

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

О.И.Доценко, Е.О.Драгущенко

Введение. В настоящее время не вызывает сомнений, что процессы свободнорадикального окисления (СРО) играют чрезвычайно важную роль в жизнедеятельности клеток, так как с одной стороны, реакции СРО являются необходимым этапом различных метаболических процессов, а с другой стороны, повышенная интенсивность СРО во многих случаях является либо следствием, либо причиной тех или иных патологических изменений в клетках и тканях. В качестве примеров патологических состояний, развитие которых тесно связано со СРО, можно привести ревматические заболевания, атеросклероз, осложнения сахарного диабета (кардиомиопатия, нефропатия, ретинопатия), амиотрофический боковой склероз, катаракту. На сегодняшний день накоплен обширный фактический материал о взаимосвязи функциональной активности антиоксидантной системы (АОС) с интенсивностью СРО в физиологических условиях и при патологии. Это существенно приблизило нас к пониманию, каким образом протекают и регулируются процессы СРО в живых организмах.

Для изучения механизма функционирования ферментов АОС защиты клетки, а также влияния антиоксидантов прямого действия на процессы СРО могут быть использованы относительно простые и доступные биохимические тест-системы. При исследовании отдельных звеньев процесса СРО и компонентов АОС *in vitro* предлагается [1,2] использовать модельные системы из 3-х составных частей (модулей): химической системы генерации активных форм кислорода (АФК) (или АФК и продуктов СРО); компонентов селективной элиминации определенных АФК или продуктов СРО и системы индикации. Использование модельной системы позволяет более тщательно изучить отдельные стадии СРО и взаимодействие тех или иных компонентов клетки с различными АФК и продуктами СРО. Такая модульная структура позволяет за счет использования различных сочетаний определенных отдельных составляющих частей создать систему, приспособленную для изучения практически любой реакции СРО, действия определенного вида АФК или функционирования конкретного компонента АОС.

Изучение свойств ферментов и в первую очередь ферментов системы антиоксидантной защиты в условиях метаболической адаптации организма к изменяющимся условиям внешней среды составляет важнейшую проблему современной молекулярной биологии и медицины. Адаптационные возможности организма в ответ на действие неблагоприятных факторов среды в значительной мере зависят от неспецифических реакций красной крови. Самая многочисленная и быстро изменяющаяся популяция красных клеток – эритроцитов обладает мощной антиоксидантной системой, способной прерывать развитие свободнорадикального окисления [3].

В последние несколько лет появились данные, позволяющие обоснованно предполагать вовлеченность ионов Cu^{2+} в процессы СРО: с одной стороны, существенная часть меди в клетках находится в виде связанной с белками меди (I), с другой стороны, различные вещества, включая естественные метаболиты, оказались способны высвобождать катионы меди из комплексов с белками. Таким образом, медь сейчас вновь рассматривается как возможный естественный стимулятор ПОЛ *in vivo*, роль которого особенно важна при некоторых патологиях человека [4–6]. Свободные радикалы, генерируемые ионами меди в присутствии аскорбиновой кислоты, вызывают модификацию белков и аминокислот, снижают активность многих ферментов [7, 8], играют немаловажную роль в патогенезе сахарного диабета (СД) и диабетических ангиопатий [9]. Известно, что у больных СД отмечается значительное повышение уровня дегидроаскорбиновой кислоты и ионов Cu^{2+} в плазме и особенно эритроцитах. Таким образом, существует вероятность, что аскорбиновая кислота и ионы Cu^{2+} влияют на окислительный стресс при диабете. В связи с этим, большое количество научных публикаций посвящено поиску лекарственных препаратов для комплексной терапии СД, которые наряду с фармакологической активностью обладали бы антиоксидантным действием.

В связи с вышесказанным, **цель работы** состояла в изучении функционирования глутатионзависимой ферментной системы эритроцитов в условиях окислительного стресса, вызванного совместным присутствием ионов меди и аскорбиновой кислоты. С патобиохимических позиций увеличенное функционирование системы глутатиона противостоит оксидативному стрессу, защищает от АФК и продуктов перекисидации, позволяет в определенной степени восстановить равновесие и улучшить редокс-регуляцию клетки.

