

ДИСТАНТНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ Fe и pH-ЗАВИСИМОГО ОКИСЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА НА ЭРИТРОЦИТЫ, ТРОМБОЦИТЫ И ПЛАЗМЕННЫЕ ФАКТОРЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ IN VITRO

[В. Ю. Куликов, Е. А. Арчибасова](#)

ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Новосибирск)

Впервые показано, что процесс неферментативного окисления адреналина в щелочной среде (pH = 10,8) в присутствии ионов двухвалентного железа, сопровождающийся генерацией активных форм кислорода и адrenoхрома, дистантно (через стекло) влияет на устойчивость эритроцитов в гипоосмолярной среде, активизирует АДФ-зависимую агрегацию тромбоцитов и снижает активность плазменных факторов свертывания крови человека в условиях in vitro. Открытый нами феномен можно представить как часть единой энергоинформационной системы организма, в формировании и функционировании которой важная роль принадлежит активным формам кислорода в целом и неферментативному окислению адреналина в частности.

Ключевые слова: адреналин, окисление, активные формы кислорода, адrenoхром, кровь человека, тромбоциты, факторы свертывания.

Куликов Вячеслав Юрьевич — доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 225-07-37, e-mail: Kulikov_42@mail.ru

Арчибасова Елена Алексеевна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 225-07-37

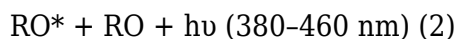
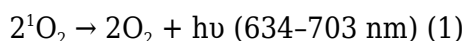
Актуальность. Следует признать, что в реализации исследований в области биотропных эффектов активных форм кислорода (АФК) в норме и различных патологических

процессах можно выделить несколько основных направлений.

Первое из них связано с пониманием и осмыслением фундаментальных закономерностей, лежащих в основе генерации АФК и путей их взаимопревращений, включая механизмы хемилюминесценции и безызлучательной конверсии электронно-возбужденных состояний с участием ингибиторов свободнорадикальных реакций, включая природные антиоксиданты [1–3]. Начальные этапы формирования АФК связаны с образованием анион-радикала кислорода, который при взаимодействии с супероксиддисмутазой (СОД) превращается в перекись водорода, которая в свою очередь разлагается каталазой. Каталаза катализирует разложение образующегося в процессе биологического окисления пероксид водорода на воду и молекулярный кислород ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) либо при взаимодействии с ионами двухвалентного железа (реакция Фентона) трансформируется в активный гидроксильный радикал. Гидроксилрадикал может запускать процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) с образованием липидных радикалов. Второй радикал, имеющий не меньшее значение в жизни клетки, — это монооксид азота, NO, образуемый NOсинтазами. Оба радикала образуются ферментными системами и были названы первичными радикалами [1]. По другому пути трансформации перекиси водорода под влиянием миелопероксидазы (например, фагоцитов) образуется гипохлорная кислота и синглетный кислород. Оценка появления в среде анион-радикала кислорода либо синглетного кислорода осуществляется за счет применения различных эмиттеров (люминол, люцигенин), достаточно специфически взаимодействующих с тем или иным типом кислородного радикала [4].

Второе направление связано с разработкой информативных методов оценки как свободных радикалов, так и промежуточных, и конечных продуктов свободнорадикального окисления, которые целесообразно использовать в клинко-экспериментальных исследованиях. Среди наиболее информативных методов можно выделить методы оценки кинетики хемилюминесценции (спонтанной и индуцированной) [4], а также определение одного из конечных продуктов свободнорадикального окисления — малонового диальдегида и продуктов окислительной деструкции белков [5]. Хемилюминесценция, сопровождающая перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот, широко используется в качестве инструмента оценки кинетики окислительных процессов в биологических системах при различных физиологических состояниях и патологии [6].

Синглетный кислород, образующейся как на начальных этапах взаимопревращений АФК, так и в процессе рекомбинации промежуточных пероксильных радикалов (RO_2), совместно с карбонильными соединениями являются важными эмиттерами хемилюминесценции, отражающими в целом интенсивность окислительного стресса. Хемилюминесцентные системы могут быть классифицированы в две группы, в зависимости от происхождения излучающей молекулы. В первую группу можно отнести начальные реакции, обусловленные процессами рекомбинации АФК (например, синглетного кислорода), ко второй группе относятся реакции, когда энергия электронно-возбужденных состояний мигрирует на эмиттер (например, карбонильные соединения), которые и формируют определенный спектр излучения, это так называемая сенсibilизированная хемилюминесценция [7]. Эти реакции можно представить в следующем виде [8]: первый тип реакций представлен синглетным кислородом, второй — излучением в результате возбуждения карбонильных групп.



Таким образом, спонтанная хемилюминесценция зависит от внутриклеточного образования синглетного кислорода [8] с последующей рекомбинацией пероксильных радикалов и миграцией энергии электронно-возбужденных состояний на фотоактивные молекулы, выступает в качестве достаточно надежного показателя окислительного стресса в клинической и экспериментальной практике. На следующих этапах превращений АФК, в присутствии ненасыщенных жирных кислот, что типично для биологических тканей и жидкостей, происходит активация процессов ПОЛ, на начальном этапе которого образуются диеновые конъюгаты, затем альдегиды (малоновый альдегид), шиффовы основания и т. д., оценка которых достаточно широко используется в медицине [9].

Хемилюминесценция, которая активируется металлами с переходной валентностью, в клинической практике является также важным показателем активности систем неферментативной антиоксидантной защиты ткани.

Третье направление подразумевает внедрение фундаментальных разработок в клиническую практику с целью выявления роли процессов свободнорадикального окисления, или так называемого окислительного стресса в патогенезе заболеваний самой различной природы, и использование при этом различных классов естественных антиоксидантов и синтетических ингибиторов для коррекции деструктивных эффектов, вызванных АФК и продуктами ПОЛ [10]. Нарушение баланса между системами генерации и детоксикации перекисных соединений, наряду с реперфузионными расстройствами, процессами воспаления и нарушения структуры и функции соединительной ткани [11], лежит в основе таких грозных и актуальных неврологических заболеваний, как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и сосудистая деменция [12, 13].

Четвертое направление, истоки которого были заложены рядом российских ученых и специалистов [14–16], направлено на проведение исследований в области изучения биоинформационной значимости биохемилюминесценции, являющейся практически неотъемлемой частью свободнорадикальных реакций и окислительных процессов в биологических системах в целом. Важность и проблематичность этого направления очевидны, поскольку оно подразумевает введение новых парадигм и новых методических подходов в устоявшиеся представления о значимости АФК в биологических системах. В первую очередь это касается разработки методических подходов, позволяющих надежно оценить наличие или отсутствие дистантных (полевых) эффектов в биологических системах, и, во-вторых, осмыслить происходящие явления с участием АФК в рамках 3D-пространства.

Начиная исследования в данной области, мы исходили из представлений о том, что, по-видимому, неконструктивно полагать, что хемилюминесценция является лишь проявлением банального «сброса» энергии электронно-возбужденных состояний и не обладает определенными биотропными свойствами. Выбор соответствующих подходов и моделей диктовался интересами в области изучения фундаментальной роли АФК в реализации стресса и постстрессовых состояний, которые связываются, естественно, с эффектами катехоламинов и активностью симпатoadренальной системы в целом. Оказалось, что наряду с взаимодействием с различными типами адренорецепторов, выступающих в качестве вторичных посредников, адреналин является мощным инициатором выработки АФК в результате неферментативного окисления. В процессе неферментативного (хиноидного) окисления адреналина в щелочной среде и присутствии ионов двухвалентного железа образуются активные формы кислорода, обладающие высоким деструктивным потенциалом за счет появления в среде свободных

радикалов и продуктов свободнорадикального окисления [17]. Следует различать свойства адреналина как инициатора генерации АФК в биологических системах и в условиях *in vitro*. В последнем случае, вследствие отсутствия антирадикальных систем, осуществляющих процессы биотрансформации АФК, их генерация представлена преимущественно анион-радикалом кислорода, образующегося в присутствии ионов двухвалентного железа. Эту реакцию предлагают использовать для оценки активности СОД биологических тканей и жидкостей [18]. В этой реакции образуются также продукты хиноидного окисления адреналина, представленные главным образом адrenoхромом, обладающим определенными биотропными свойствами. о-Хиноновый фрагмент адrenoхрома может в щелочной среде восстанавливаться с образованием адренолютина, который в щелочной среде имеет желто-зеленую флуоресценцию.

