

Предисловие

Разделов химии — научных направлений и сопутствующих им журналов — сотни. Особенно много их в сфере наук о живых системах. Узкая специализация явилась прямым следствием внедрения исследователей во все более тонкие области строения и функций биомолекул. Существенно расширился спектр биологических наук и биотехнологий, углубившихся в своем развитии до молекулярных основ: этот спектр простирается от физиологии, медицины и сельского хозяйства до пищевой промышленности и экологии.

«Биохимическую физику» (возможны варианты «биофизическую химию», «физико-химическую биологию») вряд ли можно считать цельным научным направлением, однако уже само название олицетворяет известное диалектическое сочетание анализа и синтеза в естественных науках. Накопление знаний в биологии неминуемо требует их углубленного физико-химического осмысления.

В предлагаемом вниманию читателей выпуске «Российского химического журнала» представлены статьи, объединенные физико-химическими подходами к изучению важнейших биологических проблем. Авторы статей в большинстве своем представляют Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН и кафедру биофизики Физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, выпускники которой получают специальность «Биохимическая физика».

профессор **В.А. Твердислов**

Молекулярная биофизика клетки

УДК 678.048

Биоантиоксиданты

Е. Б. Бурлакова

ЕЛЕНА БОРИСОВНА БУРЛАКОВА — доктор биологических наук, профессор, лауреат Государственной премии, заместитель директора Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (ИБХФ РАН), заведующая лабораторией. Область научных интересов: физико-химические основы регуляторных процессов клетки, биохимические и биофизические механизмы действия биологически активных веществ.

19334 Москва, ул. Косыгина 4, ИБХФ РАН, тел. (495) 137-31-27, radbio@sky.chph.ras.ru

В данном обзоре освещаются основные этапы и направления в развитии исследований биоантиоксидантов.

Проведенные исследования свидетельствуют о защитном действии антиоксидантов от поражения факторами, вызывающими повреждение клеток организма. Это позволяет говорить о биоантиоксидантах как перспективных терапевтических средствах для лечения многих болезней. Напомним, что биоантиоксидантами называют вещества, которые в модельных свободнорадикальных процессах окисления проявляют свойства ингибиторов реакций и сохраняют эти свойства при введении их в живой организм.

Становление работ по изучению роли антиоксидантов в физиологических процессах

В 1954 г. профессор Биологического факультета МГУ Б.Н. Тарусов [1] высказал гипотезу о том, что развитие лучевой болезни вызвано индукцией цепной разветвленной реакции окисления жиров клеточных мембран, продукты которой являются для клетки токсичными. Эта гипотеза послужила отправной точкой для постановки исследований, направленных на изучение цепных реакций окисления липидов, вызванных радиоактивным облучением животных. Прежде всего ставилась задача выявить продукты, образующиеся при облучении липидов, которые могут быть

токсичными для биообъектов. В качестве модельного субстрата радиолитического окисления жира был выбран природный жир тресковой печени (рыбий жир): его облучали, исследовали состав, затем окисляли. В результате работы было показано, что токсичность облученного жира даже в случае высоких доз радиации зависит только от степени его окисленности, а при равной степени окисления токсичность облученного и необлученного жира одинакова [2].

Основной эффект облучения, как было зафиксировано ранее в условиях *in vitro*, сводится к разрушению природных антиоксидантов в жирах. Отсюда вытекал важный с точки зрения развития лучевых реакций следующий практический вывод: необходимость введения перед облучением препаратов-антиоксидантов для замедления процессов, способствующих ускорению окисления липидов с образованием токсичных продуктов. Наши эксперименты на животных, которым перед облучением вводили природный антиоксидант токоферол, а также нетоксичные синтетические антиоксиданты, используемые в пищевой промышленности, такие как бутилокситолуол, пропилгаллат и др., показали, что в этих случаях среднее время жизни облученных животных, а также их выживаемость увеличиваются [2], т.е. антиоксиданты оказывают радиозащитное действие.

Принципиальное значение этих модельных экспериментов было связано не только с использованием нами впервые синтетических антиоксидантов с целью защиты от развития лучевой болезни (хотя это было новым словом в радиобиологии), но и с тем, что была обнаружена способность антиоксидантов независимо от их происхождения и строения реагировать со свободными радикалами, которые могли сохраняться и проявляться после введения в организм антиоксиданта. Полученные результаты в определенной степени подтвердили представления Б.Н. Тарусова о роли цепных (свободнорадикальных) реакций окисления липидов в органах облученных животных для развития лучевого поражения.

В 1960 г. Н.М. Эмануэль высказал предположение, что не только радикалы липидов, но и радикалы, возникающие в других биохимических компонентах клетки (ДНК, белки, полисахариды и др.), несвойственные ей в норме и образующиеся при воздействии радиоактивного излучения, могут вызывать многочисленные повреждения в клетке, ведущие в конечном итоге к ее гибели [3]. Показано, что эти радикалы могут вступать в обменные реакции с антиоксидантами, в результате которых неспаренный электрон радикала биополимера переходит на молекулу антиоксиданта (HIn) с образованием неактивного радикала ингибитора [4]:



Тогда же была озвучена гипотеза о роли несвойственных клетке в норме свободных радикалов в развитии других болезней и способности синтетических ингибиторов радикальных процессов тормозить эти свободнорадикальные реакции и оказывать лечебный эффект [5]. Такое предположение могли сделать только физикохимики и в первую очередь из школы химической кинетики Семенова—Эмануэля, придающие важное значение не столько вариациям состава реа-

гентов, сколько их физико-химическим свойствам: один и тот же результат может быть достигнут разными по составу компонентами, но обладающими одним и тем же физико-химическим свойством, в данном случае — способностью реагировать со свободными радикалами. Именно поэтому синтетические препараты могут заменить природные в радикальных реакциях.

В 1960-х годах в Институте химической физики (ИХФ) РАН стало активно развиваться новое направление, связывающее химию и биологию антиоксидантов, обозначившее важную проблему — зависимость биологической активности антиоксидантов от их свойств как ингибиторов радикальных реакций. В рамках этой проблемы целенаправленно синтезировались нетоксичные антиоксиданты разного строения, в основном производные экранированных фенолов, гидроксипроизводные гетероциклических углеводородов [6, 7]. Наличие гомологических рядов производных-антиоксидантов позволяет установить связь структура—активность и выбрать наиболее эффективные и наименее токсичные препараты.

В экспериментах *in vivo* была установлена прямая линейная связь радиозащитной активности синтетических антиоксидантов с их антирадикальными свойствами [8]. Проводились также кинетические исследования природных антиоксидантов — витаминов, были определены их константы как ингибиторов радикальных процессов [9]. С помощью метода хемилюминесценции изучались явления синергизма и антагонизма синтетических и природных антиоксидантов и поведение в целом системы антиоксидантов в липидах мембран [10].

