

На правах рукописи



ХОЛОВА ШОИРА АЛИМАХМАДОВНА

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕКОТОРЫХ ПРИРОДНЫХ
ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ НА СВОЙСТВА И
НАДМОЛЕКУЛЯРНУЮ СТРУКТУРУ ХОЛЕСТЕРИНА
IN VITRO ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ**

02.00.04 – физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Душанбе – 2015

Работа выполнена в Государственном научно-исследовательском институте питания и в Физико-техническом институте им. С.У. Умарова Академии наук Республики Таджикистан

Научный руководитель:

Джураев Хисори Шарипович
кандидат химических наук

Официальные оппоненты:

Раджабов Умарали Раджабович
доктор химических наук, доцент,
зав. кафедрой фармацевтической и
токсикологической химии Таджикского
государственного медицинского
университета им. Абуали ибни Сино

Горшкова Раиса Михайловна
кандидат химических наук, доцент,
ведущий научный сотрудник Института
химии им. В.И. Никитина АН РТ

Ведущая организация:

Таджикский национальный университет,
кафедра физической и коллоидной химии

Защита состоится «___» _____ 2015 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 047.003.02 при Институте химии им. В.И. Никитина АН Республики Таджикистан по адресу: 734063, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2.
E-mail: gulchera@list.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института химии им. В.И. Никитина АН Республики Таджикистан и на сайте Института химии им. В.И. Никитина АН Республики Таджикистан www.chemistry.tj

Автореферат разослан «___» _____ 2015 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор химических наук, профессор



Абулхаев В.Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последние годы значительно возрос интерес к биохимическим и биофизическим свойствам жизненно важных субстантов. Одним из таких субстантов является холестерин (ХЛ), который играет особую роль в жизненных процессах, как животных, так и людей. С биохимико-физическим состоянием холестерина в организме связаны многие заболевания. К таким заболеваниям, в первую очередь, относятся: желчнокаменная болезнь, инфаркт миокарда, атеросклероз, которые являются весьма распространенной патологией среди людей.

Связь между повышенным уровнем холестерина плазмы крови и коронарным атеросклерозом была установлена более 100 лет назад, однако длительное время лечение гиперхолестеринемии было ограничено в основном не медикаментозными методами. Первые попытки фармакологической коррекции гиперхолестеринемии были предприняты в начале 50-х годов XX века, когда О. Поллак для снижения уровня ХЛ у человека применил растительные стеролы. Позднее в качестве средств, снижающих уровень ХЛ, использовали никотиновую кислоту, холестирамин, клофибрат, неомидин, трипаранол и эстрогены.

В настоящее время известно, что одним из основных факторов изменения физико-химического свойства крови и желчи человека является избыток холестерина в них. Избыток холестерина в организме приводит к нарушению мицеллярности состава крови и желчи. С увеличением холестерина в составе крови и желчи происходит уменьшение содержания фосфолипидов и ненасыщенных триглицеридов, что приводит к образованию липопротеидов низкой и очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП) и холестериновых бляшек в стенках кровеносных сосудов, а в жёлчном пузыре – образованию холестериновых камней. В то же время, несмотря на огромное количество работ, посвященных исследованию холестерина, многие вопросы до настоящего времени остаются неясными и неизученными. На сегодняшний день одним из актуальных вопросов остается поиск методов и способов устранения литогенных свойств крови и желчи, с целью предупреждения сердечно – сосудистых заболеваний и образования желчных камней. Известно, что многие клиники мира для разжижения крови как профилактическое средство при различных сердечно – сосудистых заболеваниях применяют ацетилсалициловую кислоту. По сей день практически не исследованным осталось и то, как влияют другие жизненно важные органические кислоты на биохимико-физическое состояние биообъектов, и, в первую очередь, на холестерин.

В настоящее время для изучения биологических объектов широко используется метод спиновых меток. Последние 20 лет благодаря фундаментальным работам зарубежных авторов метод спиновых меток стал одним из информативных методов в изучении биологических объектов. Первые экспериментальные работы по применению метода спиновых меток для исследований биологических объектов и биополимеров были выполнены профессором Г.И. Лихтенштейном и его сотрудниками в Российской Федерации, а также в лаборатории Х. Мак–Коннела в США. С тех пор этот метод нашел

широкое применение в различных областях молекулярной биологии, биохимии, медицины и т. д.

Указанные выше определило актуальность изучения данной проблемы и явилось основанием для проведения настоящей работы.

Цель работы. Исследование влияния некоторых природных органических кислот: аскорбиновой, янтарной, лимонной, ацетилсалициловой и хенодезоксихолевой на агрегатное состояние холестерина.

Задачи исследования. Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи:

- изучить изменение рН и показателей преломления в физиологическом растворе *in vitro* в зависимости от концентрации аскорбиновой, янтарной, лимонной и ацетилсалициловой кислот и их смесей;
- определить растворимость холестерина в зависимости от концентрации лимонной, янтарной и аскорбиновой кислот в условиях *in vitro*;
- исследовать систему CaCl_2 – холестерин – H_2O ;
- изучить влияние ацетилсалициловой, янтарной, лимонной, аскорбиновой и хенодезоксихолевой кислот на образование агрегатов холестерина методом спиновых меток *in vitro*.

Научная новизна работы. Впервые изучено изменение рН, показателя преломления и растворимости холестерина в среде жизненно важных органических кислот: аскорбиновой, янтарной, лимонной и ацетилсалициловой в условиях *in vitro*.

Методом спиновой метки впервые изучено влияние органических кислот на агрегатное состояние холестерина.

Установлено, что указанные органические кислоты по-разному влияют на молекулярную структуру холестерина.

Разработанный в работе экспериментальный подход по изучению надмолекулярной структуры холестерина может быть использован для изучения состояния холестерина в биологических мембранах при изменении этого состояния под действием физиологически активных веществ и при патологии.

Практическая ценность результатов исследования. Полученные данные об изменении рН и растворимости холестерина в различных концентрациях аскорбиновой, янтарной, лимонной и ацетилсалициловой кислот и в их смесях в физиологическом растворе позволили установить количественные критерии по использованию этих органических кислот при гипо – и гиперхолестеринемии. Установление природы влияния жизненно важных органических кислот (аскорбиновой, янтарной, лимонной, ацетилсалициловой и хенодезоксихолевой) на надмолекулярную структуру холестерина методом спиновой метки на приборе ЭПР *in vitro*. Результаты представляют интерес для специалистов, работающих в области биомедицины и молекулярной биологии.

Положения, выносимые на защиту:

- изменение рН, показателя преломления и растворимости холестерина в физиологическом растворе *in vitro* при различных концентрациях аскорбиновой, янтарной, лимонной и ацетилсалициловой кислот;
- исследование системы CaCl_2 – холестерин – H_2O ;

- результаты изучения образования молекулярных агрегатов холестерина в среде этанола методом нитроксильных спиновых меток;
- исследование влияния указанных природных органических кислот на агрегатное состояние холестерина в условиях *in vitro*.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на II-ой Республиканской научно – практической конференции «Здоровое питание – здоровая нация» (Душанбе, 2009); Международной научной конференции «Современные проблемы физики», посвященной Году образования и технического знания (Душанбе, 2010); Международной конференции по физике конденсированного состояния, посвященной 85 – летию академика А.А. Адхамова (Душанбе, 2013); 1st INTERNATIONAL SYMPOSIUM «Dushanbe Symposium on Computational Materials and Biological Sciences» (Dushanbe, 2014).

Публикация результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, включенных в список ВАК РФ.

Личный вклад автора в работы, включённые в диссертацию, заключается в теоретическом обосновании цели, положений и задач, в практическом их выполнении, в непосредственном участии на всех этапах исследования в проведении экспериментов, статистической обработке полученных результатов, написании и оформлении публикаций.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 165 наименований, изложена на 100 страницах компьютерного текста, включающего 18 рисунков и 9 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность проблемы, сформулирована цель и задачи исследования, показана научная новизна, практическая ценность полученных результатов исследования и приведены положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен аналитический обзор имеющихся литературных сведений об основных работах в области изучения влияния некоторых природных органических кислот на свойства и надмолекулярную структуру холестерина физико-химическими методами *in vitro*. Данная глава содержит химико-биологическую характеристику холестерина и природных органических кислот: аскорбиновая, лимонная, янтарная и ацетилсалициловая, а также сведения об использовании метода спиновых меток при исследовании биологических объектов.

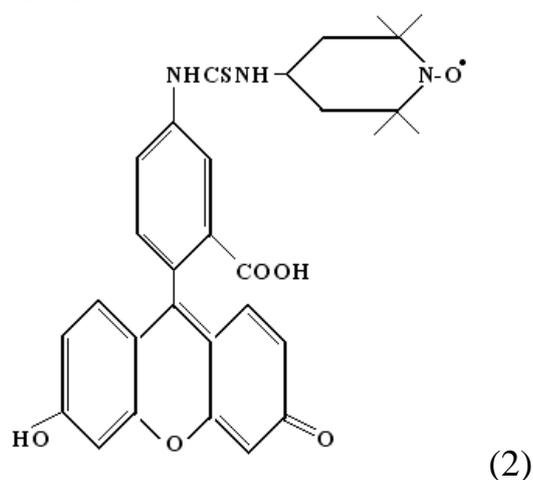
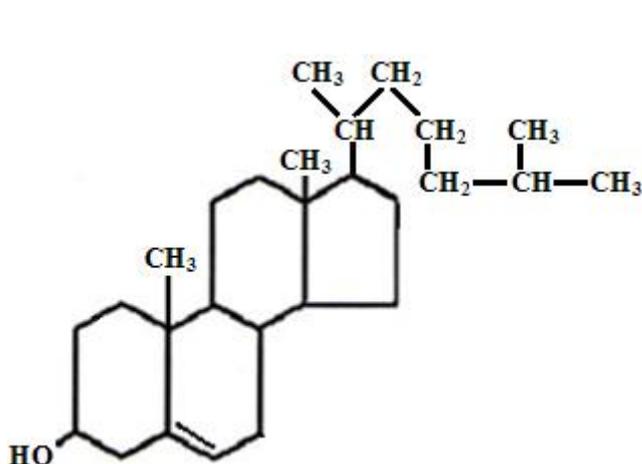
Во второй главе содержится характеристика материалов и методов исследования.