Таким образом, в условиях неферментативного окисления адреналина в щелочной среде *in vitro* появляются фотоактивные метаболиты, которые наряду с адреналином могут выступать в качестве потенциальных эмиттеров электронно-возбужденных состояний, способствуя тем самым генерации хемилюминесценции.

Цель работы: оценить возможность дистантного (бесконтактного — через стекло) влияния неферментативного окисления адреналина на осмотическую устойчивость эритроцитов, АДФ-зависимую агрегацию тромбоцитов и плазменных факторов свертывания крови человека в условиях *in vitro*.

Задачи

1. Разработать методику оценки дистантных взаимодействий биологических объектов в условиях *in vitro*.
2. Оценить дистантное влияние неферментативного окисления адреналина:
 - на осмотическую устойчивость эритроцитов и активность каталазы;
 - АДФ-зависимую агрегацию тромбоцитов;
 - плазменные факторы свертывания крови на основе использования АПТВ-теста.

Материал и методы

1. Разработка методики оценки дистантных взаимодействий биологических объектов в условиях in vitro. Нами предлагается достаточно простой метод (модель) для оценки дистантных взаимодействий в различных модельных системах в целом. Как видно на рис. 1, пробирка с кровью, забранная в цитрат натрия, помещается в стаканчик, в котором запускается реакция окисления адреналина в щелочной среде в присутствии ионов двухвалентного железа (справа). Слева кровь в центрифужной пробирке находится в идентичном буфере, выступая в качестве контроля. Естественно, что в зависимости от задачи состав исследуемых реакций и ингредиентов может изменяться. Таким образом, справа находится опытный образец, слева — контроль.



Рис. 1. Модель оценки дистантных эффектов

В работе использовалась кровь одного, практически здорового человека, что позволило, естественно в разумных пределах, ограничить количество дублей, существенно повысив точность измерений. Все работы проводились в течение 2 часов от начала забора. Кровь забиралась в цитрат натрия в обычной пропорции в две центрифужные пробирки — одна контрольная, вторая — опытная. В опытный и контрольный стаканчики добавлялось 40 мл 0,2 М раствора бикарбонатного буфера с $\text{pH} = 10,8$. В расчетах используемых ингредиентов исходили из данных, представленных в работах [8, 21]. Каждая из пробирок с кровью помещалась в отдельный лабораторный стаканчик емкостью 50 мл. В опытный стаканчик последовательно (трижды) добавляли 200 мкл 0,02 М раствора двухвалентного железа в виде соли FeSO_4 и раствор адреналина (по 1 мл через 15 мин). Общее время инкубации составляло 1 час 20 мин. Процесс окисления адреналина оценивался как визуально, так и спектрофотометрически по появлению адrenoхрома (спектры поглощения в области 490 нм). В контрольном стаканчике был только раствор буфера.

После окончания инкубации и аккуратного перемешивания крови забиралось 100 мкл на определение каталазы. Затем контрольные и опытные образцы центрифугировались при 1000 об./мин 15 мин для получения богатой тромбоцитами плазмы. При повторном центрифугировании при 3000 об./мин получали бедную тромбоцитами плазму. В плазме крови опытных и контрольных образцов определялось время коагуляции с использованием АПТВ-теста на гемокоагулометре SOLAR-2110 стандартными АПТВ-реагентами. Эритроцель дважды промывали физиологическим раствором и оценивали осмотическую устойчивость при различных концентрациях NaCl из расчета 30 мкл эритроцель на 6 мл раствора различной молярности и оценивали содержание ТБК-реактивных продуктов с использованием 10 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и 0,7 % раствора ТБК. После часа инкубации пробирки центрифугировались при 3000 об./мин 15 мин, гемоглобин определялся с использованием прибора «Мини-Гема». Оценка каталазы проводилась по методу [20] на приборе «Specol». Для обработки полученных данных использовались пакеты прикладных программ Statistica 7.0.

Результаты исследований

2. Оценка дистантного влияния неферментативного окисления адреналина

на осмотическую устойчивость эритроцитов и активность каталазы. При оценке осмотической устойчивости эритроцитов использовались осмолярные градиенты от 0,15 % NaCl в первой пробирке, до 0,45 % — в пятой. Полученные данные по итогам трех независимых экспериментов представлены на рис. 2. Как видно из представленных данных, устойчивость эритроцитов в опыте достоверно меньше, чем в контроле, в то же время в опыте достоверно увеличивается активность каталазы. Так, содержание перекиси водорода (отн. ед.) в контроле и опыте ($n = 5$) составило: в контроле $0,139 \pm 0,0029$, в опыте $0,114 \pm 0,0065$, из чего следует, что в опыте активность каталазы достоверно (при $P = 0,005$) выше, чем в контроле.

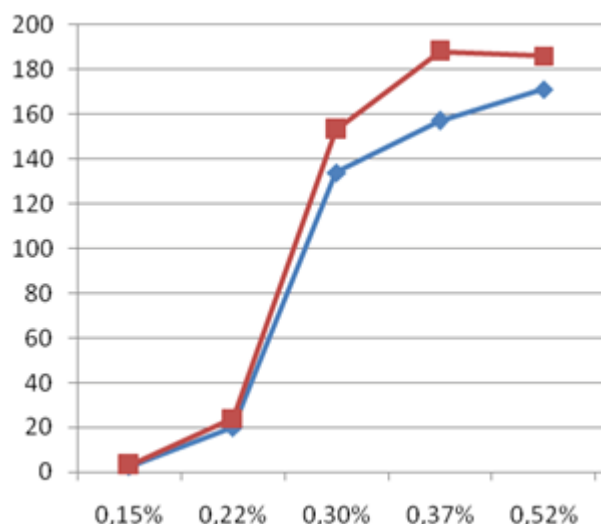


Рис. 2. Осмотическая устойчивость эритроцитов в условиях контроля (нижняя кривая) и опыта (верхняя кривая). Уровень достоверно: при $P = 0,031$. По оси X — концентрации NaCl, по Y — содержание гемоглобина (г/л — по данным «Мини-Гем»)

Таким образом, дистантный эффект окисляющегося адреналина на цельную кровь человека проявляется в лабильности мембраны эритроцитов, что характеризуется снижением их устойчивости в осмолярных градиентах NaCl и повышением активности каталазы. Выявленные особенности, по-видимому, связаны с изменением окислительных процессов в эритроците, когда возрастает вероятность внутриклеточной генерации АФК, и изменение активности каталазы можно рассматривать как компенсаторную реакцию. В ряде исследований [19] при изучении характера изменения активности отдельных эритроцитарных ферментов в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro* (реакция Фентона) были выявлены разнонаправленные изменения активности ряда ферментов, включая каталазу.

