

На правах рукописи

ЗАЙЦЕВ Валерий Геннадьевич

**МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ
ЛИПИДОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ
АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
ПРЕПАРАТОВ**

14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Волгоград — 2001

Работа выполнена в Волгоградской медицинской академии Министерства
Здравоохранения РФ

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:

доктор медицинских наук, профессор Закревский В.И.

доктор медицинских наук, профессор Островский О.В.

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор медицинских наук, профессор И.Н. Тюренков

доктор медицинских наук, профессор В.Б. Бородулин

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

НИИ фармакологии РАМН, г. Москва

Защита состоится «__» _____ 2001 г. в __ часов на заседании

Диссертационного совета Д 208.008.02 при Волгоградской медицинской
академии (400066, Волгоград, пл. Павших борцов, 1).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Волгоградской
медицинской библиотеки.

Автореферат разослан «__» _____ 2001 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

доктор медицинских наук

А.Р. Бабаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Существование живых организмов на Земле (за исключением некоторого количества облигатных анаэробных микроорганизмов) невозможно себе представить в отсутствие кислорода, являющегося неотъемлемым компонентом метаболических процессов в живых клетках. Однако существование организмов в богатой кислородом окружающей среде несет в себе и постоянную угрозу для их существования (K.J. Davies, 1995; J.S. Valentine e.a., 1998).

При включении кислорода в процессы жизнедеятельности организмов постоянно в существенном количестве образуются различные активные формы кислорода (АФК) (Ю.А. Владимиров, 1998; J.S. Valentine e.a., 1998). Одновременно, биомолекулы могут легко подвергаться окислению и разрушению под действием АФК (Е.Е. Дубинина, И.В. Шугалей, 1993; А.В. Пескин, 1997; R.T. Dean e.a., 1997; I. Fridovich, 1998; B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, 1999). Соответственно, выживание организмов в кислородной среде весьма сильно зависит от предотвращения и репарации окислительных повреждений в организме (K.J. Davies, 1995).

Для ограничения интенсивности свободнорадикальных процессов и уровня окислительных повреждений в живых организмах в ходе эволюции возникла особая антиоксидантная система (АОС), состоящая из большого числа согласованно работающих специфических ферментов и группы низкомолекулярных природных антиоксидантов (АО) (Ю.А. Владимиров, 1998; I. Fridovich, 1997; B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, 1999; C.E. Pirrenge e.a., 1998). При различных отклонениях от нормального функционирования организма может развиваться дисбаланс между интенсивностью продукции АФК и свободнорадикального окисления (СРО) и уровнем функциональной активности АОС. Это, в свою очередь, вызывает усиление окислительных повреждений биомолекул, развитие дисфункции клеток и тканей и, в конечном итоге, гибель организма (В.З. Ланкин и др., 2000; B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, 1999). При патологических состояниях у человека рассмотренный дисбаланс может быть полностью или частично скорректирован применением в качестве лекарственных средств природных или синтетических АО (O.I. Aruoma, 1998; C.A. Rice-Evans, A.T. Diplock, 1993).

К настоящему времени накоплен обширный материал о многих тонких механизмах протекания процессов СРО и предложено для медицинского применения значительное число антиоксидантных препаратов. Выяснены некоторые механизмы действия отдельных групп химических соединений, проявляющих антиоксидантные свойства

(Е.Б.Бурлакова и др., 1998; Ю.А.Владимиров, 1998; О.В. Васильева и др., 1998; M. Patel, V.J. Day, 1999). Выявлены структурные компоненты, наличие которых в молекуле вещества является необходимым или существенным фактором для проявления антиоксидантных свойств. Однако использование разными исследовательскими группами отличающихся подходов для выявления антиоксидантных свойств у химических соединений создает определенные сложности в сравнении результатов (L.L. De Zwart e.a., 1999; H. Esterbauer, 1996; B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, 1995). Важнейшей методологической проблемой является отсутствие детально разработанного комплекса систем моделирования СРО *in vitro*, позволяющего унифицированным образом осуществлять скрининг новых АО с требуемыми свойствами. Важной в этом плане представляется разработка модельных систем перекисного окисления липидов (ПОЛ), с помощью которых можно не только выявлять наличие антиоксидантных свойств у химических соединений в ходе систематических скрининговых исследований, но и изучать одновременно механизм и особенности действия этих веществ в различных условиях протекания процессов ПОЛ.

Применение в таких исследованиях тест-систем с длительным протеканием ПОЛ может позволить выявить отдаленные эффекты АО в условиях, когда с течением времени концентрация АО уменьшается, а интенсивность ПОЛ возрастает. Указанный подход может оказаться полезным для моделирования *in vitro* поведения АО при длительном окислительном стрессе организма, когда повышенная интенсивность ПОЛ наблюдается на фоне истощения пула АО (B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, 1999; J.G. Scandalios, 1997).

Важно также отметить, что АО способны проявлять прооксидантные свойства (M. Девис и др., 1999; В.З. Ланкин и др., 1998; H. Ohshima e.a., 1998). Условия и химико-структурные основы стимуляции СРО под действием АО изучены недостаточно. Основными выявленными на сегодняшний день факторами, определяющими возможность инверсии антиоксидантных свойств, являются концентрация самого АО, концентрация и химическая структура субстрата окисления и наличие в реакционной среде катионов металлов переходной валентности (В.З. Ланкин и др., 1998; G.R. Buettner, L. Milne, 1996; M.J. Burkitt e.a., 1996; A. Kontush e.a., 1996). В то же время вопрос о влиянии продолжительности протекания процесса ПОЛ на возможность проявления прооксидантного действия АО остается открытым.

Понимание взаимосвязи между структурой АО и изменением их свойств в зависимости от временного этапа процесса СРО позволит приблизиться к возможности синтеза и выявления химических соединений с максимально предсказуемыми особенностями антиоксидантных свойств, на основе которых могли бы быть созданы новые лекарственные препараты с антиоксидантным действием.

Тема диссертации является составной частью плана научно-исследовательской работы Волгоградской медицинской академии и утверждена на заседании Ученого совета Волгоградской медицинской академии (протокол № 4 от 8 декабря 1999 г.).

Цель исследования:

Разработка модельных тест-систем для скрининга и первичной оценки мишеней и особенностей действия антиоксидантов, а также оценка антиоксидантных и прооксидантных свойств биологически активных веществ различной химической природы.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительное изучение и выбрать оптимальный метод оценки интенсивности перекисного окисления липидов в суспензии липосом.
2. Определить условия применения модельных систем перекисного окисления липидов на основе липосом для скрининга лекарственных препаратов антиоксидантного действия, выявления мишеней и условий проявления антиоксидантной активности.
3. Установить особенности антиоксидантного действия химических соединений в зависимости от природы и свойств функциональных групп, определяющих антиоксидантную активность соединений, на различных временных этапах перекисного окисления липидов.
4. Выявить у антиоксидантов различной химической природы возможность и условия потери антиоксидантных свойств и их трансформации (инверсии) в прооксидантные.

Научная новизна работы

Доказано, что изменение концентрации карбонильных соединений, реагирующих с N-(2,4-динитрофенил)гидразином (ДНФГ), может быть использовано для оценки интенсивности ПОЛ в липосомальных модельных системах, в том числе при инициации ПОЛ металлами переходной валентности.

Показано, что использование тиобарбитуровой кислоты (ТБК) для определения продуктов ПОЛ в целях оценки интенсивности ПОЛ может приводить к неадекватным результатам в случае металлозависимой индукции ПОЛ.

Впервые обнаружено, что эффективность действия АО изменяется в ходе длительно протекающего процесса ПОЛ в липосомах. Выявлено, что на отсроченных этапах ПОЛ (длительность окисления 24 ч и более) антиоксидантная активность химических соединений может усиливаться, пропадать или инвертироваться в прооксидантную активность.

Впервые установлены характерные особенности динамики изменения эффективности антиоксидантного действия АО различной химической природы в ходе длительно протекающего процесса ПОЛ в липосомальной модельной системе.

