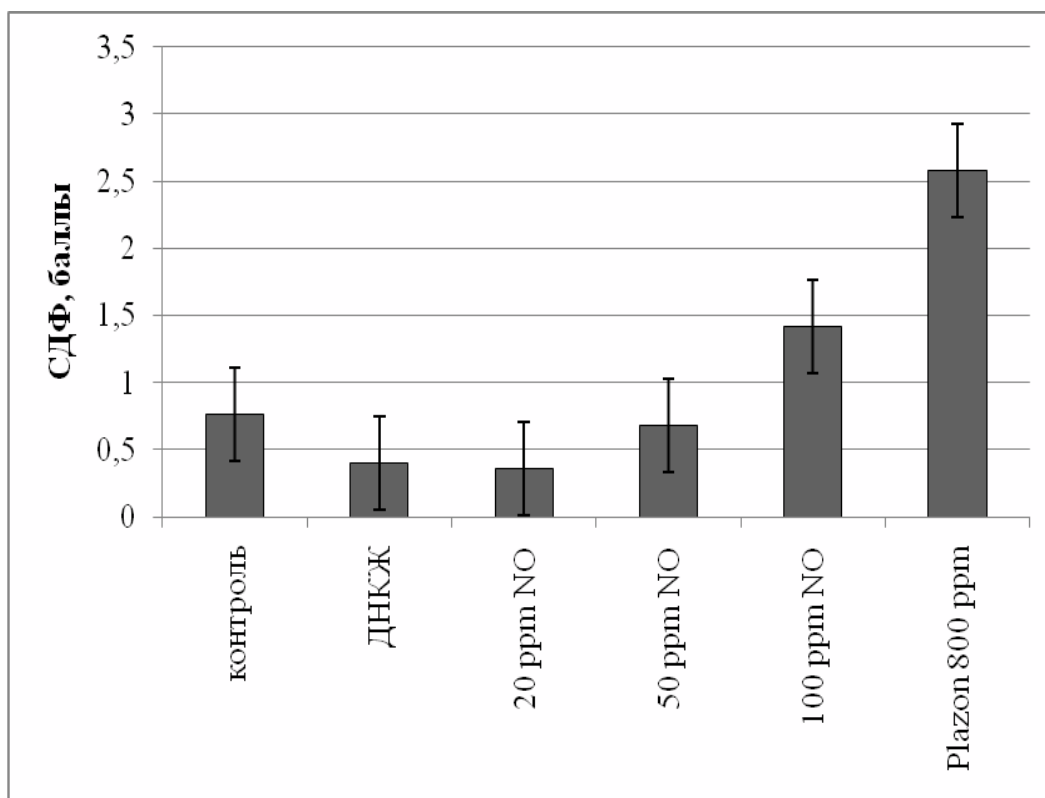


Рис. 4. Степень деструкции элементов образцов плазмы крови при ее обработке различными формами и концентрациями оксида азота

Повышение концентрации приводит к дозозависимому нарастанию параметра, практически выходящему на плато при воздействии на образцы цельной крови 50 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.

Введение в кровь водного раствора ДНКЖ уменьшает степень деструкции фации практически в 2 раза ($0,75 \pm 0,15$ балла до $0,4 \pm 0,14$ балла)

Анализируя выраженность краевой зоны микропрепарата, указывающая на относительное содержание нативного белка в пробе, наиболее оптимальные результаты можно наблюдать при использовании ДНКЖ и самых низких концентраций NO (50 и 20 ppm). 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 и с $1,10 \pm 0,12$ до $0,9 \pm 0,12$ балла при концентрации NO 50 ppm ($p < 0,05$).

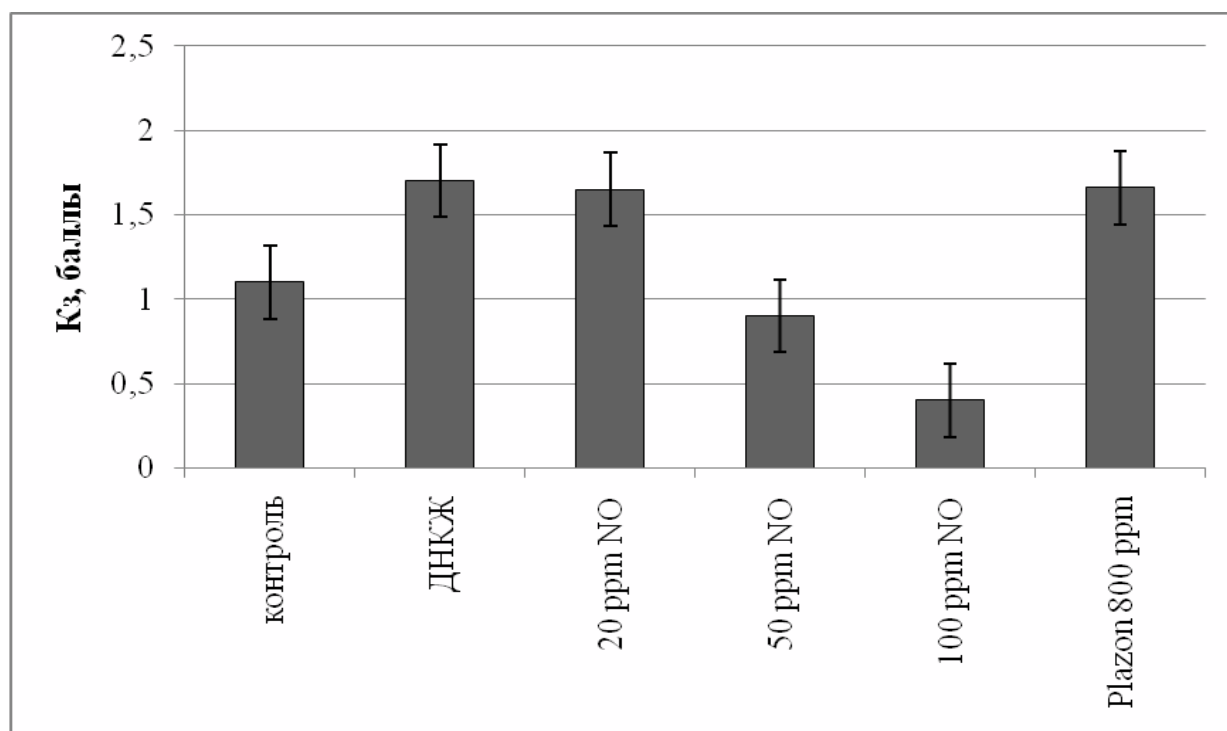


Рис. 5. Выраженность краевой зоны образцов плазмы крови при ее обработке различными формами и концентрациями оксида азота

Дальнейшее увеличение воздействующей дозы NO приводило к резкому сужению краевой зоны с соответствующим падением уровня показателя, достигающим максимума ($0,41 \pm 0,12$ балла, $p < 0,05$) при обработки образцов крови концентрацией оксида азота 100 ppm (рис. 5). Ложноположительным результатом являются данные, которые были получены при обработки крови газовым потоком от Плазона (концентрация NO 800 ppm). В данном случае образуется широкая зона ($1,66 \pm 0,12$ балла $p < 0,05$), но краевую зону, в которой конденсируются нитрозилированные белки, нельзя отделить от промежуточной.

Заключение

Результаты проведенных экспериментов позволили установить, что результат влияния монооксида азота на кристаллогенные свойства сыворотки крови непосредственно определяется концентрацией NO и его формой доставки (свободной или депонированной). 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, наиболее оптимальным эффектом, проявляющимся в увеличение выраженности краевой зоны и формировании в ней регулярных центростремительных разломов, обладает концентрация NO 20 ppm.

Напротив, высокие концентрации оксида азота (800 ppm) способствуют ингибированию кристаллогенной активности биосреды, многократно повышая степень деструкции формирующихся структурных элементов и способствуя формированию дополнительной полосы в краевой зоне микропрепарата.

Исследование поддержано грантом РФФИ №19-015-00444_a.

Список литературы

1. Граник В.Г., Григорьев Н.Б. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств. М.: Вузовская книга, 2004. 360 с.
2. Карелин В.И., Буранов С.Н., Пименов О.А. с соавт. Плазмохимическая установка для NO-терапии // Медиаль. 2013. №4. С. 46.
3. Мартусевич А.К., Симонова Ж.Г. Кристаллогенные свойства биологической жидкости при введении химического агента // Современные технологии в медицине. 2011. №1. С. 95-98.
4. Мартусевич А.К., Перетягин С.П. Молекулярная стереотипия в реализации эффекта некоторых лечебных физико-химических факторов: роль NO // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2012. №2, Ч. 3. С. 205-210.
5. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Ванин А.Ф. Экспериментальная оценка влияния динитрозильных комплексов железа на энергетический метаболизм эритроцитов при термической травме // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2014. Т. 77, №2. С. 16-20.
6. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П. с соавт. Влияние различных концентраций оксида азота (NO) на интенсивность процессов липопероксидации в плазме крови *in vitro* // Медицинский альманах. 2013. №3. С. 76-77.
7. Borodulin R.R., Kubrina L.N., Shvydkiy V.O. et al. A simple protocol for the synthesis of dinitrosyl iron complexes with glutathione: EPR, optical, chromatographic and biological characterization of reaction products // Nitric oxide. 2013. Vol. 35. P. 110-115.

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

9. Martusevich A.K., Soloveva A.G., Peretyagin S.P., Vanin A.F. Action of gaseous nitric oxide on some physical and chemical parameters of human blood samples // J. Biomedical Science and Engineering. 2014. Vol. 7, №9. P. 675-681.

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

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

ОРГАНОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИОКСИДАНТНЫЕ ЭФФЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА ПРИ ОЖОГЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

А.Г. Соловьева¹, В.И. Сергиенко², С.П. Перетягин³

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет»

Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины

Федерального медико-биологического агентства» России, Москва

³Ассоциация российских озонотерапевтов, Нижний Новгород, Россия

Abstract

The work was devoted to the study of influence of deposited form of nitric oxide, dinitrosyl iron complexes (DNIC), on the processes of free radical oxidation (FRO) and the status of antioxidant system in rat organs with combined thermal injury (CTI). The experiment was conducted on Wistar rats. CTI (contact burn on area of 20% of the body surface and termoinhalation impact) was applied under anesthesia. Animals with burn daily was injected intraperitoneally 10% solution of DNIC. The intensity of FRO and total antioxidant activity, the specific activity of catalase, superoxide dismutase, concentration of malonic dialdehyde (MDA) were determined in homogenates of the liver, kidney, heart and lung at 3 and 10 days after burn. The results showed that the introduction of DNIC to the rats with burn had a normalizing effect on the processes of lipid peroxidation in the lungs and heart. The DNIC has caused a decrease of MDA level and intensity of FRO in the liver on the 10th day after injury. A reduction of lipid peroxidation in the kidney in CTI under the influence of DNIC was revealed. The specific activity of superoxide dismutase and catalase on the 10th day after injury increased in the lung, heart and liver of rats under the influence of the deposited form of NO. Thus, DNIC have pro- and antioxidant properties and can be used in correction of disturbances of oxidative metabolism during the CTI.