В третьей главе представлены результаты экспериментальных исследований, по изучению изменения рН, показателя преломления и растворимости холестерина в указанных органических кислотах в среде физиологического раствора, а также результаты исследования системы CaCl_2 – холестерин – H_2O .

В четвёртой главе представлены и обсуждены результаты экспериментов, проведенных в ходе выполнения диссертационной работы по изучению влияния природных органических кислот: ацетилсалициловой, янтарной, лимонной, аскорбиновой и хенодезоксихолевой на свойства и надмолекулярную структуру холестерина методом спиновой метки.

Материалы и методы исследования Характеристика экспериментального материала

В качестве объекта исследования были использованы: кристаллический холестерин $C_{27}H_{45}OH$ (1); янтарная кислота – $C_4H_6O_4$ «х.ч.»; лимонная кислота – $C_6H_8O_7$ «х.ч.»; аскорбиновая кислота – $C_6H_8O_6$ «х.ч.»; ацетилсалициловая кислота – $C_9H_8O_4$ «х.ч.»; хенодезоксихолевая кислота – $C_{24}H_{40}O_4$ (фирма «Фалк» Германия) «ос.ч.». Физраствор – аптечный и спиновая метка нитроксильного радикала, имеющая следующую структурную формулу (2):



Физико-химические методы исследования. Измерения рН проводились на приборе рН – метр, производства METTLER TOLDO. Показания преломления (n) – измерялись на приборе марки ИРФ – 454 БМ. Растворимость холестерина в жизненно важных органических кислотах (лимонной, янтарной, аскорбиновой) определялась ферментативным – колориметрическим методом на ФЭК марки КФК – 2МП, влияние таких органических кислот, как янтарная, ацетилсалициловая, лимонная, аскорбиновая и хенодезоксихолевая на надмолекулярную структуру холестерина определялось с использованием спиновой метки на приборе ЭПР марки РЭ – 1306, по следующей методике: после измерения рН и показателя преломления растворов, в шесть плоскодонные колбы (50 мл), содержащие по 50 мг кристаллического холестерина, добавляли определенные количества указанных органических кислот. Термостатирование образцов проводилось при температуре $35 \pm 1^{\circ}C$ в термостате, в течение 3 часов, содержимое колбы периодически перемешивалось. После 3-х часового термостатирования содержимое колбы профильтровывали через бумажный фильтр. В каждую колбу вводили по 20 мл хлороформа, колбы периодически встряхивали, далее на делительной воронке отделяли хлороформную часть от

водного раствора. Экстрагирование хлороформом для каждого образца проводилось по 2 раза. Для удаления влаги из хлороформных экстрактов добавляли по 0,5 г сульфата натрия. Затем содержимое колбы отфильтровывалось через плотный бумажный фильтр, при этом определялось содержание холестерина. Определение холестерина проводилась по стандартному набору «Холестерин – ПАП», который используется для его определения в биологических жидкостях ферментативно – колориметрическим методом. Для определения холестерина брали 1 мл хлороформного экстракта, к которому добавляли 10 мл готового реактива, имеющегося в наборе. Далее оставляли на 30 мин. в темном месте, при этом раствор окрашивался в розовый цвет. Фотоколориметрию проводили при длине волны (500 – 550 нм.) и толщине кюветы 10 мм.

Методика исследования молекулярной структуры холестерина спиновой меткой

Метод спиновых меток позволяет изучить вращательную подвижность нитроксильного радикала в растворах, эта подвижность количественно характеризуется временем корреляции вращения « τ_c », определяемой по формуле:

$$\nu_{(-1)} = 1/\tau_{c(-1)} = \frac{3,6 \cdot 10^9}{\left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{(-1)}}} - 1 \right) \Delta H_0} \text{сек}^{-1},$$

где ΔH_0 – ширина центральной компоненты в гауссах; h_0 и h_{-1} – интенсивность компонент спектра с $M = 0, +1$ и -1 ; $\nu = 1/\tau$ – величина, условно называемая «частотой вращения» радикала.

При присоединении спиновой метки к другим молекулам или их агрегатам вращение затормаживается и следовательно величина τ увеличивается. Поэтому измерение этого параметра позволяет оценить эффективный молекулярный объем агрегата.

Эксперимент проводился в следующих условиях. Навеска образца (холестерин) 25 мг помещалась в пробирку, содержащую 1 мл этанолового раствора спин-метки с концентрацией $4 \cdot 10^{-3}$ М. Смесь инкубировали в течение двух суток при комнатной температуре, затем добавляли по 2 мг различных органических кислот. Спектры ЭПР регистрировали на радиоспектрометре РЭ-1306 в стандартных стеклянных ампулах с внутренним диаметром 3,0 мм, в которые помещали по 25 мг спин-меченого образца. Спектры ЭПР образцов записывали при следующих условиях: затухание СВЧ мощности 5дБ; амплитуда развертки магнитного поля 200 Э; скорость развертки магнитного поля 40 Э/мин; амплитуда ВЧ модуляции 0,3 Э постоянная времени 0,1 с, частота модуляции 100 кГц.

Исследование молекулярной структуры холестерина методом спиновой метки в среде органических кислот проводилось в Физико-техническом институте им. С.У. Умарова АН РТ.

Обсуждение результатов

Изучение изменения рН и показателей преломления янтарной, лимонной и аскорбиновой кислот в зависимости от их концентрации в среде физраствора

Водородные ионы занимают особое положение среди других ионов благодаря резко выраженному влиянию их на ход многих реакций, протекающих в растворах. Установлено, что физиологические процессы могут происходить нормально только при определенной для каждого процесса концентрации ионов водорода, то есть при определенном значении рН. Влияние рН на физиологические процессы настолько велико, что уже незначительное изменение этой величины может заметно изменить скорость процесса или даже совсем приостановить его.

Согласно литературными данными, человек ежедневно употребляет в зависимости от сезона года от 50 до 250 мг хорошо усвояемых органических кислот (яблочной, лимонной, аскорбиновой, винной и т. д.). Органические кислоты в зависимости от их содержания в определенной степени влияют на кислотно-щелочную среду организма. Следовательно, полученные нами результаты изменения концентрации ионов водорода в физрастворе в зависимости от концентрации органических кислот представляют огромный интерес, как в современной медицине, так и в вопросах правильного питания при различных видах заболеваний. Исследование изменения рН проводили при температуре $35 \pm 1^\circ\text{C}$, то есть при температуре, близкой к температуре организма человека. Исследование показателя преломления (n) проводили при температуре 20°C .

Как показали результаты исследований при добавлении лимонной кислоты (10 мг) в физиологический раствор значение рН уменьшается от 6,97 до 4,11, то есть оно практически от нейтральной среды переходит в слабокислый. Показатель преломления (n) меняется от 1,3350 до 1,3345. С увеличением концентрации лимонной кислоты до 20 мг, показание рН снижается от 4,12 до 4,03. Далее, при концентрации 30, 40, 50 мг лимонной кислоты рН от 4,03 снижается до 3,83. При изменении концентрации лимонной кислоты в пределах от 60 до 80 мг показатель иона водорода практически не меняется (рис. 1) и при этом показание рН – 3,83 сохраняется до концентрации 100 мг. При концентрации лимонной кислоты 100 мг значение рН от 3,83 снижается до 3,77. Постоянство рН при её концентрации от 60 до 80 мг для лимонной кислоты свидетельствует о возможности в системе фазы образования. Таким образом, использованные в данной работе кислоты снижают рН раствора до определенного уровня. Полученные результаты приведены в таблице 1 и изображены на рисунках 1, 2.

