


Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

 Заведующий кафедрой  
Е. И. Шишацкая

« 22 » июня 2016 г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

**Исследование антиоксидантных свойств наночастиц ферригидрита**

06.03.01 – Биология

Научный  
руководитель  проф., канд. биол. наук Н. М. Титова

Выпускник  В. В. Родин

Красноярск 2016

## Оглавление

Введение.....	3
1 Обзор литературы .....	4
1.1 Активные формы кислорода: источники образования, эффекты .....	4
1.2 Характеристика основных активных форм кислорода .....	8
1.3 Перекисное окисление липидов .....	12
1.4 Антиоксидантная система .....	17
1.5 Характеристика наночастиц оксидов и гидроксидов железа .....	20
2 Материалы и методы .....	22
2.1 Объект исследования .....	22
2.2 Наночастицы.....	22
2.3 Приготовление упакованных эритроцитов .....	22
2.4 Перфузия изолированной печени крыс.....	22
2.5 Приготовление гомогената печени.....	24
2.6 Определение содержания малонового диальдегида.....	24
2.7 Метод хемилюминесценции .....	25
2.8 Метод определения морфологических форм эритроцитов.....	27
2.9 Статистическая обработка результатов .....	28
3. Результаты исследований и их обсуждение .....	29
Список литературы: .....	30

## **Введение**

Нано технологии одна из наиболее быстро развивающихся отраслей. На сегодняшний день нанотехнологии уже используются в биомедицине, сельском хозяйстве, биологии и фармакологии. Так же данная отрасль имеет кучу перспектив и возможностей в будущем.

Наночастицы обладают уникальными свойствами вследствие своих малеяньких размер а именно от 1 нм до 100 нм. Имеющие абсолютно различные и многообразные формы. Одним из основных механизмов действия наночастиц, являются механизмы сорбции. Механизм сорбции обусловлен большой поверхностью действия наночастиц и их малыми размерами.

В данных исследованиях затрагивается вопрос антиоксидантных и проксидантных свойств наночастиц, данные показатели способны приносит как огромный вред, например разрушение клеток, так и огромную пользу, снижение переизбытка свободных радикалов за счет антиоксидантных свойств.

Объектом моего исследования являются наночастицы ферригидрида.

Целью моего исследования является установления антиоксидантных и проксидантных свойств наночастиц железа при помощи методов определения количества малонового диальдегида,. Так же в данном исследовании использовался хемилюминисцентный метод. Метод хемилюминисценции необходим для установки интенсивности и суммарной продукции свободных радикалов наночастиц железа.

Актуальность моего исследования состоит в определении сорбции нано частиц железа при помощи которого можно определить перспективы данного исследования.

Для полной реализации потенциала нано частиц в частности ферригидрида необходимо как можно больше исследований направленных на определения антиоксидантного и проксидантного эффекта наночастиц.

## 1 Обзор литературы

### 1.1 Активные формы кислорода: источники образования, эффекты

Кислород является неизменной частью жизнедеятельности подавляющего большинства живых организмов. Кислород выполняет несколько функций: он является конечным акцептором электронов в дыхательной цепи; необходим для образования АТФ в процессе окислительного фосфорилирования; служит субстратом ферментов – оксигеназ и оксидаз (данные подкласс ферментов относятся к классу оксидоредуктаз. Оксидоредуктазы является одним из наиболее крупных классов ферментов) [1,2].

Повышение концентрации кислорода в среде выше уровня, характерного для атмосферного воздуха, является для аэробных организмов токсическим. Токсические эффекты кислорода определяются не им самим, а разнообразными кислородными радикалами, которые образуются в тканях [9].

Молекула кислорода в основном состоянии представляет собой бирадикал, у которого на молекулярных  $\pi$ -орбиталях находятся два неспаренных электрона с параллельными спинами. Молекулярный кислород сам по себе не вступает в неконтролируемые химические реакции внутри организма, для его активации нужны ферментные процессы.

Ферменты, восстанавливающие молекулярный кислород, являются металлопротеинами, в активном центре которых содержатся атомы (ионы) металлов переменной валентности (чаще всего железо, цинк, медь). Основными ферментами метаболизма кислорода у млекопитающих служат оксидазы и оксигеназы. В процессах восстановления молекулярного кислорода могут участвовать также дыхательные железосодержащие белки – гемоглобин и миоглобин. Каталитические центры ферментов, включающие металлы переменной валентности, служат донором электронов для молекулярного кислорода.

При последовательном присоединении электронов к молекулярному кислороду образуются активные формы кислорода (далее – АФК). Это генерирование происходит в живых организмах постоянно в процессе биологического окисления. К АФК относят синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ), супероксидный анионрадикал ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), пергидроксильный радикал ( $\text{HO}_2$ ), пероксидный радикал ( $\text{RO}_2$ ), гидроксильный радикал ( $\text{OH}\cdot$ ), пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и гипохлорную кислоту ( $\text{HOCl}$ ) [10,11].

Около 95-98% потребляемого организмом человека кислорода используется в процессах генерирования энергии. В АФК переходит около 2-5% [12]. Концентрации различных АФК в тканях могут различаться. Так, концентрация супероксида в печени – около  $10^{-11}$  мМ, концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  примерно  $10^{-8}$  мМ [13].

АФК могут проявлять выраженное токсическое действие на клетки. Они обычно появляются первыми в цепи реакций свободнорадикального окисления и дают начало серии радикалов, инициируя перекисное окисление липидов (далее – ПОЛ), что ведет к образованию пероксидных радикалов, моно- и димерных, циклических и полимерных перекисей и гидроперекисей, которые располагаются с появлением новых радикалов. Конечными продуктами ПОЛ являются альдегиды, кетоны и предельные углеводороды [8,9]. Многие продукты ПОЛ способны оказывать негативное воздействие на клетки. В частности, ненасыщенные альдегиды являются мутагенами и обладают выраженной цитотоксичностью: подавляют активность гликолиза и окислительного фосфорилирования, ингибируют синтез белка и нуклеиновых кислот, окисляют SH-группы, ингибируют различные цитозольные и мембраносвязывающие ферменты.

Одним из основных эффектов АФК является разрушение жирных кислот, являющихся компонентами клеточных мембран. В результате таких реакций происходит формирование каналов проницаемости в клеточной стенке, что нарушает жизнедеятельность клетки и приводит к ее гибели.

Повреждение свободными радикалами белковых структур и молекул ДНК делает возможным развитие многих патологических состояний [8].

Мутагенное воздействие АФК может быть причиной злокачественного перерождения клеток или их апоптозной гибели. Известно, что мишенями для свободных радикалов могут быть почти все органы и системы организма, другими словами у свободных радикалов абсолютно отсутствует какая-либо селективность, что еще раз подтверждает утверждение об их крайней опасности.

Выделяют три категории АФК: первичные, вторичные и третичные.