Вышеперечисленные работы касались в основном антиоксидантов в липидных компонентах клетки. Вместе с тем на фотохемилюминесцентных моделях была проведена оценка антирадикальной активности водорастворимых природных и синтетических ингибиторов, изучены обменные реакции такого рода антиоксидантов с радикалами пептидов, возникающими при УФ-облучении [11]. Расширился фронт работ по изучению роли биоантиоксидантов в развитии различных заболеваний и возможности с их помощью оказывать профилактический или лечебный эффект. Так, Н.М. Эмануэль и О.С. Франкфурт впервые в мире обнаружили антиканцерогенный эффект антиоксиданта дибutilгидрокситолуола [12].

Кроме того, изучались закономерности изменения антиокислительной активности липидов органов и тканей при канцерогенезе [13]. Установлена стадийность этого процесса, общая для разных канцерогенов, в частности, для бензопирена, *o*-аминоазотолуола и γ -облучения: на начальной стадии воздействия канцерогена антиокислительная активность липидов падает, затем увеличивается, достигает нормы и далее повышается выше нормы на стадии перехода от диффузионной гиперплазии к очаговой. При этом синтетические антиоксиданты действуют по-разному в зависимости от их дозы и от того, на какой стадии развития болезни они вводятся в организм [14]. Дозы препаратов, увеличивающие антиокислительную активность липидов, на первой стадии канцерогенеза оказывают защитное действие, а на поздних стадиях могут ускорять процесс и увеличивать число индуци-

рованных опухолей. Этим объясняется необходимость на поздних стадиях болезни вводить антиоксиданты в высоких дозах, в которых они способны уменьшать антиокислительную активность [15].

Большое число работ было посвящено изучению закономерностей свободнорадикальных процессов, протекающих при опухолевом росте, и противоопухолевому действию антиоксидантов [16]. Обнаружено, что опухолевый процесс проходит в основном на фоне повышенного уровня антиоксидантов, а их противоопухолевое действие проявляется лишь при высоких дозах, когда они не только не увеличивают антиокислительную активность липидов органов и тканей, но, напротив, уменьшают ее и выступают в роли прооксидантов [17]. Интересно, что для противоопухолевых препаратов из разных классов существует общая закономерность: они тем эффективнее, чем сильнее снижают антиокислительную активность липидов [18].

В ИХФ РАН были получены данные о радиопротекторном воздействии препаратов в соответствии с их антиоксидантной активностью [8], причем в экспериментах не только на животных, но и на модельных объектах — облученных растворах их ДНК, белков, липидов [19].

В 1970 г. стало развиваться новое направление — применение антиоксидантов в геронтологии. Кинетические исследования модельных процессов старения, изучение изменения антиоксидантов с возрастом, специальные экспериментальные исследования антиоксидантов как геропротекторов показали теоретическую и практическую важность этого направления [20]. Удивительно, что в настоящее время идея применять антиоксиданты в геронтологии подается как новая, приписываемая совершенно иным людям, а не тем, которые работают по этой проблеме уже в течение многих десятилетий. Следует отметить, что витамины — антиоксиданты, хронически добавленные в пищу животным, продлевают их среднее время жизни в случае ускоренного радиационно-индуцированного старения, но не влияют на животных с нормальным старением.

Наряду с изучением влияния антиоксидантов на развитие той или иной болезни активно исследовалась роль антиоксидантов в нормальных физиологических процессах. Так, установлено, что все воздействия, увеличивающие антиоксидантную активность, ускоряют пролиферацию клеток, а уменьшающие активность ингибируют процесс пролиферации [21]. Исследования воздействия антиоксидантов на активность генетического аппарата показали, что способность биоантиоксидантов влиять на состав липидов клеток может приводить к изменению активности липид-зависимых ферментов синтеза и репарации ДНК и сказываться на активности хроматина [22].

Таким образом, можно сказать, что конец 70-х годов прошлого столетия ознаменовался в биологии активным изучением роли антиоксидантов в нормальном метаболизме клетки. Было сделано заключение, что антиоксиданты являются универсальными модификаторами состава, структуры и функциональной активности мембран и многие закономерности их влияния на клеточный метаболизм можно объяснить с этих позиций [23]. Была открыта физико-химическая система регуляции клеточного метаболизма мембра-

нами, основанная на взаимосвязи между скоростью пероксидного окисления липидов мембран, с одной стороны, и изменением состава липидов мембран и их окисляемостью, с другой [24]. Отсюда следует, что с помощью антиоксидантов можно переводить клетку, орган, организм из одного метаболического состояния в другое.

В 1970-х годах антиоксиданты нашли применение в кардиологии, онкологии, лечении нейродегенеративных и многих других заболеваний [25]. Активно изучалась возможность использования антиоксидантов в растениеводстве в качестве стимуляторов роста, для профилактики и лечения заболеваний животных [26].

Подводя итоги работ по изучению биоантиоксидантов, выполненных в 1970-х годах, сформулируем основные выводы [27].

1. Нетоксичные ингибиторы радикальных процессов — антиоксиданты — обладают широким спектром биологической активности.
2. Биологическая эффективность антиоксидантов коррелирует с их антиокислительными свойствами.
3. В зависимости от дозы антиоксиданты могут как увеличивать антиокислительную активность (в малых дозах), так и уменьшать ее.
4. Активность антиоксидантов при лечении различных заболеваний зависит от того, на какой стадии болезни вводится препарат, поскольку само развитие болезни может сопровождаться стадийным изменением антиокислительной активности.

Современные тенденции в развитии исследований биоантиоксидантов

Можно сказать, что за 50 лет, прошедших с начала систематического изучения роли радикалов и антиоксидантов в физиологических процессах в норме и при развитии патологий в организме, появилась новая наука — свободнорадикальная биология. В одной обзорной статье невозможно подробно осветить все этапы развития этой науки, поэтому ограничимся изложением основных тенденций в развитии антиокислительной тематики в ИХФ РАН после 1984 года.

В настоящее время изучаются следующие пути воздействия антиоксидантов на клеточный метаболизм: 1) взаимодействие биоантиоксидантов со свободными радикалами различной природы; 2) встраивание в структуру мембраны и изменение ее функциональной активности, связанной с изменением вязкостных свойств; 3) влияние биоантиоксидантов непосредственно на активность мембранных белков: ферментов, рецепторов; 4) влияние на генетический аппарат клетки, в том числе на экспрессию генов; 5) влияние на регуляторные системы клетки и опосредованно на ее метаболизм в целом.