Так, при заболеваниях, сопровождающихся развитием окислительного стресса, в эритроцитах больных наблюдается снижение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатионредуктазы. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы снижалась на 27,7 % при желчнокаменной болезни и на 42,6 % при циррозе печени. Активность глутатионредуктазы снижается на 26,3 и 39 % при желчнокаменной болезни и циррозе печени соответственно. На фоне снижения активности указанных ферментов прослеживается увеличение активности каталазы: в 3,0 раза при желчнокаменной болезни и в 3,5 раза при циррозе печени. Авторами делается вывод о том, что выявленные варианты реакции ферментных систем эритроцита отражают усиление в эритроцитах свободно-радикальных реакций и деструктивных процессов, связанных с непосредственным действием АФК на белковые молекулы эритроцитарной мембраны. В эритроцитах нами был оценен уровень ТБК-реактивных

продуктов, который не выявил достоверных отличий между опытными и контрольными образцами, что видно на рис. 3. Следовательно, сценарий активации процессов ПОЛ в мембранах эритроцитов в условиях опыта не может быть использован для оценки механизмов дистантного эффекта окисляющегося адреналина.

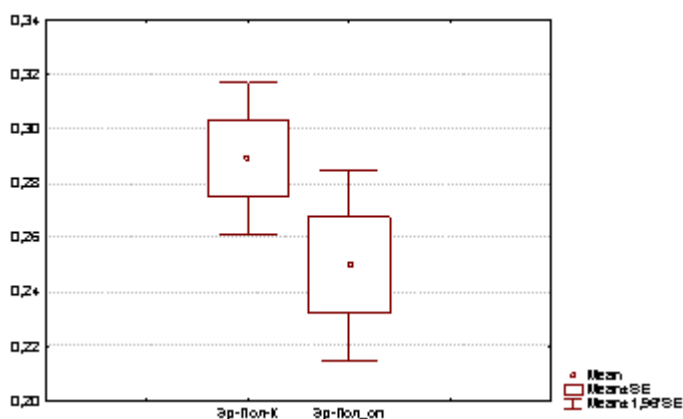


Рис. 3. Содержание ТБК-реактивных продуктов в эритроцитах в опыте и контроле.
Уровень достоверности: $P = 0,108$

Модификация свойств эритроцитарной мембраны по существу является основным фактором, определяющим не только устойчивость эритроцитов к действию осмолярных сил и градиентов, но и его способность к деформации при прохождении в микроциркуляторном русле. В этом плане можно выделить несколько узловых, наиболее общих механизмов, объясняющих полученными нами данные.

«Ахиллесовой пятой» клетки (не только эритроцита) является проницаемость мембраны для малых молекул, в первую очередь катионов. Изменение пассивной проницаемости мембраны так же сильно влияет на величину объема, как и изменение осмолярности. К настоящему времени становится понятным участие в регуляции не только энергетики клетки, но и формировании осмолярных градиентов и физико-химических свойств клеточных мембран в целом, мембранной Na^+/K^+ -АТФазы — фермента из группы транспортных аденозинтрифосфатаз, находящегося в клеточной мембране и переносащего одновалентные катионы через мембрану.

До недавних пор практически все работы, посвященные изучению Na^+/K^+ -АТФазы, начинались с утверждения о том, что в клетке этот белок нужен для создания ионной асимметрии и электрической разности потенциалов на мембране клетки. Однако очень быстро после открытия этого фермента стало ясно, что он есть в любых животных клетках. Есть он и в клетках, которые не имеют практически никакой электрической активности. Так, применительно к эритроциту нами было показано, что дигоксин, ингибируя работу Na^+/K^+ -АТФазы, снижает устойчивость эритроцитов в гипотоническом растворе [21]. В ряде последних работ [22] было обосновано уже более широкое участие системы ионных насосов и каналов в мембране клетки (Na^+ , K^+ -насос, Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы), обеспечивающих заданный объем клетки и его стабилизацию. Одной из основных систем клетки, участвующих в поддержании постоянного объема, является асимметрия в распределении концентраций ионов внутри и вне клетки. Создаваемое обменными процессами осмотическое давление в эритроците вызывает деформацию мембраны.

На основе анализа модели осмометра были также предложены [23] два механизма осмотической протекции эритроцитов в гипотонических средах. Один из них связан

с протектирующим сбросом внутриклеточных электролитов, другой — с изменением внутриклеточной осмолярности предположительно за счет деградации тетрамеров гемоглобина в димеры с одновременным перераспределением внутриклеточных электролитов. Наконец, если исходить из положения о том, что дистантный эффект адреналина, который можно считать доказанным, реализуется за счет электромагнитного излучения в видимой области спектра в результате образования АФК, то процесс модификации эритроцитарной мембраны и изменение активности каталазы может быть объяснено процессами взаимодействия излучения с гемоглобином с последующим изменением внутриклеточных окислительных процессов, рассмотренных выше. Такой эффект наблюдается, например, при облучении цельной крови лазерным излучением, когда общая концентрация гемоглобина уменьшается в результате, во-первых, фотопревращения гемоглобина в метгемоглобин и образования супероксидного иона кислорода, который, являясь вторичным радикалом, нарушает структуру и функции мембраны эритроцитов и вызывает деструкцию эритроцитов. Во-вторых, среди эритроцитов можно выделить группу клеток с пониженной резистентностью (это либо поврежденные, либо старые эритроциты), мембраны которых легко разрушаются от любого внешнего воздействия [24].

3. Дистантное влияние окисляющегося адреналина на АДФ-зависимую агрегацию тромбоцитов. Для определения АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов использовали обогащенную и бедную тромбоцитами плазму (ОТП и БТП соответственно). Для получения ОТП кровь забирали из локтевой вены в пробирки с 3,8 % цитратом натрия в соотношении 9:1 и затем центрифугировали при 1000 об./мин (150—200g) в течение 5 мин. БТП получали центрифугированием цитратной крови при 3000 об./мин (1200g) в течение 15 мин. После центрифугирования плазму помещали в силиконовые пробирки в количестве 0,4 мл, и определяли уровень светопропускания на гемокоагулометре SOLAR-2110 в режиме AR. Для определения агрегационной способности тромбоцитов к ОТП добавляли индуктор агрегации тромбоцитов АДФ второго разведения 5,0 мкг/мл = 1×10^{-5} М в количестве 0,05 мл. АДФ-стимулированная агрегация тромбоцитов оценивалась по изменению светопропускания плазмы в динамике в течение 5 мин с интервалом в 1 мин. Изменение светопропускания плазмы в контроле и опыте определяли по отношению к таковой БТП, которую использовали в качестве контроля и условно принимали за 100 %. Было проведено 3 серии независимых исследований по 2 дубля в каждой. Полученные данные показаны в табл. 1.

Таблица 1

Дистантное влияние окисляющегося адреналина на АДФ-зависимую агрегацию тромбоцитов ($M \pm m$)

Условия	0 мин	1 мин	2 мин	3 мин	4 мин	5 мин
Контр.	78,4 ± 2,1	79,2 ± 2,1	79,8 ± 2,1	80,1 ± 2,1	80,2 ± 2,2	80,2 ± 2,2
Опыт	93,2 ± 5,1	93,8 ± 5,1	94,1 ± 5,1	94,1 ± 5,3	94,0 ± 5,4	93,4 ± 5,5
P	0,027	0,027	0,027	0,027	0,027	0,027

Как видно из данных, представленных в табл. 1, в опыте наблюдается достоверное увеличение процессов агрегации тромбоцитов.

С использованием парного теста Вилкокса для зависимых переменных было показано, что в контрольных пробах регистрируется достоверный прирост оптической плотности между исходными показателями и показателями, регистрируемыми в течение 5 мин, в то время

как в опыте достоверность изменений менее значима, что видно по данным табл. 2.