Key words: dinitrosyl iron complexes, combined thermal injury, free radical oxidation, antioxidant enzymes

Работа посвящена изучению влияния депонированной формы оксида азота, динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), на процессы свободнорадикального окисления (СРО) и состояние антиоксидантной системы в органах животных с комбинированной термической травмой (КТТ). Эксперимент проведен на крысах-самцах линии Wistar. КТТ (контактный ожог на площади 20% поверхности тела и термоингаляционное воздействие) наносили под наркозом. Животным с ожогом ежедневно вводили внутривенно 10%-ый раствор ДНКЖ. В гомогенатах печени, почек, сердца и легких определяли интенсивность СРО, общую антиоксидантную активность, удельную активность

каталазы, супероксиддисмутазы, концентрацию малонового диальдегида (МДА) на 3 и 10 сутки после ожога. Показано, что введение крысам с ожогом ДНКЖ оказало нормализующее влияние на процессы липопероксидации в легких и сердце. ДНКЖ вызвали снижение уровня МДА и интенсивности СРО в печени на 10 сутки после травмы. Выявлено уменьшение липопероксидации в почках при КТТ под влиянием ДНКЖ. Под воздействием депонированной формы NO наблюдалось повышение удельной активности супероксиддисмутазы и каталазы на 10 сутки после травмы в легких, сердце и печени крыс. Таким образом, ДНКЖ обладают про- и антиоксидантными свойствами и могут быть использованы в коррекции нарушений окислительного метаболизма при КТТ.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, комбинированная термическая травма, свободнорадикальное окисление, антиоксидантные ферменты

Актуальность проблемы термической травмы занимает одно из центральных мест в общей структуре травматизма и определяется ее высокой распространенностью, летальность при данной форме патологии остается достаточно высокой в связи с развитием полиорганной недостаточности [1]. Активация свободно-радикальных процессов при термических травмах приводит к развитию окислительного стресса, являющегося одним из универсальных механизмов повреждения тканей [9]. В связи с этим представляет интерес исследование свободнорадикального окисления (СРО) в различных органах и тканях при ожогах и поиск возможных путей их коррекции.

Для лечения ожоговой болезни может быть использован оксид азота (NO) как универсальный регулятор различных физиологических процессов в организме животных и человека, который функционирует в сердечно-сосудистой, секреторной, репродуктивной, нервной, выделительной системах [6]. В клинической практике в качестве лекарственных средств часто используют препараты-доноры NO (нитроглицерин и его аналоги), которые быстро метаболизируются с выделением NO. Однако при длительном использовании их развивается толерантность к определенной дозе, вынужденное повышение которой может вызывать гиперпродуцирование NO. В связи с этим в настоящее время активно изучаются свойства и возможности применения также других препаратов – доноров NO [14].

Одним из перспективных источников NO, лишенных недостатков органических нитратов и потенциально приемлемых для биомедицинского применения, являются динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), в частности ДНКЖ, содержащие тиольные лиганды, например цистеин, глутатион [7]. ДНКЖ защищают NO от действия анионов супероксида, что обеспечивает депонирование NO, его внутри- и межклеточный транспорт [15]. ДНКЖ формируются в организме эндогенно, выступают в качестве регуляторов разнообразных физиологических процессов: подавляют тромбообразование, оказывают антиоксидантное действие, ускоряют заживление кожных ран, снижают некротическую зону при экспериментальном инфаркте миокарда и др. [14, 17]. При этом ДНКЖ малотоксичны, обладают пролонгированным

действием [12, 13]. Однако остается неясной реакция организма на экзогенное введение ДНКЖ при комбинированной термической травме (КТТ).

Целью работы явилось изучение влияния ДНКЖ на процессы СРО и состояние антиоксидантной системы в органах крыс при КТТ.

Материалы и методы

Эксперимент проведен на белых крысах-самцах линии Wistar, полученных из филиала «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (Москва). Все животные содержались в стандартных условиях вивария в клетках при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, согласно нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ». Работа с животными соответствовала правилам Европейской Конвенции ET/S 129, 1986 и директивам 86/609 ESC. Из 45 крыс массой 200–250 г. сформировали следующие группы: 1 – интактные здоровые животные (n=15); 2 – контроль, КТТ, 3 сутки (n=8); 3 – контроль, КТТ, 10 сутки (n=7); 4 – КТТ + ДНКЖ, 3 сутки (n=8); 5 – КТТ + ДНКЖ, 10 сутки (n=7). Животным 2 и 3 группы ежедневно внутрибрюшинно вводили 1 мл физиологического раствора, крысы 4 и 5 группы ежедневно получали лечение в виде внутрибрюшинных инъекций 10%-ого раствора ДНКЖ (1 мл; 0,3 ммоль/л). ДНКЖ с глутатионом получали по методике Ванина А.Ф. [2]. КТТ (контактный ожог на площади 20% поверхности тела и термоингаляционное воздействие горячим воздухом и продуктами горения в течение 20–30 сек) и вывод животных из эксперимента на 3 и 10 сутки после травмы проводили под наркозом (Золетил (60 мг/кг) + Ксила(6 мг/кг)).

В гомогенатах печени, сердца, почек и лёгких оценивали про- и антиоксидантный статус. Гомогенаты органов получали по Н.Д. Ещенко [4]. Активность СРО изучали с помощью метода индуцированной биохемиллюминесценции [8] на биохемиллюминетре БХЛ-06 (Н.Новгород). Оценивали следующие параметры хемиллюминограммы: $tg\ 2\alpha$ – показатель, характеризующий скорость спада процессов СРО в плазме и свидетельствующий об общей антиоксидантной активности (ОАА); S – светосумма хемиллюминесценции за 30 сек. – отражает потенциальную способность биологического объекта к СРО. Содержание промежуточного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ), малонового диальдегида (МДА) определяли по методу М. Mihara, М. Uchiyama [16]. Для оценки активности каталазы использовали спектрофотометрический метод, основанный на определении скорости разложения перекиси водорода [10]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по ингибированию образования продукта аутоокисления адреналина [11].

Результаты исследований обрабатывали с использованием программы Statistica 6.0. Значимость различий между показателями определялась с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Наиболее частым компонентом, встречающимся при ожоговой болезни,

является недостаточность органов дыхания. Проведенные исследования показали, что на 3 сутки после КТТ в гомогенате легких светосумма хемилюминесценции возросла на 68,5% ($p=0,009$) по сравнению со здоровыми животными, на 10 сутки показатель S увеличился на 11,5% ($p=0,021$) (рис. 1). Введение крысам с термической травмой ДНКЖ вызвало статистически значимое снижение процессов СРО в легких на 45% ($p=0,011$) на 3 сутки после травмы по сравнению с контролем, способствуя нормализации данного показателя. Отмечена тенденция к снижению ПОЛ под влиянием ДНКЖ в легких на 10 сутки после повреждения на 12% ($p=0,064$) по сравнению с крысами контрольной группы (рис. 1).

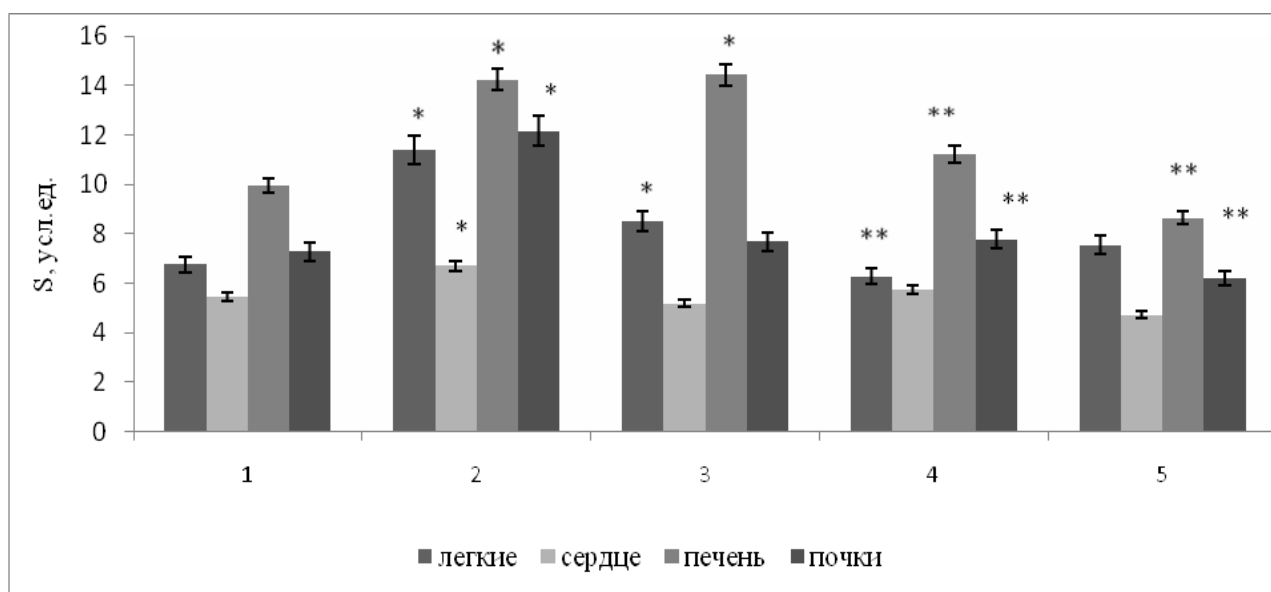


Рис. 1. Динамика изменения светосуммы хемилюминесценции в органах крыс при ожоге и на фоне введения динитрозильных комплексов железа

Примечание: 1 – интактные здоровые животные ($n=15$); 2 – контроль, КТТ, 3 сутки ($n=8$); 3 – контроль, КТТ, 10 сутки ($n=7$); 4 – КТТ + ДНКЖ, 3 сутки ($n=8$); 5 – КТТ + ДНКЖ, 10 сутки ($n=7$); * – различия статистически значимы по сравнению со здоровыми животными ($p<0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p<0,05$)

Активация ПОЛ при КТТ сопровождалась незначительным увеличением вторичного продукта липопероксидации, МДА, в легких на 3 сутки после травмы по сравнению с контрольной группой крыс (рис. 2). На 10 сутки после КТТ выявлено снижение данного показателя на 29,1% ($p=0,007$) по сравнению со здоровыми крысами, что, вероятно, можно объяснить повышением активности ферментов, участвующих в утилизации высокотоксичных альдегидов, в частности альдегиддегидрогеназы [5].

На фоне воздействия ДНКЖ в легких обнаружено снижение МДА на 3 и 10 сутки после травмы на 36% ($p=0,008$) и 28% ($p=0,021$) соответственно по сравнению с контрольной группой крыс.

Известно, что при ожоге нарушается прооксидантно-антиоксидантное равновесие, в результате чего интенсифицируются свободно-радикальные

реакции и развивается окислительный стресс. Это приводит к гиперпродукции активных форм кислорода, мишенью которых являются различные клетки и клеточные структуры [9]. Показано, что ДНКЖ оказывают нормализующее влияние на процессы липопероксидации в легких при КТТ.

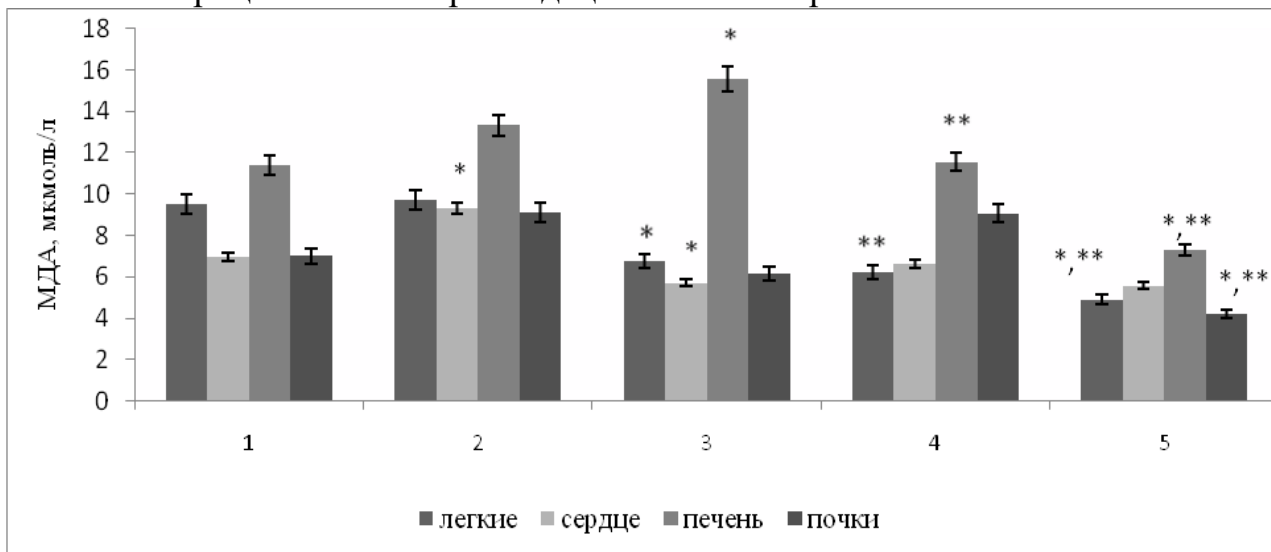


Рис. 2. Динамика изменения концентрации малонового диальдегида в органах крыс при ожоге и на фоне введения динитрозильных комплексов железа
Примечание: 1 – интактные здоровые животные (n=15); 2 – контроль, КТТ, 3 сутки (n=8); 3 – контроль, КТТ, 10 сутки (n=7); 4 – КТТ + ДНКЖ, 3 сутки (n=8); 5 – КТТ + ДНКЖ, 10 сутки (n=7); * – различия статистически значимы по сравнению со здоровыми животными ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