Важным остается вопрос о том, какие физико-химические характеристики антиоксидантов обуславливают их биологическую активность. Мы сосредоточили свое внимание на кинетических исследованиях, а именно, на определении антирадикальной активности k_7 (константы обменной реакции радикалов с ингибиторами), антиокислительной эффективности (величины, учитывающей расход антиоксидантов и их радикалов в побочных реакциях) и константы скоро-

сти реакции $In' + RH (k_{10})$, характеризующей участие радикалов из ингибиторов в продолжении цепи свободнорадикальной реакции. Существенным моментом является выбор модели, посредством которой можно адекватно вычислять эти константы.

В результате цикла работ была установлена следующая закономерность: вводимые в организм животного антиоксиданты должны обладать такой антирадикальной активностью, чтобы производство k_7C для вводимого экзогенного ингибитора было сравнимо с величиной k_7C для природного, эндогенного ингибитора (C — концентрация антиоксиданта) [28]. Если k_7C экзогенного антиоксиданта ниже k_7C эндогенного, то в свободнорадикальных реакциях, протекающих в условиях *in vitro* и *in vivo*, в первую очередь расходуется собственный, а не вводимый антиоксидант. Поэтому уровень природных антиоксидантов понижается.

Показано, что большое превышение концентраций аминокислот и оснований относительно концентраций вводимых антиоксидантов и высокие скорости (константы скоростей) их реакций с гидроксильными радикалами делают невозможным защиту компонентов клеток от гидроксильных радикалов с помощью данных синтетических антиоксидантов [29]. Эффективность антиоксидантов уменьшается и в случае высоких значений констант реакции продолжения цепи за счет участия радикалов, образующихся из ингибиторов [30].

Методом стационарного фотоллиза были оценены значения константы скорости реакции диспропорционирования k_9 феноксильных радикалов ингибиторов, которые зависят от степени экранированности феноксилов. Для этих же феноксилов была вычислена константа взаимодействия радикалов из ингибитора с тем или иным субстратом окисления в реакции продолжения цепи. Оценка связи между активностью феноксильных радикалов и общей эффективностью ингибиторов как антиоксидантов показывает, что константы k_7 недостаточно для достоверной оценки биологической активности антиоксиданта и необходимо еще учитывать активность радикальных продуктов, образующихся из ингибиторов. Именно на основании этих данных можно сделать прогноз о возможности инверсии действия антиоксиданта *in vivo*.

Следует также иметь в виду, что константы реакции одних и тех же ингибиторов с различными радикалами довольно существенно (на порядки величин) различаются друг от друга (см. табл. 1) [31], и возможны ситуации, когда антиоксиданты, будучи активными относительно одних радикалов, не смогут эффективно взаимодействовать с другими радикалами. В таких случаях не представляется возможным защитить ком-

поненты клеток от действия этих радикалов, поскольку сродство радикалов к ним будет существенно выше, чем к вводимым ингибиторам.

Еще одно препятствие для эффективного использования антиоксидантов связано с экстремальной зависимостью эффекта от концентрации. Как уже отмечалось, в больших концентрациях антиоксиданты начинают действовать в обратном направлении и не тормозить, а напротив — ускорять свободнорадикальные реакции, что может быть вызвано либо высокой активностью накапливающихся радикалов ингибиторов, либо преимущественным расходом природных антиоксидантов по сравнению с вводимыми синтетическими. Многие из этих эффектов зависят от начальных характеристик свободнорадикальных процессов и начального уровня антиоксидантов.

Таким образом, чтобы реализовать возможность положительного влияния антиоксидантов на течение нормальных и патологических состояний, необходимо точно знать природу радикалов, которые вызывают патологические изменения, стадию, когда надо вводить антиоксиданты, их концентрацию и элементарные константы. Неучет этих показателей или неправильный подход к антиоксидантотерапии может привести к отрицательным результатам.

Весьма важным является вопрос о роли и месте в метаболизме клетки эндогенных и экзогенных антиоксидантов, с одной стороны, и антиоксидантных ферментов, с другой. Дело в том, что в клетках показано наличие специальных ферментов, названных антиоксидантными, которые регулируют скорость окислительных превращений в липидах мембран и с наличием которых в клетке связывали первую линию ее защиты от «окислительных» радикалов [32]. К ним относятся в первую очередь супероксиддисмутаза, набор ферментов тиолового обмена — глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатионтрансфераза, а также фосфолипаза. Ко второй линии защиты относятся биоантиоксиданты. Как мы показали впоследствии, неправильно приписывать тем или другим компонентам главную роль в защите, ибо каждый из этих компонентов нужен для выполнения своей, присущей только ему функции на разных стадиях развития процесса окисления (зарождения цепи, продолжения, разветвления и обрыва) [33]. При изучении механизма действия биоантиоксидантов было найдено, что существует целая система связей между отдельными показателями клеточного метаболизма, изменяющимися под действием антиоксидантов.

В рамках исследований, проводимых в области биохимии биоантиоксидантов, существенное развитие

Таблица 1

Константы скорости взаимодействия ингибиторов — антиоксидантов с биологически активными радикалами (в л/(М·с))

Ингибиторы	Радикалы			
	ОН·	R· (белки)	·RO ₂ (липиды)	O ₂ ·· (супероксид)
2-Этил-6-метил-3-гидроксипиридин, гидрохлорид	$3,3 \cdot 10^{10}$	$1,9 \cdot 10^6$	$9,0 \cdot 10^5$	26—4
β -[3,5-Ди- <i>трет</i> -бутил-4-гидроксифенил]-пропионовая кислота (фенозан)	$4,4 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^4$	10—2
5,7,8-Триметилтокол (α -токоферол)	$8 \cdot 10^{10}$		$3,4 \cdot 10^6$	$4,7 \cdot 10^5$ (растворимая форма)

получило изучение физико-химической регуляторной системы, поддерживающей уровень протекания свободнорадикальных реакций и обмен мембранных липидов и скорость расходования антиоксидантов в липидах [24]. Компонентами этой системы являются антиоксиданты, свободные радикалы и продукты перексидного окисления, состав липидов, их окисляемость, скорость расходования антиоксидантов.

Было показано, что увеличение содержания антиоксиданта приводит к снижению скорости перексидного окисления липидов и уменьшению концентрации продуктов окисления, к снижению скорости выхода липидов из мембран, обогащению их ненасыщенными липидами, соответственно к увеличению окисляемости липидов и, как следствие, к возрастанию скорости подавления антиоксидантной активности и последующего возвращения активности и скорости перексидного окисления к норме. Существование такой системы регуляции было обнаружено практически для всех изученных внутриклеточных и клеточных мембран клеток животных, растительных организмов и микроорганизмов.