Материалы и методы исследований. В работе использована периферическая кровь практически здоровых доноров одного пола и примерно одного возраста. Эритроциты трижды отмывали центрифугированием с Na-фосфатным буфером (0,015 моль, рН 7,4), содержащем 0,15 моль NaCl. Отмытые от плазмы и упакован-

ные эритроциты ресуспендировали в этом же буфере. Эритроциты инкубировали в течение 5-ти часов при 25°C в окислительных средах следующего состава: среда 1 – аскорбиновая кислота (AscH) $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, Cu^{2+} $-5,3 \cdot 10^{-6}$ моль/л, Na-фосфатный буфер (0,015 моль, 0,15 моль NaCl, pH 7,4); среда 2 кроме компонентов среды 1 содержала о-фенантролин (o-phen) в концентрации $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Количество эритроцитов в среде инкубирования поддерживали на уровне, соответствующему содержанию гемоглобина 2,1-2,6 мг/мл. Через определенные временные интервалы пробы отмывали центрифугированием с Na-фосфатным буфером (pH 7,4), после чего отмывые эритроциты ресуспендировали в исходном объеме буфера 1.

Активность ферментов системы глутатиона и содержание восстановленного глутатиона (GSH) определяли в гемолизатах эритроцитов. Для получения гемолизатов к 0,5 мл суспензии отмывтых от окислительной среды эритроцитов добавляли 0,5 мл 0,01% раствора сапонина в 0,01 М Na-K-фосфатном буфере (pH 7,4). Гемолиз проводили на холоду в течение 10 мин. В качестве контроля использовали активности ферментов и уровень GSH, определенные для эритроцитов, внесенных в тот же объем, что и в экспериментальных точках, буфера.

Общую активность глутатионредуктазы (ГР) (КФ 1.6.4.2) изучали методом J. Carlberg в модификации [10]. Принцип метода заключается в регистрации скорости окисления NADPH в присутствии окисленного глутатиона (GSSG) при 340 нм. Одновременно регистрировали скорость окисления NADPH в отсутствие GSSG, что позволяет учесть количество NADPH, окисляемое NADPH-оксидазой. Активность ГР выражали в мкмольх NADPH в 1 мин на мг Hb, с использованием коэффициента молярной экстинкции NADPH $6220 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Общую активность глутатион-S-трансферазы (Г-S-T) (КФ 2.5.1.18) определяли по методу W. H. Habig [11]. Принцип метода основан на ферментативном связывании восстановленного глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом с образованием — S-(2,4-динитрофенил)-глутатиона, имеющего максимум поглощения при длине волны 340 нм. Расчет активности ГТ осуществляли с использованием молярного коэффициента поглощения для образующегося продукта $9600 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Активность выражали в мкмоль/мин-мг Hb.

Активность глутатионпероксидазы (ГП) (КФ 1.11.1.9) определяли по скорости окисления восстановленного глутатиона (GSH) в присутствии H_2O_2 [12]. Количество GSH после остановки реакции определяли фотометрически (412 нм), используя цветную реакцию взаимодействия SH-групп с 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной) кислотой с образованием окрашенного продукта – тионитрофенильного аниона (ТНФА). Контрольная проба (для определения неферментативного окисления GSH в присутствии H_2O_2) отличалась от опытной тем, что вместо сыворотки в нее вносили равный объем дистиллированной воды. Количество неокисленного глутатиона в пробе определяли по калибровочной зависимости, построенной с использованием раствора глутатиона точно известной концентрации. Активность фермента выражали в мкмольх окисленного GSH на 1 мг Hb в мин.

Количество восстановленного глутатиона определяли по J. Sedlak et R. H. Lindsey [13]. Метод основан на реакции взаимодействия SH-групп с 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной) кислотой с образованием окрашенного продукта – тионитрофенильного аниона (ТНФА). Интенсивность окраски определялась спектрофотометрически при 412 нм. Содержание GSH в эритроцитах, выраженное в мкмоль/л на 1 мг Hb, рассчитывалось с использованием калибровочной зависимости, построенной для растворов GSH точно известной концентрации.