Практическая ценность работы

Разработанные подходы к построению липосомальных модельных систем ПОЛ и способ оценки интенсивности ПОЛ в липосомах могут послужить основой для создания унифицированного комплекса методов выявления и оценки особенностей антиоксидантного действия веществ различной химической природы в ходе скрининговых испытаний. Описанная нами модельная система ПОЛ в условиях длительно протекающего окисления липосом позволяет выявлять наличие у конкретных АО зависимой от длительности периода протекания ПОЛ трансформации (инверсии) антиоксидантных свойств в прооксидантные.

Реализация результатов исследования

Разработанная модельная система используется в исследованиях веществ с антиоксидантной активностью на кафедре фармакологии и в изучении процессов перекисного окисления липидов на кафедре биологической химии Волгоградской медицинской академии. Методика определения карбонильных продуктов ПОЛ с использованием ДНФГ применяется в учебном процессе на кафедре биологической химии Волгоградской медицинской академии.

Разработанный нами подход к оценке интенсивности ПОЛ в модельных системах оформлен рационализаторским предложением («Способ оценки интенсивности перекисного окисления липидов в липосомах по содержанию карбонильных соединений», удостоверение № 10–2001 от 6 февраля 2001 г., выданное Волгоградской медицинской академией). Разработаны методические рекомендации «Выявление и оценка особенностей антиоксидантного действия химических соединений в модельной системе на основе липосом» (утверждены 5 июля 2001 г.).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Модельная система длительно протекающего процесса ПОЛ на основе суспензии фосфатидилхолиновых липосом с использованием различных инициаторов окисления и оценкой уровня ПОЛ по содержанию карбонильных соединений, реагирующих с ДНФГ, может служить тест-системой для скринингового выявления антиоксидантных свойств у лекарственных препаратов различной химической природы.

2. Эффективность действия антиоксидантных препаратов изменяется в ходе длительно протекающего процесса ПОЛ в липосомах. Особенности антиоксидантного действия в зависимости от длительности периода окисления определяются химической природой вещества.
3. Антиоксиданты различной химической природы и различного механизма действия обладают способностью к трансформации (инверсии) антиоксидантной активности в прооксидантную.

Апробация работы

Основные положения работы были представлены на научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биохимии», посвященной 100-летию кафедры биохимии Санкт-Петербургского медицинского университета им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 15 – 17 октября 1998 г.); на Российской национальной конференции с международным участием «Свободные радикалы и болезни человека» (Смоленск, 19 – 22 сентября 1999 г.); на научной сессии сотрудников Волгоградской медицинской академии (Волгоград, 5 – 9 октября 1999 г.); на научной конференции, посвященной 125-летию со дня рождения А.А. Ухтомского (Волгоград, 16 – 17 января 2001 г.); на 5-й Пущинской открытой конференции молодых ученых «Биология — наука 21-го века» (Пущино, 16 – 20 апреля 2001 г.); на конференции «Проблемы медицины и биологии» Кемеровской государственной медицинской академии (Кемерово, 19–20 апреля 2001 г.); на 66-й Республиканской конференции студентов и молодых ученых Башкортостана (Уфа, 26 апреля 2001 г.); на заседаниях Волгоградского отделения Биохимического общества РАН в 1999 – 2001 гг.

Диссертация обсуждена на совместном заседании кафедр фармакологии и биологической химии Волгоградской медицинской академии.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 научных работ.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, двух глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Список использованной литературы включает 195 источника, из них 39 отечественных и 156 иностранных авторов. Диссертация иллюстрирована 7 таблицами и 21 рисунком.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение антиоксидантной активности химических соединений проводили в экспериментах *in vitro* с использованием в качестве субстрата ПОЛ мелких моноламеллярных липосом, полученных из яичного фосфатидилхолина методом инъекции этанольного раствора липида в водную фазу (S. Batzri, E.D. Korn, 1973). Липосомы подвергали спонтанному и индуцированному окислению при 37 °С. Индукцию ПОЛ липосом вызывали добавлением сульфата или ацетата меди (II) (конечная концентрация 2,5 мМ в инкубационной среде) в отсутствие или при добавлении H₂O₂ (конечная концентрация 0,8 мМ в инкубационной среде).

Уровень ПОЛ в суспензии липосом оценивали по концентрации карбонильных соединений (КС), которую определяли оригинальным методом. Для этого к 0,05 мл суспензии липосом добавляли 0,2 мл реактива, представляющего собой 5 мМ раствор (ДНФГ) в 1,9 М HCl. Через 10 мин к реакционной смеси прибавляли 1 мл 0,75 М NaOH. Еще через 10 мин оптическую плотность реакционной смеси измеряли при длине волны 460 нм против соответствующим образом обработанной контрольной пробы (вода). Эталон — пируват натрия.

В качестве методов сравнения при оценке интенсивности ПОЛ в препаратах липосом использовали определение концентрации веществ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ВР-ТБК), в присутствии трихлоруксусной кислоты (Н. Esterbauer, К.Н. Cheeseman, 1990) или фосфорной кислоты (Л.И. Андреева и др., 1988) и спектрофотометрическое определение концентрации конъюгированных диенов (В.Н. Ушкалова и др., 1993) и кротонного альдегида (Р.Г. Примак, О.И. Лебедь, 1986).

В работе было исследовано влияние на процесс ПОЛ в модельной системе 7 химических соединений, входящих в состав лекарственных препаратов (2,3-димеркаптопропансульфоната натрия [унитиола], 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола [ионола], кверцетина, пробукола, ретинола ацетата, таурина и эргокальциферола), важного природного АО глутатиона (восстановленный) и трех комплексообразующих карбоновых кислот: янтарной, лимонной и винной.

Эффективность антиоксидантного действия (ЭАД) исследуемого химического соединения в каждой серии опытов и для каждой длительности периода окисления липосом рассчитывали по формуле:

$$[(C_0 - C_1) / C_0] \times 100 \%,$$

где C_0 – концентрация КС в суспензии липосом, не содержащей исследуемого соединения (контроль), C_1 – концентрация КС в суспензии липосом, содержащей исследуемое соединение (опыт).

Если значение показателя ЭАД было положительным, считали, что тестируемое вещество проявляет антиоксидантное действие; если значение показателя ЭАД было отрицательным, считали, что тестируемое вещество проявляет прооксидантное действие.

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с рекомендациями К. Дёрффеля (1994) и фирмы StatSoft, Inc. (США) (1999). Статистически обработанные данные представлены в виде $M \pm SD$, где M – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение. Достоверность отличий между средними в различных группах опытов устанавливали с помощью дисперсионного анализа ANOVA. При значении $p < 0,001$ мы полагали результаты статистического анализа высоко значимыми; при $0,001 < p < 0,01$ — значимыми (достоверными); при $0,01 < p < 0,05$ — сомнительными (спорными); а при $p > 0,05$ — незначимыми.

Для оценочного выявления вида взаимосвязи между двумя показателями использовали построение диаграмм рассеяния; количественную меру степени взаимосвязи определяли с помощью численных методов (расчет коэффициента линейной корреляции Пирсона r). Для оценки линейности зависимости одного показателя от другого вычисляли уравнение линейной регрессии.