Все указанные характеристики влияют на активность и кинетические характеристики мембраносвязанных белков-ферментов, рецепторов, поэтому изменение скорости перексидного окисления липидов может приводить к изменению не только структуры, но и функциональной активности мембран. Во всех мембранах в норме наблюдаются одинаковые закономерности в связи между параметрами, различие лишь во времени релаксации системы (от минут до суток).

При действии на организм какого-либо повреждающего фактора происходят изменения в системе регуляции. Длительные изменения могут быть вызваны хроническим фактором, который не приводит к разрыву связей в системе регуляции, и тогда после окончания его действия система может возвратиться к норме. Кроме того, возможны ситуации, когда под действием повреждающего фактора происходит переход на новый уровень регуляции и, наконец, возможны разрывы связей в системе регуляции, которые не позволяют ей вернуться к норме. В таком случае антиоксиданты могут быть полезны как один из компонентов в комплексной терапии. Подобные закономерности были установлены как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях.

Так, например, при развитии лучевого поражения отмечается разрыв связи между процессом перексидного окисления и окисляемостью липидов [34]. В норме с усилением процесса окисления липиды обогащаются трудноокисляемыми фракциями, и, как следствие, окисляемость уменьшается и система возвращается к норме. Противоположная картина наблюдается при действии облучения: на фоне увеличения перексидного окисления окисляемость липидов увеличивается, что не позволяет системе регуляции вернуться к норме, и уменьшается эффективность антиоксидантов как радиопротекторов.

При опухолевом росте система регуляции работает с двумя разрывами связи, которые позволяют на определенных участках системы получать тот же ответ, что и в норме [35]. В процессе канцерогенеза основные нарушения между составом липидов и активностью мембраносвязанных ферментов наблюдаются уже в

ранние сроки после поступления в организм канцерогена [36]. В экспериментах на крысах линии КМ установлено, что при эпилептических приступах возникает разрыв связи между изменениями концентрации антиоксидантов и скоростью перексидного окисления [37]. На фоне высокой антиокислительной активности фиксируется повышенный уровень продуктов окисления. Такой же характер нарушения связи в системе регуляции перексидного окисления обнаруживается и при действии на крыс синтетического антиоксиданта — система отвечает повышением антиокислительной активности и одновременно усилением процесса перексидного окисления липидов.

При развитии атеросклероза на первой стадии болезни система регуляции работает в нормальном режиме. Введение больным на этой стадии антиоксидантов нормализует не только перексидное окисление, но и состав липидов. На третьей стадии процесса происходит разрыв связей в системе, и необходимо введение в организм больного по крайней мере двух различных препаратов, один из которых влияет на перексидное окисление липидов, а другой нормализует их состав [38].

Не останавливаясь на причинах специфических для разных болезней разрывов в системе регуляции, обратим лишь внимание на то, что сам факт изменения скорости перексидного окисления липидов — увеличение или уменьшение — не является специфичным для того или другого патологического состояния, поскольку практически во всех этих случаях наблюдается изменение скорости перексидного окисления. Специфичность проявляется лишь на уровне всей системы регуляции в целом.

Рассмотрим подход к подбору других лечебных препаратов на примере нейродегенеративного заболевания — болезни Альцгеймера, для регуляторной системы которой также выявлены разрывы связи. Относительно этиологии этой болезни имеются две основные точки зрения. Одна из них связана с дефицитом работы холинергической системы, поэтому для лечения необходимы холиномиметики, а также ингибиторы ацетилхолинэстеразы [39]. Но многие исследователи считают, что основной причиной болезни или важной составляющей гибели нейронов при этом является чрезмерное развитие окислительного стресса, поэтому для лечения следует использовать биоантиоксиданты. Разделяя эту точку зрения, мы изучили роль биоантиоксидантов и свободнорадикальных механизмов в развитии болезни Альцгеймера, а именно, определили изменения в регуляторной системе и рассмотрели, как связаны между собой ее параметры.

Обнаружено увеличение количества продуктов перексидного окисления липидов в мембранах мозга, а также эритроцитов, тромбоцитов и других клеток как в экспериментах *in vitro*, моделирующих те или иные стороны болезни Альцгеймера, так и непосредственно у людей, страдающих деменцией альцгеймеровского типа. Обнаружено, что взаимосвязь между количеством продуктов перексидного окисления у пациентов с болезнью Альцгеймера и изменением состава липидов отличается от нормы [40]: на фоне усиления процесса перексидного окисления липидов они обогащаются не более резистентными к окислению фракциями, а напротив, более легко окисляемыми.

Результаты определения содержания двойных связей в липидах эритроцитов больных болезнью Альцгеймера показывают, что изменение состава липидов может выражаться не только в изменении соотношения фосфолипиды/холестерин или соотношения отдельных фракций фосфолипидов, но и в изменении степени ненасыщенности липидов. Следствием увеличения количества двойных связей, обнаруженных в липидах крови и эритроцитов больных, является снижение вязкостных свойств липидов (данные экспериментов со спиновыми зондами). Таким образом, разрыв связи происходит в звене «пероксидные соединения—окисляемость» и одновременно в звене «пероксидные соединения—текучесть липидов мембран» [41].

При развитии окислительного стресса липиды должны быть обогащены насыщенными соединениями, для которых ниже окисляемость и выше вязкость. С точки зрения лечения возникает дилемма: введение антиоксидантов может еще больше увеличить текучесть липидов, что приведет к большему разрыву связи между текучестью и активностью мембранных белков, а использование веществ, увеличивающих жесткость, «ригидность» мембран, повысит дефицитность холинергической системы. Для нахождения выхода из этого положения нами были синтезированы «гибридные» соединения, содержащие части, ответственные за ингибирование ацетилхолинэстеразы и антиоксидантную активность и способные локализоваться в мембранах [42]. Именно такие соединения в определенных дозах проявляют нормализующий эффект.

Изучение не отдельных изменений в системе регуляции, а состояния всей системы в целом, позволяет определить, когда можно обойтись монотерапией — антиоксидантами, а когда требуется комплексная терапия, т.е. помимо антиоксидантов для лечения необходимы другие биологически активные вещества. В определенной степени это требование может быть удовлетворено применением «гибридных» молекул.