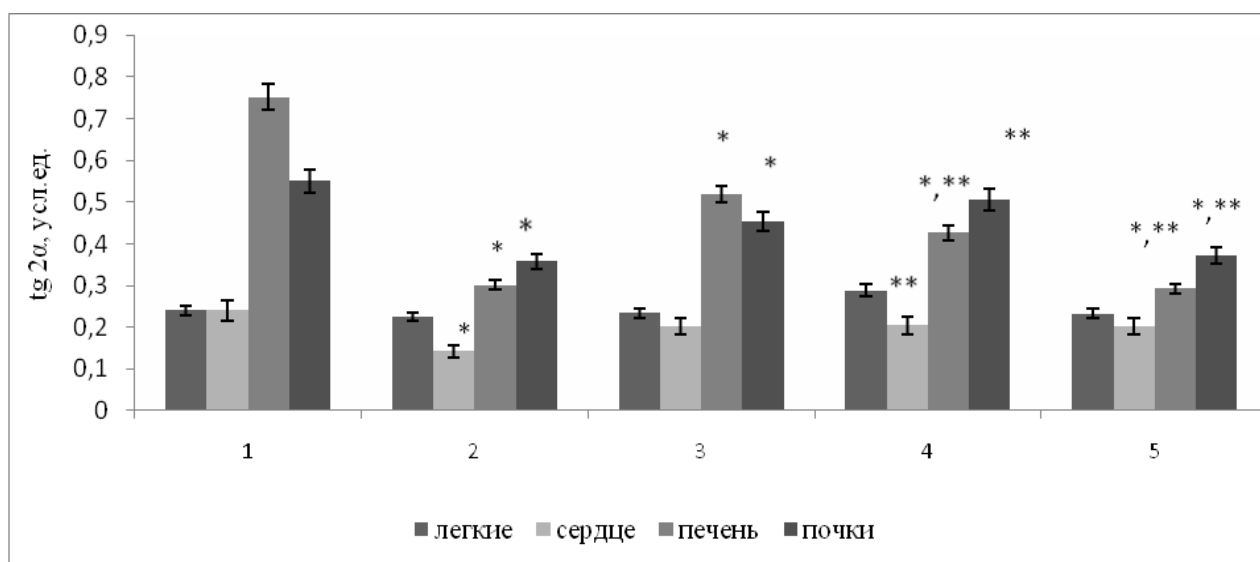


Рис. 3. Динамика изменения показателя tg2α в органах крыс при ожоге и на фоне введения динитрозильных комплексов железа
Примечание: 1 – интактные здоровые животные (n=15); 2 – контроль, КТТ, 3 сутки (n=8); 3 – контроль, КТТ, 10 сутки (n=7); 4 – КТТ + ДНКЖ, 3 сутки (n=8); 5 – КТТ + ДНКЖ, 10 сутки (n=7); * – различия статистически значимы по сравнению со здоровыми животными ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

По данным индуцированной биохемилюминесценции в легких не обнаружено статистически значимых различий в показателях ОАА между крысами контрольной группы и здоровыми животными (рис. 3). Однако введение ДНКЖ на фоне КТТ вызвало повышение ОАА на 3 сутки после поражения на 28% ($p=0,076$) по сравнению с контролем.

Большое значение для поддержания в клетках прооксидантно-антиоксидантного баланса и внутриклеточного восстановительного потенциала имеют реакции, которые катализируют СОД, каталаза. В легких удельная активность СОД уменьшилась в 1,2 раза ($p=0,034$) на 3 сутки и в 1,8 раза ($p=0,004$) на 10 сутки после КТТ по сравнению с показателем здоровых животных (табл.1). Активность каталазы, обеспечивающей разрушение перекиси водорода, в легких снизилась в 4,5 раза ($p=0,001$) на 3 сутки и в 1,2 раза ($p=0,009$) на 10 сутки после КТТ по сравнению с интактными крысами (табл. 2).

Табл. 1. Удельная активность супероксиддисмутазы (усл.ед./мг белка) в органах крыс с ожогом под влиянием динитрозильных комплексов железа

Группа	Легкие	Сердце	Печень	Почки
1	1586,70±64,14	1083,51±76,26	758,23±30,60	652,9±39,92
2	1324,59±53,62*	1380,07±78,52*	962,39±27,31 *	734,51±37,27
3	897,01±43,27*	742,99±23,82 *	476,10±35,34 *	697,49±29,76
4	599,53±31,97 */**	963,94± 37,91 **	410,84±9,47 */**	601,91±26,81 **
5	998,23±65,92*	781,26±44,14 */**	579,76±13,18*	583,64±41,05

Примечание: 1 – интактные здоровые животные (n=15); 2 – контроль, КТТ, 3 сутки (n=8); 3 – контроль, КТТ, 10 сутки (n=7); 4 – КТТ + ДНКЖ, 3 сутки (n=8); 5 – КТТ + ДНКЖ, 10 сутки (n=7); * – различия статистически значимы по сравнению со здоровыми животными ($p<0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p<0,05$)

Табл. 2. Удельная активность каталазы (усл.ед./мг белка) в органах крыс с ожогом под влиянием динитрозильных комплексов железа

Группа	Легкие	Сердце	Печень	Почки
1	27,60±2,42	10,61±0,15	18,77±2,39	40,57±6,21
2	6,35±0,51 *	10,90±0,24	6,21±0,69 *	11,18±0,53 *
3	22,56±0,89 *	6,71±0,39 *	15,38±1,41	15,74±1,07 *
4	17,08±1,20 */**	7,99±0,37 */**	7,81±0,74 *	9,34±0,36 */**
5	8,43±0,27 */**	13,11±0,41 */**	26,18±1,78 */**	8,19±0,41 */**

Примечание: 1 – интактные здоровые животные (n=15); 2 – контроль, КТТ, 3 сутки (n=8); 3 – контроль, КТТ, 10 сутки (n=7); 4 – КТТ + ДНКЖ, 3 сутки (n=8); 5 – КТТ + ДНКЖ, 10 сутки (n=7); * – различия статистически значимы по сравнению со здоровыми животными ($p<0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p<0,05$)

Полученные результаты показали, что при введении крысам с ожогом

ДНКЖ активность СОД и каталазы в легких оставалась статистически значимо ниже показателей здоровых животных. Однако выявлено увеличение активности каталазы на 3 сутки после травмы при введении ДНКЖ в 2,8 раза ($p=0,003$) по сравнению с контролем. Отмечена тенденция к повышению удельной активности СОД на 11% ($p=0,087$) на 10 сутки после КТТ (табл. 1) в легких под влиянием ДНКЖ по сравнению с контрольной группой крыс, способствуя снижению высокореактивного супероксида, который влияет на образование S-нитрозогемоглобина и стимулирует высвобождение NO из S-нитрозоальбумина [3, 18].

При исследовании СРО в сердце крыс с КТТ было установлено повышение интенсивности индуцированной хемилюминесценции на 3 сутки после ожога на 27,8% ($p=0,015$) по сравнению со здоровыми животными (рис. 1).

Повышенная продукция активных форм кислорода инициирует реакции ПОЛ биологических мембран, следствием чего явилось выявленное увеличение содержания МДА в сердце на 33,3% ($p=0,024$) на 3 сутки после травмы по сравнению с интактными крысами, свидетельствующее об активизации ПОЛ. На 10 сутки после КТТ отмечена тенденция к снижению процесса индуцированной хемилюминесценции и уменьшение количества МДА на 20% ($p=0,027$) по сравнению со здоровыми животными. Введение раствора ДНКЖ при КТТ способствовало нормализации процессов липопероксидации и уровня МДА в сердце (рис. 2). Отмечено снижение показателя $\text{tg } 2\alpha$ при КТТ в сердце на 10 сутки и уменьшение данного показателя на 41,1% ($p=0,005$) на 3 сутки после поражения по сравнению со здоровыми животными (рис. 3). Под влиянием депонированной формы NO общая антиоксидантная активность в сердце на 3 сутки после КТТ возросла на 43,7% ($p=0,001$) по сравнению с контролем.

На 3 сутки после термического воздействия выявлено компенсаторное повышение удельной активности СОД в 1,3 раза ($p=0,031$) по сравнению с интактными крысами, что говорит о мобилизации защитных механизмов [9]. На 10 сутки после КТТ в гомогенате сердца активность СОД и каталазы уменьшилась в 1,5 ($p=0,023$) и 1,6 раза ($p=0,030$) соответственно по сравнению со здоровыми животными (табл. 1, 2), что может привести к накоплению пероксида водорода и супероксидных радикалов. К 10 суткам после КТТ на фоне воздействия ДНКЖ удельная активность каталазы возросла в 2 ($p=0,003$) и 1,2 раза ($p=0,041$) по сравнению с контролем и здоровыми крысами.

Особенности печеночной недостаточности при ожоговой болезни проявляются в нарушениях пигментного обмена, белково-образовательной, синтезирующей и детоксикационной функций, коагулопатиями, вследствие чего в кровь в избыточном количестве поступают ферменты, синтезируемые в этом органе, и билирубин [3].

Исследование процессов индуцированной хемилюминесценции в печени показало повышение ПОЛ на 3 и 10 сутки после травмы на 43,4% ($p=0,012$) и 45,3% ($p=0,006$) соответственно по сравнению со здоровыми животными (рис. 1). Данные результаты свидетельствуют о выраженной интенсификации перекисных процессов в печени при ожоге. ДНКЖ вызвали уменьшение ПОЛ в печени на 27% ($p=0,023$) на 3 сутки и на 40,1% ($p=0,017$) на 10 сутки после КТТ по

сравнению с контролем (рис. 1).

Выявлено увеличение уровня МДА в печени на 21% ($p=0,087$) на 3 сутки и повышение концентрации МДА на 36,6% ($p=0,031$) на 10 сутки после травмы по сравнению со здоровыми животными (рис. 2). Таким образом, дезадаптивно повышенный уровень МДА может быть дополнительным маркером острого паренхиматозного поражения печени. Введение крысам с термической травмой ДНКЖ привело к падению количества МДА в печени на 13% ($p=0,042$) на 3 сутки и на 53% ($p=0,003$) на 10 сутки после травмы по сравнению с контролем. Уровень МДА под влиянием ДНКЖ на 10 сутки после КТТ оказался ниже на 35,9% ($p=0,005$) по сравнению с интактными животными. Таким образом, ДНКЖ способствуют снижению и ослаблению интенсификации ПОЛ в печени при КТТ.

ОАА в печени снизилась на 3 и 10 сутки после травмы на 60% ($p=0,017$) и 30% ($p=0,022$) соответственно по сравнению со здоровыми крысами (рис. 3). Наблюдаемое усиление перекисных процессов на фоне угнетения антиоксидантной системы свидетельствует о развитии окислительного стресса в печени при КТТ, связанного, вероятно, с тем, что произошла активная мобилизация всех систем, и пластическая система не успела включиться в адаптационный процесс. ДНКЖ вызвали повышение показателя $tg\ 2\alpha$ на 3 сутки после травмы на 39% ($p=0,031$) по сравнению с контролем.