Первичные АФК образуются при окислении некоторых молекул и обладают регуляторным или умеренным антимикробным действием. К ним относятся оксид азота  $\text{NO}^\bullet$ , обладающий сосудорасширяющим действием, и супероксид  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , судьба которого может быть весьма разнообразной. Обычно при помощи специализированного фермента супероксиддисмутазы он превращается в перекись водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Оба эти соединения используются макрофагами для борьбы с бактериями. При недостаточной нейтрализации супероксида его избыток, взаимодействуя с  $\text{NO}^\bullet$ , образует пероксинитрит или переводит трехвалентное железо  $\text{Fe}^{3+}$  в двухвалентное  $\text{Fe}^{2+}$ , которое при взаимодействии с  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HClO}$  и липоперекисями образует гидроксильный радикал ( $\text{OH}^\bullet$ ) или липоксильный радикал  $\text{LO}^\bullet$ . Эти радикалы, как и пероксинитрит, представляют категорию вторичных радикалов, именно данная категория обладает сильным токсическим действием, вследствие своей способности необратимо повреждать мембранные липиды, а также молекулы ДНК, углеводов и белков. Считается, что именно образование вторичных радикалов является неспецифическим универсальным механизмом, который лежит в основе развития канцерогенеза, атеросклероза, хронических воспалений, нервных дегенеративных заболеваний и других различного рода патологий и патологических состояний [8].

При соединении вторичных радикалов с молекулами антиоксидантов и других легко окисляющихся соединений образуются третичные радикалы. Их роль может быть различной [7].

Для определения концентрации АФК используют электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) и метод хемилюминесценции, однако измерение оказывается весьма затруднительным из-за крайне низких концентраций, поэтому на практике используют соединения, позволяющие многократно усиливать сигналы. Для ЭПР это спиновые ловушки, образующие стабильные нитроксильные радикалы, а для хемилюминесценции – так называемые усилители (люминофоры) типа люцигенина или люминола [7].

Источником АФК в организме могут быть активированные макрофаги, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы и другие клетки в ходе так называемого «респираторного взрыва».

Небольшие количества АФК образуются как продукты окислительного метаболизма и в других типах клеток. Наибольший вклад вносит дыхательная цепь митохондрий, особенно при низкой концентрации АДФ. Весьма существенна и роль цитохрома P-450, локализованного в эндоплазматической сети.

АФК также образуются и в результате аутоокисления некоторых низкомолекулярных веществ, например катехоламинов, при переходе оксигемоглобина в метгемоглобин, во время метаболизма арахидоновой кислоты.

Токсичные АФК возникают в клетке в результате побочных химических реакций молекулярного кислорода с ферментами и коферментами начальных и средних участков дыхательной цепи.

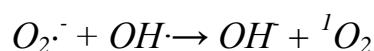
Основные механизмы появления АФК в организме связаны обычно с нарушениями функционирования электронтранспортных цепей митохондрий или макросом, а также с модификациями свойств дегидрогеназ [3].

## 1.2 Характеристика основных активных форм кислорода

К основным АФК относят синглетный кислород, супероксидный анион-радикал, пероксид водорода и гидроксил радикал [8].

**Синглетный кислород ( $^1O_2$ ).** В результате поглощения избыточной энергии (что часто имеет место в реальных условиях) происходит обращение спина одного электрона и формирование синглетного кислорода [1,2]. Под действием определенных факторов молекула кислорода способна переходить в одно из двух электронно-возбужденных синглетных состояний, различающихся степенью энергизованности.

Синглетный кислород образуется при спонтанной дисмутации супероксидных анионрадикалов.  $^1O_2$  возникает также при взаимодействии супероксидного радикала с гидроксильным радикалом:



Видимо, любая биосистема, в которой имеется  $O_2$ , может быть источником  $^1O_2$ . Однако, синглетный кислород может возникать и в темновых ферментативных реакциях в отсутствие  $O_2$ .

Считают, что одним из эффективных механизмов генерации  $^1O_2$  является его образование в результате переноса энергии на кислород от синглетных форм молекул различных соединений. В этом случае имеет место фотосенсибилизированное образование  $^1O_2$  в аэробных условиях.

Синглетный кислород обладает высокой химической активностью. Он активно реагирует с соединениями с двойной связью, что приводит к образованию диоксиэтанов, переходящих в дальнейшем в гидроперекиси. Это индуцирует ПОЛ в биомембранах.

Радиус действия синглетного кислорода – 0,3 мкм. Он вызывает повреждение нуклеиновых кислот, белков, обладает цитотоксичным и мутагенным действием. Чрезмерное образование синглетного кислорода в клетке может приводить ее к гибели.

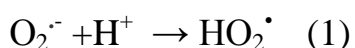
В клетках содержатся вещества, играющие роль тушителей синглетного кислорода, что уменьшает возможность вызываемых им



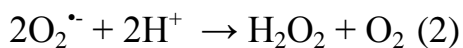
повреждений. При «тушении»  $^1\text{O}_2$  происходит переход в основное триплетное состояние. В утилизации синглетного кислорода могут участвовать каротиноиды, аскорбиновая кислота, токоферолы, мочевиная кислота, нуклеотиды. Один из самых эффективных тушителей –  $\beta$ -каротин. Основной тушитель в организме – вода [18].

**Супероксидного анион-радикала ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ).** Образование супероксидного анион-радикала ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) происходит в фотосистеме I (ФС I) и II (ФС II) хлоропластов и на комплексах дыхательной цепи в митохондриях, а также в ряде реакций, протекающих в пероксисомах (при окислении ксантина ксантиноксидазой) [19]. В митохондриях образование  $\text{O}_2^{\cdot-}$  сопряжено с функционированием дыхательной электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) во внутренней митохондриальной мембране и захватом молекулярным кислородом электронов с гемов ( $b_1$  и  $b_2$ ) и относительно долгоживущих семихинонов в Q<sub>in</sub>-сайте [3]. По некоторым оценкам, даже в физиологически оптимальных условиях примерно 2-5 % проходящих по ЭТЦ электронов идут на образование супероксидных радикалов [19]. Так же  $\text{O}_2^{\cdot-}$  является источником образования других, более токсичных активных форм кислорода.

Супероксидрадикал может протонироваться до гидропероксидного радикала в результате реакции (уравнение 1):



Дисмутация двух анион-радикалов приводит к образованию перекиси водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  (уравнение 2):

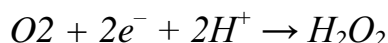


Дисмутация может протекать спонтанно или при участии специфических ферментов - супероксиддисмутаз (СОД).

**Пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).**  $\text{H}_2\text{O}_2$  не является свободным радикалом. Как уже указывалось, образование  $\text{O}_2^{\cdot-}$  в любой биологической модельной системе сопровождается накоплением  $\text{H}_2\text{O}_2$ , происходящим в результате дисмутации (неферментативно или в присутствии супероксиддисмутазы (СОД)). Поэтому в организме повышение концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  наблюдается

при активации процессов, которые связаны с генерацией супероксидного радикала: при состояниях метаболического взрыва фагоцитирующих клеток; при усиленной деятельности митохондриальных и микросомальных электронтранспортных цепей; при повышении активности оксидазных ферментов и т.д.