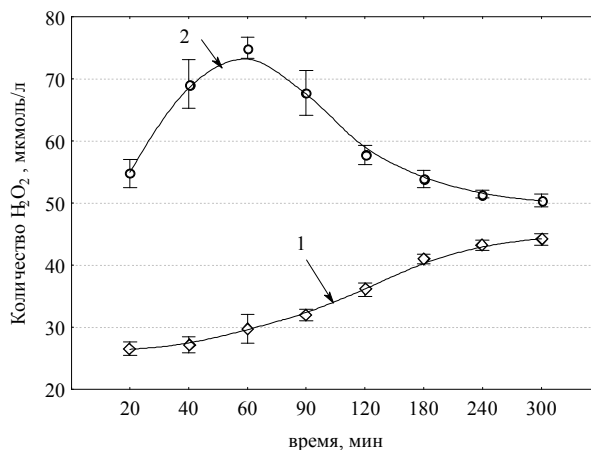
Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) (КФ 1.6.4.2.) определяли по скорости восстановления НАДФ до НАДФН, содержание которого регистрировали при длине волны 340 нм [14]. Активность Г6ФДГ выражали в мкмоль/л образующегося в мин НАДФН на 1 мг Hb, используя молярный коэффициент экстинкции, равный $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Количество H_2O_2 , образуемое в растворах, содержащих компоненты радикал-генерирующих систем (AscH – Cu^{2+} ; AscH – Cu^{2+} – o-phen) оценивали с помощью FOX-реактива [9].

Содержание гемоглобина в эритроцитах определяли гемиглобинцианидным унифицированным методом.

Каждое воздействие окислительной среды указанного выше состава исследовалось не менее чем в трех повторностях эксперимента. При построении зависимостей, приводимых ниже, использовались усредненные данные. Статистический анализ полученных результатов проводили в программе Statistica. Достоверность различий между среднегрупповыми показателями оценивали с помощью непараметрического рангового критерия Уилкоксона.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Динамика накопления H_2O_2 в системах, способных продуцировать активные формы кислорода (АФК), охарактеризована на рис. 1. Видно, что в системе Cu^{2+} – AscH содержание H_2O_2 увеличивается с течением времени и достигает $43,69 \pm 1,05$ мкмоль/л через 5 час от начала реакции.


 Рис. 1. Динаміка накоплення H_2O_2 в изучаемых системах:

 1- $AscH-1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $Cu^{2+}-5,3 \cdot 10^{-6}$ моль/л; 2- $AscH-1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $Cu^{2+}-5,3 \cdot 10^{-6}$ моль/л, о-фенантролин $-1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л

В системе 1 проокислительная роль $AscH$ описывается реакцией восстановления Cu^{2+} до Cu^+ в водной среде с константой скорости $3,5 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Ионы одновалентной меди могут вовлекаться в реакции Габера-Вейса и Фентона [15], приводящие к образованию АФК, в частности гидроксил-радикалов ($\cdot OH$). Причем нужно отметить, что константа скорости продукции АФК при взаимодействии ионов Cu^{2+} с H_2O_2 в реакции Фентона очень высокая $-4,7 \cdot 10^3 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ (для аналогичной системы с $Fe^{2+}-76 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) [2]. Далее Cu^+ окисляется до Cu^{2+} , который затем вновь восстанавливается аскорбиновой кислотой до Cu^+ . Образующаяся в ходе последней реакции дегидроаскорбиновая кислота также способна окислять Cu^+ до Cu^{2+} . Теоретически подобный цикл может продолжаться бесконечно, однако часть дегидроаскорбиновой кислоты необратимо трансформируется в 2,3-кетогулоновую кислоту и другие продукты окисления. Таким образом, система $Cu^{2+}-AscH$ достаточно эффективно генерирует активные формы кислорода (H_2O_2 , $\cdot OH$, $\cdot O_2$) в течение длительного промежутка времени.