Активность СОД в печени компенсаторно возросла на 27% ($p=0,012$) на 3 сутки после ожога и уменьшилась в 1,6 раза ($p=0,005$) на 10 сутки после КТТ по сравнению с интактными животными. Отмечена тенденция к повышению активности СОД под влиянием ДНКЖ на 22% ($p=0,065$) на 10 сутки после КТТ по сравнению с контролем. Активность каталазы снизилась в печени в 3,2 раза ($p=0,001$) на 3 сутки после КТТ по сравнению со здоровыми животными. ДНКЖ способствовали повышению активности каталазы в печени на 10 сутки после травмы в 1,7 раза ($p=0,011$) по сравнению с контрольными животными и в 1,4 раза ($p=0,022$) по сравнению со здоровыми крысами.

Показано, что показатель светосуммы и уровень МДА в почках увеличились на 3 сутки после ожога на 67% ($p=0,014$) и 21% ($p=0,034$) соответственно по сравнению с интактными крысами (рис. 1, 2). ДНКЖ способствовали снижению процессов липопероксидации в почках на 3 сутки после КТТ по сравнению с контрольными животными на 34% ($p=0,027$) (рис. 1). Уровень МДА и ПОЛ уменьшились на 10 сутки после травмы под влиянием ДНКЖ на 33% ($p=0,021$) и 15% ($p=0,039$) соответственно по сравнению с контролем.

В динамике общей антиоксидантной активности в гомогенате почек крыс наблюдалось ее снижение: на 3 сутки после КТТ – на 35% ($p=0,021$), на 10 сутки – на 17,7% ($p=0,035$) относительно здоровых животных, что свидетельствует об угнетении антиоксидантной системы защиты при термической травме (рис. 3). При введении ДНКЖ на 3 сутки происходило повышение ОАА на 41,3% ($p=0,026$) относительно контроля, однако на 10 сутки исследуемый показатель оказался ниже показателя здоровых и контрольных крыс на 32,5% ($p=0,009$) и 18,1% ($p=0,021$) соответственно.

В результате проведенных исследований выявлено снижение активности

каталазы в почках на 3 сутки в 3,6 раза ($p=0,007$), на 10 сутки после травмы в 2,5 раза ($p=0,009$) по сравнению со здоровыми животными. Введение ДНКЖ способствовало статистически значимому падению активности каталазы при КТТ и по сравнению с интактными животными, и по сравнению с контролем (табл. 2). При этом в почках не обнаружено статистически значимых изменений активности СОД при КТТ (табл. 1).

Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали, что термическая травма вызывает интенсификацию СРО на фоне снижения антиоксидантных резервов во всех исследованных органах. В печени, почках, сердце и легких крыс с КТТ выявлено усиление перекисных процессов, накопление МДА, на фоне угнетения антиоксидантной системы: отмечено уменьшение каталитических свойств каталазы во всех органах при КТТ, выявлено снижение удельной активности СОД на 10 сутки после травмы в печени, сердце и легких. Наиболее выраженное увеличение СРО и снижение ОАА отмечено в печени.

Установлено, что ДНКЖ обладают про- и антиоксидантными свойствами. ДНКЖ оказали нормализующее влияние на процессы СРО в легких и сердце крыс при КТТ. Отмечено статистически значимое снижение МДА и СРО на 10 сутки после КТТ под влиянием ДНКЖ в печени. Показано снижение СРО в почках при КТТ под влиянием ДНКЖ. Под воздействием депонированной формы наблюдалось повышение удельной активности СОД и каталазы на 10 сутки после травмы в легких, сердце и печени крыс. Поскольку ДНКЖ являются донорами оксида азота можно предположить, что NO действует в исследуемых органах как антиоксидант, перехватывая алкоксильные и алкилпероксильные радикалы, в результате чего обрываются цепные реакции СРО [3, 12], образуется аддукт (алкилпероксинитрит), близкий по структуре к пероксинитриту, и нитропроизводные липидов [13]. Кроме того, одним из механизмов антиоксидантного действия NO, возможно, является связывание свободных ионов железа в составе нитрозильных комплексов. При этом ингибируются реакции СРО, катализируемые редокс-активными ионами железа [3]. Таким образом, оксид азота может защищать биологические молекулы от окислительной модификации, нитрозилируя и восстанавливая оксоферрилформы гемопротеидов, к которым относится каталаза.

Список литературы

1. Будкевич Л.И., Воздвиженский С.И., Окатьев В.С., Степанович В.В. Летальность при термических поражениях у детей: состояние, причины и пути ее снижения // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2004. № 4. С. 51-54.
2. Ванин А.Ф., Микоян В.Д., Кубрина Л.Н., Бородулин Р.Р., Бургова Е.Н. Моно- и биядерные динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами в различных биосистемах // Биофизика. 2015. Т. 60, №4. С. 735–747.
3. Губкин А.А. Динитрозильные комплексы железа, S-нитрозотиолы и коэнзим Q как антиоксиданты в системах, моделирующих окислительный стресс. Дис. ... канд. физ.-мат. наук. Москва, 2006. 111 с.
4. Ещенко Н.Д. Выделение митохондриальной и цитоплазматической

фракций тканей для анализа активности ферментов. В кн.: Прохорова М.И., ред. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Ленинград: Издательство Ленинградского университета, 1982. С. 29–33.

5. Кирпичева А.Г., Зимин Ю.В. Влияние молекул средней массы на альдегиддегидрогеназную систему печени и эритроцитов в эксперименте // Успехи современного естествознания. 2004. №4. С. 21-23.

6. Малахов В.А., Завгородняя А.Н., Лычко В.С., Джанелидзе Т.Т., Волох Ф.А. Проблема оксиду азоту в неврологии. Суми: Видавництво СумДПУ им. А.С.Макаренка, 2009. 242 с.

7. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Давыдюк А.В. Влияние динитрозильных комплексов железа на метаболические параметры крови животных с экспериментальной термической травмой // Биофизика. 2014. Т.59, №6. С. 1173-1179.

8. Пискарев И.М., Трофимова С.В., Бурхина О.Е., Иванова И.П. Исследование уровня свободнорадикальных процессов в субстратах и биологических образцах с помощью индуцированной хемилюминесценции // Биофизика. 2015. Т. 60, №3. С. 496–505.

9. Полутова Н.В., Чеснокова Н.П., Островский Н.В. Активация свободно-радикального окисления – эфферентное звено реализации цитопатогенных эффектов ожоговой травмы // Вестник новых медицинских технологий. 2009. Т. 16, №2. С. 68-71.

10. Сибгатуллина Г.В., Хаертдинова Л.Р., Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Костюкова Ю.А., Никонорова Н.А. и др. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений: Учебно-методическое пособие. Казань: Казанский (Приволжский) Федеральный университет, 2011. 61 с.

11. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопросы медицинской химии. 1999. Т. 45, №3. С. 109-116.

12. Тимошин А.А., Лакомкин В.Л., Рууге Э.К., Ванин А.Ф. Фармакокинетика и распределение динитрозильных комплексов железа в тканях органов крыс // Биофизика. 2012. Т. 57, №2. С. 331-337.

13. Шумаев К.Б., Губкин А.А., Губкина С.А., Гудков Л.Л., Свириева И.В., Тимошин А.А. и др. Взаимодействие динитрозильных комплексов железа с интермедиатами окислительного стресса // Биофизика. 2006. Т. 51, №3. С.472-477.

14. Lewandowska H., Brzyska K., Meczycska-Wielgosz S., Rumianek K., Wyjciuk G., Kruszewski M. Dinitrosyl iron complexes: structure and biological functions // Postepy Biochem. 2010. Vol. 56, №3. P. 298 – 304.

15. Lewandowska H., Kalinowska M., Brzyska K., Wyjciuk K., Wyjciuk G., Kruszewski M. Nitrosyl iron complexes: synthesis, structure and biology // Dalton Trans. 2011. Vol. 40, № 33. P. 8273–8289.

16. Mihara M., Uchiyama M. Biochemistry. N.Y.: Medicine, 1980. 271 p.

17. Mojokina G.N., Elistratova N.A., Mikoyan V.D., Vanin A.F. Transport of dinitrosyl iron complexes into animal lungs // Biofizika. 2015. Vol. 60, № 2. P. 355-359.

18. Shekhter A.B., Rudenko T.G., Istranov L.P., Guller A.E., Borodulin R.R., Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with glutathione incorporated into a collagen matrix as a base for the design of drugs accelerating skin wound healing // Eur. J. Pharm. Sci. 2015. №78. P. 8-18.

АКТИВНОСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ КРОВИ ПРИ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ ВОЗДУШНО-ПЛАЗМЕННОГО ПОТОКА, СОДЕРЖАЩЕГО NO

А.Г. Соловьева¹, С.П. Перетягин², В.И. Сергиенко³

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет»

Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

²Ассоциация российских озонотерапевтов, Нижний Новгород, Россия

³ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины

Федерального медико-биологического агентства» России, Москва

Abstract

The work was devoted to the study of the activity of oxidoreductases in experimental burn after exposure to cold plasma containing NO. The study was conducted on Wistar rats, which were divided into 3 groups: intact animals, control and experimental group. Animals of the control and experimental groups were modeled combined thermal trauma. Rats of the experimental group were daily irradiated with air plasma flow after the operation using the PLASON for 2 minutes. The concentration of NO molecules in the plasma flow was ~3000ppm. The activity of aldehyde dehydrogenase, lactate dehydrogenase, superoxide dismutase, catalase was evaluated in erythrocytes. The specific activity of aldehyde dehydrogenase and lactate dehydrogenase in direct and reverse reactions was increased after exogenous NO-therapy for burn wound in rats with combined thermal injury. The activation of antioxidant enzymes after the use of PLAZON in the treatment of burn was noted.

Key words: combined thermal injury, nitric oxide, lactate dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, superoxide dismutase, catalase

В работе изучена активность оксидоредуктаз при экспериментальном ожоге после воздействия холодной плазмы, содержащей NO. Исследование проведено на крысах-самцах линии Wistar, которых разделили на 3 группы: интактные здоровые животные, контрольная и опытная группы. Животным контрольной и опытной групп моделировали комбинированную термическую травму. Крысы опытной группы после операции ежедневно облучались потоком воздушной плазмы с помощью аппарата «Плазон» в течение 2 минут. Концентрация молекул NO в плазменном потоке составляла ~3000ppm. В эритроцитах оценивали активность альдегиддегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, супероксиддисмутаза, каталазы. Выявлено повышение удельной активности альдегиддегидрогеназы, лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакциях, активация супероксиддисмутаза и каталазы после применения экзогенной NO-терапии при ожоге.

Ключевые слова: комбинированная термическая травма, оксид азота, лактатдегидрогеназа, альдегиддегидрогеназа, супероксиддисмутаза, каталаза

Ожоги являются одним из широко распространенных видов травм в структуре бытового и производственного травматизма и представляют не только медицинскую, но и социально-экономическую проблему [2, 4]. Патогенез ожоговой болезни включает в себя нарушения функционирования антиоксидантной системы защиты организма на фоне интенсификации свободнорадикального окисления, приводя к развитию окислительного стресса [9]. Поэтому исследование особенностей антиоксидантного звена при термической травме в крови и поиск путей их коррекции является актуальным.

Местное лечение ожоговой раны является важнейшим компонентом в комплексной терапии обожженных. При лечении ожогов помимо фармакологических препаратов и хирургического метода применяют различные физические методы [10, 11]. В настоящее время остается большой интерес к изучению свойств оксида азота (NO) для лечения ран, в том числе и ожоговых. Оксид азота обладает антимикробным, цитотоксическим и цитопротективным действием, стимулирует активность фибробластов, макрофагов и кератиноцитов, индуцирует цитокины, T-лимфоциты и иммуноглобулины, взаимодействует с кислородосодержащими радикалами и воздействует на микроциркуляцию. Оксид азота (NO) представляет собой универсальный регулятор метаболических процессов как на клеточном, так и на тканевом уровне организма человека [3, 8]. Экзогенный NO способен проникать как через раневую поверхность, так и через неповрежденную кожу и слизистые оболочки [1]. В исследованиях было подтверждено, что местное воздействие на раневую поверхность в первую очередь обеспечивало бактерицидный эффект [14]. Доказано, что NO в составе газового потока является фактором выраженной стимуляции раневого заживления. В этом плане привлекает внимание использование аппарата «Плазон». В основу используемого в исследованиях Скальпеля-коагулятора-стимулятора воздушно-плазменного СКВП/NO-01 «Плазон» - регистрационное удостоверение №ФСР 2007/00583 от 21 марта 2012 г. – положено воздействие на ткани организма потока газа, образованного охлаждением воздушной плазмы и содержащего молекулы NO, образующегося вследствие плазмохимических реакций [14].