При переносе двух электронов на  $O_2$  происходит образование перекисного аниона или пероксида водорода:

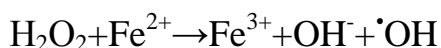


Путем одноэлектронного восстановления кислорода с последующей дисмутацией  $O_2^{\cdot-}$  в реакции, протекающей спонтанно или катализируемой СОД:



Клетки млекопитающих достаточно устойчивы к воздействию пероксида водорода, в связи с наличием антиоксидантных ферментов глутатионпероксидазы и каталазы. Однако токсичность  $H_2O_2$  усиливается в условиях оксидативного стресса, сопровождающегося интенсификацией свободнорадикальных процессов и истощением ферментативной антиоксидантной системы организма [11].

Будучи стабильным продуктом восстановления кислорода,  $H_2O_2$  обладает свойствами слабого окислителя. Эти свойства проявляются, в частности, в присутствии ионов металлов с переменной валентностью в восстановленной форме [22], в результате чего образуется высокоактивный гидроксильный радикал:

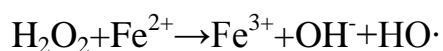


В отсутствие каталазы и ионов металлов переменной валентности перекись водорода довольно стабильна и вследствие своей незаряженной ковалентной структуры воспринимается клеткой, как молекула воды. Благодаря этому  $H_2O_2$  может легко проникать в клетки и ткани, при этом наличие нейтральных аддуктов перекиси водорода (например, гистидина)

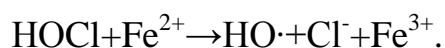
обеспечивает проникновение внутрь клеток даже в присутствии каталазы. Считается, что биологическая активность  $\text{H}_2\text{O}_2$  существенно зависит от её концентрации. Так, при низких (микромольных) уровнях  $\text{H}_2\text{O}_2$  является относительно слабореактивной. Однако с ростом концентрации агрессивность перекиси водорода увеличивается и при достаточно высоком (миллимолярном) уровне  $\text{H}_2\text{O}_2$  обладает цитотоксическим действием и может вызывать гибель фибробластов и других типов клеток, включая гепатоциты и эндотелиальные клетки. В сублетальных концентрациях перекись водорода существенно изменяет статус эндотелиальных клеток, что проявляется в ингибировании транспорта анионов через мембрану, увеличении внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , активации фосфолипаз и фосфоинозитидного обмена, повреждает Cu, Zn-СОД, тем самым снижая антиоксидантную защиту клеток.

Клетки млекопитающих достаточно устойчивы к воздействию перекиси водорода, благодаря наличию глутатионпероксидазной и каталазной ферментативных систем, первая из которых эффективно работает при малых концентрациях перекиси, вторая – при высоких.

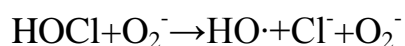
**Гидроксильный радикал ( $\text{HO}\cdot$ ).** Одноэлектронное восстановление  $\text{H}_2\text{O}_2$  приводит к образованию гидроксильных радикалов, обладающих чрезвычайно высокой реакционной способностью. Разложение  $\text{H}_2\text{O}_2$  в присутствии ионов двухвалентного железа является основным путем образования  $\text{HO}\cdot$  (реакция Фентона):



Другой путь образования гидроксильного радикала - это реакция разложения гипохлорита, которая также протекает с участием  $\text{Fe}^{2+}$ :



Установлено, что образование гидроксильного радикала возможно при разложении гипохлорита также и железонезависимым путем.



Вследствие высокой химической активности время жизни  $\cdot\text{OH}$ -радикалов в клетке составляет около  $10^{-9}$  с, а расстояние, которое они успевают пройти за это время от места их образования, не превышает 100 нм. Обладая наиболее высоким в живой природе редокс-потенциалом ( $E_0=+2.7\text{В}$ ), и будучи вследствие этого чрезвычайно агрессивным,  $\cdot\text{OH}$  оказывает действие практически на любую биологическую молекулу. Но наибольший ущерб клетке наносят его реакции с ДНК, белками и полиненасыщенными жирными кислотами внутриклеточных и плазматических мембран, что определяет сильнейшее мутагенное и цитотоксическое действие гидроксильного радикала.

Важно отметить, что в организме нет специальных ферментативных систем, обладающих способностью инактивировать гидроксильный радикал. Низкомолекулярные соединения, такие как урацил, мочевая кислота, салицилаты, глюкоза, диметилсульфоксид, обладают способностью ингибировать  $\cdot\text{OH}$  - радикал только при достаточно высоких концентрациях [6]. Таким образом, при целом ряде патологических состояний, сопровождающихся избыточным образованием АФК и, соответственно, гидроксильного радикала, организм становится практически беззащитным перед повреждающим действием этого соединения. Предотвращение повреждений клеточных структур осуществляется только за счет снижения концентрации радикалов предшественников  $\text{OH}$ , в частности, супероксиданион-радикала и перекиси водорода.

### **1.3 Перекисное окисление липидов**

Перекисное окисление липидов представляет собой процесс непосредственного переноса кислорода на субстрат с образованием перекисей, кетонов, альдегидов и других соединений. Отличительной чертой этой реакции является ее цепной, самоиндуцирующийся характер. Реакция протекает в несколько стадий, которые получили название «инициирование», «продолжение», «разветвление» и «обрыв» цепи [12].

Таблица 1 – Основные этапы ПОЛ

Стадия процесса	Химические реакции	Характеристика стадии
Инициация	$\text{HO}\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{L}\cdot$	Свободный радикал (чаще всего гидроксильный) проникает в липидный слой мембран. Образуется липидный радикал $\text{L}\cdot$ -алкильный радикал.
Продолжение	$\text{L}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}\cdot$ $\text{LOO}\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}\cdot$	Включает 2 реакции: - взаимодействие липидного радикала ( $\text{L}\cdot$ ) с растворенным в среде молекулярным $\text{O}_2$ с образованием радикала диперекиси ( $\text{LOO}\cdot$ ); - радикал липоперекиси атакует одну из соседних молекул фосфолипида, в результате чего образуется гидроперекись липида ( $\text{LOOH}$ ) и алкильный радикал.
Разветвление	$\text{Fe}^{2+} + \text{LOOH} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}\cdot + \text{LO}\cdot$ $\text{LO}\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{LOH} + \text{L}\cdot$ $\text{L}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}\cdot$ ит.д.	Происходит в присутствии небольших количества ионов металлов переменной валентности. В

		результате образуется радикал LO•(алкоксильный радикал).
Обрыв	$\text{LOO}\cdot + \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ \rightarrow \text{LOOH}$ $\text{LOO} + \text{AnH} \rightarrow \text{An}\cdot$ $\text{LOO}\cdot + \text{LOO}\cdot \rightarrow \text{молекулярные продукты}$	Происходит в результате взаимодействия свободных радикалов с антиоксидантами, ионами металлов с переменной валентностью или друг с другом.



Липопероксиды являются весьма нестойкими и подвергаются дальнейшей окислительной дегенерации. При этом накапливаются вторичные продукты окисления, наиболее важными из которых являются ненасыщенные альдегиды, такие как малоновый диальдегид.