Одними из наиболее перспективных синтетических биоантиоксидантов являются гибридные соединения, сочетающие антиоксидантную активность с другой функциональной активностью [43]. К такому типу относятся так называемые поплавковые соединения, синтезированные на базе кватернизованных производных диалкиламиноалкилзамещенных 2,4- и 2,6-ди-*трет*-бутилфенолов и диалкиламиноалкиловых эфиров фенозана. Для подобных соединений обнаружен широкий спектр биологической активности — антимикробная, антивирусная, анальгетическая и др. Установлено также, что ступенчатые окислительно-восстановительные и сольволитические превращения приводят к каскаду интермедиатов, обладающих различными видами собственной активности — антиоксидантной, хелатирующей, способностью к встраиванию в цепь передачи заряда и т.п. В каскадном механизме действия производных 2,4- и 2,6-ди-*трет*-бутилфенола большую роль играет их склонность к образованию гетероциклических соединений, также вносящих вклад в суммарную биологическую активность.

Другое важное направление, развивающееся в настоящее время — синтез гибридов функциональных ди-*трет*-бутилфенолов и биосовместимых биополимеров. На этом направлении возможно достижение

рекордной антиокислительной активности гибридных соединений с широкими вариациями гидрофобно-гидрофильных соотношений и особыми структурными характеристиками их в растворах [44].

Итак, представленный обзор работ по изучению биоантиоксидантов, проведенных в 1980—90-х годах, показывает, что в данный период значительно расширилась тематика исследований. Это функциональные возможности антиоксидантов в лечении нового спектра заболеваний, кинетические характеристики стадий реакции ингибированного окисления, специфические нарушения в связях между отдельными параметрами регуляторной системы, основанной на окислении липидов, синтез и испытания экспериментальные и в клинике гибридных антиоксидантных соединений.

Новое направление в исследовании биоантиоксидантов. Эффект сверхмалых доз

Наиболее впечатляющее открытие, сделанное в середине 80-х годов прошлого столетия и касающееся новых путей влияния антиоксидантов, связано с обнаружением активности этих веществ в сверхмалых концентрациях, 10^{-12} — 10^{-13} М и ниже. Этот эффект был установлен для антиоксидантов различного происхождения и разной химической природы: для синтетических и природных антиоксидантов, для спиртов (токоферол), фенолов и оксипиридинов [46].

В 1983 г. сотрудники Института биохимической физики вместе с коллегами из Института психологии, изучая влияние антиоксидантов на электрическую активность изолированного нейрона виноградной улитки, получили весьма неожиданный результат. Первоначальная доза препарата (10^{-3} М) была не только активной для нейрона, но и довольно токсичной, поэтому пришлось перейти на менее концентрированный раствор. Доза на четыре порядка ниже первоначальной оказалась не только менее токсичной, но и более эффективной. Дальнейшее уменьшение концентрации привело к росту эффекта, он достигал максимума (при 10^{-15} М), затем (при 10^{-17} М) снижался до уровня, практически совпадающего с контрольным [46].

Дальнейшие исследования показали, что обнаруженный эффект проявляется по отношению к антиоксидантам различного строения и при воздействии широкого спектра факторов: противоопухолевых и антиметастатических агентов, радиозащитных препаратов, ингибиторов и стимуляторов роста растений, нейротропных препаратов разных классов, гормонов, адаптогенов, иммуномодуляторов, детоксикантов, а также физических факторов (ионизирующее и неионизирующее излучения) и др. Уровень биологической организации, на котором проявляется действие сверхмалых доз биологически активных веществ, также весьма разнообразен — от макромолекул, клеток, органов и тканей до животных, растительных организмов и даже популяций. Сказанное не означает, что эффект возникает при сверхмалых дозах любого биологически активного вещества на любом биологическом объекте. Мы хотим подчеркнуть, что получение эффекта при действии вещества в концентрациях 10^{-13} — 10^{-17} М и ниже нельзя связать с какой-то определенной структурой вещества или степенью биологической организации.

В проявлениях влияния на клеточный метаболизм сверхмалые дозы биологически активных веществ и физические факторы низкой интенсивности обнаруживают много общих черт, которые касаются как формальных признаков (дозовые зависимости), так и показателей биологической активности [47]. Природа этого феномена может быть связана с общностью критических мишеней, например, клеточных и субклеточных мембран, а также с особенностями кинетики реакций, в которых важную роль играют слабые взаимодействия. Для эффектов сверхмалых доз характерны следующие особенности:

- немонотонная, полимодальная зависимость «доза—эффект», в большинстве случаев максимумы активности наблюдаются в определенных интервалах доз, разделенных между собой так называемой мертвой зоной;

- изменение чувствительности биообъекта к действию разнообразных агентов как эндогенных, так и экзогенных, что приводит к явлениям синергизма и антагонизма;

- проявление кинетических парадоксов: возможность уловить эффект сверхмалых доз биологически активных веществ, когда в клетке или в организме имеется то же вещество в дозах на несколько порядков выше, а также влияние на рецептор вещества в дозах на порядки более низких, чем константы диссоциации комплекса лиганд-рецептор;

- зависимость «знака» эффекта от начальных характеристик объекта;

- «расслоение» свойств биологически активного вещества по мере уменьшения его дозы, при которой еще сохраняется активность, но исчезают побочные эффекты.

Общие закономерности действия сверхмалых доз антиоксидантов наиболее ярко проявляются при изучении зависимости «доза—эффект». В ряде случаев эта зависимость бимодальная: эффект возрастает при сверхмалых дозах препарата, достигает максимума, а затем, по мере увеличения дозы, уменьшается, сменяется «мертвой зоной» и далее вновь усиливается. Иногда в дозовой зависимости обнаруживается стадия «перемены знака» эффекта. Так, в области сверхнизких доз ингибирующая активность по мере роста концентрации меняется на стимулирующую, а затем вновь проявляется ингибирующий эффект. Например, препарат фенозан К может взаимодействовать с радикалами липидов в концентрации 10^{-6} М и выше, а в концентрационной области 10^{-7} — 10^{-9} М его прямая реакция с радикалами $\cdot\text{RO}_2$ практически отсутствует.

Следующая особенность — изменение чувствительности (как правило увеличение) биообъекта к действию разнообразных факторов после введения веществ в сверхмалых дозах — также является универсальной. На этом основано получение, например, таких эффектов, как синергизм при действии двух противоопухолевых агентов, один из которых вводится в сверхмалой дозе [48], и повышение активности выше аддитивной для гербицидных препаратов, когда один из них применяется в сверхмалой дозе [49].

Относительно другого свойства — «знака» эффекта, известно, что направленность эффекта зависит от начальных характеристик биообъекта. Например, в случае изолированных нейронов с разными потенциа-

лами действия влияние антиоксиданта в сверхмалой дозе таково: потенциал уменьшается, если первоначально он был высоким, и увеличивается при низком начальном потенциале [45]. Аналогичные результаты получены при изучении влияния антиоксидантов на мембраны эритроцитов с разной антиокислительной активностью липидов [45].