Таблица 1
Значения рН и показания преломления (n) в физрастворе в зависимости от концентрации органических кислот

№ п/п	Концентрация орг. кислот в мг/мл	Лимонная кислота рKa=3,13		Янтарная кислота рKa=4,21		Аскорбиновая кислота рKa=4,04	
		рН	n	рН	n	рН	n
1	10	4,11	1,3350	4,37	1,3350	4,53	1,3345
2	30	4,03	1,3345	4,32	1,3348	4,47	1,3344
3	40	3,97	1,3346	4,26	1,3345	4,43	1,3344
4	50	3,93	1,3346	4,23	1,3348	4,40	1,3343
5	60	3,83	1,3350	4,21	1,3350	4,35	1,3345
6	70	3,83	1,3350	4,20	1,3350	4,34	1,3345
7	80	3,82	1,3350	4,19	1,3350	4,33	1,3345
8	100	3,77	1,3350	4,18	1,3350	4,33	1,3345

* Показания рН физраствора – 6,97

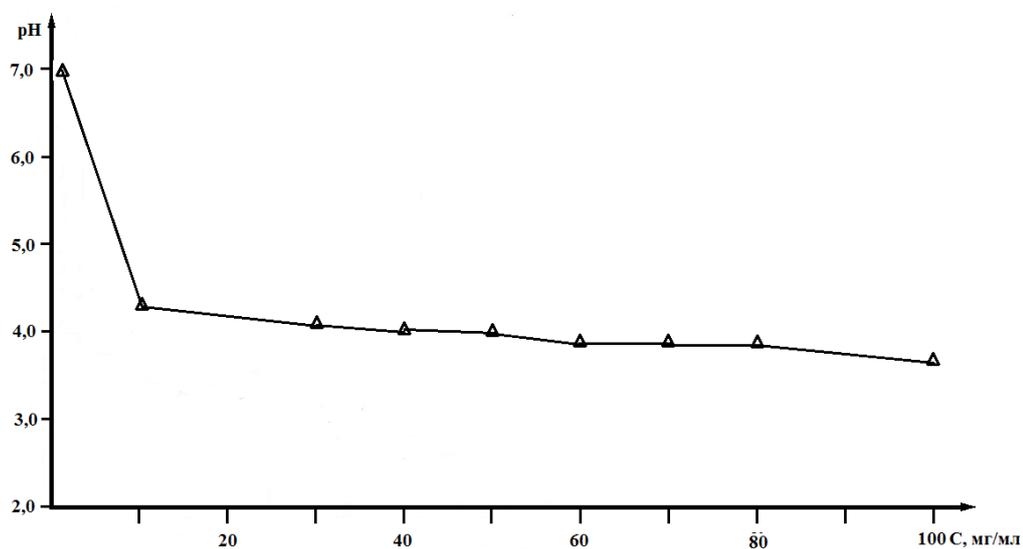


Рисунок 1. Изменение рН физраствора в зависимости от концентрации лимонной кислоты

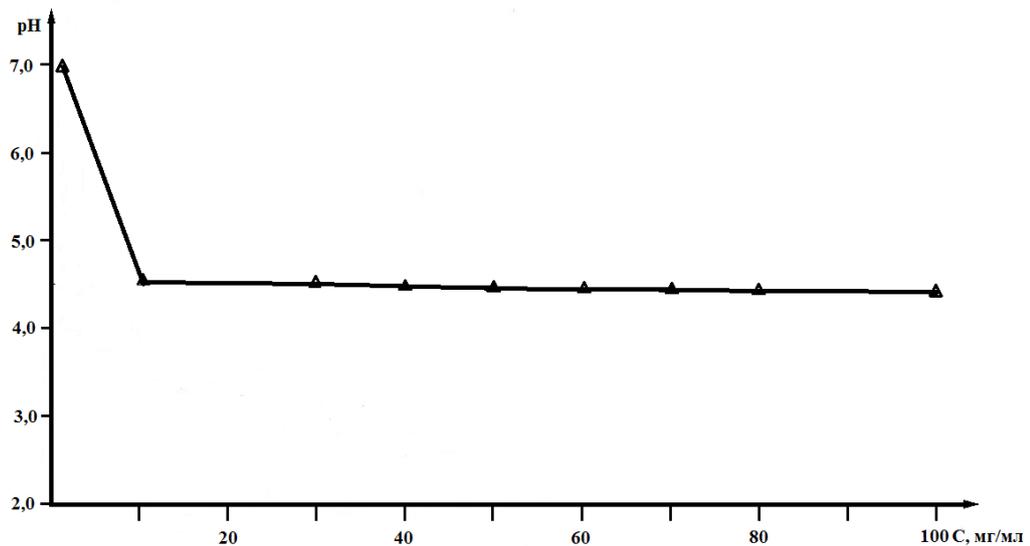


Рисунок 2. Изменение pH физраствора в зависимости от концентрации аскорбиновой кислоты

Аналогичный эксперимент проводился с янтарной и аскорбиновой кислотами (табл. 1). Как показали результаты исследований при добавлении 10 мг янтарной кислоты pH физраствора от 6,97 снижается до pH – 4,37, т. е. от нейтральной среды резко переходит к слабокислой. Дальнейшее увеличение концентрации янтарной кислоты от 10 мг до 50 мг pH физраствора меняется незначительно. Происходит незначительное изменение pH от 4,37 до 4,21. Далее при увеличении концентрации янтарной кислоты от 60 мг до 100 мг значение pH практически не меняется. Аналогичный характер изменений pH физраствора наблюдался при добавлении аскорбиновой кислоты, pH физраствора от 6,97 после добавления 10 мг аскорбиновой кислоты снижался до 4,53. С увеличением концентрации аскорбиновой кислоты от 10 мг до 100 мг значение концентрации ионов водорода менялось в пределах от 4,53 до 4,33.

Большой интерес представляло изучение pH и показателя преломления в смесях органических кислот при различных их композициях. Указанные органические кислоты в овощах, фруктах, растениях и в пищевых продуктах в основном находятся в смесях и в различных концентрациях. Однако по сей день в литературе практически отсутствуют данные по влиянию этих кислот на значение pH организм человека, если при этом учесть, что вода в организме человека составляет 70% от веса его тела. Соотношение смеси кислот брали при композициях (1:1) 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Значение рН и коэффициента преломления физраствора при добавлении смеси органических кислот

№ п/п	Концентрация различных орг. кислот в мг/мл	Лимонная кислота Янтарная кислота		Лимонная кислота Аскорбиновая кислота	
		рН	n	рН	n
1	10 + 10	4,22	1,3345	4,20	1,3345
2	20 + 20	4,05	1,3346	3,98	1,3347
3	30 + 30	3,94	1,3348	3,90	1,3348
4	40 + 40	3,87	1,3348	3,82	1,3349
5	60 + 60	3,77	1,3350	3,73	1,3351
6	80 + 80	3,71	1,3351	3,68	1,3352
7	100 + 100	3,66	1,3353	3,63	1,3355

Как видно из таблицы 2 при композициях (1:1) 10 мг (янтарной кислоты), 10 мг (лимонной кислоты) значение рН равно 4,22, а при 30 мг, рН – 3,94 и при 40 мг рН – 3,87. По характеру изменения рН смеси янтарной и лимонной кислот аналогичен рН лимонной кислоты, то есть с увеличением концентрации лимонной кислоты показание рН меняется незначительно и среда физраствора становится слабокислой. В случае композиции аскорбиновая + лимонная кислота, наблюдаются аналогичные изменения, как в случае с лимонной кислотой: значения рН независимо от композиции концентраций указанных кислот остаются на одном и том же уровне, как и в случаях, когда эти кислоты брались в отдельности.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что минимальная концентрация органических кислот (лимонная, янтарная, аскорбиновая) влияет на значение концентрации ионов водорода физиологического раствора, то есть рН физраствора от нейтральной среды переходит в слабокислую рН – 6,97 → рН – 4,0. Такая тенденция сохраняется и в эксперименте, когда использовались смеси органических кислот. Полученные результаты, несомненно, имеют большой интерес для современной медицине.

Растворимость холестерина в различных концентрациях лимонной, янтарной и аскорбиновой кислот в среде физраствора

Если учесть, что в организм человека ежедневно в различных количествах поступают различные пищевые органические кислоты, то актуальность поставленной задачи не вызывает сомнения. Из литературных данных известно, что холестерин в чистой воде практически не растворяется. Однако, как показали результаты исследования в физиологическом растворе, где содержатся

вышеуказанные органические кислоты, наблюдается минимальная растворимость холестерина. Такое явление, возможно, связано тем, что холестерин взаимодействует с указанными органическими кислотами, что способствует растворимости холестерина. Растворимость холестерина в жизненно важных органических кислотах (лимонной, янтарной, аскорбиновой) определялась ферментативным – колориметрическим методом по Ильку, реакция Либермана – Бухарда. Для исследования использовалось определенное количество холестерина. Объем физраствора 50 мл, температура $35\pm 1^\circ\text{C}$. Изучение растворимости холестерина в различных концентрациях указанных органических кислот проводилось по известной методике. Полученные результаты представлены в таблице 3 и на рисунке 3.

Таблица 3

Растворимость холестерина в среде физраствора в зависимости от концентрации органических кислот

№ п/п	Концентрация органических кислот в мг/мл	Растворимость холестерина (мг/%) в кислотах		
		Лимонная кислота	Янтарная кислота	Аскорбиновая кислота
1	10	0,01	0,0056	0,00303
2	20	0,0125	0,0066	0,0045
3	30	0,015	0,0075	0,00605
4	50	0,011	0,00905	0,00214
5	80	0,014	0,0085	0,002
6	100	0,016	0,0082	0,0019

Как видно из таблицы 3 добавление кислот приводит к увеличению растворимости холестерина. По эффекту влияния на растворимость холестерина кислоты располагаются в следующий ряд: лимонная > янтарная > аскорбиновая. Как показали результаты исследований максимальное растворение холестерина наблюдается в лимонной кислоте, то есть при добавлении 10 мг лимонной кислоты, растворимость холестерина достигает величины 0,01 мг/%. При этой же концентрации янтарной кислоты растворимость холестерина равна 0,0056 мг/%, а аскорбиновой кислоты 0,00303 мг/%. Далее с увеличением концентрации лимонной кислоты до 100 мг растворимость холестерина практически не меняется. В тоже время с увеличением концентрации янтарной кислоты до 20 мг, 30 мг, 40 мг растворимость холестерина увеличивается незначительно (табл. 3, рис. 3).