Малоновый диальдегид (МДА) – вторичный продукт ПОЛ. Как известно, МДА образуется только из жирных кислот с двумя и более двойными связями. Малоновому диальдегиду принадлежит важная роль в синтезе простагландинов, прогестерона и других стероидов [41].

Отрицательная роль малонового диальдегида заключается в том, что он сшивает молекулы липидов, белков, понижая текучесть мембраны и инактивируя ферментные системы. Нарушаются процессы, связанные с изменением структуры мембраны: фагоцитоз, пиноцитоз, клеточная миграция, клеточная сигнализация и др.

Высокий уровень малонового диальдегида, вторичного продукта перекисного окисления липидов служит косвенным доказательством гиперпродукции АФК. МДА – высокореакционный метаболит, способный модифицировать азотистые основания в молекуле ДНК и образовывать Шиффовы основания с такими аминокислотами в белках, в том числе и ферментах, как гистидин, лизин, цистеин, приводя к потере биологических свойств биомолекул и возможному изменению конформации белка.

Шиффовы основания – конечные продукты ПОЛ. Образуются шиффовы основания в результате обратимой реакции между карбонильной группой альдегида или кетона со свободной аминогруппой. Непрерывное накопление оснований Шиффа дестабилизирует мембраны и способствует деструкции клеток [42].



#### **1.4 Антиоксидантная система**

Проявление негативного повреждающего воздействия свободных радикалов и перекисных соединений ограничивает многоуровневая антиоксидантная система (АОС), обеспечивающая связывание и рекомбинацию свободных радикалов, предупреждение образования и/или разрушение перекисей. Система антиоксидантной защиты организма, согласно современной классификации, состоит из двух основных звеньев: ферментативного и неферментативного.

**Ферментативная антиоксидантная защита.** Функция антиоксидантных ферментов в организме заключается в поддержании стационарных концентраций перекисей и кислородных радикалов. К антиоксидантным ферментам относят: супероксиддисмутазу, каталазу, глутатионпероксидазу, глутатионтрансферазу.

Исключительно важным моментом эффективности ферментативного звена АОС является сбалансированность активности супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы. Подавление активности одного из ферментов может привести к избыточному накоплению АФК и деструкции клеток. При различных патологических состояниях концентрация и активность ферментов АОС может меняться в различных направлениях [6].

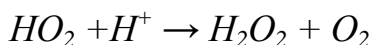
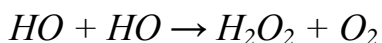
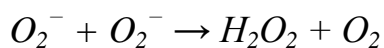
**Супероксиддисмутаза (КФ1.15.1.1 –  $O_2^{\cdot-}$ :  $O_2^{\cdot-}$  оксидоредуктаза, СОД).**

Это фермент, нейтрализующий активные формы кислорода путем превращения их в перекись водорода. Супероксиддисмутаза содержится во всех клетках организма, потребляющих кислород.

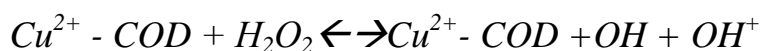
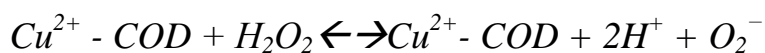
Супероксиддисмутаза имеет несколько изоферментных форм, различающихся строением активного центра. Медь – цинковая форма чувствительна к цианиду и содержится в цитозоле и межмембранном пространстве митохондрий клеток эукариот, марганецсодержащая форма локализована в митохондриях клеток эукариот, а так же бактерий, экстрацеллюлярная высокомолекулярная форма СОД (эСОД) обладает

высоким сродством к гепарину и хорошо связывается с гепаринсульфатом гликокаликса эндотелиоцитов [5].

COD выдерживает нагревание при 100°C в течение одной минуты, устойчива к колебаниям значений pH в широком диапазоне. COD существенно ускоряет реакцию дисмутации  $O_2^-$ , обрывая тем самым опасную цепь свободнорадикальных превращений кислорода:



В определенных условиях Cu,Zn-COD может взаимодействовать с перекисью водорода и выступать в качестве прооксиданта, инициируя образование радикалов – супероксида и гидроксила:



COD играет важную роль в защите клеток от действия супероксид-анион радикала: стабилизирует клеточные мембраны, предотвращая процессы ПОЛ. Снижая уровень  $O_2^-$ , она защищает от его дезактивирующего действия каталазу и глутатионпероксидазу [5].

Регулирующее влияние на активность COD оказывают глутатион, цистеин, другие SH – содержащие соединения, а также опосредованно ферменты глутатионового обмена [43].

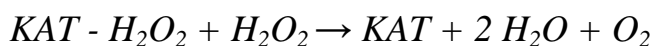
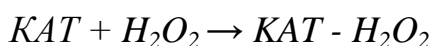
Супероксиддисмутаза обладает самой высокой известной каталитической скоростью реакции ( $\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Реакция лимитирована только частотой столкновения супероксида с ферментом (т.н. диффузионно-лимитированная реакция), благодаря чему супероксиддисмутаза эффективно защищает клетку от повреждающего действия супероксида [8].

**Каталаза** (КФ 1.11.1.6,  $H_2O_2$ :  $H_2O_2$  оксидоредуктаза) катализирует диспропорционирование  $H_2O_2$  до  $H_2O$  и  $O_2$ , защищая клетки от окислительного эффекта  $H_2O_2$ . Фермент имеется у всех аэробов и у многих аэротолерантных анаэробов. Известны два типа гемовых каталаз,

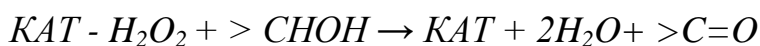
фиогенетически далеких друг от друга – монофункциональные и бифункциональные каталазы – пероксидазы, использующие при каталазной активности в качестве донора электронов  $H_2O_2$  ( $K_m \sim 2,5 - 6,5$  мМ), а при пероксидазной активности ( $K_m \sim 0,2 - 0,7$  мМ) – различные органические соединения (пирогаллол, NADH, NADPH).

Этот фермент также содержится практически во всех органах и тканях. Особенно им богаты печень, почки и эритроциты. Каталаза препятствует накоплению в клетках большого количества перекиси водорода, образующейся при действии супероксиддисмутазы.

Разложение  $H_2O_2$  каталазой осуществляется в два этапа:



При этом в окислительном состоянии каталаза работает, как и пероксидаза, катализируя окисление спиртов или альдегидов:



Каталаза ингибируется азидом, цианидом, пероксидом водорода в высоких концентрациях и некоторыми органическими гидроперекисями. Каталаза может выступать источником образования АФК. 0,5% кислорода, образующегося в результате разложения перекиси водорода, возникает в возбужденном синглетном состоянии [10].

**Неферментативная антиоксидантная система.** Помимо ферментативного звена система АОС организма включает в себя неферментативное звено, играющее не менее важное значение и состоящее из низкомолекулярных эндогенных антиоксидантов. Существует точка зрения, что при окислительном стрессе ферментативная АОС может оказываться иногда менее эффективной по сравнению с защитным действием низкомолекулярных соединений.