Таблица 2

Достоверность прироста оптической плотности в контроле и опыте

Показатели	Интервал времени, мин				
	0-1	0-2	0-3	0-4	0-5
Кр	0,046	0,027	0,027	0,027	0,027
Ор	0,043	0,027	0,046	нд	нд

Примечание. Условные обозначения: 0-1, 0-2 и т. д. — достоверность отличий между исходной точкой и первой и последующими минутами, К_р — показатель достоверности отличий в контроле и соответственно опыте

Выявленные изменения АДФ-зависимого окисления тромбоцитов в опыте, т. е. в условиях дистантного (электромагнитного) воздействия окисляющегося адреналина на гемоглобин эритроцитов, могут быть следствием как минимум двух процессов. Один из них основывается на представлениях о ведущей роли внутриэритроцитарных окислительных реакций как генератора последующего увеличения продуктов ПОЛ и белков в плазме крови. Действительно, образование синглетного кислорода сопровождается не только образованием перекисей липидов, но и окислением триптофановых, гистидиновых и тирозиновых остатков изолированных пептидов и протеинов, что может приводить к образованию полустабильных (semistable) пероксидов. С ними связано образование других реакционноспособных соединений, включая кислородные и углеродные радикалы, что приводит к образованию протеиновых сшивок и ингибированию биологической активности протеинов [5]. Окислительная модификация белков, сопровождающаяся появлением молекул средней массы (МСМ), может быть оценена спектрофотометрически [25] по изменению оптической плотности при 254 нм после осаждения белков плазмы крови 10 % ТХУ-раствором с последующим центрифугированием при 3000 об./мин. На рис. 4 показаны данные, полученные нами по оценке МСМ в БТП, из которых видно, что в контроле МСМ достоверно больше, чем в опыте (при $P < 0,01$). Следовательно, отсутствие достоверного увеличения МСМ в опыте не позволяет нам принять гипотезу о наличии окислительного стресса в плазме крови в опыте и, по крайней мере, не рассматривать её как основное звено в модификации агрегационной способности тромбоцитов в опыте по сравнению с контролем.

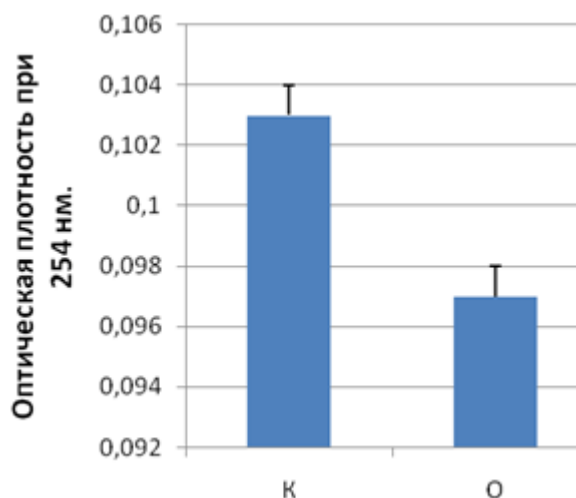


Рис. 4. Оценка МСМ в БТП (в контроле и опыте)

В то же время в ряде экспериментальных исследований по введению крысам различных классов антиоксидантов было показано, что на фоне снижения содержания в крови продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов) наблюдалось удлинение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) и увеличение содержания тромбоцитов [26]. При активации процессов ПОЛ, вызванных введением свинца как прооксиданта, укорачивалось время АЧТВ и увеличивалось содержание тромбоцитов. Налицо наличие различных вариантов взаимоотношений между окислительным стрессом, который может быть представлен как процесс с повышенной генерацией продуктов ПОЛ и депрессией систем антиоксидантной защиты и как состояние депрессии процессов ПОЛ, вызванное активацией ферментативных и неферментативных антиоксидантных систем. И в одном, и в другом случаях формируются определенные регуляторные контуры межклеточных, межсистемных и межорганных взаимоотношений, в конечном итоге в каждом конкретном случае определяющие их вклад в регуляцию гомеостаза в целом. Так, фракция лимфоциты + моноциты крыс в физиологической концентрации оказывает высокий проагрегантный эффект на тромбоциты [26], который, по данным авторов, в большей степени обусловлен лимфоцитами, чем моноцитами.

Таким образом, среди возможных факторов, в какой-то мере объясняющих полученные нами данные, следует выделить системные перестойки гемостаза, обусловленные изменениями характера взаимодействия клеток крови между собой. Наличие таких взаимодействий достаточно подробно рассматривается в ряде исследований [27, 28]. Активация процессов агрегации тромбоцитов, обнаруженная нами в опыте, может быть следствием тесной взаимосвязи между функцией эритроцитов и активностью тромбоцитов. В эритроцитах обнаружен целый ряд соединений, аналогичных тромбоцитарным факторам. Они получили название эритроцитарных факторов свертывания крови, среди этих факторов можно выделить внутри- и внеэритроцитарные факторы. К первым относятся тромбопластический фактор эритроцитов, антигепариновый фактор, АДФ-фактор, усиливающий адгезивность и агрегацию тромбоцитов. Разрушенные эритроциты, как известно, сильнее, чем интактные, оказывают влияние на адгезивно-агрегационную активность тромбоцитов.

В тромбоцитах выявлено наличие трех подтипов P2-рецепторов — P2Y₁, P2Y₁₂ и P2X₁, каждый из которых играет специфическую роль в активации и агрегации кровяных пластинок при стимуляции АДФ [29]. Так стимуляция P2Y₁-рецепторов АДФ мобилизует ионы Ca²⁺ из депо, активация P2Y₁₂-рецепторов ведет к усилению агрегации как самим АДФ, так и другими агонистами.

В регуляции процессов адгезии и агрегации тромбоцитов помимо ТХА₂ принимают участие и другие метаболиты арахидоновой кислоты, в частности, 12-НЕТЕ, образующаяся в тромбоцитах даже в больших количествах, чем ТХА, PGI₂ [28].

Показательно, что PGI₂ принимает участие в регуляции процессов, способствующих инактивации тромбина, которые делают невозможным его участие в процессе фибринообразования, но сообщают тромбину высокую активность в обеспечении реакции расщепления протеина С, способствуя тем самым выявлению противосвертывающего эффекта последнего [28]. Следовательно, процесс активации тромбоцитов может осуществляться комплексом факторов, которые формируются в клетках крови при различных физиологических реакциях и патологических состояниях, в то же время спектр соединений, образующихся при активации тромбоцитов, чрезвычайно разнообразен и, судя по литературным данным, он не сводится только к активации плазменных факторов свертывания крови. В ряде случаев возможны противоположные

эффекты, особенно в условиях *in vitro*, когда не реализуются системные механизмы регуляции гемостаза.

4. Дистантное влияние окисляющегося адреналина на плазменные факторы свертывания крови по данным АПТВ-теста. В плазме крови опытных и контрольных образцов определялась время коагуляции с использованием АПТВ-теста на гемокоагулометре SOLAR-2110 стандартными АПТВ-реагентами. Было проведено 2 серии экспериментов по 6 дублей в каждой. Ниже приводятся полученные данные.

Таблица 3

Время коагуляции в контрольном и опытном образцах крови

Показатели	К-во	Средние значения	Мин.	Макс.	Станд. откл.	Станд. ошибка
Контроль	12	33,65000	25,10000	38,90000	4,226217	1,220004
Опыт	12	44,73333	42,40000	46,30000	1,305466	0,376856

Примечание: уровень достоверности: $P = 0,0022$

Как видно из данных, представленных в табл. 3, между контролем и опытом разница высоко достоверна. На рис. 5 эта разница наиболее наглядна.