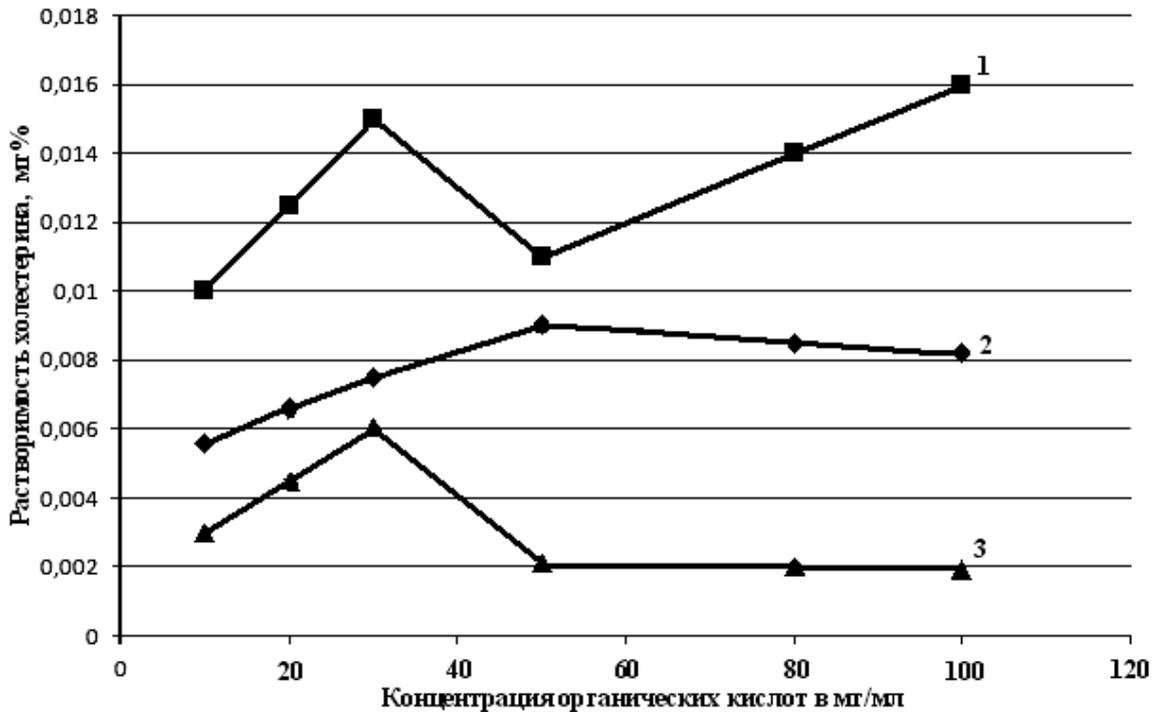


Рисунок 3. Растворимость холестерина в зависимости от концентрации кислот в физрастворе в условиях *in vitro*, кривые: 1. лимонная; 2. янтарная; 3. аскорбиновая

Как показали результаты исследований растворимость холестерина в органических кислотах (лимонной, янтарной, аскорбиновой) в среде физиологического раствора имеет прямую зависимость от концентрации указанных органических кислот. Такая тенденция повышения растворимости холестерина наблюдается до 100 мг концентрации янтарной кислоты. Аналогичные изменения наблюдались и в среде аскорбиновой кислоты, где растворимость холестерина при концентрации аскорбиновой кислоты от 10 мг до 30 мг плавно увеличивается от 0,00303 до 0,00605 мг%. Значительное повышение растворимости холестерина наблюдается при концентрациях аскорбиновой кислоты выше 50 мг, где величина растворимости достигает 0,0214 мг%, при дальнейшем увеличении концентрации аскорбиновой кислоты до 100 мг растворимость холестерина практически не меняется. Для статистической достоверности результатов эксперимента каждый опыт проводился 3 – 4 раза и вычислялось среднее значение.

Результаты, полученные по растворимости холестерина в этих органических кислотах, безусловно, представляют определенный интерес для медицины. Обобщая полученные результаты по растворимости холестерина, а также данные по влиянию различных концентраций органических кислот на концентрацию ионов водорода физраствора можно констатировать, что это позволит в определенной степени проводить корректировку диеты больных при различных видах заболеваний. В частности, когда врач назначает больным фруктово-овощную диету, содержащую достаточное количество вышеуказанных жизненно важных органических кислот.

Исследование системы CaCl_2 – холестерин – H_2O

Известно, что одной из причин дестабилизации жёлчи при ЖКБ является перенасыщение ее холестерином, приводящее к образованию холестериновых камней. Как показали наши исследования, холестериновые камни в основном состоят из холестерина и солей кальция. В связи с этим изучение системы CaCl_2 – холестерин – H_2O представляет большой интерес для понимания механизмов дестабилизации стабильной жёлчи и образования холестериновых камней.

Исследование системы CaCl_2 – холестерин – H_2O проводилось при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Равновесие в системе достигалось в течение 36 ч. Содержание холестерина определяли фотоколориметрическим методом. Для определения холестерина в жидкой фазе раствор декантировали и экстрагировали хлороформом (3-4 раза). Хлороформный экстракт выпаривали досуха, затем растворяли в этаноле и фотоколориметрическим методом определяли холестерин. Содержание холестерина и хлорида кальция в твердой фазе определяли по следующей методике. Стеклой лопаточкой отбирали твердую фазу и отжимали фильтровальной бумагой для избавления от избытка влаги. Полученную твердую массу сушили на воздухе под электролампой. Далее холестерин определяли по известной методике, результаты приведены в (табл. 4).

Таблица 4

Результаты исследования системы CaCl_2

Состав жидкой фазы, %		Остаток, %		Состав твердой фазы, %
CaCl_2	Холестерин	CaCl_2	Холестерин	
0	-	-	-	Холестерин 0,5 H_2O
2	-	1,2	50,4	
4	0,0065	2,6	48,2	
6	0,0072	4,1	49,4	
8	0,0080	6,2	50,9	
10	0,0091	7,5	47,3	
12	0,0101	8,3	48,2	
14	0,0101	9,4	45,4	
16	0,0085	14,3	48,6	
18	0,0074	15,0	49,0	
20	0,0073	17,1	61,0	
22	0,0072	18,3	60,4	
24	0,0078	19,6	60,0	
26	0,0086	21,1	62,3	
28	0,0091	21,8	63,1	
30	0,0093	24,2	61,2	
32	-	26,8	65,4	
34	-	28,7	-	
36	-	-	-	
38	-	-	-	
40	-	-	-	

Как видно из таблицы 4, растворимость холестерина в растворе хлорида кальция до концентрации 20 % повышается (рис. 4). Затем растворимость плавно понижается, и начиная с 28 % показатель опять повышается. Полученные результаты свидетельствуют о том, что растворение холестерина происходит вследствие образования двух фаз: до 20 % CaCl_2 растворимость повышается, затем снижается и далее опять увеличивается.

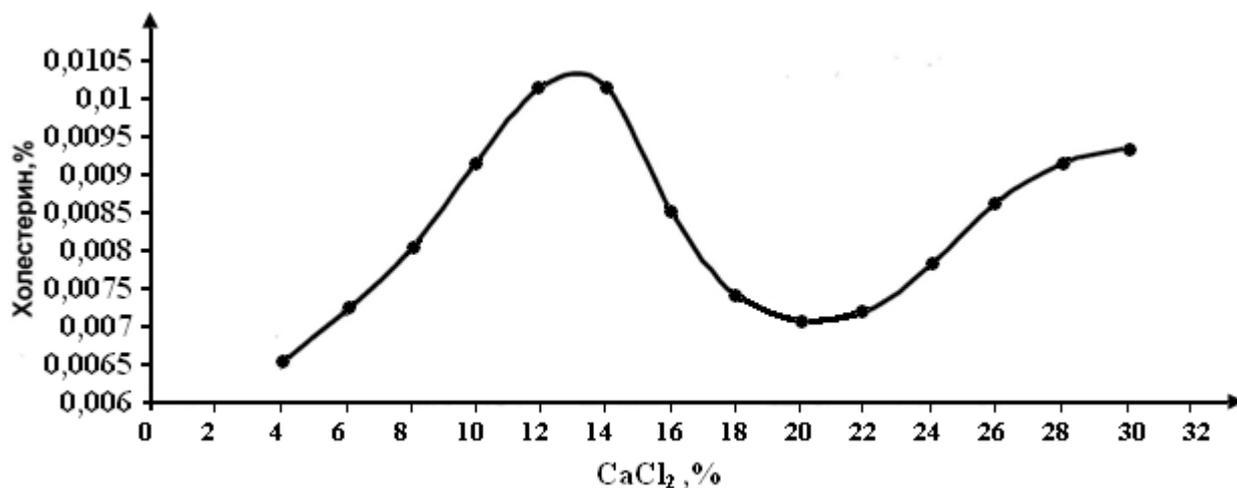


Рисунок 4. Изменение растворимости холестерина в системе CaCl_2 – холестерин – H_2O

Как видно из рисунка 4 кривая растворимости состоит из двух ветвей. Излом на кривой растворимости свидетельствует о фазе образования в системе.

