

ВОЗМОЖНОСТИ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ИЗУЧЕНИИ ПРИЖИЗНЕННОГО СОСТОЯНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА НИХ НИЗКОИНТЕНСИВНЫМ ЛАЗЕРОМ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ СТРЕССА

DOI: 10.17691/stm2018.10.4.09

УДК 612.111:615.849.19

Поступила 1.06.2018 г.



А.В. Дерюгина, д.б.н., зав. кафедрой физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины¹;

М.Н. Иващенко, к.б.н., доцент кафедры биохимии им. Г.Я. Городисской²;

П.С. Игнатьев, к.физ.-мат.н., начальник отдела медицинских изделий и микроскопии³;

М.Н. Таламанова, к.б.н., доцент кафедры биохимии и биотехнологии¹;

А.Г. Самоделкин, д.б.н., профессор, зав. кафедрой физиологии и биохимии животных⁴

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, пр. Гагарина, 23, Н. Новгород, 603950;

²Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Н. Новгород, 603005;

³Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова», ул. Восточная, 33б, Екатеринбург, 620100;

⁴Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия, пр. Гагарина, 97, Н. Новгород, 603107

Цель исследования — изучение корригирующего действия низкоинтенсивного лазерного излучения на прижизненное морфофункциональное состояние эритроцитов при стрессе с помощью интерференционной микроскопии.

Материалы и методы. Исследовали образцы крови интактных и стрессированных крыс при действии низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) в экспериментах *in vitro*. Длина волны излучения НИЛИ — 890 нм. Изучали морфологию эритроцитов методом лазерной интерференционной микроскопии, концентрацию малонового диальдегида и аденозинтрифосфата спектрофотометрически.

Результаты. Установлено, что действие НИЛИ не вызывает значимых изменений дискоидальной формы эритроцитов и метаболических процессов в клетках, но характеризуется появлением выростов на поверхности. Стрессовое воздействие определило уменьшение количества дискоцитов при значительном увеличении эхиноцитов, стоматоцитов и дегенеративно-измененных форм с изменением микрорельефа поверхности, сочетающееся с увеличением окислительных процессов. Воздействие НИЛИ на образцы крови стрессированных животных привело к уменьшению патологических форм эритроцитов с восстановлением поверхностной архитектоники клеток.

Ключевые слова: лазерная интерференционная микроскопия; прижизненное состояние эритроцитов; низкоинтенсивное лазерное излучение; стресс.

Как цитировать: Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatiev P.S., Talamanova M.N., Samodelkin A.G. The capabilities of interference microscopy in studying the *in vitro* state of erythrocytes exposed to low-intensity laser radiation for stress correction. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(4): 78–83, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.4.09>

English

The Capabilities of Interference Microscopy in Studying the *in vitro* State of Erythrocytes Exposed to Low-Intensity Laser Radiation for Stress Correction

A.V. Deryugina, DSc, Head of the Department of Physiology and Anatomy, Institute of Biology and Biomedicine¹;

M.N. Ivashchenko, PhD, Associate Professor, Department of Biochemistry named after G.Ya. Gorodisskaya²;

P.S. Ignatiev, PhD, Head of Medical Device and Microscopy Department³;

Для контактов: Иващенко Марина Николаевна, e-mail: kafedra2577@mail.ru

M.N. Talamanova, PhD, Associate Professor, Department of Biochemistry and Biotechnology¹;
A.G. Samodelkin, DSc, Professor, Head of the Department of Animal Physiology and Biochemistry⁴

¹National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

²Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

³Production Association "Ural Optical and Mechanical Plant named after Mr. E.S. Yalakov", 33B Vostochnaya St., Ekaterinburg, 620100, Russia;

⁴Nizhny Novgorod State Agricultural Academy, 97 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603107, Russia

The aim of the investigation was to study the corrective action of low-intensity laser radiation on the *in vitro* morphofunctional state of stressed erythrocytes using interference microscopy.

Materials and Methods. Blood samples of intact and stressed rats exposed to low-intensity laser radiation (LILR) were studied in experiments *in vitro*. The wavelength of LILR radiation was 890 nm. Erythrocyte morphology was studied using laser interference microscopy, malondialdehyde and adenosine triphosphate concentrations were assessed spectrophotometrically.