Согласно общепринятому мнению, о-фенантролин, вводимый в среду 2, является проникающим через мембрану хелатирующим агентом. Связывая ионы Cu^{2+} , о-фенантролин транспортирует их через мембрану эритроцита, увеличивая концентрацию каталитически активных ионов меди внутри клетки [9]. Введение в систему $Cu^{2+}-AscH$ о-фенантролина в 2–2,5 раза увеличивает содержание H_2O_2 в системе в течение первого часа реакции по сравнению с системой $Cu^{2+}-AscH$. Затем продукция H_2O_2 снижается, однако остается выше, чем в системе $Cu^{2+}-AscH$. Известно, что о-фенантролин является хелатирующим лигандом и образует с ионами Cu^{2+} комплексные частицы состава $[Cu(o-phen)]^{2+}$ и $[Cu(o-phen)_2]^{2+}$. Показано, что в условиях избытка о-фенантролина и в присутствии аскорбата в качестве восстановителя ионы меди образуют преимущественно комплексы состава $[Cu(o-phen)_2]^{2+}$, обладающие уникальной способностью катализировать реакции окисления молекулярным кислородом [16]. Очевидно, что накопление H_2O_2 в системе $H_2A-Cu^{2+}-o-phen$ ускоряется наличием катализатора, а лимитируется количеством субстрата реакции, то есть аскорбиновой кислоты, что мы и регистрировали (рис. 1, зависимость 2).

Таким образом, окислительные системы 1 и 2 могут быть использованы в качестве модельных проокислительных систем и инициировать процессы СРО.

Характер изменения активностей ГП и Г-S-T в системе $Cu^{2+}-AscH$ показано на рис. 2, А, Б (зависимости 1).

Изменение активностей Г-S-T и ГП эритроцитов, инкубируемых в системе $AscH-Cu^{2+}$, имеет сходную динамику, с той разницей, что за 90 мин от начала эксперимента активность Г-S-T увеличивается в 1,6 раза относительно контроля, тогда как активность ГП увеличивается в 6 раз. Увеличение активностей Г-S-T и ГП очевидно следует рассматривать как адаптивный процесс, направленный на защиту клеточных структур и нормализацию процессов СРО. Полученные экспериментальные данные подтверждают тот факт, что ведущая роль в инактивации АФК, в частности, перекиси водорода, принадлежит глутатионпероксидазе.

За это же время происходит значительное падение содержания восстановленного глутатиона в клетке (рис. 3, А, зависимость 1). Поскольку в цитозоле основной мишенью для АФК являются белки, важную роль в защите от эндогенных АФК играют восстановленный глутатион (ГSH) и цистеин. SH-группы этих веществ окисляются гораздо легче, чем SH-группы в белковых молекулах, защищая тем самым белки от окислительной модификации. Кроме того, ГSH является субстратом для глутатионпероксидазы, активность которой максимальна. Через два часа от начала эксперимента АОС эритроцитов обнаруживает адаптивную перестройку, свидетельствующую об эффективности нейтрализации АФК, образующихся в системе.