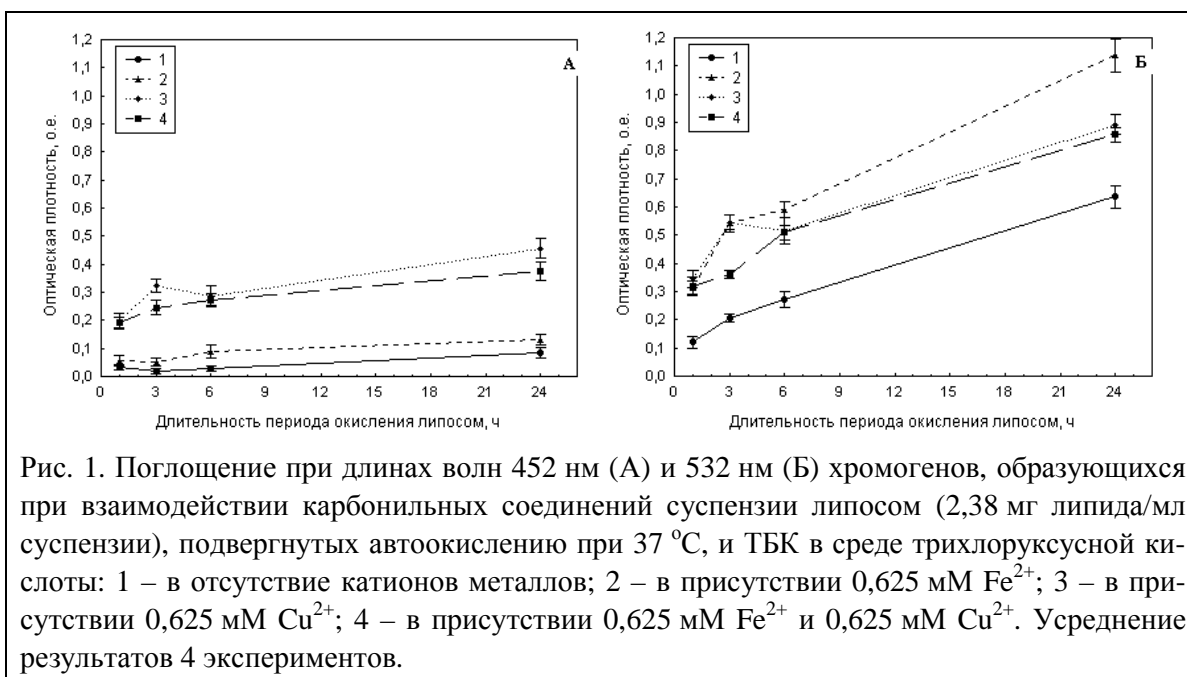
Все статистические расчеты проводили с применением пакета прикладных программ Statistica for Windows, Kernel Release 5.5 А фирмы StatSoft, Inc. (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

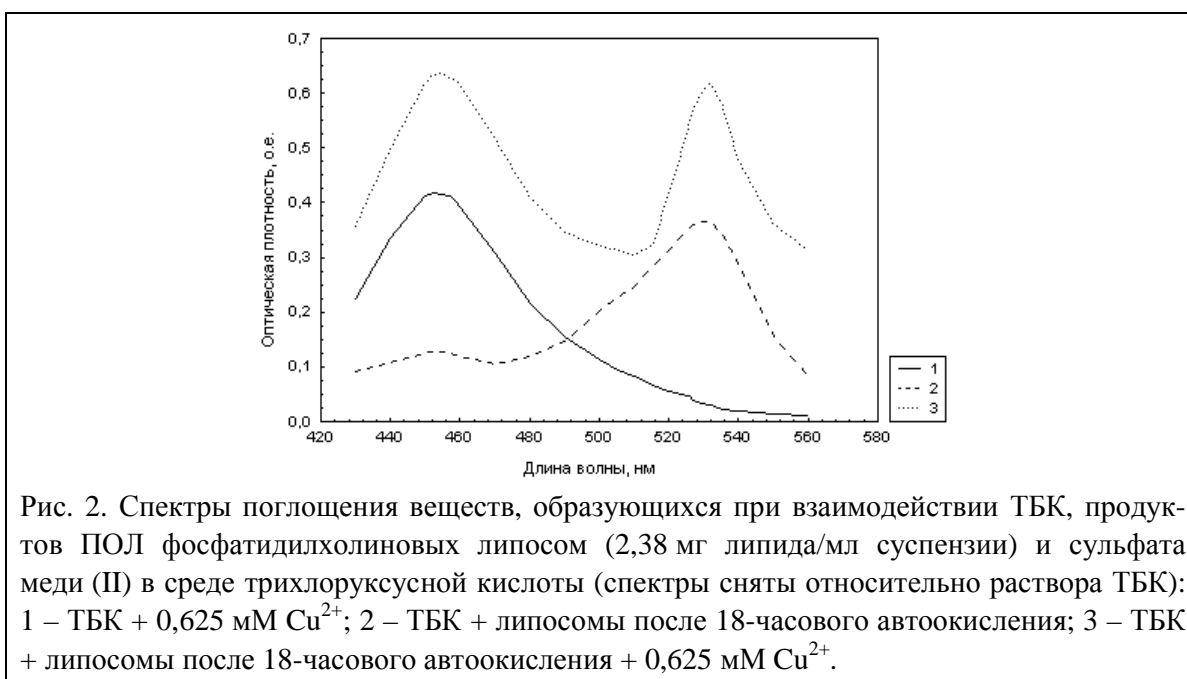
Применимость метода определения веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, для оценки уровня ПОЛ в модельной системе

Хотя определение ВР-ТБК широко используется для оценки уровня ПОЛ в модельных системах, данному методу присущи определенные недостатки (L.L. De Zwart e.a., 1999; H. Esterbauer, 1996; B. Halliwell, S. Chirico, 1993). Нами была изучена возможность применения метода определения ВР-ТБК для оценки уровня ПОЛ в суспензии липосом в присутствии катионов металлов переходной валентности (Fe^{2+} и Cu^{2+}), широко используемых для металлозависимой индукции ПОЛ.

Было обнаружено, что добавление солей Fe^{2+} или Cu^{2+} к реакционной смеси, содержащей ТБК и аутоокисленные липосомы, вызывает существенное усиление образования ВР-ТБК, поглощающих при длинах волн 452 и 532 нм (Рис. 1).



В последующих опытах было установлено, что катионы Cu²⁺ способны непосредственно взаимодействовать с ТБК в отсутствие липосом и значительно влиять на спектр поглощения ВР-ТБК в суспензии липосом (Рис. 2).



Полученные результаты свидетельствуют, что содержание ВР-ТБК не может быть достоверным показателем содержания продуктов ПОЛ в анализируемом образце, если в нем присутствуют катионы Fe²⁺ или Cu²⁺, поскольку, с одной стороны, катионы металлов переходной валентности стимулируют образование в ходе анализа дополнительных коли-

честв ВР-ТБК, а с другой стороны, катионы Cu^{2+} способны непосредственно взаимодействовать с ТБК.

Применимость метода определения карбонильных соединений с использованием ДНФГ для оценки уровня ПОЛ в модельной системе

ДНФГ, в отличие от ТБК, не реагирует как с различными солями Cu^{2+} (сульфат, хлорид, ацетат), так и с продуктами их реакции с H_2O_2 .

В ходе оптимизации метода количественного анализа карбонильных продуктов ПОЛ с использованием ДНФГ были изучены спектры поглощения динитрофенилгидразонов КС, образующихся при спонтанном и Cu^{2+} -индуцированном ПОЛ липосом. Было установлено, что образующиеся хромогены имеют широкую полосу поглощения. В большинстве случаев спектры образующихся продуктов имели широкий пик при 450–470 нм с максимумом при 460 нм, что близко к максимуму поглощения динитрофенилгидразона 4-гидроксинафенала (456 нм), являющегося одним из основных продуктов ПОЛ *in vivo* и в модельных системах. Область линейной зависимости оптической плотности образующихся хромогенов от концентрации карбонильных групп — от 0,1 до 2 мМ.

Для сравнения результатов оценки уровня ПОЛ методом с использованием ДНФГ с основными распространенными методами определения продуктов ПОЛ было проведено определение содержания различных продуктов ПОЛ в липосомах, подвергнутым автоокислению и $\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированному ПОЛ. Динамика накопления в липосомах КС, реагирующих с ДНФГ, в ходе спонтанного и индуцированного окисления качественно сходна с динамикой накопления других продуктов ПОЛ, определяемых с использованием общепринятых методов. В то же время, количественно накопление КС в период между 3-м и 24-м часами окисления (и при автоокислении, и при индуцированном ПОЛ) было наиболее выраженным (Рис. 3).