Results. The action of LILR was found to cause no significant changes in the discoid form of erythrocytes and cellular metabolic processes, though it resulted in the appearance of projections on the surface. Exposure to stress promoted a decrease in discocyte count and a significant increase in echinocytes, stomatocytes and degenerative forms of cells with altered microrelief, which was combined with an increase in oxidation processes. The effect of LILR on blood samples of stressed animals led to a decrease in pathological forms of erythrocytes and restoration of cell surface architectonics.

Key words: laser interference microscopy; *in vitro* state of erythrocytes; low-intensity laser radiation; stress.

Введение

Эритроцит — универсальная модель для изучения процессов, происходящих на клеточной мембране под действием самых различных агентов. Детальное исследование изменений морфофункциональных показателей эритроцитов под влиянием различных раздражителей позволяет полностью установить возможные последствия и определить наиболее эффективные пути их коррекции.

Особого внимания заслуживают исследования влияния стресса на эритроциты, поскольку стрессовые воздействия являются неотъемлемой частью современной жизни людей и минимизация их приобретает особую актуальность [1]. Большую роль в решении данной проблемы играет поиск фармакологических и физических средств и методов, повышающих адаптационный резерв клеток. Арсенал фармпрепаратов в настоящее время состоит из большого числа различных средств, применение которых позволяет снизить реакцию центральной нервной системы на поступающие раздражители, предотвратить значительный выброс катехоламинов и развитие гиперметаболического состояния [2]. Однако фармакотерапия часто сопровождается возникновением различной степени выраженности побочных эффектов, что диктует необходимость поиска немедикаментозных методов. Перспективным с этой точки зрения является использование низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ), зарекомендовавшего себя как эффективный и доступный способ лечения различных патологий [3]. Однако вопрос о возможных механизмах биологического действия лазерного излучения на клетки организма при стрессе остается открытым [4].

Анализ современных тенденций развития науки в области визуализации биообъектов показывает, что на первый план выходят новейшие технологии, которые обладают высокой точностью, чувствительностью, оперативностью и информативностью, позволяют объективизировать получаемую научную информацию, выявлять и оценивать новые аспекты влияния различных факторов на морфофункциональные показатели изучаемых цитообъектов.

Достаточно перспективной в этом отношении является лазерная интерференционная микроскопия, основанная на комплексном оптико-геометрическом подходе к прижизненному анализу морфофункциональных характеристик форменных элементов периферической крови. Важная особенность данной технологии — то, что регистрируемая величина оптической разности хода лучей в интерферометре позволяет получать количественную информацию об объемном распределении показателя преломления биологического объекта и его морфологии [5].

Все вышеизложенное определило направление выбранного исследования и методические подходы к реализации поставленных научных задач.

Цель исследования — изучение корректирующего действия низкоинтенсивного лазерного излучения на прижизненное морфофункциональное состояние эритроцитов при стрессе с помощью интерференционной микроскопии.

Материалы и методы

Объектом исследования явилась цельная кровь крыс, которым моделировали стресс внутрибрюшинным введением раствора адреналина гидрохлорида

(0,1 мг/кг), — опытная группа и кровь интактных животных — контрольная группа. Каждая группа включала по 10 особей.

При работе с животными руководствовались Приказом №199н «Об утверждении Правил надлежущей лабораторной практики» (Россия, 2016) и «Международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (CIOMS и ICLAS, 2012), при этом неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). На проведение экспериментальных исследований на животных получено разрешение Этического комитета Нижегородской государственной сельскохозяйственной академии.

Кровь исследуемых групп подвергали облучению в течение 15 мин в чашках Петри диаметром 3 см. На расстоянии 1 см от поверхности мембран находился источник лазерного излучения, в качестве которого применяли лазерный терапевтический аппарат «Успех» («Восход», Россия), представляющий собой малогабаритную автономную матрицу из 10 лазерных диодов. Длина волны излучения — 890 нм. Частота повторения импульсов — 415 Гц. Суммарная импульсная мощность излучения — 30 Вт, минимальное значение плотности средней мощности излучения в плоскости выходного окна аппликатора — 193 мкВт/см². Площадь выходного отверстия — 20 см². Контролем служила необлученная кровь тех же особей.

Во всех группах изучали морфологию эритроцитов, концентрацию малонового диальдегида (МДА) и аденозинтрифосфата (АТФ) в них. Исследование проводили через час после облучения. Перед измерением необлученную и облученную кровь 3 раза центрифугировали с физиологическим раствором при 3000 об./мин по 10 мин.