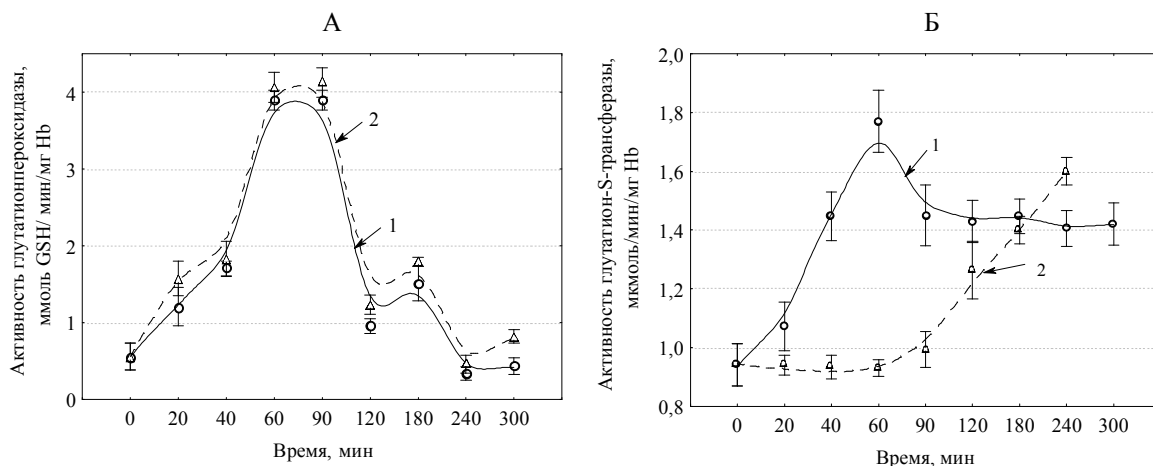


Рис. 2. Изменение активности ГП (А) и Г-S-T (Б) в изучаемых системах: 1- AscH – Cu²⁺; 2- AscH – Cu²⁺ – o-phen

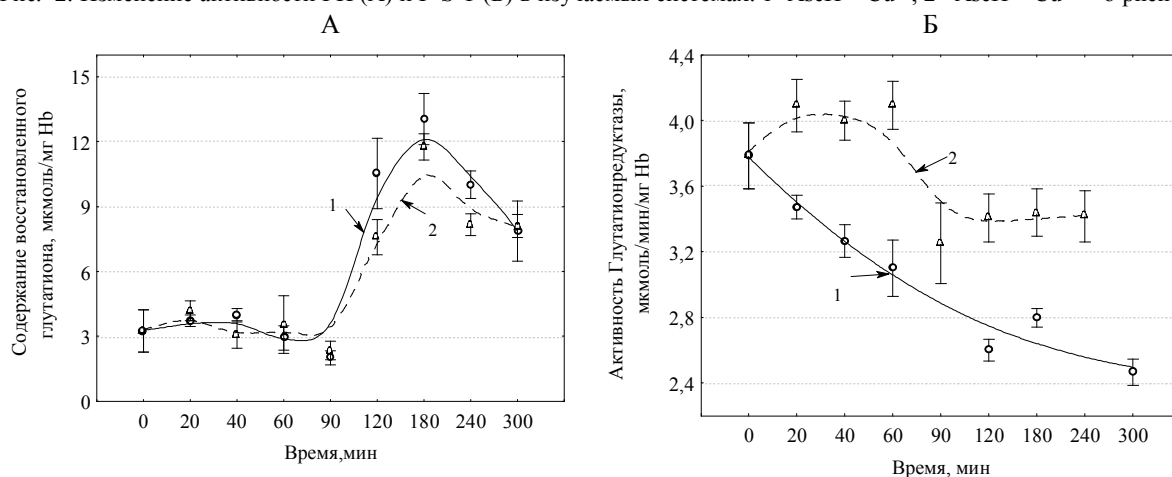


Рис. 3. Изменение содержания ГSH (А) и ГР (Б) в изучаемых системах: 1- AscH – Cu²⁺; 2- AscH – Cu²⁺ – o-phen

Этот процесс находит свое отражение в снижении активностей ГП (рис. 2, А, зависимость 1) до уровня контроля, Г-S-T – на 20% (рис. 2, Б, зависимость 1) и регенерации в системе восстановленного глутатиона (рис.3, А, зависимость 1). Однако через 3 ч от начала эксперимента содержание Г-SH в эритроцитах снова имеет тенденцию к снижению.

Характер изменения активности ГП в системе AscH – Cu²⁺ – o-phen такой же, как и в системе AscH – Cu²⁺. Достоверных отличий в изменении активности ГП эритроцитов, инкубируемых в окислительных средах разного состава, не выявлено ($p > 0,05$).

Активность Г-S-T эритроцитов, инкубируемых в среде AscH – Cu²⁺ – o-phen в течение 90 мин от начала эксперимента остается на уровне контроля, хотя и наблюдается тенденция к ее увеличению (рис. 2, Б, зависимость 2). Активность Г-S-T становится выше контрольного уровня через два часа и достигает максимального значения в конце эксперимента. Известно, что Г-S-T ндуцируется токсическими электрофильными метаболитами и повышение ее активности может свидетельствовать об увеличении содержания последних в клетке. В связи с этим, очевидно, что система AscH – Cu²⁺ – o-phen обладает менее выраженными цитотоксическими свойствами, несмотря на высокую способность генерировать АФК в растворе.