В таблице 5 приведены результаты химического и теоретического анализов твердых фаз, выделенных из системы CaCl_2 – холестерин – H_2O .

Таблица 5

Химический и теоретический анализ твердых фаз, выделенных в системе CaCl_2 – холестерин – H_2O

Формула соединения	Масса, % теорет.		Масса, % найдено	
	$\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{OH}$	CaCl_2	$\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{OH}$	CaCl_2
$\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{OH} \cdot 0,8 \text{CaCl}_2$	83,21	16,79	83,01	16,99

* $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{OH}$ – эмпирическая формула холестерина

Как видно из таблицы 5, при концентрации хлорида кальция 20 % в системе каких – либо изменений не происходит. Однако в пределах концентрации от 23 % и выше лучи указывают на образование двойной соли холестерин – $0,8 \text{CaCl}_2$.

Таким образом, исследование системы CaCl_2 – холестерин – H_2O показало, что при концентрации CaCl_2 от 0 до 20 % холестерин не взаимодействует с CaCl_2 , что видно из таблиц 4, 5 и диаграммы Гиббса, которые приведены в работе. В случае концентрации выше 20 % лучи Шрейнемакера указывают на образование с холестерином двойной соли: $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{OH} \cdot 0,8 \text{CaCl}_2$.

Исследование молекулярной структуры холестерина методом спиновой метки

В настоящее время в научной литературе отсутствуют данные об исследованиях в этаноловом растворе надмолекулярной структуры холестерина методом «спиновой метки». Для решения поставленной задачи используется гидрофобное спиновое метка, которое присоединяется к гидрофобному фрагменту холестерина.

Суть нашего подхода заключается в том, что в результате присоединение метка к холестерину агрегатное вращение радикала замедляется и, следовательно, время корреляции τ возрастает. По этому значению оценивается молекулярный объем агрегата.

Изучения надмолекулярной структуры холестерина проводилось по указанной методике. Время корреляции вращения спиновых меток в исследуемых образцах определялось по формуле, в разделе Материалы и методы исследования. Полученные результаты представлены на рисунке 5.

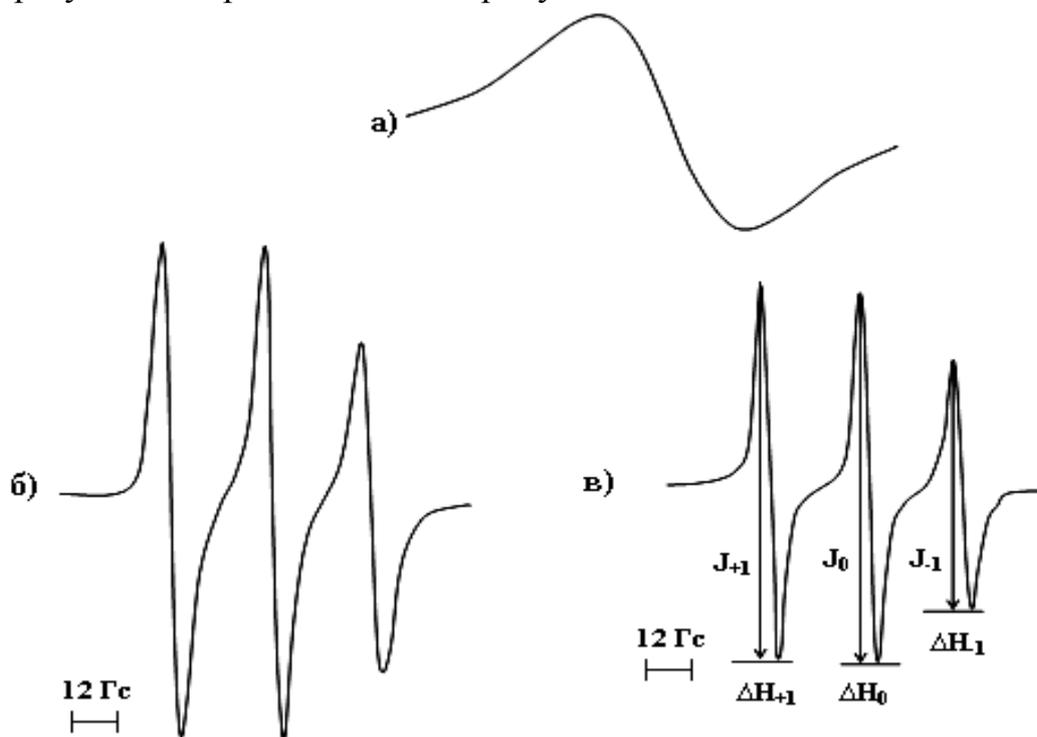


Рисунок 5. Спектр ЭПР нитроксильного радикала (I): а) в виде порошка,
б) спектр нитроксильного радикала в этаноле с концентрацией $4 \cdot 10^{-3} \text{M}$,
в) спин-меченый холестерин в среде этанола

Как видно из рисунка 5 (б), спиновая метка радикала (I) в растворе вращается свободно с временем корреляции $\tau_c \geq 1,54 \cdot 10^{-8} \text{c}$ и все 3 компонента сигнала ЭПР по интенсивности почти одинаковы и симметричны, а для спин-меченого холестерина спектр ЭПР отличается (в), то есть затормаживается, в этом случае время корреляции $\tau_c \leq 9,9 \cdot 10^{-7} \text{c}$. Эти факты свидетельствуют о том, что имеется взаимодействие молекулы холестерина с радикалом.

Исследование влияния ацетилсалициловой и янтарной кислот на молекулярную структуру холестерина методом спиновой метки

Ацетилсалициловая кислота (аспирин) – это продукт синтеза двух кислот – салициловой и уксусной. Попадая внутрь организма, аспирин распадается на салициловую и уксусную кислоты, но именно в том месте, где необходимо их последовательное суммарное воздействие. Коротко механизм действия аспирина можно описать как действие тромбксана, образующегося в кровеносном сосуде вокруг коллагеновых волокон, который усиливает отлипание сгустка и рост тромба за счет сцепления между собой растущих отростков тромбоцитов.

Янтарная кислота (ЯК) – продукт, полученный в результате переработки натурального янтаря. Это абсолютно безвредное вещество, обладающее особыми полезными свойствами. В научной литературе известно, что ЯК используется для лечения хронических сердечнососудистых заболеваний (коронарный атеросклероз и перенесенный инфаркт миокарда), одной из причин, которых является увеличение свободного холестерина в крови. Исследование влияния ацетилсалициловой и янтарной кислот на молекулярную структуру холестерина методом спиновых меток проводилось по методике, указанной в разделе Материалы и методы исследования. Полученные результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6

Параметры спектров ЭПР спиновой метки радикала (I) в среде этанола и модифицированного холестерина при погружении в янтарную и ацетилсалициловую кислоту

№ п/п	Наименование вещества	Спектральные параметры								
		J_{+1} , мм	J_{-1} , мм	J_0/J_{-1}	J_0 , мм	$2A'z$, Гс	ΔH_{+1} , Гс	ΔH_{-1} , Гс	ΔH_0 , Гс	τ_c , сек.
1	Радикал + этанол	206	138	1,46	202	31,1	2,66	2,66	2,16	$1,54 \cdot 10^{-8}$
2	Радикал + этанол + холестерин	154	103	1,47	152	32,4	2,66	2,22	1,73	$9,9 \cdot 10^{-7}$
3	Янтарная к-та + хл + радикал	187	114	1,65	189	31,1	2,66	2,22	2,23	$1,76 \cdot 10^{-8}$
4	Ацетилсалициловая к-та + хл + радикал	31	26	1,69	44	31,5	1,77	2,66	1,78	$1,46 \cdot 10^{-8}$

Как видно из (табл. 6), J_{+1} – интенсивность высокопольной, J_{-1} – интенсивность низкопольной, J_0 – интенсивность центральной, интенсивность исследуемых систем резко отличаются друг от друга. Например, интенсивность системы II НР+ЭТ+ХЛ начало спектра 154 мм, а системы III НР+ЭТ+ХЛ+ЯК и IV НР+ЭТ+ХЛ+АЦК соответственно конец спектра имеют значения 114 мм и 26 мм.

Аналогичные изменения наблюдаются в значениях ΔH_0 , ΔH_{+1} , ΔH_{-1} – ширина центральной, высокопольной и низкопольной компоненты спектров.

Отмечена разница в параметрах $2A'z$ – расстояние между высокопольной и низкопольной компонентами спектра и J_0/J_{-1} – отношение интенсивностей центральной и низкопольной линий, что свидетельствует о иммобилизации метки вследствие образование агрегатов холестерина в исследуемом растворе.