В каждой серии проведено исследование 10 проб.

Изучение комплексной фазометрии эритроцитов выполнено методом лазерной модуляционной интерференционной микроскопии на микроскопе МИМ-340 (Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова, Россия). В работе использовали лазер с длиной волны 650 нм и объектив с увеличением 30 (NA=0.65), разрешение по поверхности — до 15 нм, разрешение по вертикали — 0,1 нм, возможность контроля изделий с глубиной рельефа — до 600 нм. Для захвата изображений применяли CCD-видеокамеру VS-415U (НПК «Видеоскан», Россия) с разрешением 782x582 пикселей. Регистрация морфологии нативных клеток без предварительной фиксации позволяла визуализировать модификацию клеток в режиме реального времени, изучать их морфологию и динамику внутриклеточных процессов.

Концентрацию МДА исследовали по образованию окрашенного триметинового комплекса с максимумом

поглощения при 532 нм [6]. Для расчета концентрации использовали коэффициент молярной экстинкции: $E = 1,56 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Измерение концентрации АТФ проводили неэнзиматическим методом в фильтрате гемолизированных эритроцитов [7]. В пробах определяли неорганический фосфор, регистрируя плотность окраски на фотометре КФК-3 (Загорский оптико-механический завод, Россия) при длине волны 660 нм. Концентрацию фосфора определяли по калибровочной кривой, используя стандартный раствор KH_2PO_4 [8].

Полученные результаты обрабатывали с помощью пакетов прикладных программ BIOSTAT и Microsoft Excel. Достоверность различий средних определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

С помощью лазерной интерференционной микроскопии были визуализированы эритроциты двояковогнутой формы, стоматоциты, эхиноциты и дегенеративно-измененные эритроциты. У животных интактной группы 89% эритроцитов были представлены дискоцитами, 11% приходились на клетки эхиноцитарной, стоматоцитарной и дегенеративно-измененной формы. Использование НИЛИ у них не вызывало значимых изменений морфологии клеток (рис. 1).

При стрессе отмечалась морфологическая неоднородность эритроцитарного пула: снижение количества дискоцитов, увеличение переходных (эхиноцитов, стоматоцитов) и дегенеративно-измененных форм (каплевидных, мишеневидных, сфероцитов и дегмацитов).

Воздействие НИЛИ на образцы крови стрессированных животных привело к увеличению количества дискоцитов за счет уменьшения эхиноцитов (в 2 раза относительно показателей группы «стресс»). При этом сохранялось высокое содержание морфологически измененных форм клеток.

Анализ морфометрических показателей, проводимый с помощью лазерной интерференционной микроскопии, позволил получить высококонтрастные изображения эритроцитов без обработки их фиксаторами. Кроме того, были построены 3D-модели эритроцитов с учетом неоднородности оптической плотности клеточных структур, которые дают возможность анализировать изменение показателя преломления клетки и свидетельствуют об изменении внутриклеточной концентрации и/или перераспределении веществ внутри клетки [9].

Результаты экспериментов показали, что у эритроцитов интактной группы животных мембрана имела ровную поверхность, внутриклеточные структуры были равномерно распределены с равномерным распределением гемоглобина (рис. 2, а). После действия НИЛИ эритроциты характеризовались появлением большого количества выростов и выпуклостей (рис. 2, б). Следует подчеркнуть, что при схожести

дискоидальной формы эритроцитов и их размеров как у интактных образцов, так и при действии НИЛИ использование лазерной интерференционной микроскопии позволило выявить заметные отличия фазовых изображений в данных группах.

Фазовые портреты эритроцитов в группе стрессированных животных без облучения характеризовались появлением значительного количества эхиноцитов (рис. 3, а), изменялась архитектура и количество отростков, увеличивалась сферичность клеток (рис. 3, б). Изменялся также геометрический размер клетки в сторону уменьшения (в большем количестве клеток) и увеличения объема клеток. Действие НИЛИ на образцы крови стрессированных животных приводило к уменьшению стомато-эхиноцитарной трансформации клеток с восстановлением дискоидальной формы (см. рис. 3, б). При этом дискоциты имели различную степень двояковогнутости с сохранением шипов. Изменялись кривизна и глубина центрального углубления: соотношение диаметра эритроцита и диаметра впадины значительно отличалось от контрольного значения: 16 ± 4 и 20 ± 2 ед. соответственно ($p < 0,05$). При этом сохранялись необратимо измененные (предгеомолитические)