К неферментативным антиоксидантам относится большая группа веществ, защищающих клетки от разрушающего воздействия свободных радикалов. К наиболее важным антиоксидантам неферментативной АОС

относят глутатион, токоферолы, аскорбиновую кислоту, убихинон, тиоктовая кислота, селен, мелатонин.

Взаимодействуя с радикалами, такие вещества сами превращаются в радикалы антиоксидантов [8].

### **1.5 Характеристика наночастиц оксидов и гидроксидов железа**

В биомедицинских приложениях широко используются наноразмерные частицы оксидов и гидроксидов железа. Они рассматриваются как перспективные материалы для магнито-резонансной томографии, гипертермии, носителей лекарственных препаратов и др. Вместе с этим известно, что наночастицы (на основе железа, титана и др.) могут оказывать цито- и генотоксическое влияние на живые клетки [34]. Обсуждаемый в литературе механизм токсичности наночастиц часто связывают с действием активных форм кислорода [11]. Предполагается, что нанокристаллиты оксидов и гидроксидов железа разрушаются внутри клеток. Высвобождающееся в ионной форме железо взаимодействует с перекисью водорода по механизму Фентона, что приводит к росту уровня активных форм кислорода в клетках [26]. В результате нарушается баланс активных форм кислорода (АФК) и антиоксидантной системы. В связи с этим заметим, что направленные воздействия на образование АФК и функционирование антиоксидантной системы представляют собой признанный путь к разработке новых средств лекарственной терапии рака [30].

Механизмы такого рода влияния наночастиц оксидов и гидроксидов активно обсуждаются. Показано, что цитотоксичность наночастиц оксидов и гидроксидов железа зависит от восстановленности железа [Auffanetal, 2008]. Наиболее токсично железо нулевой валентности, в меньшей степени магнетит, затем маггемит и наименее токсичен гидроксид железа лепидокрокит [27]. Заметим, что до настоящего времени в исследованиях токсичности наночастиц железа большее внимание уделяется магнетиту [17]. В экспериментах исследовали частицы размером 30 – 60 нм и более (до 1

мкм). Частицы крупного размера, очевидно, представляли собой агломераты наночастиц малого размера. Заметим, что диаметр наночастиц гидроксидов железа намного меньше (2 – 15 нм). Они имеют существенно больше площадь поверхности и сорбционную емкость.

Токсичность наночастиц обусловлена не только (дис)балансом антиоксидантной системы и активных форм кислорода, индуцированным образованием в клетках гидроксильных радикалов [27]. Однако их роль в цитотоксичности наночастиц не вызывает сомнений. Наблюдаемые факты отсутствия токсичного влияния не рассматриваются как опровержение этих механизмов.

Недавно были получены данные о двойственном проявлении активности наночастиц оксидов железа (магнетита и маггемита), как ферментов [20]. В зависимости от условий они проявляют пероксидазную или каталазную активность.

## **2 Материалы и методы**

### **2.1 Объект исследования**

В качестве объекта исследования использовали цельную кровь, упакованные эритроциты и гомогенаты печени. Забор крови у здоровых людей осуществляли сотрудники лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии Института медицинских проблем Севера. Кровь забирали натошак из локтевой вены. Антикоагулянтом служил гепарин. Часть цельной крови использовалась для проведения хемилюминесцентного анализа, часть – для получения упакованных эритроцитов.

### **2.2 Наночастицы**

Использованные в работе наночастицы ферригидрита биогенного происхождения любезно предоставлены лабораторией нанотехнологий НИИ Биофизики. Полученные при помощи микроорганизмов *DelfiaTshuracatensis* выращенных в аэробной среде на цитрате железа.

Размер наночастиц колеблется от 2 - 7 нм, удельная площадь поверхности 600 м<sup>2</sup>/г. В их состав входит железо (Fe<sup>3+</sup>) 8% и 40 % углерода.

### **2.3 Приготовление упакованных эритроцитов**

Цельную гепаринизированную кровь центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Оставшуюся после отбора плазмы эритроцитарную массу трижды отмывали физиологическим раствором (0,9%-ным NaCl) и центрифугировали по 15 мин при 3000 об/мин. Супернатант отбрасывали. Последнее центрифугирование проводили в течение 20 мин для более плотной упаковки клеток [21].

### **2.4 Перфузия изолированной печени крыс**

Исследование влияния наночастиц ферригидрита на хемилюминесцентную активность клеток печени проводили на установке для проточной перфузии, разработанной в МНЦИЭСО при Президиуме КНЦ СО РАН. Данный аппарат состоит из оксигенатора, который выполняет роль искусственных легких, перистальтического насоса, он в свою очередь

выполняет функции сердца, и термостата который необходим для поддержания постоянной температуры (рис.2).

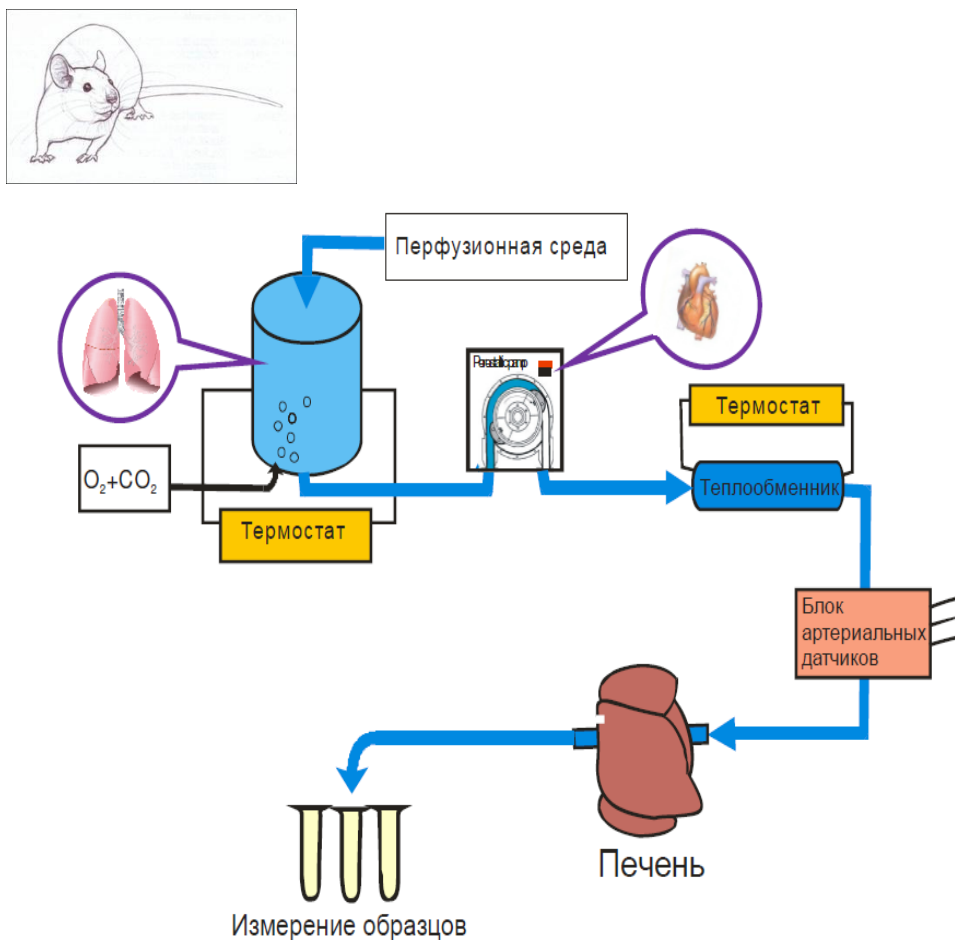


Рисунок 2 – Схема установки для перфузии печени [Круглик О.]