Чтобы понять, как действуют сверхмалые дозы препаратов на биообъекты, нужно в первую очередь объяснить с кинетической точки зрения саму возможность реакций для столь малого количества молекул со своими мишенями. При концентрации 10^{-15} М и ниже перестает работать закон действующих масс и в определенной степени теряется смысл самого понятия «концентрация» [50].

Л.А. Блюменфельд [51] высказал идею о параметрическом резонансе как о возможном механизме действия сверхнизких концентраций биологически активных веществ на клеточном и субклеточном уровнях. Он полагает, что в результате связывания активного вещества с его мишенью фермент (рецептор) переходит в конформационно неравновесное состояние, которое на определенной стадии релаксации обеспечивает его максимальную активность. В рамках этих представлений находит свое объяснение и наблюдаемое уменьшение активности фермента при возрастании дозы действующего вещества.

Мы предложили другой подход к объяснению кинетических парадоксов, основанный на представлениях об аллостерическом взаимодействии каталитических центров в молекуле фермента [52].

В статье [53] приведен ряд гипотез, трактующих механизм усиления биологического сигнала от воздействия сверхмалых доз. Для реализации эффекта сверхмалых доз необходимы по крайней мере четыре рецепторные или сопряженные с рецепторами системы: каскадные системы, амплифицирующие (усиливающие) сигнал; собирательные, конвергентные системы; накопители и транспортеры сигнальных молекул; супераффинные рецепторы. В работе [54] предлагается адаптационный механизм, согласно которому эффекты малых доз объясняются аналогично объяснению эффекта хемотаксиса — изменение ответа биообъекта определяется не самой концентрацией биологически активного вещества, а градиентом концентраций в пространстве и во времени. На наш взгляд, основную трудность в построении этих гипотез представляет объяснение начального акта взаимодействия единичных молекул с биомишенями. Мы обнаружили, что всякий раз при введении сверхмалых доз биологически активного вещества в организм животного, клеточную культуру или в модельную систему, содержащую суспензию мембран, происходит изменение структурных характеристик мембран. В свою очередь изменения структуры мембран могут приводить к изменению функционального состояния клетки, а наличие полимодальности в ответе можно объяснить сменой механизма действия вещества на структуру мембраны в том или ином концентрационном интервале. Но как объяснить первичный акт взаимодействия биологически активного вещества в сверхмалой дозе с белком или липидом мембраны, если отношение числа молекул этого вещества к числу молекул белка равно $1 : 10^6$ — 10^9 ?

Эффекты действия сверхмалых доз антиоксидантов на активность ферментов

Фермент	Антиоксидант	Концентрация, М	Эффект	Соотношение молекул антиоксиданта и фермента
Протеинкиназа С из мозга крысы	α -Токоферол	10^{-4} — 10^{-5} 10^{-14}	Ингибирующий То же	1 : 2400
Протеинкиназа С (гладкомышечные клетки аорты крысы)	Фенозан К	10^{-5} — 10^{-7} 10^{-17}	Активирующий То же	1 : 10^4
Протеинкиназа С (опухолевые клетки остеосаркомы человека)	Фенозан К	10^{-4} — 10^{-5} 10^{-18}	Активирующий То же	1 : 10^4
Ацетилхолинэстераза	Фенозан К	10^{-9} 10^{-15}	Ингибирующий То же	1 : (10^4 — 10^5)

В табл. 2 приведены результаты изучения влияния антиоксидантов в сверхмалых дозах на активность изолированных ферментов и ферментов в составе клеток [47].

Фенозан К и α -токоферол действуют однотипно и в «обычных» концентрациях (10^{-3} — 10^{-5} М), и в сверхмалых (10^{-9} — 10^{-18} М). Если α -токоферол выступает как ингибитор протеинкиназы С в концентрации 10^{-4} М, то он ингибирует активность этого фермента и в концентрации 10^{-14} М. Фенозан К работает как активатор протеинкиназы С в концентрациях 10^{-5} — 10^{-6} М и 10^{-18} М. В отношении ацетилхолинэстеразы этот лиганд действует как ингибитор в концентрации 10^{-4} — 10^{-5} М, и он же ингибитор фермента в концентрации 10^{-13} — 10^{-14} М.

Из этих данных напрашивается вывод относительно общности механизмов действия лигандов на активность ферментов в «обычных» и в сверхмалых дозах. Однако полученные результаты не могут быть объяснены с позиции классической биохимии. Чрезвычайно низкое молекулярное соотношение лиганд : фермент (одна молекула лиганда на 10^4 — 10^9 молекул фермента) исключает объяснение природы эффекта сверхмалых доз тем, что образуется комплекс лиганд-фермент. Биохимические механизмы усиления ответной реакции, например, через системы регуляции циклическим нуклеотидом, через фосфоинозитидный цикл, применимые к эффектам на клеточном уровне, не могут быть использованы для объяснения эффектов в модельных системах.

Естественно возникает мысль, что биологически активные вещества в концентрациях 10^{-11} — 10^{-18} М могут реализовывать другие механизмы воздействия на активность ферментов. Для проверки такого предположения нами изучались биохимические изменения в организме животного после внутрибрюшинного введения антиоксиданта фенозана в сверхмалой дозе 10^{-14} М и в обычно употребляемой дозе 10^{-4} М. Как оказалось, масштаб изменений и их направленность практически одинаковы при действии доз, различающихся в 10^{10} раз. Показателен также результат изучения влияния на экспрессию гена р53 антиоксиданта в концентрациях 10^{-14} и 10^{-3} М. Несмотря на разную

временную зависимость, характер изменения экспрессии гена был один и тот же. Следовательно, попытки объяснить проявление близких эффектов при действии «обычных» и сверхмалых доз с позиции различных биохимических механизмов и мишеней нельзя признать состоятельными.

У многих исследователей возникает желание объяснить наблюдаемые эффекты с точки зрения представления о влиянии антиоксидантов в сверхмалых концентрациях на структурные характеристики воды [55]. Однако экспериментальных доказательств этих моделей явно недостаточно и, главное, нет опытных данных, свидетельствующих о долговременности существования структурных кластеров воды. Вместе с тем нельзя не признать, что многие парадоксы сверхмалых концентраций весьма логично разрешаются в рамках представлений об изменении структуры воды. Например, поддается объяснению тот факт, что знак и направление эффекта зависят в ряде случаев от начальных свойств биообъекта: если у фермента высокая активность — она снижается под действием антиоксиданта, если низкая — повышается, причем в обоих случаях уровни, до которых изменяется активность, близки. Это легко объясняется тем, что в растворе биологически активного вещества, например антиоксиданта, структура воды изменяет структуру как более, так и менее активного вещества одинаковым образом.