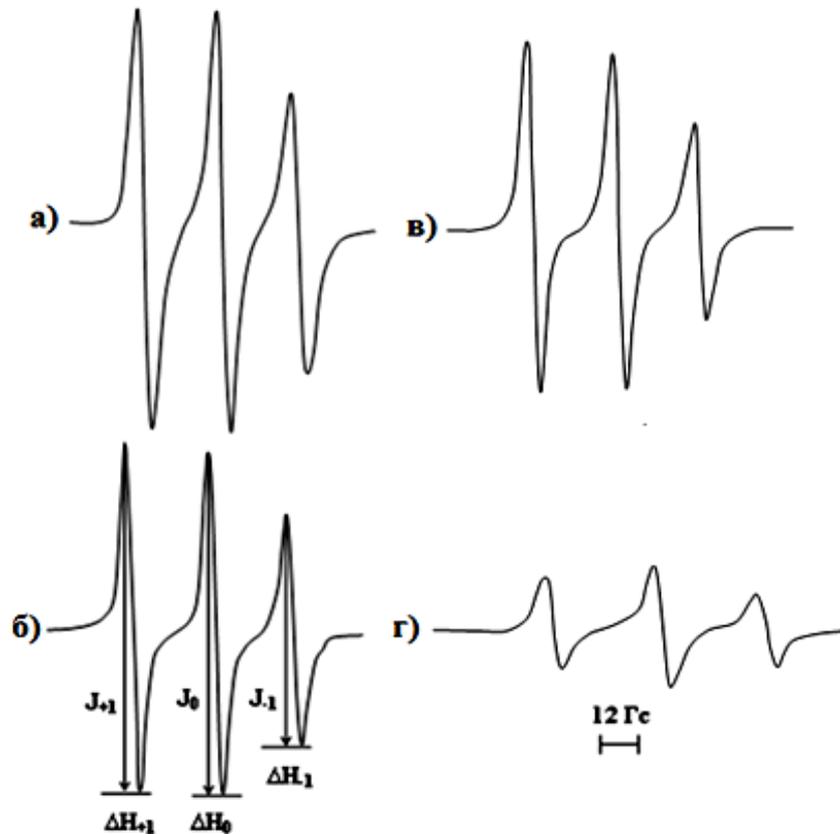


Рисунок 6. Спектры ЭПР: а) спиновой метки радикала (I) в этаноле; б) спин-меченого холестерина с радикалом (I); в) спин - меченого холестерина при погружении в янтарную кислоту; г) спин - меченого холестерина при погружении в ацетилсалициловую кислоту при температуре 300 К

Как видно из рисунка 6, вид спектров отличается друг от друга, например, спиновая метка в этаноловом растворе (рис. 6 (а)) вращается свободно с временем корреляции (τ_c) = $1,54 \cdot 10^{-8}$, а в системе III НР+ЭТ+ХЛ = $9,9 \cdot 10^{-7}$. Однако при добавлении янтарной кислоты в этаноловый раствор, содержащий холестерин и радикал, время корреляция τ_c составляет = $1,76 \cdot 10^{-8}$, а в присутствии ацетилсалициловой кислоты оно равно $1,46 \cdot 10^{-8}$. Как показали результаты экспериментов, увеличение спектральных параметров в исследуемых системах свидетельствует о подвижности спиновой метки с временной корреляцией $\tau_c \leq 1,76 \cdot 10^{-8}$ и $1,54 \cdot 10^{-8}$. Это увеличение связано с вытеснением метки и с появлением движений высокой амплитуды с $\tau_c \geq 10^{-8}$. Это свидетельствует о том, что янтарная кислота соединяется с агрегатами холестерина в растворе.

Таким образом, полученные методом спиновых меток экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что янтарная и ацетилсалициловая кислоты влияют на молекулярную структуру холестерина.

Исследование влияния лимонной и аскорбиновой кислот на молекулярную структуру холестерина методом спиновой метки

Аскорбиновая кислота (Витамин С) с целью лечения холестериноза начала использоваться относительно недавно, с 70-х г. Предполагается, что основную роль в данном случае играет антиоксидантное воздействие витамина «С». Известно, что одной из причин образования атеросклеротических бляшек является окисление липопротеидов низкой плотности с участием свободного радикала. Аскорбиновая кислота значительно улучшает фосфолипидный обмен и этим препятствует проникновению холестерина не только в сосудистую стенку, но и в клеточные мембраны, так как снижает их проницаемость для холестерина. Аскорбиновая кислота, служит как профилактическое средство по отношению к развитию общего холестериноза. Однако и по сей день в литературе практически отсутствуют данные исследований механизма действия указанных кислот на молекулярную структуру холестерина методом спиновой метки, который в настоящее время считается наиболее информативным методом.

Следует отметить, что лимонная кислота по номенклатуре кислот является более сильной кислотой, чем аскорбиновая, но в тоже время по своей физиологической активности она слабее. В научной литературе о физиологической роли лимонной кислоты, и в особенности её влияния на свойства свободного холестерина данных практически нет. Исходя из вышесказанного, были проведены исследования влияния лимонной кислоты на свойства холестерина методом спиновой метки по методике, приведенной в разделе Материалы и методы исследования.

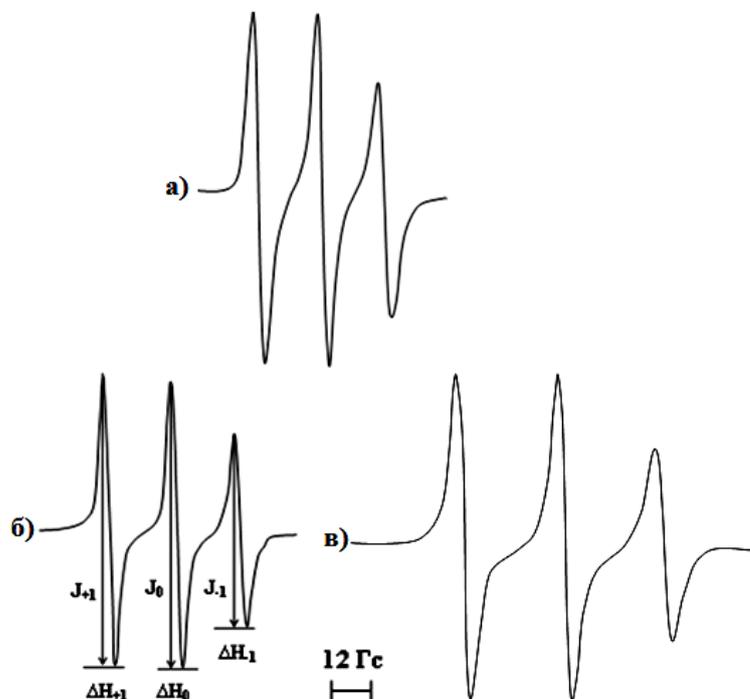


Рисунок 7. Спектры ЭПР: а) спиновой метки радикала (I) в этаноле; б) спин – меченого холестерина с радикалом (I); в) спин – меченого холестерина при погружении в лимонную кислоту

Как видно из рисунка 7, в суммарном спектре ЭПР наблюдается разница в значениях высокопольной (J_{+1}) и низкопольной (J_{-1}) части спектра системы V НР+ЭТ+ХЛ+ЛК по отношению к спектру системы II НР+ЭТ+ХЛ. Например, в присутствии лимонной кислоты система V НР+ЭТ+ХЛ+ЛК, значение (J_{+1})=191 мм, а в отсутствии лимонной кислоты в системе II НР+ЭТ+ХЛ, оно равно – 154 мм. Аналогично и по отношению (J_{-1}) с лимонной кислотой, которое равно 108 мм, а без кислоты – 103 мм. Подобная разница также отмечена в значениях ΔH_{+1} и ΔH_{-1} , то есть для системы II НР+ЭТ+ХЛ, оно равно 2,66 Гс, а для системы V НР+ЭТ+ХЛ+ЛК равно 4,88 Гс. Также выявлена значительная разница в значениях расстояний между высокопольными и низкопольными ($2A'z$) спектрами системы II НР+ЭТ+ХЛ, которая равна – 32,4 Гс и системы V НР+ЭТ+ХЛ+ЛК – 34,2 Гс.

В совокупности, все эти изменения привели к изменению основного показателя – τ_c , то есть частота вращения молекулы для системы V НР+ЭТ+ХЛ+ЛК $=1,69 \cdot 10^{-8}$ с, а для системы II НР+ЭТ+ХЛ равна $9,9 \cdot 10^{-7}$ с.

Аналогично по этой же методике было изучено и влияние аскорбиновой кислоты на молекулярную структуру холестерина. Полученные результаты представлены на рисунке 8.

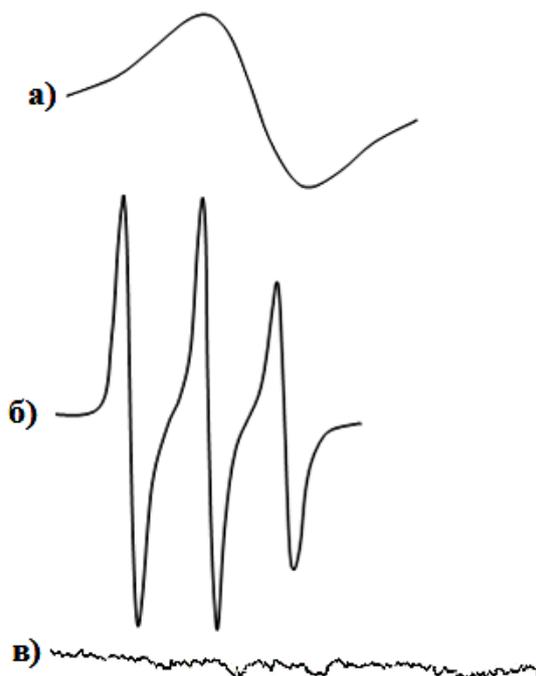


Рисунок 8. Спектры ЭПР спиновой метки радикала (I): а) в виде порошка; б) спин – меченого радикала в этаноле; в) спин – меченого радикала при погружении в аскорбиновую кислоту

Как видно из рисунка 8 (б) спиновая метка радикала в этаноловом растворе вращается свободно со временем корреляции $\tau_c \geq 10^{-8}$ с. Однако при погружении аскорбиновой кислоты в этаноловый раствор спиновой метки радикала (I), спектр ЭПР полностью исчезает (рис. 8 (в)).