Исследования проведены на 7 крысах (самцах) линии Wistar возраста семи месяцев, весом ????? г. Операцию выделения печени проводили под общим тиопентал-натриевым наркозом. Стабилизацию гемостаза осуществляли внутривенным введением в бедренную вену гепарина (1000 ед./кг массы). Печень после канюлирования воротной вены инфузировали (под давлением 5–7 см вод. ст.) охлажденным до +10°C раствором Кребса–Хенселейта. Перфузию проводили с использованием установки с разомкнутым контуром кровообращения. Чтобы условия приближались к естественным, перфузию печени проводили при пульсирующем кровотоке в печеночной артерии, а в воротной вене – при ламинарном. Орган находился в

установке 120 мин. В качестве перфузата использовался раствор Кребса-Хенселейта, с добавлением наночастиц (50-100 мкл).

## 2.5 Приготовление гомогената печени

Навеску печени весом 200 мг помещали в стеклянный гомогенизатор, добавляли 1 мл раствора Хенкса. Далее печень гомогенизировали ручным гомогенатором, гомогенат откручивали на центрифуге 10 минут. После чего супернатант отбрасывался, осадок растворяли 1 мл раствора Хенкса.

## 2.6 Определение содержания малонового диальдегида

Принцип метода: В липидных системах в результате процессов перекисного окисления липидов образуется малоновый диальдегид (МДА), взаимодействие которого с 2-тиобарбитуровой кислотой приводит к образованию хромогена с максимумом поглощения в красной области видимого спектра при длине волны 532 нм.

### Реактивы:

1. 0,9%-ный раствор NaCl (физиологический раствор);
2. 30%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ);
3. 0,1М раствор динатриевой соли этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) ( $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ , Mr = 372,24г/моль);
4. 1%-ный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК), приготовленный на 0,05 н растворе NaOH.

Ход определения: К 0,2 мл упакованных эритроцитов добавляли 0,8 мл физиологического раствора, 0,5 мл раствора ТХУ и тщательно перемешивали. Затем центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Аналогичным образом готовили контрольную пробу, в которой эритроциты заменяли равным объемом дистиллированной  $H_2O$ . 1 мл супернатанта переносили в другую пробирку, добавляли 0,075 мл ЭДТА и 0,25 мл раствора ТБК, Содержимое перемешивали и ставили пробирки в кипящую водяную баню на 15 мин, после чего пробирки охлаждали до



комнатной температуры. Измеряли поглощение опытной пробы против контрольной на спектрофотометре Spexol 1320 при 532 нм в кюветах с толщиной слоя 1,0 см.

Расчет содержания малонового диальдегида осуществляли, используя коэффициент молярной экстинкции, равный  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [21].

## 2.7 Метод хемилюминесценции

Свободнорадикальную активность определяли методом хемилюминесценции по изменению люминесценции люминола и люцигенина, опосредованной взаимодействием хромофора со свободными радикалами, образование которых инициируется наночастицами ферригидрита.

Люминол и люцегенин в присутствии АФК окисляется и генерирует электронно-возбужденные карбонильные хромофоры с огромным квантовым выходом.

Люминолзависимой хемилюминесценцией определяют суммарный пул АФК – супероксидный анион-радикал, пероксид водорода, гидроксильный радикал, синглетный кислород и др. [12]. Схема люминолзависимой ХЛ приведена на рис. 3

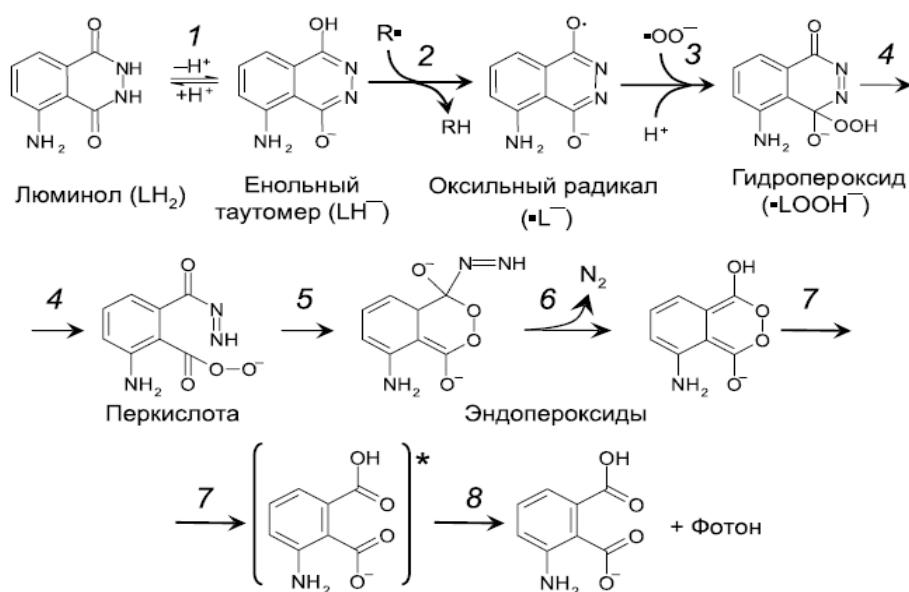


Рисунок 3 – Схема люминолзависимой хемилюминесценции [12]

Люцигенинзависимая хемилюминесценция позволяет определить продукцию только супероксидного радикала [12]. Схема люцигенинзависимой ХЛ приведена на рис. 4.

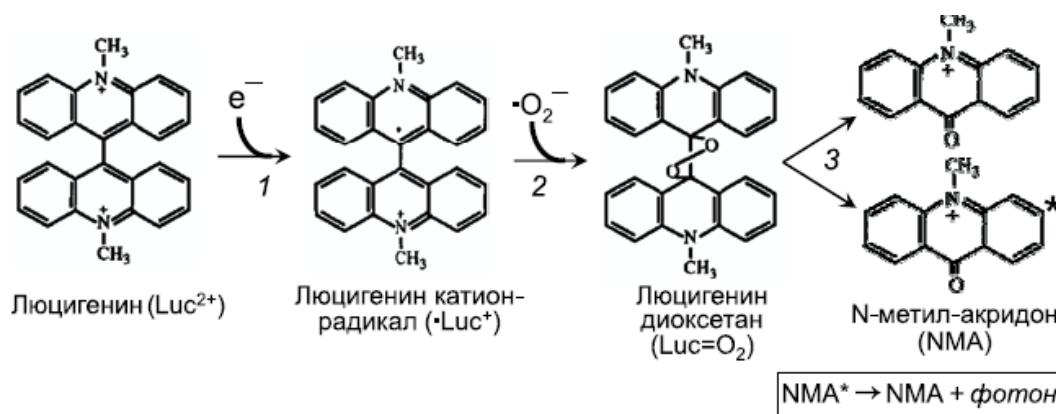


Рисунок 4 – Схема люцигенинзависимой хемилюминесценции [12]

Как правило, при хемилюминесценции можно выделить три стадии:

1. В самом начале хемилюминесценции происходит восстановление одного из участников данной реакции. После чего данная энергия позднее выделится в виде фотона.