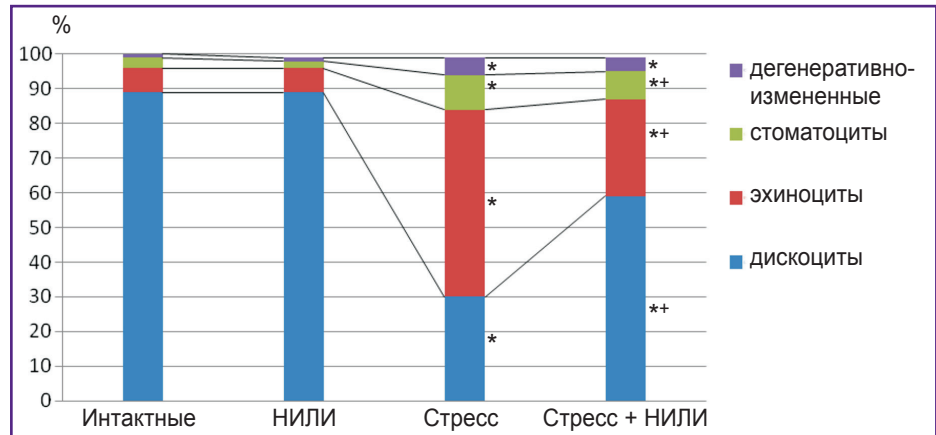


Рис. 1. Морфология эритроцитов в исследуемых группах

* — статистически значимые различия с показателями интактной группы; ** — с показателями группы «стресс»; $p < 0,05$

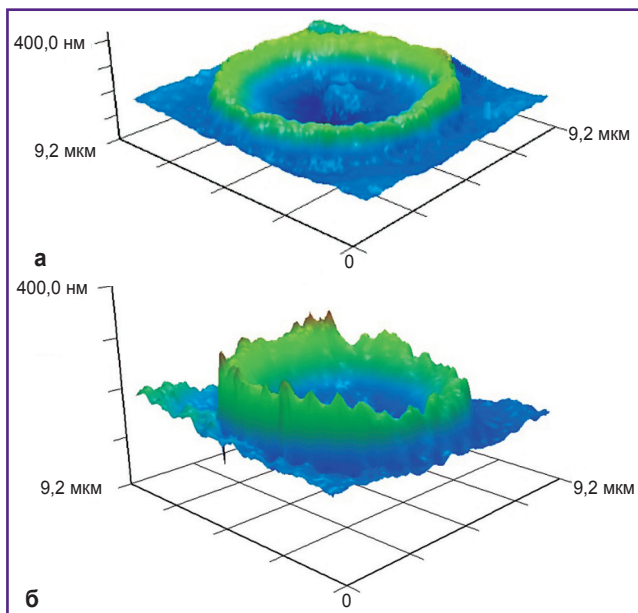


Рис. 2. Фазово-интерференционный портрет эритроцита интактных животных:

а — без облучения; б — после действия НИЛИ на образцы крови

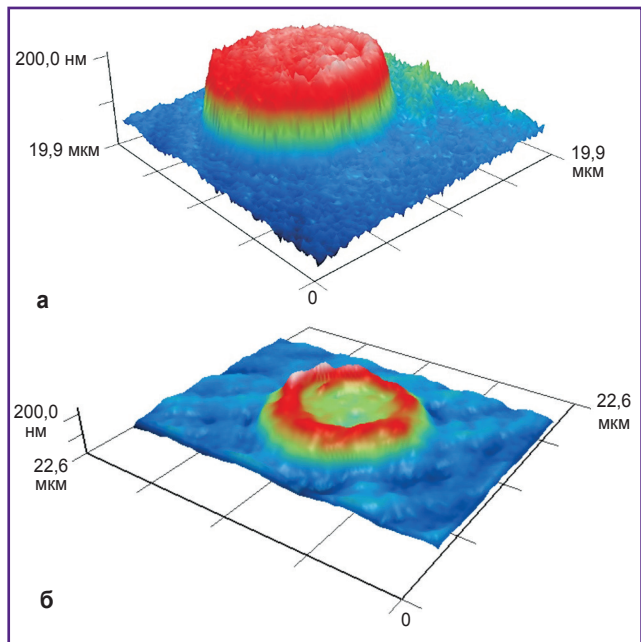


Рис. 3. Фазово-интерференционные портреты эритроцитов в группе стрессированных животных:

а — до облучения; б — при действии НИЛИ на образцы крови

эритроциты в виде стоматоцитов и дегенеративно-измененных клеток.