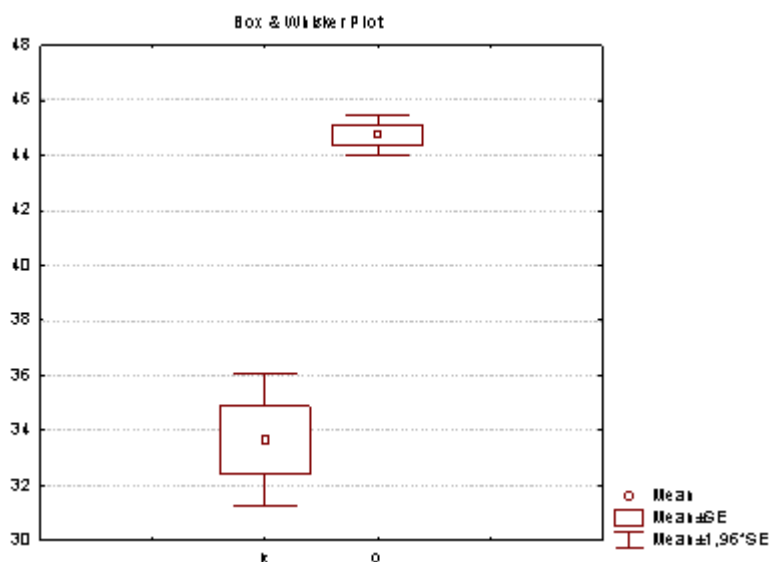


Рис. 5. Время коагуляции в контроле и опыте (по данным АПТВ-теста)

Таким образом, открытый нами эффект дистантного влияния окисляющегося по хиноидному механизму адреналина на физико-химические свойства эритроцитов, АДФ-зависимую агрегацию тромбоцитов и активность плазменных факторов свертывания крови свидетельствует о наличии в организме новой системы коммуникативных взаимоотношений, базирующейся на наличии сигналов электромагнитной природы, тесно связанных с активными формами кислорода и хемилюминесценцией, механизмы которой подробно описаны [31, 32], хотя биологическая значимость данного феномена остается до сих пор ещё непонятной. Несомненно одно, что выявленный феномен является лишь частным вариантом наиболее общей закономерности по регуляторной роли АФК и связанного с ними электромагнитного излучения в регуляции биологических процессов в норме и патологии.

Следует иметь в виду, что полученные нами данные касаются модельной ситуации, когда генерация активных форм кислорода ограничивается по-существу только генерацией

анион-радикала кислорода. Моделью хиноидного окисления адреналина, как известно, является реакция автоокисления адреналина в щелочном карбонатном буфере, которая происходит через ряд последовательных этапов с образованием промежуточных соединений до конечного продукта адrenoхрома [33]. При низкой концентрации H^+ самоинициируется процесс внутримолекулярных перестроек молекулы адреналина: происходит его депротонизация, последующая циклизация и образование соединения хиноидной природы — адrenoхрома. Электроны от молекулы адреналина и его последующих окисленных промежуточных соединений в процессе этих преобразований поступают на растворённый в среде инкубации кислород. Получая электрон, кислород превращается в супероксид анион-радикал (САР) кислорода, обладающий очень высокой реактивностью за счет наличия неспаренного электрона и свободной валентности. Введение НСТ в реакцию автоокисления адреналина показало [33], что в процессе окисления адреналина действительно образуются супероксидные анионы, скорость генерации которых чрезвычайно интенсивна, а его энергия может передаваться не только на НСТ, но и молекулу активатора, в качестве которой может, по-видимому, выступать адrenoхром и адренолютин. Спектральный состав излучения в этом случае, согласно закону Стокса, соответствует спектру люминесценции активатора (обладающего, как правило, высоким квантовым выходом), располагающимся в более длинноволновой области, по сравнению со спектрами поглощения. Если исходить из того, что спектр поглощения адrenoхрома лежит в области 480–490 нм, то спектры флуоресценции должны лежать в области 520–600 нм, т. е. в области поглощения гемоглобина.

В биологических системах спектр превращений АФК намного разнообразнее, поскольку целый ряд антиоксидантных ферментных систем трансформируют АФК в промежуточные и конечные продукты. Все радикалы весьма реактивны, и первичные радикалы быстро переходят в молекулярные продукты (рис. 6). Специальный фермент СОД превращает САР в пероксид водорода H_2O_2 (реакция 1). NO в присутствии САР реагирует с ним с образованием токсичного иона пероксинитрита ONOO^- (реакция 2). Супероксид обладает способностью восстанавливать трехвалентное железо, хранимое в ферритине или входящее в состав железосерных комплексов цепей переноса электронов, до двухвалентного (реакция 3), что и происходит в неблагоприятных для клетки условиях. Двухвалентное железо реагирует с H_2O_2 или гипохлоритом с образованием чрезвычайно активного радикала гидроксила $\text{OH}^\bullet$ (реакции 4–5).

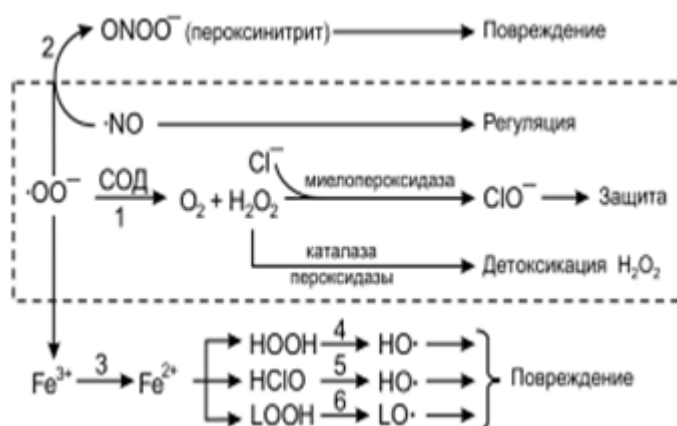


Рис. 6. Метаболизм первичных радикалов (Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурина)

Синглетный кислород переходит в основное (триплетное) состояние кислорода с испусканием кванта света (хемилюминесценции) в инфракрасной области спектра (длина волны 1270 нм). Кроме того, молекулы синглетного кислорода могут образовывать

возбужденные димеры (так называемые эксимеры) кислорода, которые переходят в основное состояние с испусканием видимого света (длины волн 635, 580, 535 нм), рис. 7.

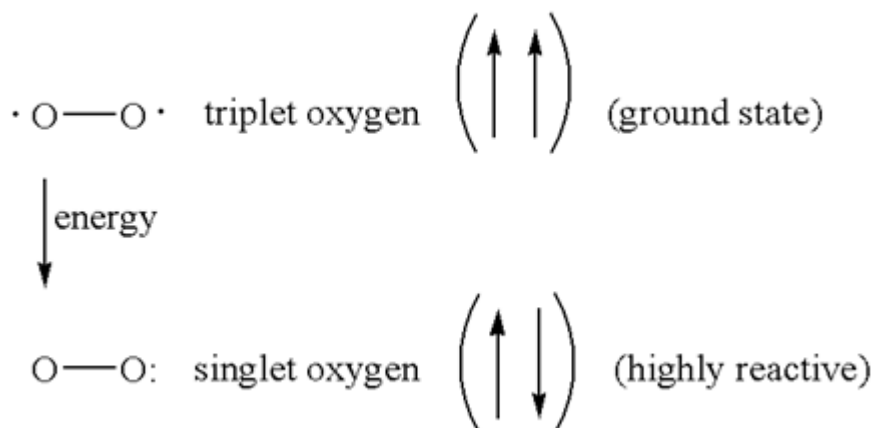


Рис. 7. Структура внешних орбиталей кислорода в триплетном и синглетном состояниях

Структура внешних орбиталей, отличающаяся у кислорода в основном состоянии (триплетном) и синглетном, лежит в основе высокой реактивности синглетного кислорода и его разнообразных биотропных свойств [34]. С синглетным кислородом связывают окисление холестерина, развитие сердечно-сосудистых изменений. Антиоксиданты на основе полифенолов и ряд других могут снижать концентрацию активных форм кислорода и предотвращать такие эффекты.

Наиболее интригующими оказались недавние заключения европейских исследователей о том, что молекулы синглетного кислорода могут оказаться важнейшими регуляторами клеточной жизнедеятельности, существенно определяющими механизм инициации апоптоза [35].