Важно отметить, что метод с использованием ДНФГ позволяет наиболее полно определять количество КС, образующихся в ходе ПОЛ, что согласуется с литературными данными (В.Н.Ушкалова и др., 1993; Н.Н.Draper e.a., 1993; Н.Esterbauer e.a., 1991; В.Halliwell, J.M.C.Gutteridge, 1990; Y.Yamamoto e.a., 1984). В то же время, метод определения ДНФГ-реактивных продуктов ПОЛ отличается простотой и низкой трудоемкостью выполнения в сравнении с общепринятыми методами определения продуктов ПОЛ нерадикальной природы.

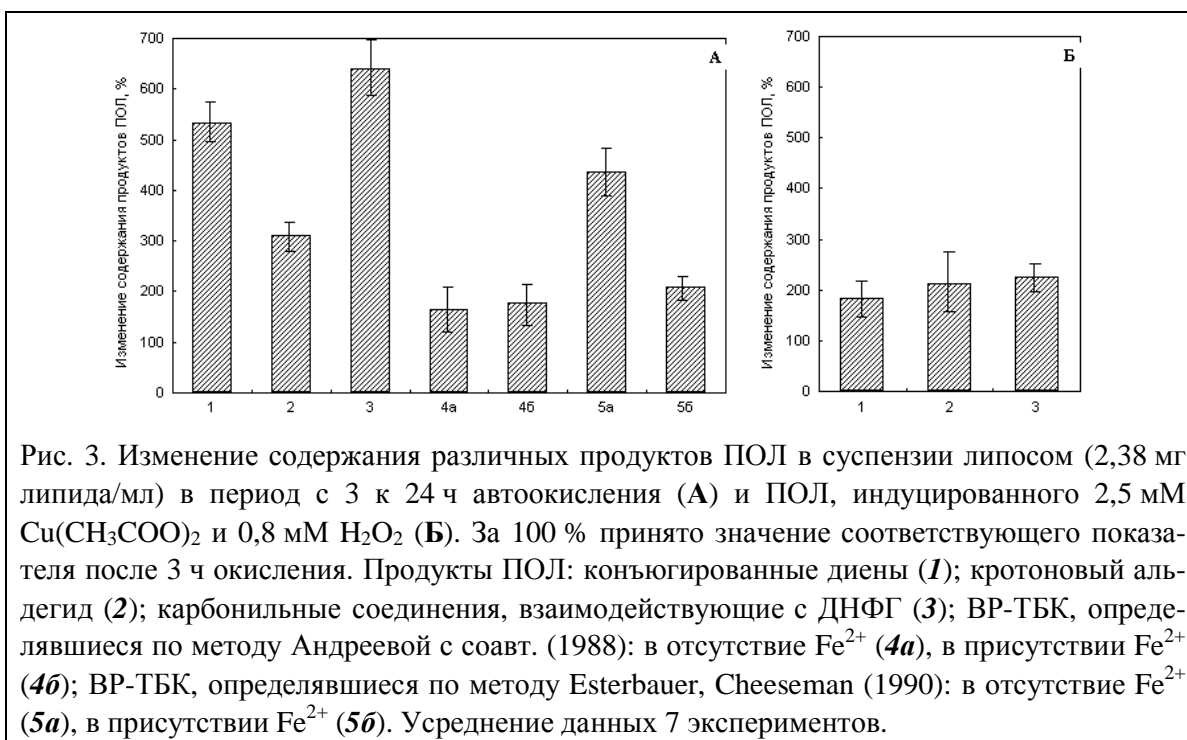


Рис. 3. Изменение содержания различных продуктов ПОЛ в суспензии липосом (2,38 мг липида/мл) в период с 3 к 24 ч автоокисления (А) и ПОЛ, индуцированного 2,5 мМ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и 0,8 мМ H_2O_2 (Б). За 100 % принято значение соответствующего показателя после 3 ч окисления. Продукты ПОЛ: конъюгированные диены (1); кротоновый альдегид (2); карбонильные соединения, взаимодействующие с ДНФГ (3); ВР-ТБК, определявшиеся по методу Андреевой с соавт. (1988): в отсутствие Fe^{2+} (4а), в присутствии Fe^{2+} (4б); ВР-ТБК, определявшиеся по методу Esterbauer, Cheeseman (1990): в отсутствие Fe^{2+} (5а), в присутствии Fe^{2+} (5б). Усреднение данных 7 экспериментов.

Таким образом, полученные нами результаты демонстрируют возможность использования определения ДНФГ-реактивных КС для адекватной оценки интенсивности ПОЛ в опытах *in vitro* независимо от способа инициации окисления.

Зависимость накопления карбонильных соединений в липосомах от длительности периода окисления и особенностей инициации процесса ПОЛ

Была изучена динамика накопления КС в ходе ПОЛ липосом в зависимости от длительности периода окисления и вида используемой системы инициации ПОЛ (табл. 1). Установлено, что динамика изменения концентрации КС в липосомах в процессе их окисления существенно зависит от того, какое именно вещество (смесь веществ) было использовано для инициации ПОЛ. В течение первых 24–48 часов окисления скорость накопления карбонильных соединений непостоянна и существенно зависит от способа инициации ПОЛ.

При автоокислении существенное возрастание содержания КС происходит только к 24-му часу. При автоокислении в течение 48 ч и дольше содержание КС практически не изменяется ($p > 0,5$). Добавление к инкубационной среде H_2O_2 несколько ускоряет накопление КС в первые часы процесса ПОЛ в сравнении с автоокислением ($p < 0,01$), однако на отсроченных этапах окисления (24 ч и дольше) содержание КС в суспензиях липосом, подвергнутых автоокислению и H_2O_2 -индуцированному окислению, значимо не отличается ($p > 0,2$).

Таблица 1.

Содержание карбонильных соединений в суспензии липосом, подвергнутых спонтанному и индуцированному окислению при 37 °С

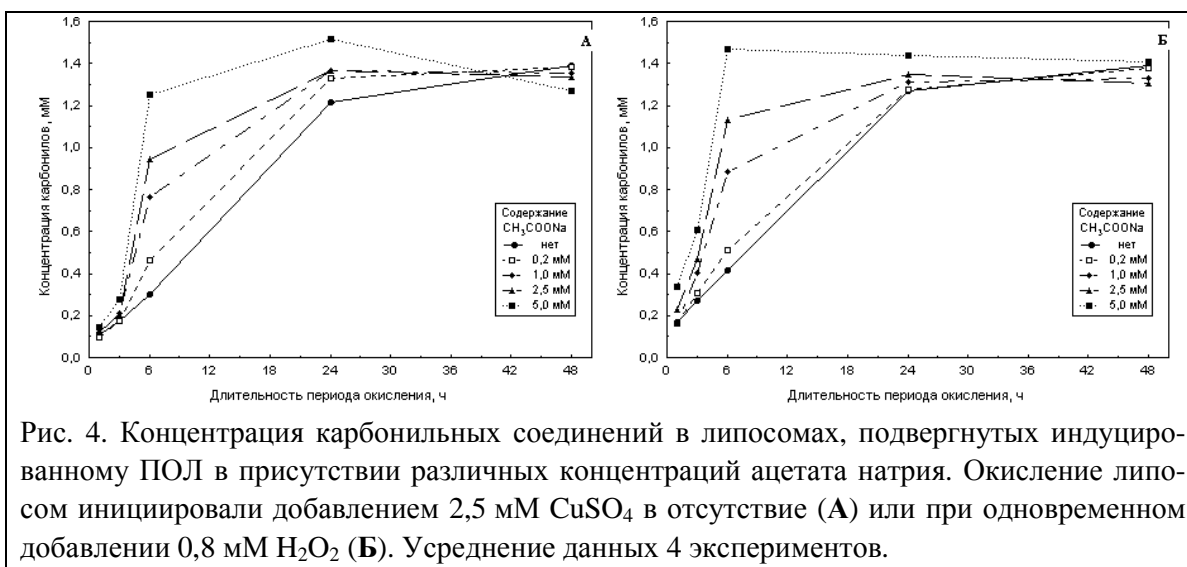
Период окисления, ч	Индукция ПОЛ*					
	A	HP	CS	CSHP	CA	CAHP
1	0,113 ± 0,038	0,169 ± 0,047	0,107 ± 0,028	0,169 ± 0,054	0,157 ± 0,056	0,308 ± 0,109
3	0,141 ± 0,049	0,219 ± 0,057	0,175 ± 0,043	0,270 ± 0,103	0,300 ± 0,072	0,560 ± 0,111
6	0,189 ± 0,065	0,357 ± 0,079	0,303 ± 0,113	0,417 ± 0,186	0,560 ± 0,103	0,777 ± 0,106
24	0,908 ± 0,200	0,988 ± 0,177	1,214 ± 0,141	1,270 ± 0,139	1,238 ± 0,148	1,268 ± 0,154
48	1,228 ± 0,296	1,184 ± 0,164	1,387 ± 0,160	1,392 ± 0,158	1,259 ± 0,150	1,298 ± 0,246
72	1,486 ± 0,061	1,437 ± 0,028	1,386 ± 0,044	1,376 ± 0,048	1,201 ± 0,033	1,160 ± 0,101
96	1,296 ± 0,209	1,422 ± 0,072	1,373 ± 0,032	1,373 ± 0,022	1,212 ± 0,039	0,961 ± 0,165
Усреднение результатов 15–22 экспериментов в группе.						
* Условные обозначения видов индукции: A – автоокисление; HP – H ₂ O ₂ ; CS – CuSO ₄ ; CSHP – CuSO ₄ + H ₂ O ₂ ; CA – Cu(CH ₃ COO) ₂ ; CAHP – Cu(CH ₃ COO) ₂ + H ₂ O ₂ . Конечная концентрация H ₂ O ₂ в инкубационной среде 0,8 мМ, солей Cu ²⁺ – 2,5 мМ.						