Важным преимуществом лазерной интерференционной микроскопии по сравнению с другими методами визуализации является способность с высокой точностью оценить перераспределение оптической плотности внутри клетки. По данным [10], этот метод позволяет представить интерференционные изображения цветных каналов и результирующее цветное изображение (рис. 4).

Анализ полученных результатов свидетельствует, что у интактных эритроцитов без облучения и при дей-

ствии НИЛИ характеристики длин волн фазовых портретов находятся в области 500–600 нм, при стрессе и действии НИЛИ на фоне стресса у эритроцитов в фазовом портрете преобладает увеличение длины волны до 600–650 нм. Данная динамика может быть связана с несколькими процессами, происходящими в клетках. Так, характерные максимумы поглощения для оксигемоглобина (HbO₂) наблюдаются на длинах волн 541 и 576 нм, для других форм гемоглобина с Fe²⁺ они также находятся в области 500–600 нм. При окислении железа и увеличении количества метгемоглобина происходит смещение спектра к 630 нм [11]. Кроме того, увеличение длины волны может свидетельствовать об увеличении плотности упаковки гемоглобина. В частности, показано, что наиболее характерно для порфиринов проявление молекулярной агрегации, которая существенно меняет физико-химические свойства веществ [12]. Следует учитывать также, что изменение фазового портрета может быть связано с изменением внутриклеточных продуктов метаболизма в клетке [13]. Показано, что смещение спектра в сторону 650 нм наблюдается при увеличении H₂O₂ [13]. В наших экспериментах анализ окислительного метаболизма по концентрации МДА и энергетических процессов — по содержанию АТФ выявил, что при стрессе наблюдалось значительное увеличение окислительных процессов в клетке (в 3 раза по сравнению с интактными образцами) и снижение энергетических показателей (в 2 раза по сравнению с интактными клетками) (см. таблицу). При действии НИЛИ на фоне

Концентрация МДА и АТФ эритроцитов в исследуемых группах (M±m)

Группы исследования	МДА, нмоль/мл	АТФ, мкмоль/мл
Интактные	1,91±0,33	1,09±0,34
Интактные + НИЛИ	1,14±0,31*	0,79±0,32
Стресс	3,04±0,49*	0,57±0,26*
Стресс + НИЛИ	2,54±0,23 ⁺	1,87±0,27**

Примечание: * — статистически значимые различия значений с показателями интактной группы; ⁺ — с показателями группы «стресс»; p<0,05.

стресса метаболические процессы восстанавливались, но не достигали уровня интактных клеток.

При стрессе усиление ПОЛ рассматривается как универсальный механизм повреждения клеток [14]. Нарастание проокислительных процессов нарушает состояние липидного и белкового компонентов, что может отражаться на показателях жизнеспособности и морфологии клеток [15, 16]. Показано, что НИЛИ способно уменьшать процессы ПОЛ, оказывая упорядочивающее воздействие на жидкокристаллическую структуру липидного бислоя, которая накладывает ограничения на протекание этих процессов [17]. Анализ поверхности структуры эритроцитов методом лазерной интерференционной микроскопии позволил выявить увеличение шероховатостей поверхности мембраны при стрессе (рис. 5), что, по всей вероятности, объясняется усилением липопероксидации и нарушением белковой фазы, тогда как восстановление поверхностной архитектоники при действии НИЛИ соотносится со снижением окислительных процессов.

Заключение

Фазовая картина эритроцитов при действии на них низкоинтенсивного лазерного излучения на фоне стресса, полученная с использованием лазерной интерференционной микроскопии, свидетельствует об изменении морфологии эритроцитов, которое сопровождается перераспределением плотности клеток и их поверхностной архитектоники, что может зависеть от метаболической активности эритроцитов.

Применение лазерной интерференционной микроскопии является хорошим аналогом классической микрофлюориметрии. Полученные изображения эритроцитов позволяют исследовать морфологию клеток и рельеф, сопряженный с их физиологическим метаболическим состоянием, что дает возможность анализировать физиологический статус клеток.