Энергия электронно-возбужденного состояния синглетного кислорода в момент перехода его в основное состояние и излучения в области 634 нм рассматривается с позиции переноса энергии синглетного кислорода (ЭСК) для дистантной модификации свойств той или иной системы, тем более что излучение этого диапазона проникает через стекло [36]. Энергия электронно-возбужденных состояний как синглетного кислорода, так и АФК в целом, может мигрировать на различные эмиттеры с последующим переизлучением в соответствующем спектральном диапазоне, либо в зависимости от квантового выхода вещества трансформироваться в виде безызлучательных переходов. Последний механизм лежит в основе действия различных классов антиоксидантов ферментативной либо неферментативной природы.

Одна из главных составляющих собственной (неактивированной) хемилюминесценции животных клеток и тканей — свечение, сопровождающее цепное окисление липидов в мембранных структурах клеток и липопротеинах крови. Эти реакции идут с участием свободных радикалов липидов и липопероксидов, которые за счет окислительной деструкции клеточных структур и макромолекул оказывают системный деструктивный эффект [37]. В то же время радикалы, ведущие цепь окисления, взаимодействуют друг с другом. В реакции взаимодействия двух радикалов липопероксида образуются молекулы кетона и кислорода в электронно-возбужденном состоянии, которые затем переходят в основное состояние, испуская квант света. Возможный спектральный диапазон такой хемилюминесценции также достаточно разнообразен и лежит от 420 до 1270 нм [38].

В биологических системах, кроме потенциальных генераторов энергии, существуют разнообразные фотоактивные соединения, которые могут за счет донорно-акцепторных отношений активно участвовать в процессах переизлучения энергии АФК [39] и процессах пероксидации, причем наиболее «прозрачный диапазон» для биологических структур лежит в области 650–1000 нм.

Таблица 4

Эндогенные флуорофоры и длины волн, соответствующие максимумам возбуждающего излучения и флуоресценции

Эндогенные флуорофоры	Длина волны поглощения, нм (max)	Длина волны флуоресценции, нм (max)
Аминокислоты		
Триптофан	280	350
Тирозин	275	300
Фенилаланин	260	280
Структурные белки		
Коллаген	270, 325, 340	310, 400
Эластин	290, 325, 360, 460	340, 400, 410, 520
Ферменты и коферменты		
ФАД, флавины	440, 450	520, 535
НАД-Н	290, 351	440, 460
НАДФ-Н	336	464
Витамины		
Вит. А	327	510
Вит. К	335	480
Вит. D	390	480
Вит. B ₁₂	275	305
Пиридоксин	332, 340	400
Липиды		
Фосфолипиды	436	540, 560
Липофусцин	340–395	540, 430–460
Цероид	340–395	430–460, 540
Порфирины*	400–430	630, 700

В табл. 4 в сокращенном виде приводятся спектры поглощения и флуоресценции некоторых биологически активных соединений, которые эффективно участвуют в регуляции метаболизма [40] и которые потенциально способны к регуляции и размену энергии электронно-возбужденных состояний. Логично предположить, что такой ансамбль взаимодействующих между собой фотоактивных соединений в условиях энергетической «подкачки» со стороны АФК, а также хиноидного окисления адреналина, может формировать электромагнитное 3D-пространство, как проявление надмолекулярных механизмов энергоинформационных и пространственных взаимодействий в биологических системах в целом.

Список литературы

1. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурина // *Успехи биологической химии*. — 2009. — Т. 49. — С. 341–388.
2. Repetto M. G. Transition metals : bioinorganic and redox reactions in biological systems / M. G. Repetto, A. Boveris // In : *Transition metals: uses and characteristics*. Nova Science Publishers Inc. (ed.). — New York, USA, 2012. — P. 349–370.
3. Yin H. Free radical lipid peroxidation : mechanisms and analysis / H. Yin, L. Xu, N. A. Porter // *Chemical Reviews*. — 2011. — Vol. 111. — P. 5944–5972.
4. Vladimirov Yu. A. Free Radicals and Cell Chemiluminescence / Yu. A. Vladimirov, E. V. Proskurnina // *Biochemistry (Moscow)*. — 2009. — Vol. 74, N 13. — P. 1545–1566.
5. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях / Е. Е. Дубинина, А. В. Пустыгина // *Укр. біохім. журн.* — 2008. — Т. 80, № 6. — С. 5–18.
6. Benov L. C. Study of Activated Oxygen Production by Some Thiols Using Chemiluminescence / L. C. Benov, S. R. Ribarov, O. H. Monovich // *Gen. Physiol. Biophys.* — 1992. — Vol. 11, N 195–202. — P. 195.
7. Repetto M. G. Clinical use of chemiluminescence assays for the determination of systemic oxidative stress / M. G. Repetto // In : *Handbook of chemiluminescent methods in oxidative stress assessment* / I. Popov, G. Lewin (ed.). — Transworld Research Network : Kerala, India, 2008. — P. 163–194.
8. Organ chemiluminescence : noninvasive assay for oxidative radical reactions Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States / A. Boveris [et al.]. — 1980. — Vol. 177. — P. 347–351.
9. Weber G. R. The Measurement of Oxygen-Derived Free Radicals and Related Substances in Medicine / G. R. Weber // *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* — 1990. — Vol. 28. — P. 569–603.
10. Sharma N. Free Radicals, Antioxidants and Disease [electron resource] / N. Sharma. — 2014. — Access mode : (<http://dx.doi.org/10.4172/0974-8369.1000214>). — Access date : 10.01.2016.
11. Куликов В. Ю. Роль окислительного стресса в регуляции метаболической активности внеклеточного матрикса соединительной ткани (обзор) [Электронный ресурс] / В. Ю. Куликов // *Медицина и образование в Сибири : сетевое научное издание*. — 2009. — № 4. — Режим доступа : (http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=363). — Дата обращения : 10.01.2016.
12. Insulin, glucose and glycated haemoglobin in Alzheimer's and vascular dementia with and without superimposed Type II diabetes mellitus condition / R. O. Domínguez [et al.] // *Journal of Neural Transmission*. — 2008. — Vol. 115. — P. 77–84.
13. Antioxidant enzymatic blood profiles associated with risk factors in Alzheimer's and vascular diseases. A predictive assay to differentiate demented subjects and controls / A. Famulari [et al.] // *Journal of the Neurological Sciences*. — 1996. — Vol. 141. — P. 69–78.
14. Гурвич А. Г. Митогенетическое излучение / А. Г. Гурвич, Л. Д. Гурвич. — М. : Издво Наркомздрава СССР, 1945.
15. Казначеев В. П. Сверхслабые излучения при межклеточных взаимодействиях / В. П. Казначеев, Л. П. Михайлова. — Новосибирск : Наука, 1981. — 143 с.
16. Кузин А. М. Электромагнитная информация в феномене жизни / А. М. Кузин // *Биофизика*. — 2000. — Т. 41. — С. 144–147.
17. Сирота Т. В. Новый подход в исследовании реакции автоокисления адреналина : возможность полярографического определения активности спекроксиддисмутазы и антиоксидантных свойств различных препаратов / Т. В. Сирота // *Биомед. химия*.