Индукция ПОЛ CuSO₄ приводит к достоверному повышению уровня карбонильных продуктов ПОЛ при средних сроках окисления (6 и 24 ч) (p<0,006), но не на начальных или отсроченных этапах ПОЛ. Различия в накоплении КС при индукции ПОЛ CuSO₄ или H₂O₂ + CuSO₄ статистически сомнительны (0,016<p<0,042) на начальных этапах окисления (1 и 3 ч) и недостоверны (p>0,175) при большей длительности окисления. При сроках окисления 1–24 ч концентрация КС в суспензии липосом, подвергнутых CuSO₄ + H₂O₂-индуцированному окислению достоверно выше, чем в суспензии автоокисленных липосом (p<0,003).

Индукция ПОЛ Cu(CH₃COO)₂ вызывает усиление ПОЛ в сравнении с CuSO₄ на начальных этапах окисления (различия высоко значимы через 3 и 6 ч, p<0,0004). При инициации ПОЛ Cu(CH₃COO)₂ + H₂O₂ накопление КС в липосомах в первые 6 часов инкубации было наиболее интенсивным по сравнению со всеми перечисленными выше случаями (p<0,0001).

Влияние аниона уксусной кислоты на накопление карбонильных соединений

Поскольку инициация окисления липосом ацетатом меди (II) приводит к более выраженному накоплению КС, чем инициация ПОЛ CuSO_4 , было изучено влияние ацетат-аниона на интенсивность ПОЛ в липосомах. Было обнаружено, что добавление ацетата натрия к инкубационной среде (индукция окисления CuSO_4 или $\text{CuSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$) приводит к возрастанию содержания КС в липосомах при длительности окисления 1–24 ч концентрационно-зависимым образом (Рис. 4). Этот факт говорит о способности ацетат-аниона стимулировать накопление КС при Cu^{2+} -зависимом окислении липосом.



Влияние концентрации фосфатидилхолина на накопление карбонильных соединений в липосомах

Показано, что от концентрации фосфолипида в суспензии липосом существенно зависит концентрация КС в липосомах в ходе их длительного окисления. Анализ зависимости концентрации КС от концентрации липида в суспензии липосом при различной длительности периода окисления демонстрирует наличие очень жесткой прямой взаимосвязи между указанными показателями (значения коэффициента Пирсона r от 0,959 до 0,996, $p < 0,041$)

Возможность использования буферных растворов в модельной системе на основе липосом при Cu^{2+} -зависимой индукции ПОЛ

При окислении суспензии фосфатидилхолиновых липосом происходит постепенное закисление инкубационной смеси. Скорость закисления при Cu^{2+} -индуцированном ПОЛ относительно медленная, а при автоокислении закисление среды существенно ускоряется длительности окисления больше 24 ч (табл. 2).

Таблица 2.

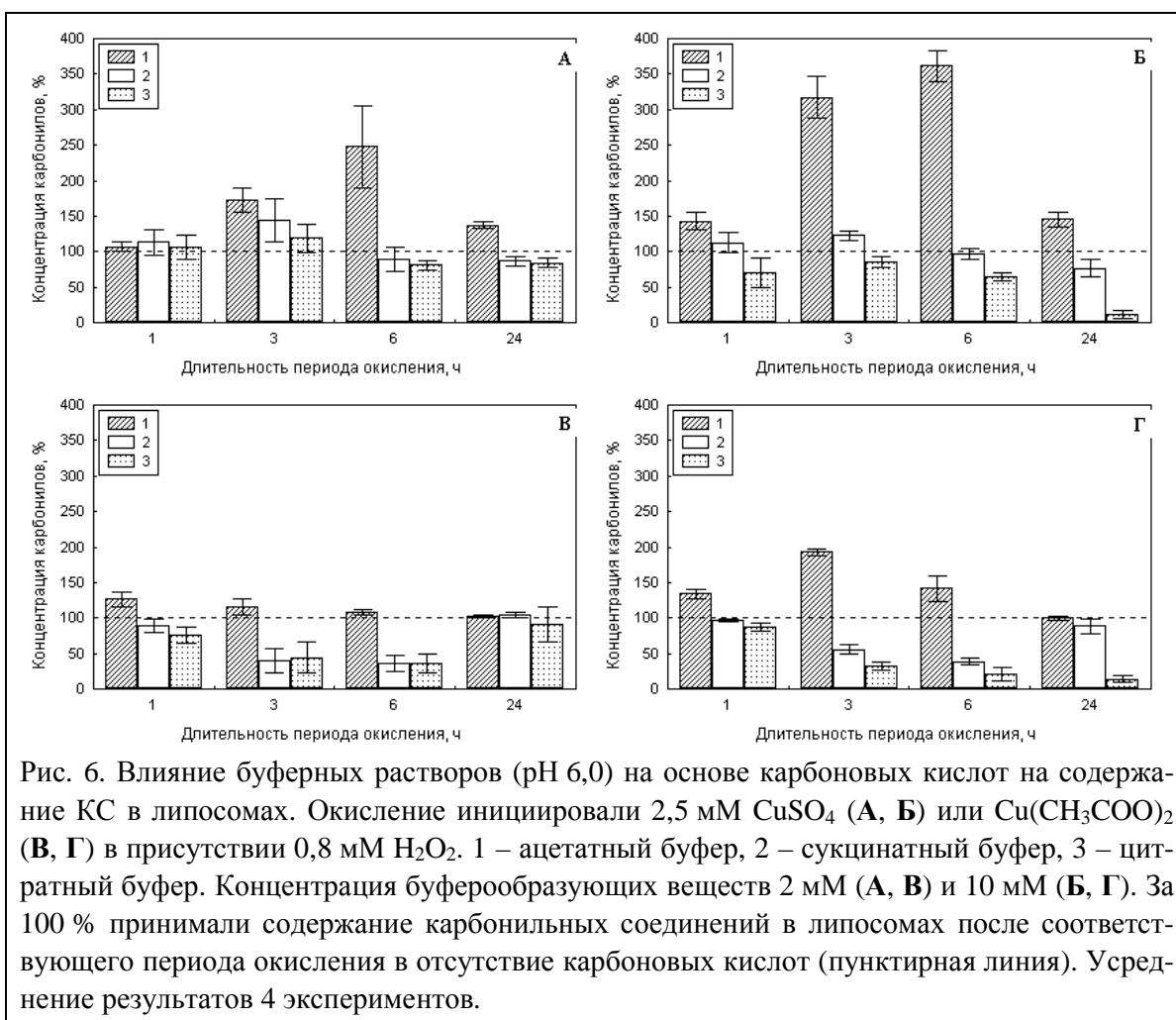
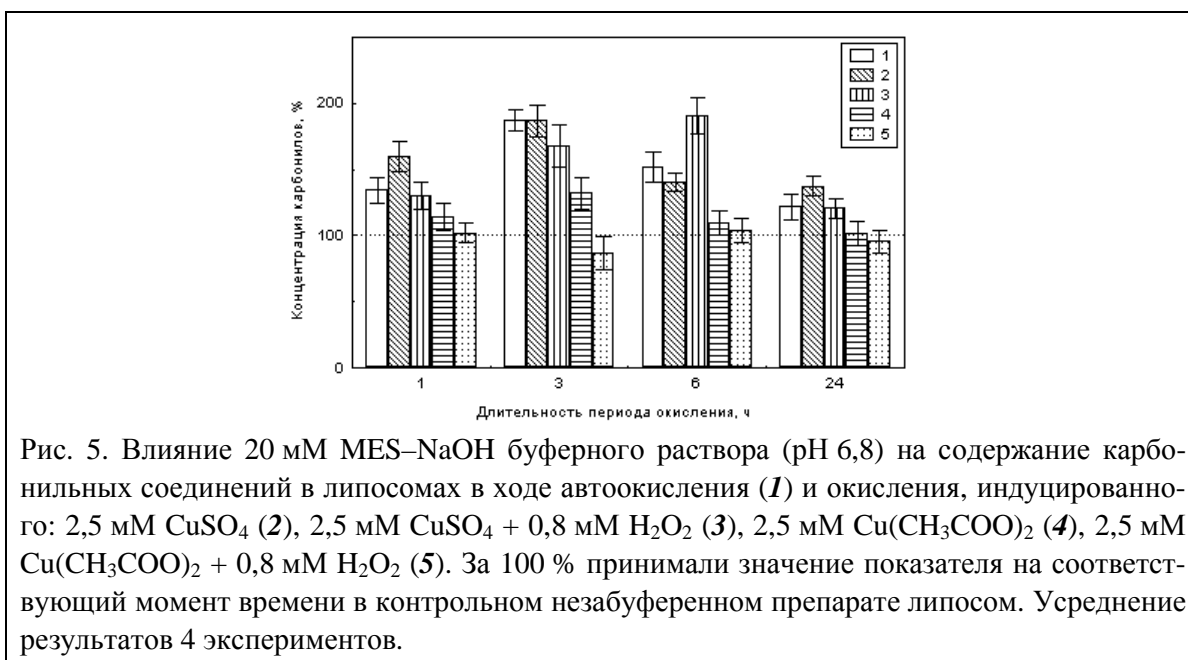
Изменение значения рН незабуференной суспензии фосфатидилхолиновых липосом в процессе длительного окисления