По-другому реагирует на присутствие стресс-агентов ГР (рис. 3, А). Активность этого фермента для эритроцитов, инкубируемых в средах, различного состава, имеет тенденцию к снижению. Однако, если для эритроцитов, инкубируемых в среде 1 активность ГР постепенно снижается, то для эритроцитов, инкубируемых в среде 2, она удерживается на уровне контроля в течение 1 часа от начала эксперимента, а затем резко снижается; однако уровень активности ГР в системе 2 остается выше, чем в системе 1. Известно, что каталитическая активность ГР сильно зависит от состояния SH-групп [17], которые легко подвергаются окислительной модификации, однако, вполне вероятно, что этот фермент также инактивируется ионами Cu²⁺. Тогда, вполне объяснимо, наблюдаемое изменение активности ГР в системе 2, в которой ионы Cu²⁺ находятся в составе комплексов состава [Cu(o-phen)₂]²⁺.

Таким образом, наблюдаемое увеличение содержания ГSH в эритроцитах, максимум которого приходится на 3 часа от начала эксперимента, не может быть связано с глутатион-редуктазной реакцией,

т.к. активность ГР снижается. Фиксируемое же увеличение уровня восстановленного глутатиона при существующей тенденции снижения активности ГР, указывает на то, что наряду с ферментативным восстановлением окисленной формы глутатиона в восстановленную, в эритроцитах могут иметь место окислительно-восстановительные процессы без участия ферментов. Известно [17], что некоторая часть глутатиона внутри клеток обычно существует в связанном виде – в форме смешанных дисульфидов с белками (порядка 5 или даже 35 % всего ГSH). Таким образом, существуют внутриклеточные резервы, высвобождающиеся в условиях напряженного функционирования в экстремальных ситуациях и повышающие мощность глутатионовой антиоксидантной системы.

Полученные нами данные о поведении Г-S-T и ГР эритроцитов в среде, содержащей o-phen, позволяет заключить, что система $AscH-Cu^{2+}-o-phen$ (и скорее всего подобные системы, в состав которых входят другие хелатирующие агенты, например, витамин B_{12}) не способны генерировать окислительный процесс внутри клетки. Использование о-фенантролина в качестве хелатирующего агента во многих работах основано на устаревшем представлении о том, что о-фенантролин, и другие комплексообразователи, способны транспортировать ионы металлов в цитоплазму клеток, и генерировать АФК так, как в растворе. Вторая ошибка, базируется на том, что цитоплазма клетки по физическим свойствам не отличается от внеклеточной среды, поэтому реакции, которые могут иметь место в обычном растворе, также могут протекать внутри клетки, если все исходные компоненты туда будут доставлены. Но цитоплазма клетки – это гель, имеющий очень низкую растворимость для многих соединений, а вещества, которые бы имели качества транспортеров металлов внутрь клетки не найдены до сих пор [18]. Основываясь на данных, изложенных в [18], легко объяснить, почему более активная (с точки зрения способности генерировать АФК) система становится менее активной при внесении в нее эритроцитов. Сорбция $[Cu(o-phen)_2]^{2+}$ компонентами клетки приводит к тому, что этот комплекс теряет способность координировать молекулярный кислород и субстрат и тем самым генерировать АФК. Большой размер этого соединения вряд ли позволит ему попасть в клетку, даже при переходе цитоплазмы из геля в золь (как это описано для убаина [18]).

Самым важным антиоксидантным ферментом в эритроцитах является глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа – ключевой и скорость лимитирующий фермент пентозофосфатного пути окисления глюкозы. Роль этого фермента в метаболизме эритроцитов чрезвычайно велика, поскольку в ходе реакций, катализируемых Г6ФД, а также 6-фосфоглюконатдегидрогеназой, происходит образование НАДФН, необходимого для поддержания функциональной активности и целостности эритроцита. Огромная роль НАДФН в эритроцитах состоит в регенерации окисленного глутатиона. Снижение активности Г6ФД приводит к дефициту НАДФН и восстановленного глутатиона. В связи со сказанным выше, далее анализировался характер изменения активности Г6ФДГ в эритроцитах, инкубируемых в системах 1 и 2. Полученные экспериментальные данные отражены на рис.4.