2. Процесс переноса электрона или окислительно-восстановительные реакции. Электрон переносится на более высокий энергетический уровень, образуя тем самым продукт реакции, который пребывает в возбужденном состоянии.

3. Далее возбужденная молекула переходит в основное состояние, именно в этот момент происходит испускание кванта света или люминесценция.

При помощи измерения светосуммы производилась оценка содержания свободных радикалов, площади под кривой одна из основных характеристик взаимодействия АФК с люминолом. Данная характеристика

пропорциональна концентрации АФК, которые взаимодействовали с люминолом в течение всего времени свечения.

## **2.8 Метод определения морфологических форм эритроцитов**

Цельную кровь обрабатывают для получения суспензии эритроцитов, содержащей  $10^7$  кл/мл. Суспензию клеток инкубируют в фосфатном буфере с добавлением глюкозы в отсутствие (контроль) и при добавлении наночастиц ферригидрита (опыт). После фиксации клеток глутаровым альдегидом подсчитывают число различных морфологических форм эритроцитов.

Приготовление клеточной суспензии:

1. 100 мкл крови набирают автоматической пипеткой с пластиковым наконечником и переносят в «эппендорф» (объем 1 мл). В пробирку предварительно вносят 900 мкл фосфатного буфера с 5 мМ глюкозой и ЭДТА (0,2 мг/мл), pH=7,4.

2. Кровь суспендируют. Клеточную суспензию центрифугируют 3,000 об/мин, 10 мин. Супернатант отбрасывают. К осадку клеток повторно добавляют 900 мкл фосфатного буфера с глюкозой (без ЭДТА). Осадок суспендируют и повторно центрифугируют (3,000 об/мин, 10 мин). Супернатант отбрасывают.

3. Осадок суспендируют в 900 мкл фосфатного буфера с глюкозой. Отбирают аликвоты для определения концентрации клеток (20 мкл суспензии эритроцитов + 500 мкл фосфатного буфера). Клеточные суспензии переносят в термостат. Инкубируют 30-60 при  $37^{\circ}$  C (для адаптации клеток).

4. После завершения инкубации клетки суспендируют и доводят их концентрацию до  $10^7$  кл/мл.

Культивирование:

*Контроль.* В 6 пластиковых пробирках вносят 100 мкл суспензии эритроцитов (концентрация  $10^7$  кл/мл), 80 мкл фосфатного буфера с глюкозой, 20 мкл дист. воды.

*Опыт.* В 6 пластиковых пробирок вносят 100 мкл суспензии эритроцитов (концентрация  $10^7$  кл/мл), 80 мкл фосфатного буфера с глюкозой, 20 мкл раствора наночастиц ферригидрита.

Контрольные и опытные пробы (всего 12 пробирок) инкубируют 1 час при  $37^\circ\text{C}$ .

После завершения инкубации клетки фиксируются глутаровым альдегидом: в пробирку вносят 500 мкл 2,5 %-ного раствора глутарового альдегида, приготовленного на фосфатном буфере с глюкозой). Зафиксированные клетки хранят в холодильнике, не замораживая.

Зафиксированные клетки центрифугируют при 2000 об/мин в течение 5 мин. Из супернатанта отбирают 500 мкл и отбрасывают. Клетки суспендируют в конечных 200 мкл среды. Из каждой пробирки отбирают по 50 мкл клеточной суспензии и вносят 10 мкл 1%-ного водного раствора метиленового синего. После чего клетки микрокопируют, выделяя различные морфологические классы эритроцитов.

## **2.9 Статистическая обработка результатов**

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием пакета программы Microsoft Excel. Достоверность различий определялась по t-критерию Стьюдента. Результаты считались достоверными при уровне значимости 95% ( $p \leq 0.05$ ). Построение графиков осуществлялось с помощью программы Microsoft Excel 2007.

### **3. Результаты исследований и их обсуждение**

Из текста ВКР изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## Список литературы:

1. Янковский, О. Ю. Токсичность кислорода и биологические системы эволюционные, экологические и медико- биологические аспекты: Монография/ О. Ю. Янковский// СПб: 2000.- С. 294.
2. Костюк , В. А. Биорадикалы и биоантиоксиданты: Монография/ В. А Костюк , А. И. Потапович //БГУ, 2004. – С. 174.
3. Кузницов С. Л., Молекулярная биология / Н. Н. Мушкамбетов // М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2007. – С. 520.
4. Анисимова Н. Ю. , Исследование сорбционных свойств ферримагнитных наночастиц/ Ф. С. Сенатов, С. И. Миляев, М. В. Киселевский//Медицинские науки, 2011. С. 263-265.
5. Зенков Н.К. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах / Е. Б. Меньщикова // Успехи современной биологии. – 1993. – Т.113, вып.3.
6. Бертини И., Биологическая неорганическая химия: структура и реакционная способность: в 2т. Т.2/ И. Бертини, Г. Грей, Э. Стифель, Дж. Валентине//пер. с англ.-М.: бином лаборатория знаний, 2013- С.623
7. Бертини И., Биологическая неорганическая химия: структура и реакционная способность: в 2т. Т.1/ И. Бертини, Г. Грей, Э. Стифель, Дж. Валентине//пер. с англ.-М.: бином лаборатория знаний, 2013. С.623.
8. Mathias ,Cytotoxicity and Genotoxicity of Size-Fractionated Iron Oxide (Magnetite) in A549 Human Lung Epithelial Cells: Role of ROS,JNK, and NF-jB, Sandra Ebeling, Ella Goldenberg / Chemical Research in Toxicology// 2011.. vol. 24, no. 9, p. 1460–1475
9. СавченкоА.А., Клинические аспекты применения хемиллюминесцентного анализа / Ю.С. Винник, О.В. Перьянова, О.В.

Теплякова, С.В. Якимов, Е.Ю. Тепляков, О.С. Мешкова // Сибирский медицинский журнал, 2004. С. 11-15.

10. Гудков, С. В Биоантиоксиданты (часть 1) / С. В. Гудков, В. И Брусков, А. В. Куликов, А. Г. Бобылёв, Д. А. Куликова, А. В. Молочкова// Альманах клинической медицины, 2014. С.61 – 65.