Целью исследования явилось изучение активности оксидоредуктаз при комбинированной термической травме после воздействия холодной плазмы, содержащей NO.

Материал и методы исследования

Исследование было проведено на 30 самцах крыс линии Wistar массой 200-250 г., полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (г. Москва). Все животные содержались в стандартных условиях вивария в клетках при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, согласно нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ». Условия работы с животными соответствовали правилам Европейской Конвенции ET/S 129, 1986 и директивам 86/609 ESC. Животные были разделены на 3 группы: 1 – интактные животные, 2 – контрольная, 3 – опытная. Животным контрольной и опытной групп моделировали комбинированную термическую травму (КТТ) путем нанесения контактного ожога нагретым телом на 20%

эпилированной поверхности тела (3 с.), и термоингаляционной травмы (10 с.) продуктами горения. Животных 2 и 3 групп выводили из эксперимента на 14 сутки. Крысы опытной группы после операции ежедневно облучались потоком воздушной плазмы с помощью аппарата «Плазон» на расстоянии 1 см от ожоговой поверхности в течение 2 минут. Концентрация молекул NO в плазменном потоке (на оси плазменного потока) составляла ~3000ppm. В гемолизате отмытых эритроцитов оценивали активность альдегиддегидрогеназы (АлДГ) [5], лактатдегидрогеназы в прямой реакции (ЛДГ_{пр.}) и лактатдегидрогеназы в обратной реакции (ЛДГ_{обр.}) [7], супероксиддисмутазы (СОД) [13], каталазы [12]. Для расчета удельной активности оксидоредуктаз определяли концентрацию белка [6]. Для исследований использовали спектрофотометр Power Wave (Япония).

Результаты исследований обрабатывали с использованием программы Statistica 6.0, с помощью которой рассчитывалась средняя арифметическая величина показателей и ошибка среднего. Значимость различий между показателями определялась с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведенное исследование показало, что при комбинированной термической травме удельная активность ЛДГ_{пр} уменьшилась в 2,44 раза ($p=0,023$), ЛДГ_{обр} – в 1,65 раза ($p=0,031$) по сравнению с показателями интактных крыс (табл.1).

Табл. 1. Активность альдегиддегидрогеназы, лактатдегидрогеназы при КТТ после экзогенной NO-терапии

Условия эксперимента	ЛДГ _{пр} , нмоль НАДН/мин×мг белка	ЛДГ _{обр} , нмоль НАДН/мин×мг белка	АлДГ, нмоль НАДН/мин×мг белка
Интактные крысы	73,45±3,21	91,97±4,01	20,25±1,21
КТТ	30,15±1,17*	55,88±0,494*	10,94±0,783*
КТТ+ NO-терапия	54,82±0,479*/**	104,22±1,94*/**	65,43±2,06*/**

Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с интактными крысами ($p \leq 0,05$); ** - различия статистически значимы по сравнению с животными с КТТ ($p \leq 0,05$)

Расчет соотношения ЛДГ_{пр}/ЛДГ_{обр} показал его снижение (у здоровых крыс ЛДГ_{пр}/ЛДГ_{обр} = 0,798, при КТТ ЛДГ_{пр}/ЛДГ_{обр} = 0,539), что свидетельствует о накоплении в крови крыс с КТТ лактата, являющегося косвенным показателем тканевой гипоксии.

Под действием экзогенной NO-терапии активность ЛДГ_{пр} увеличилась в 1,78 раза ($p=0,029$) по сравнению с показателем крыс с КТТ. Однако удельная активность ЛДГ_{пр} после лечения была меньше в 1,34 раза ($p=0,033$) по сравнению с интактными животными. При этом удельная активность ЛДГ_{обр} после воздействия NO возросла в 1,87 раза ($p=0,032$) по сравнению с показателем

животными с КТТ без лечения, но осталась выше в 1,13 раза ($p=0,024$) по сравнению с интактными крысами. Показано, что удельная активность АлДГ при термической травме уменьшилась в 1,85 раза ($p=0,033$) по сравнению с показателем интактных крыс. Уменьшение активности фермента ведёт к накоплению большого количества высокотоксичных альдегидов, которые ингибируют активность ферментов, нарушают детоксикационную функцию печени. Благодаря применению экзогенной NO-терапии на ожоговую поверхность крыс удельная активность АлДГ в крови увеличилась в 5,98 раза ($p=0,035$) по сравнению с животными с КТТ без лечения.

В результате эксперимента показано снижение удельной активности СОД и каталазы на 14 сутки после нанесения КТТ в 2,1 раза ($p=0,003$) и в 1,6 раза ($p=0,037$) по сравнению с показателем здоровых крыс (табл. 2), что свидетельствует об ослаблении антиоксидантных резервов. Полученные данные соответствуют картине развивающейся гипоксии, а также динамике показателей при токсемии, заканчивающейся между 7 и 14 сутками.

Отмечено, что применение холодной плазмы с NO на ожоговую поверхность увеличивает удельную активность СОД в 1,5 раза ($p=0,033$) и каталазы 6,7 раза ($p=0,032$) по сравнению с показателями активности крыс с КТТ без лечения (табл. 2).

Табл. 2. Активность супероксиддисмутазы, каталазы при КТТ после экзогенной NO-терапии

<i>Условия эксперимента</i>	<i>СОД (усл.ед./мин×мг белка)</i>	<i>Каталаза (усл.ед./мин×мг белка)</i>
Интактные крысы	1382,35±18,61	19,04±0,82
КТТ	670,15±1,17*	11,88±0,49*
КТТ+ NO-терапия	1041,85±21,71*/**	79,90±7,16*/**

Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с интактными крысами ($p \leq 0,05$); ** - различия статистически значимы по сравнению с животными с КТТ ($p \leq 0,05$)

Таким образом, применение «Плазона» при лечении термических травм позволяет восстановить антиоксидантный статус организма, активировать энергетические и детоксикационные системы крови, что способствует увеличению скорости заживления раны.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование показало, что применение экзогенной NO-терапии на ожоговую рану крыс с комбинированной термической травмой в течение 14 суток, вызвало повышение удельной активности ЛДГ в прямой и обратной реакциях. При этом отмечено резкое увеличение и удельной активности АлДГ. Выявлена активация антиоксидантных ферментов после применения «Плазона» при КТТ.

Список литературы

1. Василец В.Н., Шехтер А.Б. Медицинские и биологические применения плазменных источников окислов азота // Известия высших учебных заведений. Серия: химия и химическая технология. 2012. Т.55, №4. С. 21-25.
2. Еремина Т.В. Показатели антиоксидантной системы эритроцитов при ожоговой травме. Автореф дис. ... канд. биол. наук. Ростов-на-Дону, 1999. 23с.
3. Звягинцева Т. В., Кривошапка А. В., Желнин Е. В. Роль метаболитов оксида азота в механизмах развития экспериментального ожога // Экспериментальная клиническая медицина. 2011. Т. 51, №2. С. 5-9.
4. Здравоохранение в России 2017: Статистический сборник. М: Росстат, 2017. 48с.
5. Кершенгольц Б.М., Серкина Е.В. Некоторые методические подходы к изучению метаболизма этанола // Лабораторное дело. 1981. №2. С.126.
6. Королева О.В. Спектрофотометрические методы биохимических исследований. Л: Ленинградский университет, 1979. 119 с.
7. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М: Высшая школа, 1980. 272с.
8. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Карелин В.И., Селемир В.Д. Влияние NO-содержащего газового потока на некоторые параметры энергетического метаболизма эритроцитов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. Т. 158, №7. С. 40-42.
9. Парамонов Б.А., Порембский Я.О., Яблонский В.Г. Ожоги: Руководство для врачей. СПб.: СпецЛит, 2000. 480 с.
10. Писаренко Л.В. Применение плазменных потоков и жизнеспособных кожных аллотрансплататов в комплексном лечении ран. Дис. ... докт. мед. наук. Москва, 2004. 328 с.
11. Подойницына М.Г., Цепелев В.Л., Степанов А.В. Применение физических методов при лечении ожогов кожи // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 5.
12. Сибгатуллина Г.В., Хаертдинова Л.Р., Гумерова Е.А. и др. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений: учебно-методическое пособие. Казань: Казанский (Приволжский) Федеральный университет, 2011. 61 с.
13. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопросы медицинской химии. 1999. Т 45, № 3. С.109-116.
14. Скальпель-коагулятор-стимулятор воздушно-плазменный СКВП/NO-01 «Плазон». ТУ 9444-001-96571701-2007. Паспорт КРЛД 38642.001 ПС. Редакция от 22 сентября 2016г. М.-2017. - 28 с.

ИЗМЕНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ДОРСО- И АРТРОПАТИЯМИ ПОД ВЛИЯНИЕМ OZOTENS-ТЕРАПИИ БОЛЕВОГО СИНДРОМА

С.П. Перетягин¹, А.Г. Соловьева², А.В. Новиков², С.А. Соколов¹,

С.Е. Хрулёв², Н.В. Диденко², О.В. Гречканёва²

¹Ассоциация российских озонотерапевтов, Нижний Новгород, Россия

²ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет»

Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

Abstract

The paper presents studies of the biochemical blood parameters of patients with syndrome in dorsal and arthropathies treated with using the combined effects of electrical myostimulation (EMS) and transcutaneous electroneurostimulation (TENS) of para-articular zones and transcutaneous electrophoretic administration of creams containing active oxygen forms. The preferential stimulating effect of the combined use of electropulse stimulation and electrophoretic transdermal contamination of active oxygen on oxygen-dependent blood parameters, accompanied by an analgesic effect, is shown. It emphasizes the need for activation of oxygen homeostasis in algorithms for pain therapy.

Key words: dorsalgia, arthralgia, EMS-TENS-stimulation, ozone therapy, aerobic metabolism, cream containing ozonide

В работе представлены исследования биохимических показателей крови пациентов, лечившихся по поводу болевого синдрома при дорсо- и артропатиях с применением сочетанных воздействий электромиостимуляции (ЭМС) и транскутанной электронеуростимуляции (ТЕНЗ) (ЭМС-ТЕНЗ-стимуляции) параартикулярных зон и чрезкожного электрофоретического введения кремов, содержащих активные формы кислорода. Показано преимущественное стимулирующее влияние сочетанного применения электроимпульсной стимуляции и электрофоретической чрезкожной контаминации активного кислорода на кислородзависимые параметры крови, сопровождаемое противоболевым эффектом. Подчёркивается необходимость активации кислородного гомеостаза в алгоритмах противоболевой терапии.

Ключевые слова: дорсалгии; артралгии; ЭМС-ТЕНЗ-стимуляция; озонотерапия; аэробный метаболизм; крем, содержащий озониды

Среди патогенетических факторов формирования болевого синдрома важное место занимает снижение уровня кислородного дыхания тканей. Нарушение окислительных процессов в тканях или прекращение доступа крови (основного переносчика кислорода к тканям) приводит к возникновению боли

[7]. Поэтому использование в лечебной практике купирования болевых синдромов возможности стимуляции транспортной системы доставки крови в очаг формирования боли путём электроимпульсных воздействий на нервно-мышечный блок близлежащих тканей, и, тем самым, усиления мышечного кровотока, а также, одновременно с этим целенаправленной активации кислородного гомеостаза в этой зоне активными формами кислорода, доставляемыми неинвазивно с помощью электрофоретического механизма из накожно применяемого озонсодержащего крема может оказаться патогенетически значимым.