- 2012. — Т. 58, вып. 1. — С. 77-87.
18. Сирота Т. В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы / Т. В. Сирота // *Вопр. мед. химии.* — 1999. — Вып. 3.
 19. Ёлкина Н. М. Характер изменения активности отдельных эритроцитарных ферментов в условиях моделирования окислительного стресса при патологии / Н. М. Ёлкина, В. В. Казакова, С. В. Коношенко // *Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия : Биология, химия.* — 2009. — Т. 22 (61). — С. 35-39.
 20. Метод определения активности каталазы / М. А. Королук [и др.] // *Лаб. дело.* — 1988. — № 1. — С. 16-19.
 21. Осмотическая резистентность эритроцитов в условиях различной напряженности геомагнитного поля и при действии Дигоксина в условиях *in vitro* [Электронный ресурс] / В. Ю. Куликов [и др.] // *Медицина и образование в Сибири : сетевое научное издание.* — 2010. — № 3. — Режим доступа : (http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=432). — Дата обращения : 03.01.2016.
 22. Калягина Н. В. Математическая модель осморегуляции эритроцита с учетом механических характеристик мембраны : дис. ... канд. физ.-мат. наук / Н. В. Калягина. — М., 2015. — С. 151.
 23. Руденко С. В. К механизму осмотической протекции эритроцитов. I. Модель осмометра / С. В. Руденко, Е. М. Щетинина, Е. Л. Воловельская // *Проблемы криобиологии.* — 2011. — Т. 21, № 4. — С. 377-384.
 24. Воздействие лазерного излучения на газовый состав гемоглобина и высокоспецифичные клетки крови / Е. В. Бескровная [и др.] // *Вестн. Омского университета.* — 2005. — № 1. — С. 32-34.
 25. Патент 0002525437 РФ. Способ определения окислительной модификации белков в пуле веществ средней молекулярной массы в сыворотке крови, плазме, эритроцитах и в моче / Анопин К. Д. ; 10.08.2014.
 26. Kamath S. Platelet activation : assessment and quantification / S. Kamath, A. D. Blann, G. Y. H. Lip // *European Heart Journal.* — 2001. — Vol. 22. — P. 1561-1571.
 27. Ральченко И. В. Роль тромбоцитов, эритроцитов и лейкоцитов в реализации связи между перекисным окислением липидов : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / И. В. Ральченко. — Уфа, 1998.
 28. Бережанская С. Б. Роль оксипинов в формировании эндотелиальной дисфункции и нарушений гемостаза при перинатальной патологии / С. Б. Бережанская, А. С. Тодорова, Е. А. Лукьянова // *Педиатрия.* — 2011. — Т. 90, № 1. — С. 137-141.
 29. Влияние тромбоцитов и процесса их агрегации на межэритроцитарные взаимодействия / М. Ю. Милорадов [и др.] // *Ярославский педагогический вестн.* — 2013. — Т. III (Естественные науки), № 4.
 30. Пероксидазная резистентность эритроцитов и содержание маркеров окислительного стресса в крови лошадей украинской верховой породы в динамике физических нагрузок / А. В. Андрийчук [и др.] // *Научный журн. «Известия КГТУ».* — 2015. — № 36.
 31. Vladimirov Yu. A. Free Radicals and Cell Chemiluminescence / Yu. A. Vladimirov, E. V. Proskurnina // *Biochemistry (Moscow).* — 2009. — Vol. 74, N 13. — P. 1545-1566.
 32. Benov I. C. Study of Activated Oxygen Production by Some Thiols Using Chemiluminescence / I. C. Benov, S. R. Ribarov, O. N. Monovich // *Gen. Physiol. Biophys.* — 1992. — Vol. 11. — P. 195-202.
 33. Сирота Т. В. Использование нитросинего тетразолия в реакции аутоокисления адреналина для определения активности супероксиддисмутазы / Т. В. Сирота //

- Биомед. химия. — 2013. — Т. 59, вып. 4. — С. 399-410.
34. Zhao L. Singlet Oxygen, free Radical and Radiation Biology Graduate Program / L. Zhao. — Department of Radiology The University of Iowa City. — 2001. — Vol. 77 (222). — P. 2-10.
 35. Шляхто Е. В. Молекулярные и генетические аспекты сердечной недостаточности при сахарном диабете / Е. В. Шляхто // Вестн. РАМН. — 2012. — № 1.
 36. Хюльтен Л. М. Влияние синглетного кислорода на генерацию активных форм кислорода человеческими моноцитами / Л. М. Хюльтен, М. Холмстрем, Б. Сусси // Free Radical Biology and Medicine. — 1999. — Т. 27, № 11-12. — С. 1203-1207.
 37. Repetto M. Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. Additional information is available at the end of the chapter / M. Repetto, J. Semprine, A. Boveris // In : Lipid Peroxidation / Ed. by A. Catala. — New Delhi, 2012. — P. 1-28.
 38. Владимиров Ю. А. Свечение, сопровождающее биохимические реакции / Ю. А. Владимиров // Соросовский образовательный журн. — 1999. — № 6. — С. 25-32.
 39. DeRosa M. C. Photosensitized singlet oxygen and its applications / M. C. DeRosa, J. Robert, R. J. Crutchley // Coordination Chemistry Reviews. — 2002. — Vol. 233-234. — P. 351-371.
 40. Распространение света в биологических средах. Спектры поглощения, рассеяния, флуоресценции наночастиц в эмульсиях и биотканях [Электронный ресурс]. — Режим доступа : (<http://shark007.narod.ru/21/b21v2.htm>). — Дата обращения : 15.01.2016.

DISTANTNY IMPACT OF Fe AND p H-DEPENDENT OXIDATION OF ADRENALINE ON ERYTHROCYTES, THROMBOCYTES AND PLASMA FACTORS OF BLOOD COAGULATION OF PERSON IN VITRO

[*V. Y. Kulikov, E. A. Archibasova*](#)

SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health» (Novosibirsk)

For the first time it was shown that the process of non-enzymatic oxidation of adrenaline in alkaline medium (pH = 10,8) in the presence of ions of divalent iron which is followed generation of active forms of oxygen and adrenochrome, distantly (through glass) influences on fastness of erythrocytes in hyposmotic medium, activates ADP-dependent aggregation of thrombocytes and reduces activity of plasma factors of human blood coagulation in vitro. The phenomenon opened by the authors can be presented as part of uniform power information system of organism, and in the formation and functioning of that an important role belongs to an active forms of oxygen in general and to non-enzymatic oxidation of an adrenaline in particular.

Keywords: adrenaline, oxidation, active forms of oxygen, adrenochrome, human blood, thrombocytes, coagulation factors.

About authors:

Kulikov Vyacheslav Yuryevich — doctor of medical science, professor, honored scientist of the RF, head of normal physiology chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 225-07-37, e-mail: Kulikov_42@mail.ru

Archibasova Elena Alekseevna — candidate of medical science, assistant professor of normal physiology chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 225-07-37

List of the Literature:

1. Vladimirov Y. A. Free radicals and cellular chemoluminescence / Y. A. Vladimirov, E. V. Proskurina // Achievements of biological chemistry. — 2009. — Vol. 49. — P. 341-388.
2. Repetto M. G. Transition metals : bioinorganic and redox reactions in biological systems / M. G. Repetto, A. Boveris // In : Transition metals: uses and characteristics. Nova Science Publishers Inc. (ed.). — New York, USA, 2012. — P. 349-370.
3. Yin H. Free radical lipid peroxidation : mechanisms and analysis / H. Yin, L. Xu, N. A. Porter // Chemical Reviews. — 2011. — Vol. 111. — P. 5944-5972.
4. Vladimirov Yu. A. Free Radicals and Cell Chemiluminescence / Yu. A. Vladimirov, E. V.