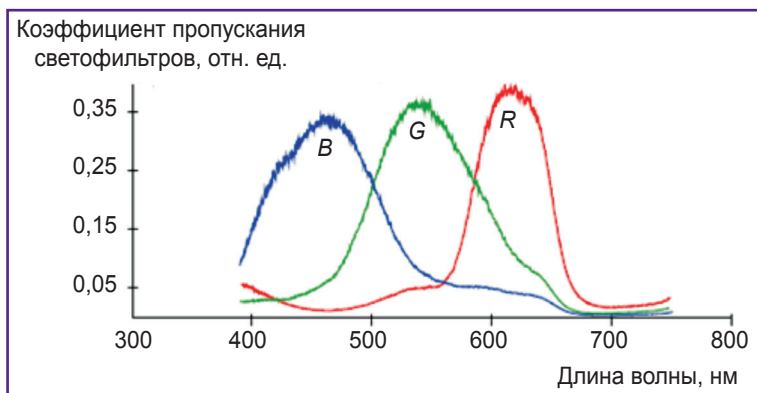


Рис. 4. Кривые пропускания красного (R), зеленого (G) и синего (B) светофильтров матрицы



Рис. 5. Объемные изображения фрагментов мембраны эритроцита при стрессе (а) и при действии низкоинтенсивного лазерного излучения на фоне стресса (б), поле зрения — 800х800 нм

Финансирование исследования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта №18-016-00195.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Литература/References