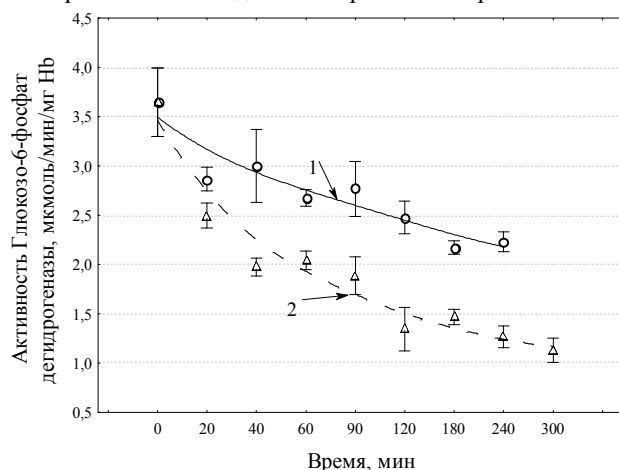


Рис. 4. Изменение активности Г6ФДГ в системах: 1– $AscH-Cu^{2+}$; 2– $AscH-Cu^{2+}-o-phen$. Видно, что в процессе инкубирования в окислительной среде, активность Г6ФДГ снижается, и в большей степени в системе, содержащей о-фенантролин

Определенный вклад в снижение активности фермента могут вносить посттрансляционные модификации белковой молекулы в результате окисления. К модификациям, вызываемым процессами СРО, относят агрегацию, полимеризацию и окисление свободных SH-групп. Однако следует учесть, что исследуемые системы не содержат глюкозы, поэтому активность Г6ФДГ снижается также из-за истощения клетки относительно глюкозо-6-фасфата. Таким образом, снижение активности Г6ФД приводит к дефициту НАДФН, что вызывает снижение активности ГР и содержания восстановленного глутатиона.

Выводы. 1. Развитие экстремального состояния в условиях окислительного стресса связано с повышением активностей глутатионпероксидазы, в меньшей степени глутатион-S- трансферазы и снижении уровня ГSH.

2. Кинетика окисления и восстановления глутатиона отражает момент включения компенсаторных механизмов в ответ на действие АФК.

3. В системах AscH – Cu²⁺ и AscH – Cu²⁺ – o-phen инактивируется фермент глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа. Последствиями инактивации этого фермента является падение НАДФН и снижение активности фермента глутатион-редуктазы.

5. Система AscH – Cu²⁺ имеет прооксидантные свойства, в то время как система AscH – Cu²⁺ – o-phen их теряет из-за сорбции комплекса [Cu(o-phen)₂]²⁺. В основе цитотоксичности системы AscH – Cu²⁺ – o-phen не лежит ее способность генерировать АФК внутри клетки.

РЕЗЮМЕ

Вивчено динаміку зміни активностей глутатионредуктази, глутатион-S-трансферази, глутатионпероксидази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази й відновленого глутатиону еритроцитів, що інкубуються протягом 5-ти годин у середовищах, що містять Asc – Cu²⁺ і Asc – Cu²⁺ – про-phen. Показано, що динаміка змін активностей ферментів системи глутатиона і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, а також змісту відновленого глутатиона відображує момент включення компенсаторних механізмів у відповідь на дію стрес-фактора.