Известно, что одним из основных показателей межмолекулярного и внутримолекулярного взаимодействий молекул методом спиновых меток является время корреляции вращения молекул « τ_c ». Полученные результаты приведены на рисунке 10.

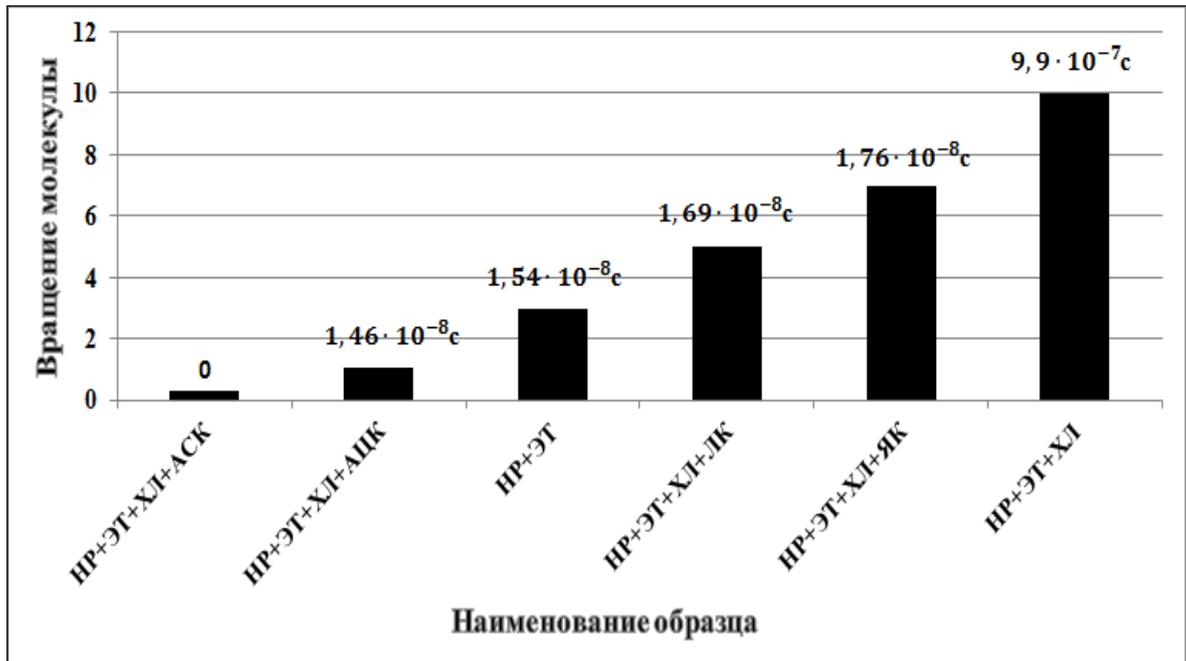


Рисунок 10. Диаграмма времени корреляции вращения молекул в системах

Как видно из таблицы 7 и рисунка 10 время корреляции вращения молекул « τ_c » при введении в систему II NR+ЭТ+ХЛ лимонной, янтарной и ацетилсалициловой кислот происходит межмолекулярное и внутримолекулярное взаимодействие этих кислот с молекулами холестерина. Об этом свидетельствуют показания времени корреляции вращения молекул « τ_c » при сравнении с системой II NR+ЭТ+ХЛ, где значение « τ_c »= $9,9 \cdot 10^{-7}$, а при погружении в указанные кислоты эти значения резко уменьшаются (рис. 10). Однако погружение в аскорбиновую кислоту системы II NR+ЭТ+ХЛ приводит значение « τ_c » к нулю, то есть аскорбиновая кислота поглощает нитроксильный радикал, что ещё раз свидетельствует об антиоксидантном свойстве аскорбиновой кислоты. Результаты исследований влияния жизненно важных органических кислот (лимонной, янтарной, ацетилсалициловой и аскорбиновой) показали, что они по – разному влияют на меж – и внутримолекулярную структуру холестерина. Об этом свидетельствуют обобщенные параметры спектров ЭПР, приведённые в таблице 7, а также данные времени корреляции вращения молекулы « τ_c », приведённые на рисунке 10, что явно указывает на то, что указанные органические кислоты по-разному влияют на структуру холестерина. По всей вероятности, такое взаимодействие зависит от химической структуры указанных кислот.

Исследование влияния хенодезоксихолевой кислоты на молекулярную структуру холестерина методом спиновой метки

В работе метод нитроксильных спиновых меток был использован для влияния различных концентраций ХДХК на молекулярную структуру холестерина. Главной идеей, составляющей основу нашего подхода, является холестерин, растворенный в этаноле со спиновой меткой с последующим обнаружением и определением с помощью ЭПР. Для решения поставленной задачи были использованы: нитроксильный радикал, этанол, кристаллический холестерин и хенодезоксихолевая кислота.

Результаты исследования влияния различных концентраций ХДХК методом спиновых меток на структуру холестерина приведены на (табл. 8 и рис. 11). Как видно на таблице 8 и рисунке 11, с погружением ХДХК при комнатной температуре в исследуемых образцах холестерина в спектре ЭПР наблюдается увеличение интенсивности высокопольной (J_{+1}) и расстояния между высокопольной и низкопольной ($2A'z$) компонентами сигналов ЭПР. Для разных концентраций ХДХК они принимают различные значения (табл. 8). Например, при погружении ХДХК в систему II НР+ЭТ+ХЛ при концентрации ХДХК $3 \cdot 10^{-4}$ М наблюдается увеличение спектральных параметров, что характеризует уширение, то есть заторможенность сигнала с временной корреляцией ($\tau_c \leq 10^{-9}$ с.).

Таблица 8

Параметры спектров ЭПР модифицированного холестерина радикалом (I) при погружении в ХДХК

№ п/п	Наименование вещества	Спектральные параметры								
		J_{+1} , мм	J_{-1} , мм	J_0/J_{-1}	J_0 , мм	$2A'z$, Гс	ΔH_{+1} , Гс	ΔH_{-1} , Гс	ΔH_0 , Гс	τ_c сек.
1	Радикал + этанол + холестерин ($4 \cdot 10^{-3}$ М)	154	103	1,47	152	32,4	2,66	2,22	1,73	$9,9 \cdot 10^{-7}$
2	Радикал + этанол + холестерин + ХДХК ($3 \cdot 10^{-4}$ М)	115	71	1,54	110	33,7	1,77	1,77	2	$0,134 \cdot 10^{-9}$
3	Радикал + этанол + холестерин + ХДХК ($2,2 \cdot 10^{-3}$ М)	195	120	1,58	190	33,3	1,77	1,33	2,05	$0,148 \cdot 10^{-9}$
4	Радикал + этанол + холестерин + ХДХК ($3,3 \cdot 10^{-3}$ М)	199	110	1,72	190	32,8	1,33	1,33	2,46	$0,219 \cdot 10^{-9}$

Следует отметить, что процесс заторможенности в спектрах ЭПР указывает на то, что ХДХК влияет на молекулярную структуру холестерина, иными словами ХДХК взаимодействует с холестерином. Однако иная картина наблюдается с увеличением концентрации ХДХК, то есть при $2,2 \cdot 10^{-3}$ М и $3,3 \cdot 10^{-3}$ М

ХДХК отмечено (рис. 11. (в), (г)) увеличение интенсивности сигнала, которое сопровождается незначительным сужением спектральных линий (параметров ΔH_{+1} , ΔH_0 , ΔH_{-1}) образцов с увеличением их амплитуды. Этот факт объясняется появлением мелкомасштабных движений, приводящих к усреднению диполь – дипольных взаимодействий. Эффект сужения (параметров ΔH_{+1} , ΔH_0 , ΔH_{-1}), по – видимому, связан с движением протонов среди окружающих нитроксильный фрагмент радикала, которые также частично усредняет взаимодействие магнитных диполей неспаренного электрона и протона, усредняя при этом взаимодействие магнитных диполей неспаренного электрона и протона.