Ранее нами в результате экспериментально исследований были изучены: влияние низкочастотного постоянного импульсного тока на физико-химические параметры кремов, содержащих озониды; местные и системные ответные реакции организма подопытных животных при проведении процедуры ОЗОТЕНЗ-терапии. Кроме того, при клинических исследованиях установлено, что в механизмах противоболевого действия низкочастотных электроимпульсных токов с одновременной электрофоретической доставкой активного кислорода из крема, его содержащего, лежат увеличение объёмного кровенаполнения и тонуса сосудов артериального и венозного русла, активизация работы аппарата центрального кровообращения, функции внешнего дыхания [2–4, 9].

Целью настоящего исследования явилась оценка влияния процедур ОЗОТЕНЗ-терапии на изменения биохимических показателей крови у пациентов с болевым синдромом при дорсо- и артропатиях.

Материал и методы исследования

В работе представлены материалы клинико-биохимических исследований 43 пациентов с диагнозом дорсопатии поясничного отдела позвоночника и артропатии коленных суставов в возрасте от 62 до 73 лет. Критерием включения было наличие болевого синдрома в виде люмбагии или люмбоишиалгии и артралгии. Протокол лечения пациентов группы контроля (n=20) был ограничен использованием в качестве обезболивающего лечения только НПВС (мелоксикам или мовалис). В качестве дополнительного лечения назначалась сосудистая, антиоксидантная, витаминотерапия (цитофлавин, детралекс, витамины группы В). Из физиотерапевтических средств применялись процедуры ЭМС-ТЕНЗ-стимуляции параартикулярных зон позвоночника в грудной и поясничной области и параартикулярных зон коленных суставов, выполняемые на низкочастотном электроимпульсном массажёре МН8002 КОМБО.

В опытной группе пациентов (n=23) физиотерапевтические процедуры электроимпульсной низкочастотной стимуляции параартикулярных зон сопровождались сочетанным электрофоретическим введением активных форм кислорода, содержащихся в креме для ОЗОТЕНЗ-терапии, выполняемые на низкочастотном электроимпульсном массажёре МН8002 КОМБО. Не применялось обезболивающих препаратов, миорелаксантов, стероидов, мочегонных. Оценку сенсорной составляющей болевого ощущения проводили с помощью визуальной аналоговой шкалы (ВАШ). Методика оценки интенсивности боли по ВАШ: 0 баллов - боль отсутствует, 1-2 балла - слабая

боль, 3-4 балла - умеренная боль, 5-6 баллов - сильная боль, 7-8 баллов - очень сильная, 9-10 баллов - нестерпимая боль.

Протокол обследования включал оценку болевого синдром (ВАШ) в 1, 3, 7, 10 дни лечения. Кроме того, изучали ряд биохимических параметров. Активность свободнорадикального окисления (СРО) изучали с помощью метода индуцированной биохемиллюминесценции на биохемиллюминиметре марки БХЛ-07 (Н.Новгород). Оценивали следующие параметры хемиллюминограммы: $\text{tg } 2\alpha$ – показатель, характеризующий скорость спада процессов СРО в плазме и свидетельствующий об общей антиоксидантной активности (АОА); S – светосумма хемиллюминесценции за 30 сек. – отражает потенциальную способность биологического объекта к СРО. Содержание промежуточного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ), малонового диальдегида (МДА) определяли по методу М. Mihara, М. Uchiyama [8]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по ингибированию образования продукта аутоокисления адреналина [6]. Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в прямой (ЛДГпр) и обратной (ЛДГобр) реакциях определяли по Г.А. Кочетову [1]. Концентрацию лактата и глюкозы определяли в плазме крови на анализаторе Super GL ambulance (Германия), окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) и pH – на pH-метре стационарном inoLab pH 7110.

Результаты исследований обрабатывали с использованием программы Statistica 6.0. Значимость различий между показателями определялась с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Перед началом восстановительного лечения преобладающими у больных были жалобы на быструю утомляемость, слабость в нижних конечностях (91,6%), боли ноющего характера в нижних конечностях при ходьбе или в покое, локализованные в области коленных суставов, голеней и подошвенной части стоп (85,8%), ощущение зябкости в ногах (77,5%). Интенсивность боли перед лечением оценивалась как умеренная - показатель ВАШ составил - 6,7 баллов.

В результате проведенного лечения значительное улучшение отмечалось у 88,6 % (19) пациентов основной группы. Оно наступало обычно на второй – третьей процедуре после ОЗОТЕНЗ-терапии и характеризовалось существенным снижением болей и их исчезновением в конце курса лечения в нижней части спины при физической нагрузке, полным восстановлением объема движений в пояснично-крестцовом отделе позвоночника. Улучшение состояния, характеризовавшееся восстановлением активных движений и незначительными болями в спине при физической нагрузке, диагностировано у 11,1 % пациентов и возникало, как правило, после пяти процедур. Ухудшения состояния у больных основной группы и осложнений не отмечалось. В контрольной группе значительное улучшение состояния отмечено у 75,0 % пациентов и улучшение – у 25,0 % пациентов. Анализ динамики степени интенсивности боли и функциональных проб в виде флексии и латерофлексии позвоночника в поясничном отделе достоверно указывали на значительно более выраженный эффект при применении ОЗОТЕНЗ-терапии (рис.1).

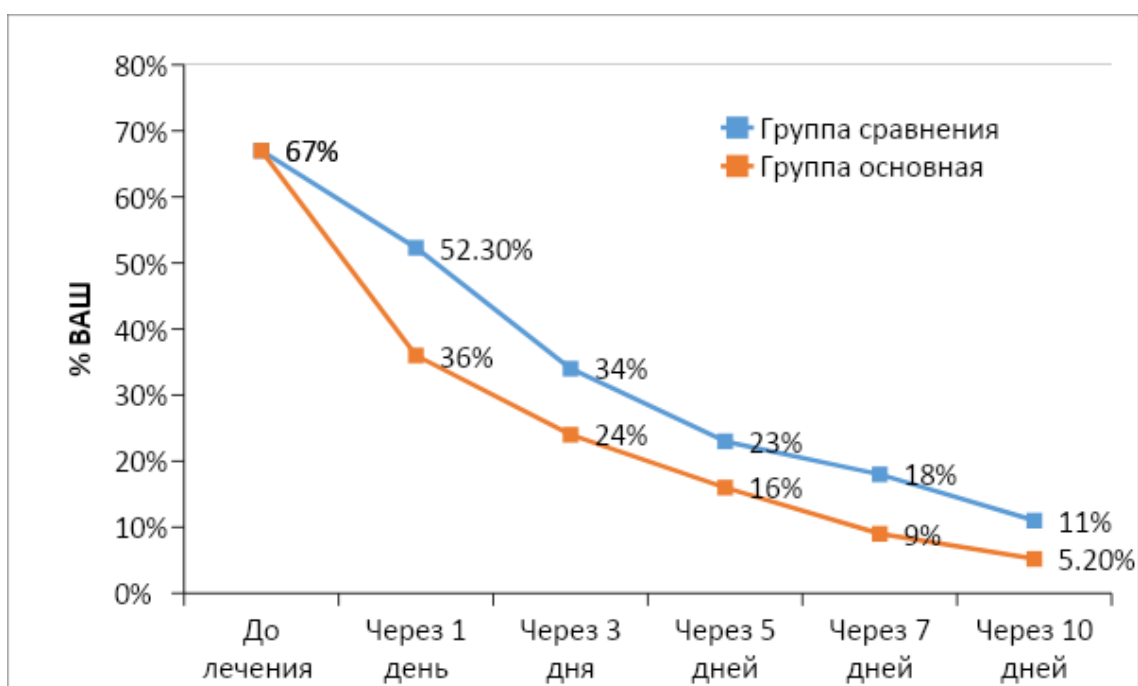


Рис. 1. Динамика болевого синдрома на фоне проведения сочетанной медикаментозной терапии и ОЗОТЕНЗ-терапии – основная группа (средний балл по шкале ВАШ)

Табл. 1. Показатели биохимического гомеостаза у пациентов с дорсалгиями и артралгиями после курса из 10 процедур OSOTENS-терапии

Показатели	До курса (перед процедурой)	После курса (контрольная группа)	После курса ОЗОТЕНЗ-терапии
Глюкоза, ммоль/л	5,22±0,47	4,51±0,40	4,30±0,39
Лактат, ммоль/л	1,78±0,12	2,2±0,23	1,02±0,09
ПОЛ (плазма), усл.ед	12,90±1,17	12,13±1,10	14,27±1,29*
АОА, усл.ед	0,629±0,057	0,66±0,05	0,849±0,07*
ПОЛ (эритроциты), усл. ед	12,51±1,13	10,45±1,10	5,51±0,50
МДА (плазма), мкмоль/л	0,564±0,05	0,602±0,06	0,581±0,05
МДА (эритроциты), мкмоль/л	9,738±0,08	7,16±0,57	3,383±0,301
СОД, усл.ед/мг белка	1403,50±127,01	1141,33±103,02	1211,01±110,10
ЛДГпр, нмольНАДН/мин×мг	80,39±7,30	42,81±3,53	96,10±8,72
ЛДГобр, нмольНАДН/мин×мг	250,40±22,70	314,25±28,30	204,41±18,50
ОВП	-79,51±7,24	-68,90±6,22	-78,40±7,11
pH	7,33±0,60	7,32±0,60	7,36±0,70

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с исходным уровнем ($p < 0,05$)

К концу курса терапии выявлено значительное снижение болевого синдрома в обеих группах по сравнению с исходным состоянием ($p < 0,001$), при этом в динамике регресс болевого синдрома был преимущественным в группе пациентов, получавших ОЗОТЕНЗ-терапию.

Изменения параметров метаболического гомеостаза на фоне противоболевой ОЗОТЕНЗ-терапии представлены в таблице 1.

При клинических исследованиях установлено, что по окончании курса ОЗОТЕНЗ-терапии в крови пациентов регистрировалось усиление прооксидантной активности – ПОЛ 111% ($p < 0,05$). Одновременно, в большей степени отмечено возрастание АОА 134% ($p < 0,05$), что было значимо более высоким, чем уровень АОА после стандартной ЭМС-терапии (рис. 2).

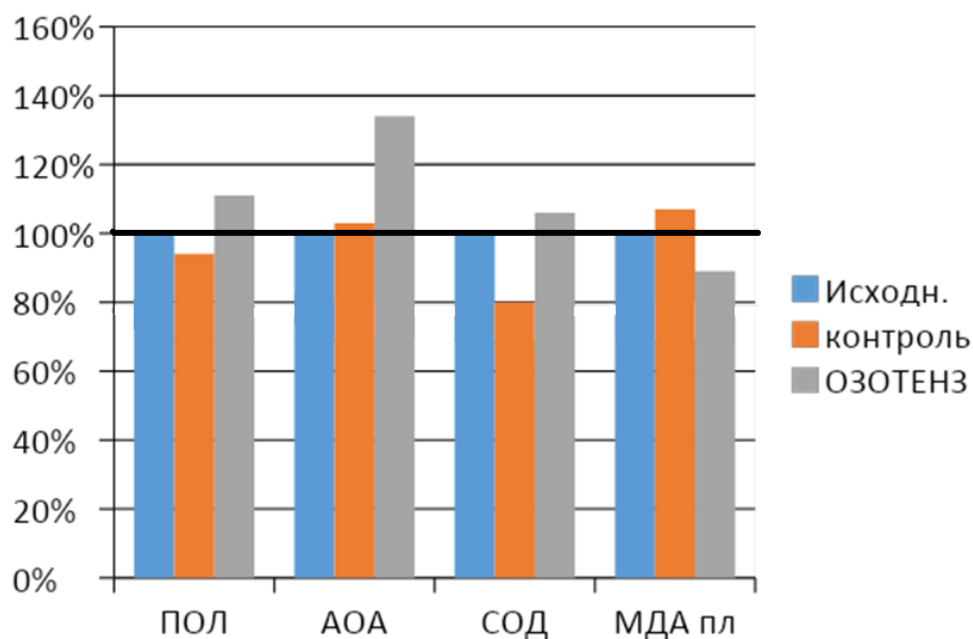


Рис. 2. Показатели про-и антиоксидантного баланса крови после процедур ОЗОТЕНЗ-терапии у пациентов с дорсопатиями и артропатиями

Такая динамика про- и антиоксидантных систем сопровождалась сохранением ОВП крови на исходном уровне. Изучение физико-химических констант крови показало, что при проведении рН-метрии и измерении ОВП (редоксметрия) показатели составляли: $pH = 7,33 \pm 0,60$, а ОВП (редокс-потенциал) = $-79,51 \pm 7,24$. После курса противоболевой терапии по стандартной схеме (контрольная группа) уровень суммарного ОВП крови снижался на 13%. Использование сочетанного воздействия (миостимуляция и транскутанная электрофоретическая доставка активного кислорода из субстратов озонсодержащего крема) способствовали сохранению ОВП практически на исходном уровне (ОВП = $-78,4 \pm 7,1$) (табл. 1, рис. 3). Это могло означать, что условия для преимущественного окисления молочной кислоты, пирувата, трикарбоновых кислот цикла Кребса, то есть для аэробного расщепления межучасточных продуктов углеводного обмена, в данной ситуации оказываются более преимущественными [5].