1. Судаков К.В. Эволюция концепции стресса. Вестник Российской академии медицинских наук 2008; 11: 59–66. Sudakov K.V. Evolution of the stress concept. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk* 2008; 11: 59–66.
2. Мусихин Л.В., Шветский Ф.М., Хосровян А.М., Молотова Н.Л., Бугровская О.И., Смольников П.В., Ширяев В.С. Некоторые аспекты применения низкоинтенсивного лазерного излучения в анестезиологической практике. Вестник интенсивной терапии 2009; 3: 75–83. Musikhin L.V., Shvetskiy F.M., Khosrovyan A.M., Molotova N.L., Bugrovskaya O.I., Smol'nikov P.V., Shiryayev V.S. Some aspects of the use of low-intensity laser radiation in anesthetic practice. *Vestnik intensivnoy terapii* 2009; 3: 75–83.
3. Babaev A.V., Gogolev D.E., Reiner O.V., Korochkin I.M., Fandeev A.V., Pivovarov V.Y., Fedulaev Y.N., Drachan K.M. Effect of intravenous low-intensity laser irradiation of the blood on clinical and laboratory parameters of hepatocellular insufficiency. *Bull Exp Biol Med* 2012; 153(5): 754–757, <https://doi.org/10.1007/s10517-012-1818-1>.
4. Luo G.-Y., Sun L., Liu T.C.-Y. Aquaporin-1-mediated effects of low level He-Ne laser irradiation on human erythrocytes. *International Journal of Photoenergy* 2012; 2012: 1–5, <https://doi.org/10.1155/2012/275209>.
5. Игнат'ев П.С. Лазерная интерференционная микроскопия морфологии и динамики биологических объектов в реальном времени. Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. М.; 2011. Ignat'ev P.S. *Lazernaya interferentsionnaya mikroskopiya morfologii i dinamiki biologicheskikh ob'ektov v real'nom vremeni*. Avtoref. dis. ... kand. fiz.-mat. nauk [Laser interference microscopy of morphology and dynamics of biological objects real-time. PhD Thesis]. Moscow; 2011.
6. Krylov V.N., Deriugina A.V., Pleskova S.N., Kalinin V.A. Apoptotic nature of erythrocyte hemolysis induced by low doses of ionizing radiation. *Biophysics* 2015; 60(1): 79–84, <https://doi.org/10.1134/s0006350915010170>.
7. Виноградова И.Л., Багрянцева С.Ю., Дервиз Г.В. Метод одновременного определения 2,3 ДФГ и АТФ в эритроцитах. Лабораторное дело 1980; 7: 424–426. Vinogradova I.L., Bagryantseva S.Yu., Derviz G.V. Method of simultaneous determination of 2,3 DPG and ATP in erythrocytes. *Laboratornoe delo* 1980; 7: 424–426.
8. Boyarinov G.A., Yakovleva E.I., Zaitsev R.R., Bugrova M.L., Boyarinova L.V., Solov'eva O.D., Deryugina A.V., Shumilova A.V., Filippenko E.S. Pharmacological correction of microcirculation in rats suffering from traumatic brain injury. *Cell and Tissue Biology* 2017; 11(1): 65–72, <https://doi.org/10.1134/s1990519x17010023>.
9. Berestovskaya Y.Y., Gerasimenko L.M., Yusipovich A.I., Maksimov G.V., Rubin A.B., Levin G.G., Shutova V.V. New possibilities of studying microbial objects by laser interference microscopy. *Biophysics* 2011; 56(6): 1063–1068, <https://doi.org/10.1134/s0006350911060224>.
10. Дьяченко А.А., Рябухо В.П. Определение оптических толщин слоистых объектов по интерференционным цветам изображений в микроскопии белого света. Компьютерная оптика 2017; 41(5): 670–679. Dyachenko A.A., Ryabukho V.P. Measurement of the optical thickness of a layered object from interference colors in white-light microscopy. *Computer Optics* 2017; 41(5): 670–679, <https://doi.org/10.18287/2412-6179-2017-41-5-670-679>.
11. Эрстенюк А.М. Лигандные формы гемоглобина в динамике кадмиевой интоксикации. Микроэлементы в медицине 2012; 13(2): 8–13. Erstenyuk A.M. Ligand forms of hemoglobin in the dynamics of cadmium intoxication. *Mikroelementy v meditsine* 2012; 13(2): 8–13.
12. Würthner F., Kaiser T.E., Saha-Möller C.R. J-aggregates: from serendipitous discovery to supramolecular engineering of functional dye materials. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011; 50(15): 3376–3410, <https://doi.org/10.1002/anie.201002307>.
13. Lobanov A.V., Nevrova O.V., Barzilovich P.Yu., Roubtsova N.A., Komissarov G.G. Interaction of metal porphyrins and hydrogen peroxide: coordination, photocatalysis and electron transfer. In: Islamova R.M., Kolesov S.V., Zaikov G.E. (editors). *Kinetics, catalysis and mechanism of chemical reactions. From pure to applied science. Vol. 2. Tomorrow and perspectives*. New York: Nova Science Publishers; 2012; p. 305–311.
14. Миронов В.А., Филиппов А.В., Ширшиков Ф.В., Черепнёв Г.В., Калачёва Н.В. Влияние биназы на некроз и апоптоз макрофагов в модели окислительного стресса. Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки 2012; 154(2): 66–76. Mironov V.A., Filippov A.V., Shirshikov F.V., Cherepnev G.V., Kalacheva N.V. The effect of binase on the necrosis and apoptosis of macrophages in an oxidative stress model. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya: Estestvennye nauki* 2012; 154(2): 66–76.
15. Конторщикова К.Н., Ведунова М.В., Макарова Е.С., Орлов Б.Ю. Влияние доxorубина, озона и кислорода на жизнеспособность нормальных и злокачественных клеток печени в культуре. Вестник физиотерапии и курортологии 2016; 22(2): 10–11. Kontorshchikova K.N., Vedunova M.V., Makarova E.S., Orlov B.Yu. Influence of doxorubicin, ozone and oxygen on the viability of normal and malignant liver cells in culture. *Vestnik fizioterapii i kurortologii* 2016; 22(2): 10–11.
16. Alyasova A.V., Terentiev I.G., Tsybusov S.N., Vedunova M.V., Mishchenko T.A., Shakhova K.A., Kontorshchikova K.N. Novel notions of the mechanisms of action of doxorubicin and ozone on malignant hepatic cells. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(2): 145, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.2.18>.
17. Срубиллин Д.В., Еникеева Д.А., Исаков И.Д. Структурно-функциональные нарушения эритроцитов и их коррекция низкоинтенсивным лазерным излучением при субхронической интоксикации дихлорэтаном. Вестник новых медицинских технологий 2012; 19(4): 105–108. Srubilinn D.V., Enikeeva D.A., Isakov I.D. The structural-functional damages of erythrocytes and their correction by low intensive laser radiation in subchronic intoxication with dichlorethane. *Vestnik novykh medicinskih tehnologij* 2012; 19(4): 105–108.