- Proskurnina // Biochemistry (Moscow). — 2009. — Vol. 74, N 13. — P. 1545-1566.
5. Dubinina E. E. Oxidizing modification of proteins, its role at pathological states / E. E. Dubinina, A. V. Pustygin // Ukr. Biochem. journal. — 2008. — Vol. 80, N 6. — P. 5-18.
 6. Benov L. C. Study of Activated Oxygen Production by Some Thiols Using Chemiluminescence / L. C. Benov, S. R. Ribarov, O. H. Monovich // Gen. Physiol. Biophys. — 1992. — Vol. 11, N 195-202. — P. 195.
 7. Repetto M. G. Clinical use of chemiluminescence assays for the determination of systemic oxidative stress / M. G. Repetto // In : Handbook of chemiluminescent methods in oxidative stress assessment / I. Popov, G. Lewin (ed.). — Transworld Research Network : Kerala, India, 2008. — P. 163-194.
 8. Organ chemiluminescence : noninvasive assay for oxidative radical reactions Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States / A. Boveris [et al.]. — 1980. — Vol. 177. — P. 347-351.
 9. Weber G. R. The Measurement of Oxygen-Derived Free Radicals and Related Substances in Medicine / G. R. Weber // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. — 1990. — Vol. 28. — P. 569-603.
 10. Sharma N. Free Radicals, Antioxidants and Disease [electron resource] / N. Sharma. — 2014. — Access mode : (<http://dx.doi.org/10.4172/0974-8369.1000214>). — Access date : 10.01.2016.
 11. Kulikov V. Y. Role of oxidizing stress in a regulation of metabolic activity of an extracellular matrix of connecting tissue (review) [electron resource] / V. Y. Kulikov // Medicine and education in Siberia : online scientific publication. — 2009. — No. 4. — Access mode : (http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=363). — Access date : 10.01.2016.
 12. Insulin, glucose and glycated haemoglobin in Alzheimer's and vascular dementia with and without superimposed Type II diabetes mellitus condition / R. O. Domínguez [et al.] // Journal of Neural Transmission. — 2008. — Vol. 115. — P. 77-84.
 13. Antioxidant enzymatic blood profiles associated with risk factors in Alzheimer's and vascular diseases. A predictive assay to differentiate demented subjects and controls / A. Famulari [et al.] // Journal of the Neurological Sciences. — 1996. — Vol. 141. — P. 69-78.
 14. Gurvich A. G. Mitogenetic radiation / A. G. Gurvich, L. D. Gurvich. — M. : PH of Narkomzdrav of the USSR, 1945.
 15. Kaznacheev V. P. Superweak radiations at intercellular interactions / V. P. Kaznacheev, L. P. Mikhaylova. — Novosibirsk : Science, 1981. — 143 p.
 16. Kuzin A. M. Electromagnetic information in a life phenomenon / A. M. Kuzin // Biophysics. — 2000. — Vol. 41. — P. 144-147.
 17. Sirota T. V. New approach in adrenaline autooxidation reaction research : possibility of polarographic determination of activity of superoxide dismutase and antioxidative properties of various drugs / T. V. Sirota // Biomedical chemistry. — 2012. — Vol. 58, Is 1. — P. 77-87.
 18. Sirota T. V. New approach in research of process of autooxidation of adrenaline and its use for measurement of activity of superoxide dismutase / T. V. Sirota // Issues of medical chemistry. — 1999. — Is. 3.
 19. Yolkina N. M. Nature of change of activity of separate erythrocyte enzymes in the conditions of modeling of oxidizing stress at pathology / N. M. Yolkina, V. V. Kazakov, S. V. Konoshenko // Scientific notes of Taurian national university of V. I. Vernadsky. Series : Biology, chemistry. — 2009. — Vol. 22 (61). — P. 35-39.
 20. Method of determination of activity of a catalase / M. A. Korolyuk [et al.] // Lab. business. — 1988. — N 1. — P. 16-19.
 21. Osmotic resistance of erythrocytes in the conditions of various intensity of the geomagnetic field and at an effect of Digoxin in vitro [electron resource] / V. Y. Kulikov

- [et al.] // Medicine and education in Siberia : online scientific publication. — 2010. — N 3. — Access mode : (http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=432). — Access date : 03.01.2016.
22. Kalyagina N. V. Mathematical model of osmoregulation of erythrocyte taking into account mechanical characteristics of membrane : theses. ... cand. of physicomat. science / N. V. Kalyagina. — M., 2015. — P. 151.
 23. Rudenko S. V. Mechanism of osmotic patronage of erythrocytes. I. Osmometer model / S. V. Rudenko, E. M. Shchetinin, E. L. Volovelskaya // Cryobiology Problems. — 2011. — Vol. 21, N 4. — P. 377-384.
 24. Impact of laser radiation on gas composition of hemoglobin and highly specific blood cells / E. V. Beskrovnaya [et al.] // Bulletin of Omsk university. — 2005. — N 1. — P. 32-34.
 25. Patent 0002525437 Russian Federation. Method of definition of oxidizing modification of proteins in a bullet of substances of average molecular weight in blood serum, plasma, erythrocytes and in Urine / Anopin K. D. ; 10.08.2014.
 26. Kamath S. Platelet activation : assessment and quantification / S. Kamath, A. D. Blann, G. Y. H. Lip // European Heart Journal. — 2001. — Vol. 22. — P. 1561-1571.
 27. Ralchenko I. V. Role of thrombocytes, erythrocytes and leucocytes in realization of communication between peroxidation of lipids : dissertation thesis ... doctor of biological science / I. V. Ralchenko. — Ufa, 1998.
 28. Berezhanskaya S. B. A role of oxilipid in formation of endothelial dysfunction and disturbances of hemostasis at perinatal pathology / S. B. Berezhanskaya, A.S. Todorova, E. A. Lukyanova // Pediatrics. — 2011. — Vol. 90, N 1. — P. 137-141.
 29. Influence of thrombocytes and process of their aggregation on intererythrocyte interactions / M. Y. Miloradov [et al.] // Yaroslavl pedagogical bulletin. — 2013. — Vol. III (Natural sciences), N 4.
 30. Peroxidase resistance of erythrocytes and the maintenance of markers of an oxidizing stress in a blood of horses of the Ukrainian roadster breed in dynamics of exercise stresses / A. V. Andriychuk [et al.] // Scientific journal. «KSTU news». — 2015. — N 36.
 31. Vladimirov Yu. A. Free Radicals and Cell Chemiluminescence / Yu. A. Vladimirov, E. V. Proskurnina // Biochemistry (Moscow). — 2009. — Vol. 74, N 13. — P. 1545-1566.
 32. Benov I. C. Study of Activated Oxygen Production by Some Thiols Using Chemiluminescence / I. C. Benov, S. R. Ribarov, O. N. Monovich // Gen. Physiol. Biophys. — 1992. — Vol. 11. — P. 195-202.
 33. Sirota T. V. Use nitroblue tetrazolium in reaction of autooxidation of adrenaline for determination of activity superoxide dismutases / T. V. Sirota // Biomedical chemistry. — 2013. — Vol. 59, Is 4. — P. 399-410.
 34. Zhao L. Singlet Oxygen, free Radical and Radiation Biology Graduate Program / L. Zhao. — Department of Radiology The University of Iowa City. — 2001. — Vol. 77 (222). — P. 2-10.
 35. Shlyakhto E. V. Molecular and genetic aspects of cardiac failure at diabetes mellitus / E. V. Shlyakhto // Bulletin of Russian Academy of Medical Science. — 2012. — N 1.
 36. Hyulten L. M. Influence of singlet oxygen on generation of active forms of oxygen human monocytes / L. M. Hyulten, M. Holmstr, B. Sussi // Free Radical Biology and Medicine. — 1999. — Vol. 27, N 11-12. — P. 1203-1207.
 37. Repetto M. Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. Additional information is available at the end of the chapter / M. Repetto, J. Semprine, A. Boveris // In : Lipid Peroxidation / Ed. by A. Catala. — New Delhi, 2012. — P. 1-28.
 38. Vladimirov Y. A. luminescence accompanying biochemical reactions / Y. A. Vladimirov // Sorosovsky educational journal. — 1999. — N 6. — P. 25-32.

39. DeRosa M. C. Photosensitized singlet oxygen and its applications / M. C. DeRosa, J. Robert, R. J. Crutchley // Coordination Chemistry Reviews. — 2002. — Vol. 233-234. — P. 351-371.
40. Distribution of light in biological mediums. Absorption spectrums, dispersion, fluorescence of nanoparticles in the emulsion and biotissues [electron resource]. — Access mode : (<http://shark007.narod.ru/21/b21v2.htm>). — Access date : 15.01.2016.