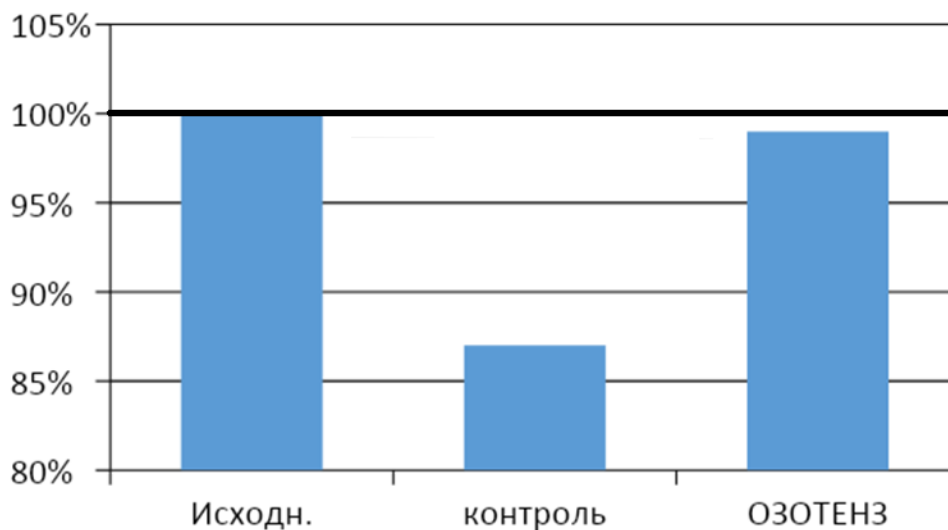


Рис. 3. Окислительно-восстановительный потенциал после процедур ОЗОТЕНЗ-терапии у пациентов с дорсопатиями и артропатиями

Исследования субстратной обеспеченности и ферментативной активности энзимов, причастных к энергообразованию, подтверждали эти результаты. Интенсификация реакций СРО на фоне стимулирующего действия экзогенных форм активного кислорода вызвала после курса ОЗОТЕНЗ-терапии достоверное снижение количества углеводных продуктов (глюкозы и лактата) в крови пациентов. Снижение гликемии составило 17% в сравнении с результатами до лечения ($p < 0,05$).

И, хотя в контрольной группе пациентов снижение сахара после ЭМС-ТЕНЗ терапии было аналогичным – 14 % ($p < 0,05$), однако, дальнейшей утилизации молочной кислоты (лактата) на этом фоне не было отмечено, наоборот выявлен его прирост, накопление, которое составило 123% ($p < 0,05$). В противоположность этой картине в динамике процессов метаболизирования углеводных продуктов после ОЗОТЕНЗ-терапии установлено достоверное снижение количество лактата до 56% ($p < 0,05$) от исходного уровня. Этот механизм биотрансформации углеводов обеспечивался значимо возросшей активностью оксиредуктаз – ЛДГпр до $96,10 \pm 8,72$ (119%; $p < 0,05$) по сравнению с исходным уровнем, и существенно отличающимся (в 2,2 раза) от уровня активности ЛДГпр в контрольной группе пациентов – $42,81 \pm 3,53$. Такая цепочка реакций метаболизирования углеводов на тканевом уровне при сочетанном применении ЭМС-стимуляции и транскутанной доставкой активного кислорода в организм должна была способствовать интенсификации в тканях процессов внутримитохондриального энергообразования и тем самым усилению механизмов регенерации на клеточном и тканевом уровне.

Заключение

Результаты биохимических исследований показали, что по степени положительного влияния на организм физиотерапевтических процедур с

использованием низкочастотных электроимпульсных воздействий на параартикулярные зоны позвоночника и крупных (коленных) суставов применение сочетанной формы таких лечебных процедур с одновременным чрескожным введением из подэлектродного пространства активных форм кислорода (озонидов) значительно повышает эффективность данного «физио-фармакологического» воздействия на биохимический статус пациентов. Эффекты лечебного действия процедур ОЗОТЕНЗ-терапии были близки к эффектам, отмеченных нами при методиках системного воздействия озонотерапии (внутривенные инфузии озонированного физиологического раствора, БАГОТ, ректальное введение озона и др.). Интенсификация местного (в заинтересованных мышечно-суставных сегментах) и системного кровообращения одновременно с доставкой в организм активных форм кислорода сопровождается оптимизацией функционального состояния процессов кислородного гомеостаза как в очагах усиленного патологического возбуждения, так и вне их.

Список литературы

1. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М: Высшая школа, 1980. 272 с.
2. Перетягин С.П., Гордцов А.С., Соловьева А.Г., Гречканёва О.А., Жильцов С.А., Соколов С.А., Перетягин П.В., Диденко Н.В. Влияние низкочастотного электроимпульсного воздействия на физико-химические показатели и биологическую активность крема, содержащего активные формы кислорода // Биорадикалы и антиоксиданты. 2017. Т. 4, № 4. С. 57-64.
3. Перетягин П.В., Гречканёва О.А., Перетягин С.П. Особенности микроциркуляции при сочетанном применении низкочастотной электроимпульсной миостимуляции и электрофоретического введения активных форм кислорода из крема с озонидами в эксперименте // Биорадикалы и антиоксиданты. 2017. Т. 4, № 4. С. 51-56.
4. Перетягин С.П., Соловьева А.Г., Соколов С.А., Жильцов С.А., Гречканёва О.А., Перетягин П.В., Диденко Н.В. Изменения параметров кислородного гомеостаза крови после сочетанного электроимпульсного чрескожного воздействия с электрофоретическим введением активных форм кислорода в эксперименте // Биорадикалы и антиоксиданты. 2017. Т. 4, №4. С. 65-76.
5. Прилуцкий В.И., Бахир В.М. Электрохимически активированная вода: аномальные свойства, механизм биологического действия. М: ВНИИИМТ АО НПО “Экран”, 1995. 151с.
6. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопросы медицинской химии. 1999. Т 45, № 3. С.109-116.
7. Судаков К.В., Андрианов В.В., Вагин Ю.Е., Киселёв И.И. Физиология человека. Атлас динамических схем: учебное пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 416 с.
8. Mihara M., Uchiyama M. Biochemistry. N.Y.: Med., 1980. 271 p.

9. Peretyagin S.P., Novikov A.V., Sokolov S.A., Khrulev S.E., Peretyagin P.V. Changes of clinical data and functional parameters in patients with dorsopathias and arthropathias under OZOTENS-therapy of pain syndrome // Биорадикалы и антиоксиданты. 2019. Т.6, №1. С. 59-72.

Правила оформления статей

Электронный журнал «Биорадикалы и антиоксиданты» – междисциплинарное научное издание, задачей которого служит объединение и активный диалог исследователей и практиков различных специальностей (медиков, биологов, ветеринаров, биофизиков, химиков, техников, математиков и др.), работающих в области свободнорадикальной биологии и медицины.

Журнал открыт для расширения и уточнения тематики публикаций, включает полнотекстовые статьи, находящиеся в открытом доступе. Приветствуются обзоры по наиболее значимым «точкам роста» биомедицины, связанным с изучением и использованием роли радикалов и антиоксидантов в биологических системах различного уровня организации.

Тематика публикаций:

1. Свободнорадикальные процессы в биологических системах. Про- и антиоксидатные системы.
2. Озон, его получение, физико-химические свойства и биологическая активность, Экспериментальные и клинические аспекты озонотерапии.
3. Активные формы кислорода: генерация, деградация, физиологическая роль, участие в патогенезе заболеваний человека и животных, клиническое применение.
4. Оксид азота и активные формы азота в биологических системах. NO-метаболизм. Получение и изучение лечебных свойств различных форм оксида азота. Физико-химия и биология естественных депо NO.
5. Природные и синтетические антиоксиданты: получение, исследование свойств, экспериментальные и клинические аспекты.
6. Высокоэнергетические физические факторы и биорадикалы.
7. Аппаратура и оборудование для генерации биорадикалов и NO.
8. Образовательные аспекты и внедрение в учебный процесс представлений об активных формах кислорода, биорадикалах и антиоксидантах.

Разделы журнала:

1. Передовая статья (до 15 стр.)
2. Оригинальные исследования (до 15 стр.)
3. Обзоры (до 20 стр.)
4. Краткое сообщение (до 5-7 стр.)
5. Новая аппаратура и оборудование (до 7 стр.)
6. Информация о профильных конференциях и конгрессах (до 5-7 стр.)
7. Рекламный блок

Технические правила по оформлению рукописей:

Статьи следует направлять по электронной почте:
cryst-mart@yandex.ru (Мартусевич Андрей Кимович)
или psp-aro@mail.ru (Перетягин Сергей Петрович).

Статья должна быть представлена на русском или английском языке (шрифт Times New Roman, кегль 14, через 1 интервал с шириной полей 2 см.).

Первая страница рукописи должна содержать:

- 1) название статьи;
- 2) инициалы и фамилию автора (-ов);
- 3) полное название учреждения, в котором выполнена работа, город, страну. Фамилии иностранных авторов следует писать в оригинальной транскрипции.

Кроме того, согласно новым требованиям ВАК, просьба представлять на отдельном листе сведения о каждом авторе: 1) фамилию, имя и отчество; 2) должность, ученую степень, ученое звание; 3) полный почтовый служебный адрес (с шестизначным почтовым индексом) и e-mail; 4) номер служебного телефона и факса. Также следует отметить автора (-ов), ответственного за переписку с редакцией.

Название статьи должно быть сформулировано по возможности информативно, но кратко и без сокращений.

Необходимо придерживаться следующего плана написания статьи с выделением каждого пункта в раздел (за исключением обзоров, лекций, кратких сообщений):

- краткое введение с указанием цели данного исследования;

- раздел «Материалы и методы» должен содержать сведения о методах исследования, достаточные для их воспроизведения, однако не следует подробно описывать известные методы, опубликованные ранее. В этом случае достаточно дать ссылку на соответствующий источник литературы. Однако модификации известных методик, разработанные автором (-ами), нужно описать подробно;

- раздел «Результаты и обсуждение» должен быть написан логично с представлением статистической обработки результатов данного исследования;

- выводы и/или заключение, резюмирующие результаты исследования;

- список литературы в алфавитном порядке;

- резюме на русском и английском языках (до 0,5 стр.) с указанием названия статьи, фамилий всех авторов, ключевые слова (не более 10) на русском и английском языках.

Таблицы помещаются в тексте. Каждая таблица должна иметь название и соответствующую ссылку на нее в тексте. В графах таблиц не должно быть пустот или непоясненных прочерков. Таблицы должны быть компактными, их шапка должна соответствовать содержанию граф. Все цифры в таблицах должны соответствовать цифрам в тексте, обязательна их статистическая обработка и объяснение в тексте с указанием принадлежности информации к конкретной таблице. При использовании в таблице сокращений, не упомянутых в статье, или символов (*, ** и т.п.) смысл их объясняется в примечании под таблицей.

Все математические формулы должны быть тщательно выверены.

Все сокращения, принятые в статье, должны быть расшифрованы при первом их упоминании в тексте.