Перестает быть также парадоксом эффект воздействия на биомишень веществ, когда их концентрация на много порядков ниже константы диссоциации лиганд-рецепторного комплекса или концентрации белка.

Несмотря на то, что еще остается много неясностей, особенно по вопросам механизмов биологической активности антиоксидантов в сверхмалых дозах, новое направление в изучении и применении антиоксидантов обещает большие перспективы в практическом плане.

В качестве примера остановимся на двух аспектах применения антиоксидантов в сверхмалых дозах. Первый пример — это применение антиоксидантов в качестве экпротекторов для защиты от низкоинтенсивного излучения. Хорошо известно, что классические

радиопротекторы в обычно применяемых дозах не проявляют защитного действия при низкоинтенсивном хроническом облучении. Это связано как с ограничением их применения из-за токсичности радиопротекторов, которые необходимо вводить длительное время, так и с тем, что низкоинтенсивное излучение имеет, по всей видимости, другой механизм действия, чем в случае высоких радиационных доз.

Однако эти подходы страдают некоторой неопределенностью по поводу количества находящихся в пищевых добавках биоантиоксидантов. Кроме того, часто неизвестно, каким образом влияют друг на друга компоненты в смеси. В экспериментах с использованием синтетического антиоксиданта из класса экранированных фенолов мы исследовали показатели перекисного окисления липидов мозга, печени, элементов крови, состава липидов, активности мембраносвязанных ферментов — ацетилхолинэстеразы, цитозольных ферментов — альдолазы и лактатдегидрогеназы, структурных характеристик мембран. Было обнаружено, что однократное и многократное их введение (профилактическое или после облучения) задерживают изменения в органах и тканях, вызванные действием низкоинтенсивного излучения в малых дозах. Это делает весьма заманчивым использование этого антиоксиданта в сверхмалых дозах при самых разнообразных воздействиях [57], включая радиационное облучение.

Одним из самых перспективных направлений является применение антиоксидантов в сверхмалых дозах в геронтологии, а также в профилактике онкологических заболеваний. При изучении нами влияния фенозана в концентрациях 10^{-4} и 10^{-14} М на продолжительность жизни и скорость развития самопроизвольного лейкоза у мышей линии АКР обнаружено, что лейкоз у мышей развивается медленнее, а гибель животных с введенным антиоксидантом наступает в более поздние сроки, чем контрольных животных [58]. Сохранение активности при концентрациях антиоксиданта порядка 10^{-14} М и практически отсутствие побочных эффектов делает применение антиоксидантов в сверхмалых дозах в качестве антиканцерогенных препаратов весьма привлекательным.

Изучение кинетических характеристик антиоксидантов, как и в случае применения их в «обычных» дозах, позволяет прогнозировать их эффективность. Нами изучалась гербицидная активность четырех антиоксидантов с разными константами взаимодействия k_7 с радикалами и было показано, что во всех случаях наблюдается бимодальная зависимость эффекта от дозы. Величина первого (низкодозового) максимума возрастает с уменьшением k_7 , а величина «мертвой зоны» и второго (высокодозового) максимума, напротив, возрастает с увеличением k_7 .

Будущее антиоксидантов и новый всплеск интереса к ним связан, на наш взгляд, с установлением важной роли антиоксидантов в экспрессии генов, влияния их на стабильность генома. Предлагаются различные механизмы для объяснения влияния антиоксидантов на экспрессию генов. Но в большинстве случаев это объяснение сводится к представлению о важной роли изменения под действием антиоксидантов концентрации свободных радикалов, которым приписывается основная роль в регуляции активности генов.

Следует упомянуть еще два интересных направления, которые начали развиваться в ИБХФ РАН в последнее время. Первое направление — изучение антиоксидантных свойств у пахучих веществ (одорантов) и развитие способов лечения различных патологий с их помощью. Второе направление — изучение связей между системой регуляции антиоксидантами и системной регуляцией оксидом азота. Эти связи весьма разнообразны и посвященная данной проблеме литература весьма обширна. З.В. Куроптева, Л.М. Байдер с сотр. ИБХФ РАН выявили, что аскорбиновая кислота может влиять на синтез оксида азота, однако пока неясно — это свойство только аскорбиновой кислоты или же и других антиоксидантов.

Общее заключение изложенного материала сводится к констатации факта всеобщего признания важной роли биоантиоксидантов в нашей жизни и широких, может быть еще не до конца изученных, перспектив в будущем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тарусов Б.Н. Основы биологического действия радиоактивных излучений. М.: Медгиз, 1954, 140 с.
2. Бурлакова Е.Б., Дзантиев Б.Г., Сергеев Г.Б., Эмануэль Н.М. Тез. докл. конференции «Биохимические и физико-химические основы биологического действия радиации». М.: Изд-во МГУ, 1957, с. 10.
3. Эмануэль Н.М. Тр. Моск. об-ва испыт. природы. М.: Наука, 1963, с. 73.
4. Эмануэль Н.М., Бурлакова Е.Б., Круглякова К.Е., Сапежинский И.И. Изв. АН СССР, сер. биол., 1965, № 2, с. 183.
5. Эмануэль Н.М., Липчина Л.П. Докл. АН СССР, 1958, т. 121, с. 141.
6. Еришов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. Пространственно-затрудненные фенолы. М.: Химия, 1972, 351 с.
7. Смирнов Л.Д., Шолina С.И. и др. Изв. АН СССР, сер. хим., 1963, № 5, с. 890.
8. Бурлакова Е.Б., Гаинцева В.Д., Слепухина Л.В., Храпова Н.Г., Эмануэль Н.М. Докл. АН СССР, 1964, т. 155, с. 1398.
9. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г., Ядыкин Г.И. Биофизика, 1971, т. 16, вып. 2, с. 201.
10. Бурлакова Е.Б., Буробина С.А., Храпова Н.Г., Ядыкин Г.И. Там же, 1971, т. 16, вып. 1, с. 39.
11. Сапежинский И.И. Биополимеры: кинетика радиационных и фотохимических превращений. М.: Наука, 1988, 214 с.
12. Франкфурт О.С., Липчина Л.П., Бунто Т.В., Эмануэль Н.М. Бюл. эксперим. биол. и мед., 1967, № 8, с. 86.
13. Бурлакова Е.Б., Молочкина Е.М. Биофизика, 1968, т. 13, с. 443.
14. Бурлакова Е.Б., Буробина С.А., Храпова Н.Г. Докл. АН СССР, 1971, т. 200, с. 461.
15. Бурлакова Е.Б., Молочкина Е.М. Вопр. онкол., 1974, т. 20, с. 62.
16. Эмануэль Н.М., Дронова Л.М., Коновалова Н.П. Докл. АН СССР, 1963, т. 152, № 2, с. 481.
17. Бурлакова Е.Б., Пальмина Н.П. Вопр. онкологии, 1990, № 10, с. 1155.
18. Пальмина Н.П., Бурлакова Е.Б. Вестн. АМН СССР, 1985, № 1, с. 91.