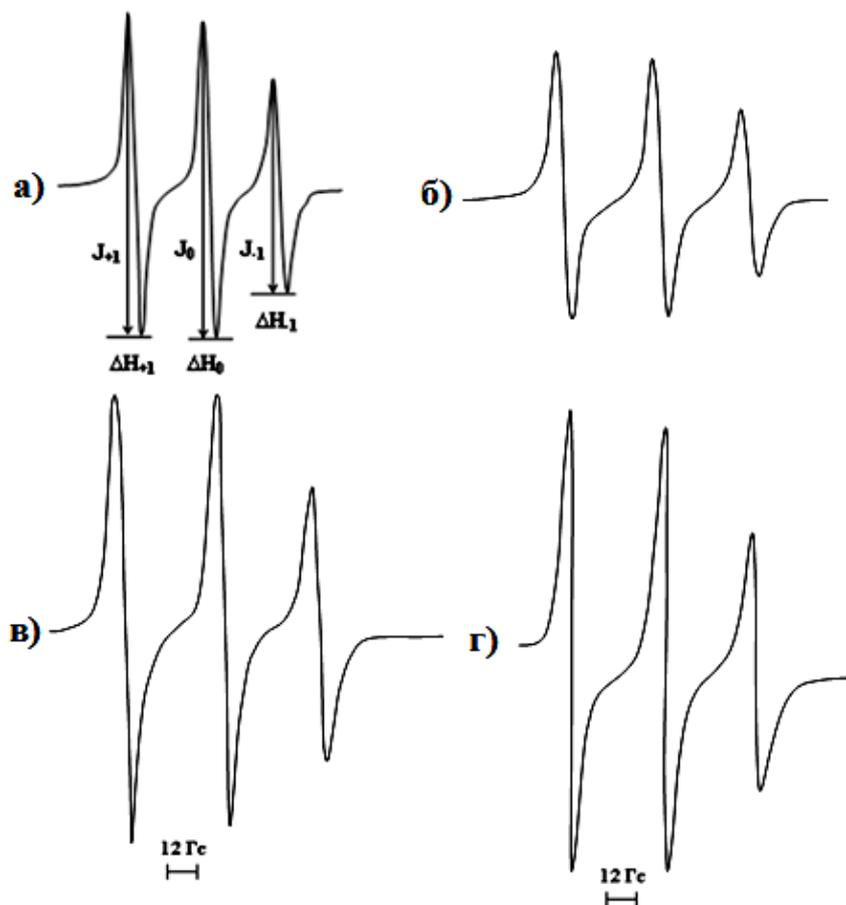


Рисунок 11. Спектры ЭПР: а) радикал + этанол + холестерин ($4 \cdot 10^{-3} M$); б) радикал + этанол + холестерин + ХДХК ($3 \cdot 10^{-4} M$); в) радикал + этанол + холестерин + ХДХК ($2,2 \cdot 10^{-3} M$); г) радикал + этанол + холестерин + ХДХК ($3,3 \cdot 10^{-3} M$)

Таким образом, как показали результаты исследования, метод нитроксильной спин метки показал, что раствор холестерина в этаноле образует стабильный комплекс с хенодезоксихолевой кислотой. Обнаружение доменов холестерина в растворе этанола открыло путь к количественному исследованию таких предметов и их взаимодействие с хенодезоксихолевой кислотой и другими молекулами в модели и биологических мембранах, пользуясь версией спиновых меток, который развит в данной работе. Метод также может быть полезным для изучения взаимодействия хенодезоксихолевой кислоты с холестерином в холестерин – насыщенный и липид протеин комплексов и для кинетики формирования и растворения холестериновых камней.

ВЫВОДЫ

1. Физико-химическими методами анализа исследовано влияние природных органических кислот на свойства и надмолекулярную структуру холестерина, одного из важнейших субстантов, выполняющего важную роль в жизненных процессах всех живых организмов. При этом установлено, что минимальное количество лимонной, аскорбиновой, янтарной и ацетилсалициловой кислот в физиологическом растворе влияет на значение рН и показателя преломления раствора. Аналогичные изменения рН наблюдаются и при добавлении смесей вышеуказанных кислот.

2. Исследование растворимости холестерина в лимонной, янтарной и аскорбиновой кислотах в условиях *in vitro* показало, что растворимость холестерина имеет прямую зависимость от концентрации и разновидности самих кислот.

3. При исследовании тройной диаграммы CaCl_2 – холестерин – H_2O , установлено образование двух фаз: холестерин $0,5 \text{ H}_2\text{O}$ и холестерин $0,8 \text{ CaCl}_2$.

4. Впервые проведено исследование взаимодействия природных органических кислот с холестерином в этаноловом растворе методом нитроксильных спиновых меток. Установлено, что холестерин в этих условиях образует молекулярные агрегаты, в которых метка замедляет ее вращательную подвижность. При этом органические кислоты вытесняют метку из агрегатов, что свидетельствует о взаимодействии этих кислот с холестерином.

5. Методом спиновой метки впервые установлено, что хенодезоксихолевая кислота, взаимодействуя с холестерином, образует везикулу ХДХК – ХЛ. Это взаимодействие имеет прямую зависимость от концентрации хенодезоксихолевой кислоты, что представляет несомненный интерес для медицины.

6. Разработанный в работе экспериментальный подход по изучению надмолекулярной структуры холестерина может быть использован для изучения состояния холестерина в биологических мембранах при изменении этого состояния под действием физиологически активных веществ и при патологии. Полученные данные о молекулярном взаимодействии природных органических кислот с холестерином в растворе этанола, моделирующим биологические мембраны, представляет интерес для специалистов, работающих в области биомедицины, биохимии и биофизики.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. **Холова, Ш.А.** Изменение рН показателя преломления физиологического раствора в зависимости от концентрации аскорбиновой, янтарной и лимонной кислот в условиях *in vitro* / **Ш.А. Холова, Х.Ш. Джураев, Д.А. Азонов** // «Здравоохранение Таджикистана». Душанбе, 2009. - № 3. - С. 214 - 215.
2. **Холова, Ш.А.** О растворимости холестерина в аскорбиновой, лимонной и янтарной кислотах *in vitro* / **Ш.А. Холова, Х.Ш. Джураев, Д.А. Азонов** // «Здравоохранение Таджикистана». Душанбе, 2009. - № 3. - С. 223 - 225.

3. Джураев, Х.Ш. Исследования системы CaCl_2 – холестерин – H_2O / Х.Ш. Джураев, **Ш.А. Холова** // «Здравоохранение Таджикистана». Душанбе, 2009. - № 3. - С. 197 - 199.
4. Джураев, Х.Ш. Некоторые аспекты механизмов образования почечных камней с позиции физической химии / Х.Ш. Джураев, Д.А. Азонов, З.Х. Сафаров, З.Х. Буриев, **Ш.А. Холова** и др. // «Здравоохранение Таджикистана». Душанбе, 2009. - № 3. - С. 20 - 22.
5. **Холова, Ш.А.** Исследование надмолекулярной структуры холестерина при погружение различных жизненно важных органических кислот методом спиновых меток / **Ш.А. Холова**, И.Х. Юсупов, Х.Ш. Джураев, Д.А. Азонов // Международной научной конференции «Современные проблемы физики», посвященной Году образования и технического знания. Душанбе, 2010. - С. 76 -81.
6. Юсупов, И.Х. Исследование молекулярной структуры холестерина методом спиновых меток при погружении в жизненно важные органические кислоты / И.Х. Юсупов, **Ш.А. Холова**, Х.Ш. Джураев, Д.А. Азонов // «Здравоохранение Таджикистана». Душанбе, 2012. - № 1. - С. 57 - 62.
7. Азонов, Д.А. Изучение влияния ацетилсалициловой и янтарной кислот на молекулярную структуру холестерина методом спиновой метки / Д.А. Азонов, Х.Ш. Джураев, И.Х. Юсупов, **Ш.А. Холова** // «Журнал научных публикаций аспирантов и докторантов» г. Курск, 2012. - № 12. - С. 139 - 141.
8. Джураев, Х.Ш. Динамика рН и времени нуклеации стабильной желчи от степени насыщения ее холестерином в условиях *in vitro* / Х.Ш. Джураев, А.А. Саидов, **Ш.А. Холова** // Сб. «Вопросы питания и регуляции гомеостаза». Душанбе, 2012. - № 12. - С. 96 - 99.
9. Джураев, Х.Ш. Некоторые аспекты образования и разрушения коллоидных частиц желчи / Х.Ш. Джураев, Д.А. Азонов, А.А. Саидов, Г. Розикова, **Ш.А. Холова** // Сб. «Вопросы питания и регуляции гомеостаза». Душанбе, 2012. - № 12. - С. 100 - 105.
10. **Холова, Ш.А.** Исследование влияния хенодезоксихолевой кислоты (ХДХК) на молекулярную структуру холестерина методом спиновых меток / **Ш.А. Холова**, Х.Ш. Джураев, И.Х. Юсупов, Д.А. Азонов, Н.А. Мукимова // Материалы международной конференции по физике конденсированного состояния, посвященной 85 – летию академика А.А. Адхамова. Душанбе, 2013. - С. 173 - 176.
11. **Kholova, Sh.A.** Interaction of chenodeoxycholic acid with cholesterol in a model system studied by spin label probe method / **Sh.A. Kholova**, Kh.Sh. Dzhuraev, I.Kh. Yusupov, G.I. Likhtenshtein // «International Journal of Biomolecules and Biomedicine (IJBB)». Bangladesh, 2014. Vol. 4, No. 1. - P. 1 - 6.
12. **Kholova, Sh.A.** Interaction of chenodeoxycholic acid with cholesterol in a model system studied by spin label probe method / **Sh.A. Kholova**, I.Kh. Yusupov, Kh.Sh. Dzhuraev, G.I. Likhtenshtein // «Dushanbe Symposium on Computational Materials and Biological Sciences». Dushanbe, 2014. - P. 66 - 67.

**Сдано в печать 03.06.2015 г. Разрешено к печати 04.06.2015 г.
Формат 60x84 1/16. Гарнитура Литературная. Объем 1,5 п. л.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Тираж 100 экз.
Заказ № 01/15**

**Издательство «Истеъдод».
734025, г. Душанбе, проспект Рудаки, 36.
Тел.: 221-95-43. E-mail: istedod2010@mail.ru**