Длительность окисления, ч	Автоокисление	Индукция ПОЛ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	Индукция ПОЛ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
0	$5,99 \pm 0,11$	$5,90 \pm 0,14$	$5,89 \pm 0,12$
24	$5,83 \pm 0,14$	$5,54 \pm 0,08$	$5,49 \pm 0,12$
48	$5,04 \pm 0,09$	$5,19 \pm 0,10$	$5,19 \pm 0,16$
72	$4,45 \pm 0,19$	$5,08 \pm 0,13$	$5,10 \pm 0,11$
Усреднение результатов 5 экспериментов.			

Для выяснения вопроса о возможности применения буферных растворов при моделировании Cu^{2+} -индуцированного ПОЛ в липосомах нами был проведен анализ данных литературы и ряд собственных экспериментов. По литературным данным применение фосфатных буферных растворов невозможно из-за образования плохо растворимых фосфатов меди, а широко применяемые в биохимии буферобразующие вещества трис, трицин, глицилглицин, BES и TES образуют прочные комплексы с Cu (Р.Досон и др., 1991; В. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, 1990).

Было изучено влияние буферных растворов на основе солей уксусной, янтарной, лимонной и 2-морфолиноэтансульфоновой (MES) кислот на накопление КС в липосомах. Было выявлено, что MES способен существенно усиливать накопление КС в ходе как Cu^{2+} -индуцированного, так и спонтанного окисления липосом: прооксидантное действие MES не наблюдалось лишь при индукции ПОЛ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ (Рис. 5).

Также было обнаружено, что ацетатные буферные растворы стимулируют накопление КС в ходе Cu^{2+} -индуцированного ПОЛ липосом, сукцинатные могут проявлять как про-, так и антиоксидантное действие в зависимости от вида индукции, а цитратные в большинстве случаев подавляют накопление КС в липосомах (Рис. 6). Следовательно, буферные растворы на основе органических соединений способны оказывать существенное влияние на процесс накопления в липосомах КС как при спонтанном, так и при индуцированном окислении. Поэтому для целей скрининговой оценки антиоксидантных свойств веществ представляется допустимым применение незабуференной суспензии липосом в экспериментах длительностью до 24 ч.



Изучение эффективности липофильных антиоксидантов

Была изучена зависимость ЭАД липофильных фенольных (ионол, пробукол, кверцетин) и полиеновых (ретинола ацетат, эргокальциферол) АО в зависимости от длительности окисления липосом при различных способах его инициации (табл. 3). Изученные концентрации АО: 5 мкМ и 100 мкМ.

Таблица 3.

ЭАД липофильных антиоксидантов (%) в ходе длительного окисления липосом

АО (концентрация, мкМ)	Индукция*	Длительность периода окисления, ч				
		1	3	6	24	48
Ионол (5)	А	11,94±16,05	9,96±12,28	8,81±3,08	82,17±3,71	89,35±5,51
	СА	8,58±15,82	35,15±7,86	62,70±16,05	4,76±3,98	-2,07±4,11
	САНР	2,81±2,40	9,09±7,24	11,43±6,92	-5,11±3,01	-7,24±5,13
Ионол (100)	А	7,24±29,26	31,43±13,57	39,35±5,43	83,36±4,70	82,41±7,93
	СА	24,60±26,47	39,20±4,67	72,67±1,43	83,78±4,33	84,37±3,07
	САНР	21,38±7,69	47,06±3,30	67,99±3,59	81,49±3,62	81,95±5,84
Пробукол (5)	А	28,23±6,46	11,58±10,34	43,78±7,39	82,98±4,12	91,95±4,56
	СА	16,11±12,28	38,14±7,62	70,49±7,00	83,47±4,94	83,83±5,22
	САНР	45,59±6,23	35,95±4,38	25,73±8,99	3,72±3,49	-28,18±10,41
Пробукол (100)	А	34,68±6,99	46,76±12,40	22,05±5,87	80,47±3,29	85,75±6,08
	СА	18,60±3,18	52,26±1,73	70,81±2,84	78,25±3,68	81,12±4,27
	САНР	44,02±11,02	57,13±10,07	67,54±1,51	84,10±2,56	88,12±4,46
Кверцетин (5)	А	20,78±10,14	27,90±7,68	30,76±6,11	51,24±5,84	60,05±6,65
	САНР	14,42±4,65	-9,76±6,22	-5,52±3,91	-7,94±5,07	-11,76±4,99
Кверцетин (100)	А	34,93±4,79	13,35±5,34	33,14±4,68	67,79±8,11	72,09±5,13
	САНР	16,83±6,54	35,50±5,92	51,36±8,39	-0,42±5,18	-9,35±8,06
Ретинола ацетат (5)	А	13,10±8,83	4,66±7,26	7,89±7,86	-6,31±5,23	-12,39±7,06
	САНР	40,91±4,92	24,25±5,40	12,78±3,97	-6,01±4,29	-21,64±6,83
Эргокальциферол (5)	А	4,37±6,89	4,35±5,91	-38,66±9,28	-239,60±12,56	-315,70±9,45
	САНР	23,69±5,78	12,42±10,20	5,42±4,66	-15,50±7,62	-52,00±11,44
Усреднение результатов 5 – 9 экспериментов в группе.						
* Способы индукции ПОЛ: А – автоокисление; СА – Cu(CH ₃ COO) ₂ ; САНР – Cu(CH ₃ COO) ₂ + H ₂ O ₂ .						