19. Эмануэль Н.М., Круглякова К.Е., Николаева Н.В., Захарова Н.А. Докл. АН СССР, 1964, т. 157, № 4, с. 935.
20. Emaniuel N.M., Obukhova L.K. Exp. Gerontol., 1979, v. 13, p. 25.
21. Алесенко А.В., Соколова И.С., Кукушкина Г.В., Бурлакова Е.Б., Горбачева Л.Б. Докл. АН СССР, 1989, т. 254, вып. 6, № 6, с. 1472.
22. Alesenko A.V., Burlakova E.B. Bioelectrochemistry, 2002, v. 58, p. 13.
23. Бурлакова Е.Б., Голощанов А.Н. Биофизика, 1975, т. 10, вып. 5, с. 816.
24. Burlakova E.B., Dzhalaybova M.I., Molochkina E.M., Khokhlov A.P. Biophysical and Biochemical Information Transfer in Recognition and Aging, 1979, p. 1583.
25. Архипова Г.В., Бурлакова Е.Б., Семюхина А.Ф., Федотова И.Б., Крушинский Л.В. Докл. АН СССР, 1981, т. 256, № 3, с. 746.
26. Крашаков С.А., Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. Биол. мембраны, 1998, т. 12, № 2, с. 173.
27. Бурлакова Е.Б., Крашаков С.А., Храпова Н.Г. Кинетические особенности токоферолов как антиоксидантов. М.: Наука, 1988, 247 с. 12
28. Кухтина Е.Н., Храпова Н.Г., Бурлакова Е.Б., Сарычева И.К., Евстигнеева Р.П. Докл. АН СССР, 1983, т. 272, № 3, с. 729.
29. Сапежинский И.И., Гудкова Н.А., Донцова Е.Г. Биофизика, 1980, т. 25, с. 30.
30. Сторожок Н.М., Гуреева Н.В., Крысий А.П., Борисенко В.Е., Русина И.Ф., Храпова Н.Г., Бурлакова Е.Б. Кинетика и катализ, 2004, т. 45, № 3, с. 1.
31. Pobedimskii D. G., Burlakova E.B. In: Mechanism of Antioxidant Action in Living Organisms, in Atmospheric Oxidation and Antioxidants. Ed. J. Scott. 1993, v. 3, № 9, p. 223.
32. Fridovich I. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1983, v. 23, p. 239.
33. Храпова Н.Г. Биофизика, 1977, т. 22, № 3, с. 436.
34. Бурлакова Е.Б. Тез. IV МБФК, 1972, М. с. 67.
35. Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л. Докл. АН СССР, 1983, т. 269, № 5, с. 1256.
36. Бурлакова Е.Б., Джалайбова М.И., Кобляков В.А., Коляда А.Ю., Молочкина Е.М. Там же, 1978, т. 241, с. 477.
37. Чернявская Л.И., Архипова Г.В., Бурлакова Е.Б. Нейрохимия, 1989, т. 8, с. 249.
38. Калмыкова В.И., Бурлакова Е.Б. Совет. медицина, 1982, т. 4, с. 3.
39. Гаврилова С.А. Психиатрия и психофармакология, 2001, т. 31, № 2, с. 1—9.
40. Брагинская Ф.И., Зорина О.М., Пальмина Н.П., Гаинцева В.Д., Бурлакова Е.Б., Селезнева Н.Д., Колыхалов И.В., Гаврилова С.А. Ж. неврологии и психиатрии, 2000, т. 100, № 6, с. 29—32.
41. Бурлакова Е.Б. Матер. III рос. конф. «Болезнь Альцгеймера и старение», 23—24 апреля 2003, с. 36.
42. Брагинская Ф.И., Зорина О.М., Молочкина Е.М., Бурлакова Е.Б. Изв. АН, сер. биол., 1992, № 5, с. 690—698.
43. Никифоров Г.А., Белостоцкая И.С., Вольева В.Б., Комиссарова Н.Л., Горбунов Д.Б. Научн. вест. Тюменск. мед. акад., 2003, т. 1, с. 50.
44. Бурлакова Е.Б., Молочкина Е.М., Голощанов А.Н. и др. Тез. конф. «Фундаментальные науки — медицине», 10—11 декабря 2003, с. 15.
45. Бурлакова Е.Б. Вестник РАН, 1994, т. 64, № 5, с. 425.
46. Бурлакова Е.Б., Греченко Т.Н., Соколов Е.Н., Терехова С.Ф. Биофизика, 1986, т. 34, № 5, с. 921.
47. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Химическая физика, 2003, т. 22, № 2, с. 21—40.
48. Крутова Т.В., Островская Л.А., Рыкова В.А., Корман Д.Б. Изв. АН, сер. биол., 1994, № 5, с. 738.
49. Бурлакова Е.Б., Богатыренко Т.Н., Конрадов А.А. Тез. X Межд. конф. «Химия органических и элементоорганических пероксидов». М., 1998, с. 130.
50. Blumenfeld L.A., Grosberg A.Yu., Tikhonov A.N. J. Chem. Phys., 1991, v. 95, № 10, p. 7541.
51. Блюменфельд Л.А. Биофизика, 1993, № 1, с. 129.
52. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Худяков И.В. Изв. АН СССР, сер. биол., 1990, № 2, с. 184.
53. Ашмарин И.П., Каразеева Е.П., Лелекова Т.В. Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 1999, № 5, с. 21.
54. Зайцев С.В., Ефанов А.М., Сазанов Л.А. Там же, 1999, № 5, с. 28.
55. Lobyshev V.I., Shikhliinskaya R.E., Ryzikov B.D. J. Mol. Liquids, 1999, v. 82, p. 73.
56. Radiobiological Disasters: Consequences of Accidents at Nuclear Power Stations. Ed. E.B. Burlakova. Nova Science Publishers, Inc., USA, 1995.
57. Radiation and Homeostasis. Eds. T. Sugahara, O. Nikaido, O. Niwa. Amsterdam: Elsevier, The Netherlands, 2002, p. 387.
58. Бурлакова Е.Б., Жижина Г.П. и др. Материалы конференции «Фундаментальные науки — медицине», ноябрь 2004, с. 25.