Оформление списка литературы осуществляется в соответствии с требованиями «Ванкуверского стиля». Названия журналов должны быть сокращены в соответствии со стилем, принятым в Index Medicus. Библиографические ссылки в тексте статьи должны даваться номерами в квадратных скобках в соответствии со списком литературы, который формируется в алфавитном порядке: фамилия и инициалы автора (-ов) (сначала отечественные, затем зарубежные авторы, в транскрипции оригинала).

Образцы оформления литературы

Статья в журнале

Парфенов Е.В., Дьяконова Е.Г., Масенко В.П. Содержание в крови гормонов, нейромедиаторов и гипертрофия левого желудочка у больных гипертонической болезнью // Кардиология. 1995. №7. С. 18–23.

Vega K.Y., Pina I., Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease // Ann. Intern. Med. 1996. Vol. 124, №11. P. 980–983.

Книга

Мухарлямов Н.М., Беленков Ю.Н. Ультразвуковая диагностика в кардиологии. М: Медицина, 1981. 320 с.

Ringsven M.K., Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers, 1996. 540 p.

Глава в книге, статья в сборнике

Сидоров М.А., Тезяев В.В. Экстренные полостные эндоскопические исследования и операции // В кн.: Хирургия: наука и труд. - Н. Новгород: Изд-во НГМА, 1999. С. 48–50.

Phillips S.Y., Whisnant Y.P. Hypertension and stroke // In: Laragh Y.H., Brenner B.M. (eds.). Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 2nd ed. New York: Raven Press, 1995. P. 465–478.

Редакторы, составители в качестве авторов

Эпидемиология и факторы риска ишемической болезни сердца / Под ред. А.Н. Климова. Ленинград: Медицина, 1989. 176 с.

Norman I.Y., Redfern S.Y. (Eds.). Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone, 1996. 325 p.

Доклад на конференции

Гринберг А.А., Нестеренко Ю.Л., Лахтина В.Т. Неотложная хирургия дуоденальной язвы // Мат. 8-го Всерос. съезда хирургов. Краснодар. 1995. С. 63–65.

Bengtsson S., Solheim B.G. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics // In: Lun K.C., Degoulet P., editors. MEDINFO 92. Proc. of the 7th World congress on medical informatics; Geneva Switzerland. Amsterdam: North-Holland, 1992. P. 1561–1565.

Диссертация

Лопатин Ю.М. Состояние нейрогуморальной регуляции кровообращения у больных с хронической сердечной недостаточностью при лечении различными группами лекарственных препаратов. Автореф дис. ... докт. мед. наук. Москва, 1995. 46 с.

Kaplan S.Y. Post-hospital home health care: the elderly's acces and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ., 1995.

Патент, авторское свидетельство

Ежов Ю.И., Фирсов АЛ. Способ лечения коксартроза при деформациях суставных поверхностей. А.с. 1706591 СССР. 1990.

В оригинальных статьях цитируется не более 30, в передовых статьях и обзорах литературы — не более 60 источников. В список литературы не включаются неопубликованные работы и учебники. Ответственность за правильность данных, приведенных в списке литературы, несет автор.

К статье может быть приложено минимальное, но достаточное количество рисунков (не более 7 для оригинальных статей) с подрисуночными подписями (сюда относятся также диаграммы и графики), необходимых для понимания текста. В тексте статьи должна быть ссылка на каждый рисунок. Рисунки должны быть четкими. Количество обозначений на рисунке должно быть сведено к минимуму, все объяснения следует давать в подрисуночной подписи. Рисунки нумеруются отдельно от таблиц.

Рисунки (графики, диаграммы), представленные в электронном виде, должны быть в файлах с расширением TIFF, BMP, JPEG, PPT. При этом может использоваться любая программа, поддерживающая эти форматы.

Статья должна быть тщательно выверена и отредактирована автором (-ами).

Направление в редакцию работ, уже опубликованных или отправленных в другие журналы, не допускается.

Редакция оставляет за собой право сокращать и редактировать присланные статьи. Корректуры автору (-ам) не высылаются, вся работа с ними проводится по авторскому

оригиналу. Редакция имеет право направить статью экспертам в области, обсуждаемой в статье темы, для независимой (анонимной) научной экспертизы (рецензирования).

Автор (-ы), направляя статью в редакцию, поручает (-ют) редакции обнародовать произведение посредством его опубликования в печати и электронном издании. Редакция при использовании статьи вправе снабжать ее любым иллюстрированным материалом, рекламой и разрешать это делать третьим лицам.

Автор (-ы), направляя статью в редакцию, соглашается (-ются) с тем, что к редакции и издательству журнала переходят исключительные имущественные права на использование статьи (переданного в редакцию журнала материала, в т.ч. такие охраняемые объекты авторского права, как фотографии автора, рисунки, схемы, таблицы и т.п.), в т.ч. на воспроизведение в печати и в сети Интернет; на распространение и тиражирование; на перевод на любые языки народов мира; экспорта и импорта экземпляров журнала со статьей автора (-ов) в целях распространения, на доведение до всеобщего сведения. Указанные выше права автор (-ы) передает (-ют) редакции и издательству без ограничения срока их действия, на территории всех стран мира без ограничения, в т.ч. на территории Российской Федерации. Права на рукопись считаются переданными автором (-ами) редакции и издательству с момента принятия в печать.

За автором (-ами) сохраняется право использования опубликованного материала, его фрагментов и частей в научных и преподавательских целях.

Перепечатка материалов, опубликованных в журнале, другими физическими и юридическими лицами возможна только с письменного разрешения издательства, с обязательным указанием названия журнала, номера и года публикации.

Статьи, оформленные с нарушением вышеизложенных правил, публиковаться не будут.

Guidelines for Authors

Journal «Bioradicals and Antioxidants» is a peer-reviewed, open access journal that publishes original research articles as well as review articles in all areas of free radical processes in different biological systems. The general purpose of the journal is integration of specialists (doctors, biologists, veterinary doctors, scientists in physics and chemistry, engineers etc.), working in area of free radical processes in biomedical systems and its practical applications

Editor-in-Chief – Prof. Sergey P. Peretyagin (*psp_aro@mail.ru*)

Vice-Editor-in-Chief – M.D. Andrew K. Martusevich (*cryst-mart@yandex.ru*)

Articles should be sent to Editor-in-Chief or Vice-Editor-in-Chief.

MAIN TOPICS:

- 1. Free radical processes in biological systems. Pro- and antioxidant systems.*
- 2. Reactive oxygen species: generation, physical and chemical aspects, decomposition, physiological effects, role in pathogenesis of different human and animals diseases, clinical use*
- 3. Ozone: generation, physical and chemical properties, biological activity. Experimental and clinical aspects of ozone therapy.*
- 4. Nitric oxide and reactive nitrogen species in biological systems. Generation, biological and sanogenic effects of NO. Bound forms of nitric oxide, including dinitrosyl iron complexes.*
- 5. Natural and synthetic antioxidants: synthesis, investigation of properties, experimental and clinical aspects.*
- 6. High-energy physical exposures and bioradicals.*
- 7. Devices and equipment for generation of bioradicals and NO.*
- 8. Functional and laboratory methods for investigation of free radical processes.*
- 9. Educational aspects in area of bioradicals, nitric oxide and reactive oxygen species.*

JOURNAL SECTIONS:

- Perspectives (up to 15 pages.)
- Original article (up to 15 pages)
- Reviews and mini-reviews (up to 20-25 pages)
- Short communications (up to 7 pages)
- New devices and equipment (up to 7 pages)
- Conferences and Congresses (up to 5 pages)

MANUSCRIPT PREPARATION

Manuscripts should be in Word Document (Microsoft Word 97, 2003, 2007) in English or Russian and should follow the style of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, a copy of which can be found at www.icmje.org.

FONTS

Use the font Times New Roman size 14 for the body, size 14 bold for subheadings and headings and size 16 bold for the title, Line spacing=1.

TITLE PAGE

The title page should state:

- **Title:** title should be without abbreviations.
- **Author(s):** full name of all authors should be mentioned.
- **Affiliation:** Author's affiliation containing: Department, University, City, Country.
- **Corresponding author:** one of the authors should be chosen. Address, telephone and fax number and E-mail should be written.

ABSTRACT AND KEYWORDS

[required for perspectives, research articles, review articles]

- Abstract of research articles and brief reports should be structured as below:

Background, Objectives, Materials/Patients and Methods, Results and Conclusions. A list of 3-10 keywords must be provided for indexing purposes. All keywords should be provided according to MeSH terms at: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>.

ARTICLE BODY

Generally includes the: Background, Objectives, Materials/Patients and Methods, Results, Discussion and References.

- **Background:** This should summarize the rationale for the study.
- **Objectives:** State the aims of the study.
- **Materials/Patients and Methods:** This should include exact method or observation or experiment. If an apparatus is used, its manufacturer's name and address should be given in parentheses. If a drug is used, its generic name, dose and route of administration must be given. Statistical method must be mentioned and specify any general computer program used.
- **Results:** Must be presented in the form of text, tables and illustrations.

The contents of the tables should not be all repeated in the text. Instead, a reference to the table number may be given. Long articles may need sub-headings within some sections (especially the Results and Discussion).

- **Discussion:** This should emphasize the present findings and their differences or similarities with other work done in the field by other workers. Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions.

• **Acknowledgments:** All contributors who do not meet the criteria for authorship should be covered in the acknowledgment section. Persons who provided technical help, writing assistance and should also be acknowledged.

- **Tables:** All tables must be included at the end of the manuscript.

Tables in the word file should be separated by page break (each table on a separate page).

The style of table should be simple.

Each cell contains only one paragraph or one line.

- **Figures:** Figures must be included in article body. Resolution should be 300 dpi for a 3*2 inch figure.

• **Units, symbols, and abbreviations:** Internationally accepted units (International System of Units), symbols, and abbreviations must be used. Abbreviations should be used sparingly and must be introduced in parentheses upon the first mention.

- **Drug names:** Generic drug names must be used.

REFERENCES

This Journal accepts references according to Vancouver style (with some minor changes) rules established by the International Committee of Medical Journal Editors. In the Vancouver system, the only indication required in the text of a paper is a number, allocated in ascending sequence, and presented in the text either in brackets, or in superscript. For example:

“Recent randomized controlled trials in primary care showed benefits for patients with depression from increased telephone support, better cooperation between primary care and mental health professionals, and more systematic follow up (7).”

If the same source is cited again later in the text, the same number is used once more. If multiple references are cited, use a hyphen to join an inclusive range of numbers thus: (2-5). Use commas without spaces to separate non-inclusive numbers in a multiple citation thus: (2-5, 7, 10).

Optimal number of references for perspectives and reviews is up to 60, and for original articles and mini0reviews – up to 30.

• *Books and Other Monographs*

The details needed to construct a book reference are presented below.

Each author’s surname followed by the initials (in the same order as they appear on the title page), a comma should separate each author’s name. Title of the book. Edition of the book if there has been more than one. Place of publication or town of origin followed by a colon, Publisher’s name, followed by a semi-colon, Year of publication. e.g.

Ringsven M.K., Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers, 1996. 540 p.

If only a part is cited, add the page numbers, and volume number in the case of multi-volume works, at the end of the reference.

Meltzer P.S., Kallioniemi A., Trent J.M. Chromosome alterations in human solid tumors // The genetic basis of human cancer. Vogelstein B., Kinzler K.W. (Eds.). New York: McGraw-Hill, 2002. P. 93-113.

• *Standard journal article*

List the first three authors followed by et al., paper title, journal title abbreviation, year of publishing, volume number, issue number in parentheses, page range. e. g.

Vega K.Y., Pina I., Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease // Ann. Intern. Med. 1996. Vol. 124, №11. P. 980–983.

• *Dissertations (not recommended)*

Kaplan S.Y. Post-hospital home health care: the elderly’s acces and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ., 1995.

REVIEW PROCESS

All submitted manuscripts are subject to peer review and editorial approval. Articles will be sent to at least 2 reviewers. Authors are usually notified within 1-2 months about the acceptability of their manuscript.