Ионол и пробукол значительно подавляли накопление КС в липосомах в случае автоокисления, причем наибольшая ЭАД наблюдалась на отдаленных этапах ПОЛ (24 и 48 ч). При этом только до 6 ч окисления наблюдалась зависимость ЭАД от концентрации АО, в эти же сроки пробукол был несколько более эффективен как АО в сравнении с ионолом. На отдаленных этапах ПОЛ ионол и пробукол в обоих изученных концентрациях были примерно равноэффективны.

При индукции окисления липосом ацетатом меди заметное антиоксидантное действие на всех этапах ПОЛ было обнаружено у пробукола (в обеих концентрациях) и ионола (в концентрации 100 мкМ), причем ЭАД возрастала с увеличением длительности периода окисления. В концентрации 5 мкМ ионол оказался неэффективен на отдаленных этапах ПОЛ.

При индукции ПОЛ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ (то есть, при наибольшей начальной интенсивности накопления КС) высокая ЭАД наблюдалась у пробукола и ионола только в концентрации 100 мкМ. В концентрации 100 мкМ антиоксидантное действие ионола и пробукола при длительном протекании ПОЛ инвертировалось в прооксидантное, причем пробукол, более эффективный как АО на начальных этапах ПОЛ, оказался на отдаленных этапах ПОЛ более сильным прооксидантом.

ЭАД кверцетина при автоокислении оказалась несколько выше, чем у ионола, на начальных этапах ПОЛ и ниже — на отдаленных. При индукции ПОЛ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ кверцетин в концентрации 5 мкМ был неэффективен, а в концентрации 5 мкМ сохранял заметную ЭАД только на начальных этапах окисления (подобно низким концентрациям ионола и пробукола).

Поскольку липофильные фенольные АО эффективно перехватывают карбо- и перокси-радикалы, обрывая цепные свободнорадикальные реакции в липидной фазе (Е.Б. Бурлакова и др., 1998; D. Bonnefont-Rousselot e.a., 1999), антиоксидантное действие таких соединений будет наиболее выраженным при интенсивной пропации ПОЛ, то есть на отсроченных этапах ПОЛ. В ситуации же, когда эффективная концентрация АО мала относительно концентрации зарождающихся свободных радикалов (исходно низкая концентрация АО или низкая остаточная концентрация АО на отдаленных этапах ПОЛ при высокой скорости зарождения радикалов), большая часть молекул АО быстро превращается в феноксильные радикалы, которые способны с относительно высокой скоростью включаться в продолжение цепей реакций ПОЛ (Е.Б. Бурлакова и др., 1998). В этом случае АО будет выступать не как ингибитор, а как субстрат реакций СРО, что мы и наблюдаем при длительном $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированном ПОЛ липосом.

Зависимость ЭАД ретинола ацетата и эргокальциферола от длительности периода окисления липосом существенно отличаются от таковой для фенольных АО (см. табл. 3). Ретинола ацетата не оказывал достоверного влияния на образование КС при автоокислении липосом, проявляя, однако, тенденцию к незначительной стимуляции ПОЛ. Эргокальциферол, не изменяя уровень ПОЛ в течение первых 3 часов автоокисления, на более поздних временных этапах демонстрировал значительную прооксидантную активность.

Выраженность прооксидантного эффекта эргокальциферола усиливалась с увеличением длительности периода окисления. В случае индукции ПОЛ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ ретинола ацетата и эргокальциферол заметно снижали содержание КС в липосомах в течение первых 3–6 часов окисления, но при большей длительности ПОЛ оба соединения проявляли прооксидантное действие, более выраженное у эргокальциферола. Интересно, что прооксидантный эффект эргокальциферола при индуцированном ПОЛ липосом была существенно ниже, чем при автоокислении.

Обнаруженная динамика ЭАД ретинола ацетата, возможно, связана с тем, что ретинола ацетат способен эффективно перехватывать радикальные инициаторы реакций ПОЛ (D.C. Liebler, T.D. McClure, 1996) лишь до тех пор, пока содержание ретинола ацетата достаточно для перехвата основного количества образующихся в ходе СРО радикалов (C.A.Rice-Evans, A.T.Diplock, 1993). После истощения пула АО с ненасыщенными связями скорость СРО существенно возрастает, тем более, что продукты окисления ретинола ацетата могут вовлекаться в дальнейшее развитие реакций СРО (J.A.Olson, 1996). По-видимому, аналогичным образом можно объяснить и анти/прооксидантные эффекты эргокальциферола.

Изучение эффективности гидрофильных серосодержащих антиоксидантов

Было обнаружено, что тиоловые АО глутатион (восстановленная форма) и унитиол (100 мкМ) проявляют заметное антиоксидантное действие только на начальном этапе ПОЛ (1 ч окисления) (табл. 4). При более длительных сроках окисления ЭАД унитиола снижается до незначительной, а глутатион полностью теряет способность подавлять накопление КС в липосомах и становится способным проявлять прооксидантное действие.

Таблица 4.

ЭАД серосодержащих антиоксидантов (%) при длительном окислении липосом

АО (концентрация, мкМ)	Индукция*	Длительность периода окисления, ч				
		1	3	6	24	48
Глутатион (100)	А	18,34±3,57	-68,63±9,12	-37,81±6,94	-43,09±5,88	-74,57±7,42
	САНР	21,15±9,32	-3,96±7,46	1,16±8,15	4,75±7,44	-36,17±5,88
Унитиол (100)	А	34,50±3,85	-1,24±5,25	10,60±5,35	16,38±8,75	7,89±7,66
	САНР	24,04±4,88	10,75±5,32	9,79±4,57	8,01±5,76	5,85±6,75
Таурин (100)	А	18,78±6,65	16,46±7,84	5,64±6,81	-7,32±9,12	-6,78±8,06
	САНР	24,52±4,44	2,55±6,89	8,53±7,54	17,87±10,35	9,80±7,23

Усреднение результатов 4 экспериментов в группе.
* Способы индукции ПОЛ: А – автоокисление; САНР – $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$.

Подобная динамика ЭАД, вероятно, определяется механизмом антиоксидантного действия тиолов, связанным как с окислением SH-групп под действием кислородных радикалов, так и с хелатированием катионов металлов переходной валентности (В. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, 1990). При взаимодействии с радикалами тиол превращается в соответствующий тиильный радикал, степенью реакционной способности которого определяется его способность вовлекаться в дальнейшее развитие ПОЛ. Образующиеся при окислении глутатиона тиильные радикалы обладают высокой реакционной способностью, что, можно предположить, приводит к инверсии антиоксидантного действия глутатиона в прооксидантное.

У природной аминосульфокислоты таурина было обнаружено слабое антиоксидантное действие, исчезающее на отдаленных этапах ПОЛ (см. табл. 4).

Изучение антиоксидантной эффективности солей комплексообразующих карбоновых кислот

Было изучено влияние солей янтарной (натрия сукцинат), винной (калия-натрия тартрат) и лимонной (натрия цитрат) кислот (2 и 10 мМ) на накопление КС в липосомах при индукции ПОЛ сульфатом или ацетатом меди в присутствии H_2O_2 (табл. 5).

Таблица 5.