11. Ferreira A.L.A., Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and glutathione levels in human erythrocytes exposed to colloidal iron hydroxide *in vitro*/ A.L.A. Ferreira, P.E.A. Machado and L.S. Matsubara// Brazilian Journal of medical and Biological Research 1999 – P. 689-694.

12. Владимиров, Ю. А. свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция/ Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина//успехи биологической химии 2009. – С. 341 – 388.

13. Kato H., Dispersion characteristics of various metal oxide secondary nanoparticles in culture medium for *in vitro* toxicology assessment. / K. Fujita , M. Horie, M. Suzuki , A. Nakamura / Toxicology in Vitro April 2010. Vol. 24, Issue 3, P. 1009–1018

14. Paik S.Y.R., Magnetic energy-barrier distributions for ferrihydrite nanoparticles formed by reconstituting ferritin / J.-S. Kim, S.J. Shin// Journal of Applied Physics Vol. 103, Issue 5 P.103 – 106.

15. Sae – Yeol- Rim P., Characterization, quantification, and determination of the toxicity of iron oxide nanoparticles to the bone marrow cells /K. Jong – Seok, S. Sung Jie //Int. J. Mol. Sci.2015, P. 16.

16. Gattoo M.A., Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations / S. Naseem, M.Y. Arfat, A.M. Dar, K. Qasim, S. Zubair // BioMed Research International, Vol. 2014, P. 8.

17. Леонид Р. И., Изучение INVITRO потенциального действия на иммунитет наночастиц окислов металла Cu и Fe / С. А. Ирина, П. А. Людмила, О. А. Сергей // Инновация в науке, 2013. – С. 1-7.

18. Chen Z., Dual enzyme like activities of iron oxide NPs and their implication for diminishing cytotoxicity / J.-J. Yin, Y.-T. Zhou, Y. Zhang, L. Song, M. Song, S. Hu, and N. Gu // ACS Nano, 2012. P. 6.
19. Paik S.Y.R., Characterization, quantification, and determination of the toxicity of iron oxide nanoparticles to the bone marrow cells / J.-S. Kim, S.J. Shin // Int. J. Mol. Sci. 2015., P. 16.
20. Sharma G., Thrall Iron oxide nanoparticle agglomeration influences dose-rates and modulates oxidative stress dose-response profiles in vitro / V. Kodali, M. Gaffrey, W. Wang, K.R. Minard, N. J. Karin, J.G. Teeguarden, B.D. // Nanotoxicology 2013. Vol. 7., P. 8.
21. Титова Н.М., Замай Т.Н., Субботина Т.Н., Савченка А.А. Оценка структурно-функционального состояния клетки: метод. указания к практическим занятиям / – Красноярск: ИПК СФУ 2009.
22. А.Н.Латышева, С. В. Бронхиальная астма и хроническая обструктивная болезнь легких: особенности системы оксидант-антиоксидант/ С. В. Смирнова, А.Ф. Колпакова// Красноярск: издательство КраГМУ, 2011. – 110с.
23. Донцов В. И., Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении/ В. Н. Крутько, Б. М. Мрикаев, С. В. Уханов// Труды ИСА РАН, 2006. С. 50 - 69.
24. Губин С.П., Магнитные наночастицы: свойства, получение и строение / Ю. А. Кокшаров, Г. Б. Хомутов, Г. Ю. Юрков, // Успехи химии, 2005. С. 539 – 574.
25. Бакеева И.В., Наноструктуры: основные понятия, классификация, способы получения / И.В.Бакеева // учебное пособие, 2008. С. 68.
26. Соцкая Н.В., Физико-химические свойства поверхностей, модифицированных наночастицами металлов / О.В. Долгих, В.М.



Кашкаров, А.С. Леньшин, Е.А. Котлярова // Сорбционные и хроматографические процессы, 2009. Т. 9., вып. 5 С. 643 – 652.

27. Печенюк С.И., Сорбция анионов на оксигидроксидах металлов (обзор) / С.И.Печенюк // Сорбционные и хроматографические процессы, 2008. Т. 8., вып. 3 С. 380 - 428.

28. Штыков С. Н., Наноматериалы и нанотехнологии в химических и биохимических сенсорах: возможности и области применения / Т. Ю. Русанова, 2008. Т. 12 Вып. 2 С. 92 – 100.

29. Yoshihiro, Y. Effect of burn injury on glucose and nitrogen metabolism, in the liver preliminary studies in a perfused liver system/ Y.Yoshihiro, Y. Yong-Ming, L. Martin// Mosby-Year Book, 1996. – P. 295-308.

30. Каркищенко Н. Н., Наноинженерные лекарства: новые биомедицинские инициативы в фармакологии / Н. Н. Каркищенко// Биомедицина, 2009. Т. 1 вып. 2 С. 5-27.

31. Тимур О. Х., Токсичность искусственных наночастиц авторы / М. Ф. Лилия, Р. З. Рамиль//Казанский медицинский журнал, 2009. – С.578-584.

32. Каркищенко Н.Н., Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов / Н.Н. Каркищенко // Биомедицина, 2009. Т1 вып.1 С. 5 – 27.

33. Плужников Н. Н., Проксидантная система. Подходы к выбору алгоритма исследования / Л. С. Бакулина // Вестник оториноларингологии. 2010. Вып. 5 С. 72-75.

34. Сырма, Е. И. Физические свойства наночастиц и их биологические эффекты/ Е. И. Сырма, //Интегративная антропология, 2013. – С. 30 - 33.

35. Орлов, Ю. П. Метаболизм железа в биологических системах (биохимические, патофизиологические и клинические

аспекты)/Ю. П. Орлов, В. Т. Долгих// Биомедицинская химия – 2007. – С. 25 - 28.

36. Богословская О. А., Применение наночастиц железа в профилактике экспериментальной гемолитической анемии / Р. А. Алла, К. П. Дмитрий // здоровье и образование в 21 веке 2014. С. 7 - 8.

37. Акопджанов А. Г., Фармакологические свойства наночастиц сложного оксида железа как субстанции магнитно-резонансного контрастного средства / В. О. Панов, А. В. Семейкин // экспериментальная и клиническая фармакология 2010. Т. 73 вып. 6 С. 23-28.

38. Мороз В. В., Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях/ В. В. Морозов, А. М. Голубев, А. В. Афанасьев//Общая реаниматология – 2012. – С. 52-60.

39. Чеснокова, Н.П. Типовые патологические процессы / Н.П. Чесноков. – Саратов: Саратовский медицинский университет, 2004. – С. 132-136.

40. Henkel, R. R. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility /R. R. Henkel // Asian J. Androl. – 2011. – V. 13, № 1. – P. 43-52.

41. Тарасов, Н.И. Состояние перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты крови у больных инфарктом миокарда, отягощенным недостаточностью кровообращения / Н.И. Тарасов // Тер. архив. 2002. № 12. С. 12-15.

42. Коган, В.Е. Проблемы анализа эндогенных продуктов перекисного окисления /В.Е. Коган // Биофизика. Итоги науки и техники. – М., 1986. – Т.18. – 136 с.