SUMMARY

The dynamics of changing activities glutathione reductase, glutathion-S-transferase, glutathione peroxidase, gluco-6-phosphatdehydrogenase and reduced glutathione erythrocytes, incubated within 5 hours in the environments containing AscH – Cu²⁺ and AscH – Cu²⁺ – o-phen were studied. It is shown that dynamics of changes activities system enzymes glutathione, gluco-6-phosphatdehydrogenase, and also reduced glutathione reflects the moment of engaging in compensate mechanisms in reply to stress-factor action.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Клебанов Г.И. Антиоксидантная активность сыворотки крови / Г.И.Клебанов, Ю.О.Теселкин, И.В.Бабенкова и др. // Вестн. РАМН. – 1999. – №2. – С.15-22.
2. Halliwell B. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview / B.Halliwell, J.M.C.Gutteridge // Methods Enzymol. – 1990. – v.186. – P.1-85.
3. Кудряшов А.М. Влияние поллютантов с различными стресс- характеристиками на антиоксидантный статус эритроцитов in vitro / А.М.Кудряшов, Н.М.Титова, Е.В.Кудряшова // Экология человека. – 2005. – №1. – С.14-18.
4. Rae T.D. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase / T.D.Rae, P.J.Schmidt, R.A.Pufahl and al. // Science. – 1999. – V.284. – P.805-808.
5. Bush A.I. Metals and neuroscience / A.I.Bush // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2000. – V.4. – P.184-191.
6. Chauhan A. Increased copper-mediated oxidation of membrane phosphatidylethanolamine in autism / A.Chauhan, A.M.Sheikh, V.Chauhan // Am. J. Biochem. & Biotech. – 2008. – V. 4 (2). – P. 95-100.
7. Степуро И.И. Окислительные превращения тиамин, катализируемые ионами меди и аскорбиновой кислотой / И.И.Степуро, Т.П.Пилецкая, В.И.Степуро и др. // Биохимия. – 1997. – Т. 62. – Вып. 12. – С.1648-1654.
8. Ткачев С.В. Роль меди в свободнорадикальном окислении сывороточного альбумина человека и дипептида L-тирозина многокомпонентным металлсодержащим ксенобиотиком / С.В.Ткачев, А.А.Ушков // Бюл. эксп. биологии и медицины. – 2005. – Т. 140. – № 9. – С.291-293.
9. Ou P. Erythrocyte catalase inactivation (H₂O₂ production) by ascorbic acid and glucose in presence of aminotriazole: role of transition metals and relevance to diabetes / P.Ou, S.P.Wolf // Biochem. J. – 1994. – 303. – P. 935-940.
10. Юсупова Л.Б. О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов / Л.Б.Юсупова // Лаб. дело. – 1989. – № 4. – С.19-21.
11. Карпищенко А.И. Глутатионзависимая антиоксидантная система в некоторых тканях крыс в условиях острого отравления дихлорэтаном / А.И.Карпищенко, С.И.Глушков, В.В.Смирнов // Токсикологический вестник. – 1997. – № 3. – С.17-23.
12. Разыграев А.В. Определение глутатионпероксидазной активности в сыворотке крови человека с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты / А.В.Разыграев, А.В.Арутюнян // Клинич. лаб. диагностика. – 2006. – № 6. – С.13-16.
13. Sedlak J. Estimation of total protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent / J.Sedlak, R.H.Lindsey // Analyt. Biochem. – 1968. – V. 25, № 2. – P. 192-205.
14. Kirkman H.N. Regulation of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase in Human Erythrocytes / H.N.Kirkman, G.F.Gaetaniij // J. Biol. Chemistry, 1986. – Vol. 261, № 9. – P. 4033-4038.
15. Goldstein S. The Fenton reagents / S.Goldstein, D.Meyerstein, G.Czapski // Free Radical Biol. Med. – 1993. – Vol.15. – P.435-445.
16. Скибида И.П. Каталитические системы на основе комплексов Cu^I и Cu^{II} как модели оксигеназ в реакциях окисления молекулярным кислородом / И.П.Скибида, А.М.Сахаров // Рос. хим. журнал. – 1995. – № 1. – С.14-31.
17. Барабой В.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. Часть 1. / В.А.Барабой, Д.А.Сутковой – Киев: Наук. Думка, 1997. – 420 с.
18. Линг Г. Физическая теория живой клетки: незамеченная революция / Г.Линг. – СПб.: Наука, 2008. – 376 с.

Надійшла до редакції 16.09.2009 р.