ЭАД антиоксидантов – комплексообразующих карбоновых кислот (%) в ходе длительного окисления липосом

АО (концентрация, мМ)	Индукция*	Длительность периода окисления, ч			
		1	3	6	24
Сукцинат натрия (2)	CSHP	-13,04 ± 17,86	-43,87 ± 30,60	10,71 ± 17,67	13,63 ± 6,33
	CAHP	10,88 ± 9,15	59,63 ± 17,17	63,31 ± 11,70	-3,57 ± 3,96
Сукцинат натрия (10)	CSHP	-12,75 ± 11,52	-22,67 ± 6,64	3,55 ± 8,13	23,75 ± 8,01
	CAHP	3,57 ± 2,25	44,61 ± 6,59	61,15 ± 4,33	11,64 ± 8,31
Тартрат калия-натрия (2)	CSHP	-11,67 ± 22,75	-39,52 ± 28,61	1,10 ± 21,15	-6,86 ± 3,07
	CAHP	17,37 ± 17,52	51,86 ± 19,78	37,63 ± 14,37	-10,97 ± 1,06
Тартрат калия-натрия (10)	CSHP	-0,98 ± 8,68	-48,00 ± 11,32	-23,40 ± 7,76	-18,60 ± 7,24
	CAHP	15,01 ± 9,00	30,81 ± 5,20	37,12 ± 10,14	-13,65 ± 6,60
Цитрат натрия (2)	CSHP	-6,22 ± 17,09	-18,98 ± 19,86	19,25 ± 6,34	15,80 ± 6,29
	CAHP	24,10 ± 11,19	55,51 ± 22,10	63,92 ± 13,92	8,83 ± 24,35
Цитрат натрия (10)	CSHP	29,41 ± 11,05	14,67 ± 7,60	36,17 ± 5,87	88,13 ± 6,04
	CAHP	13,28 ± 5,57	67,51 ± 6,40	78,89 ± 10,21	86,19 ± 5,09

Усреднение результатов 4 экспериментов в группе.
* Способы индукции ПОЛ: CSHP – $CuSO_4 + H_2O_2$; CAHP – $Cu(CH_3COO)_2 + H_2O_2$.

Было обнаружено, что при индукции ПОЛ $\text{CuSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ сукцинат и тартрат проявляют в основном прооксидантные свойства, а при индукции ПОЛ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ они продемонстрировали выраженное антиоксидантное действие (при длительности окисления до 6 ч). Цитрат, образующий более прочные комплексы с металлами, чем сукцинат и тартрат (Р. Досон и др., 1991), оказался и наиболее эффективным АО среди изученных комплексообразователей. При этом у цитрата ни в одном случае не было обнаружено значимого прооксидантного действия.

По всей видимости, связывание в комплекс с анионами карбоновых кислот лишь частично препятствует вовлечению Cu^{2+} в реакцию Фентона с продукцией гидроксил-радикала, инициирующего реакции ПОЛ в мембране липосом.

В целом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что использование предложенной модельной системы позволяет выявить у АО различной химической структуры особенности их антиоксидантного действия в зависимости от интенсивности и длительности протекания реакций ПОЛ. Было установлено, что веществам с определенным механизмом действия свойственна и определенная зависимость ЭАД от длительности и интенсивности окисления липосом.

Было обнаружено явление трансформации (инверсии) антиоксидантного действия веществ в прооксидантное в зависимости от длительности периода протекания процесса ПОЛ. Важно отметить, что инверсия антиоксидантных свойств в прооксидантные оказалась свойственной антиоксидантам различной химической природы и различного механизма действия. Такая инверсия была выявлена нами у фенольных соединений, веществ с ненасыщенными $\text{C}=\text{C}$ -связями, тиолов и карбоновых кислот, способных образовывать комплексы с катионами металлов переходной валентности.

Представленные данные демонстрируют возможность использования предложенной модельной системы для выявления наличия и особенностей антиоксидантных свойств химических соединений. Такой комплексный скрининг может иметь важное значение для целенаправленного создания высокоэффективных лекарственных препаратов с конкретными особенностями антиоксидантного действия.

ВЫВОДЫ

1. Разработана простая и доступная химическая модельная система для выявления антиоксидантной активности и первичной оценки особенностей антиоксидантного действия лекарственных препаратов различной химической природы в зависимости от длительности периода окисления в экспериментах *in vitro*.
2. Определение концентрации карбонильных соединений, реагирующих с 2,4-динитрофенилгидразином, является простым и воспроизводимым способом оценки интенсивности ПОЛ в липосомальных модельных системах, в том числе при инициации ПОЛ металлами переходной валентности. Использование тиобарбитуровой кислоты для определения продуктов ПОЛ в присутствии металлов переменной валентности приводит к неадекватной оценке интенсивности ПОЛ.
3. Разработан метод скрининга веществ различной химической природы с целью выявления антиоксидантных свойств и уточнения особенностей антиоксидантного действия с использованием модельной системы на основе суспензии фосфатидилхолиновых липосом при различной длительности окисления липосом. Продолжительное окисление липосом (24 ч и более) позволяет обнаружить особенности антиоксидантного действия веществ, не выявляющиеся при малой длительности протекания процессов ПОЛ.
4. Эффективность действия изученных фармакологически активных веществ с антиоксидантным действием существенно изменяется в ходе длительно протекающего процесса ПОЛ в липосомах и зависит от химической природы антиоксиданта, его концентрации и интенсивности ПОЛ, задаваемой способом инициации окисления липосом.
5. Липофильные антиоксиданты фенольной природы более эффективно подавляли накопление карбонильных продуктов ПОЛ при автоокислении липосом, чем при Cu-индуцированном окислении. Эффективность антиоксидантного действия фенольных липофильных антиоксидантов достигает максимума на поздних (24 ч) этапах окисления.
6. Липофильные вещества, содержащие ненасыщенные связи, проявляют максимальную эффективность на раннем этапе ПОЛ (1 ч окисления), и их антиоксидантное действие при Cu-индуцированном окислении более выражено, чем при автоокислении.
7. Содержащие серу гидрофильные антиоксиданты наиболее эффективно подавляют ПОЛ на раннем этапе процесса (1 ч окисления). На более поздних этапах антиоксидантное действие таких веществ исчезает.

8. Карбоновые кислоты, способные образовывать комплексы с катионами металлов, в зависимости от их концентрации и от условий протекания процесса ПОЛ проявляют как анти-, так и прооксидантное действие. Наибольшая эффективность антиоксидантного действия комплексообразующих карбоновых кислот наблюдается при средней длительности окисления (3 и 6 ч).
9. Трансформация (инверсия) антиоксидантного действия химических соединений в прооксидантное действие наблюдается на отсроченных этапах ПОЛ (длительность окисления 3 часа и более с момента инициации окисления). Проявление инверсии зависит от химической природы и концентрации антиоксиданта, интенсивности протекания реакций ПОЛ и способа инициации окисления липосом.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Разработка критериев отбора антиоксидантных средств // Российск. национальная научно-практ. конф. «Свободные радикалы и болезни человека», Смоленск, 19–22 сентября 1999 г. Сб. трудов.– Смоленск, **1999**.– С.74–75 (соавт. Островский О.В., Закревский В.И., Косолапов В.А., Дегтярев А.Н.)
2. Моделирование перекисного окисления липидов *in vitro*. Применение динитрофенилгидразина для оценки интенсивности перекисного окисления фосфатидилхолиновых липосом // Вестник Волгоградской медицинской академии. № 6: Сб. науч. тр.– Т.56, вып.6.– Волгоград: Волгоградская медицинская академия, **2000**.– С.130–133 (соавт. Закревский В.И.)
3. Влияние компонентов буферных растворов на перекисное окисление липидов в фосфатидилхолиновых липосомах // Материалы научн. конф., посвященной 125-летию со дня рождения А.А.Ухтомского: Тез. докл.– Волгоград, **2001**.– С.30
4. Эффективность действия антиоксидантов и инверсия их антиоксидантного действия в прооксидантное в зависимости от длительности протекания процесса перекисного окисления липидов // Биология — наука 21^{го} века. 5^{ая} Пущинская конф. молодых ученых. 16–20 апреля 2001 года. Сб. тезисов.– Пущино, **2001**.– С.21–22
5. Антиоксидантные и прооксидантные свойства пробуккола в модельной системе. // Вопросы теоретической и практической медицины. Мат. 66-й Республиканской научн. конф. студентов и молодых ученых Башкортостана. Т.2.– Уфа: Здравоохранение Башкортостана, **2001**.– С.31
6. Ацетат и лактат усиливают медь-индуцированное перекисное окисление липидов в липосомах // Проблемы медицины и биологии. Часть 3: Сб. научн. работ.– Кемерово, **2001**.– С.115