

**МИНИСТЕРСТВО ПРОМЫШЛЕННОСТИ И НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ  
РЕСПУБЛИКИ ТАДЖИКИСТАН  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО – ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ ПИТАНИЯ**

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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

**Научный руководитель:**  
кандидат химических наук  
**Джураев Х.Ш.**

**Душанбе – 2015**

## О Г Л А В Л Е Н И Е

	Стр.
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР</b>	
1.1. Химико-биологическая характеристика холестерина.....	8
1.2. Химико-биологическая характеристика использованных органических кислот в эксперименте	
а) Аскорбиновая кислота.....	14
б) Лимонная кислота.....	17
в) Янтарная кислота.....	18
г) Ацетилсалициловая кислота.....	19
1.3. Спиновые метки.....	21
1.3.1. Сведения об использовании метода спиновых меток в биологических объектах.....	22
<b>ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	
2.1. Характеристика экспериментального материала.....	26
2.2. Физико-химические методы исследования.....	26
2.3. Методика определения растворимости холестерина.....	27
2.4. Методика исследования системы $\text{CaCl}_2$ – холестерин – $\text{H}_2\text{O}$ .....	28
2.5. Метод спиновых меток.....	29
2.6. Методика исследования молекулярной структуры холестерина спиновой меткой.....	30
<b>ГЛАВА III. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ</b>	
3.1. Изучение изменения рН и показателей преломления янтарной, лимонной и аскорбиновой кислот в зависимости от их концентрации в среде физраствора.....	32
3.2. Изменения рН и показателя преломления в смесях аскорбиновой, лимонной, янтарной и ацетилсалициловой кислот в зависимости от их концентраций в среде физраствора.....	36

3.3. Растворимость холестерина в различных концентрациях лимонной, янтарной и аскорбиновой кислот в среде физраствора.....	40
3.4. Исследование системы $\text{CaCl}_2$ – холестерин – $\text{H}_2\text{O}$ .....	43
<b>ГЛАВА IV. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРИРОДНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ НА НАДМОЛЕКУЛЯРНУЮ СТРУКТУРУ ХОЛЕСТЕРИНА МЕТОДОМ СПИНОВОЙ МЕТКИ.....</b>	<b>47</b>
4.1. Исследование молекулярной структуры холестерина методом спиновой метки.....	48
4.2. Исследование влияния ацетилсалициловой и янтарной кислот на молекулярную структуру холестерина методом спиновой метки.....	52
4.3. Исследование влияния лимонной и аскорбиновой кислот на молекулярную структуру холестерина методом спиновой метки.....	57
4.4. Исследование влияния хенодезоксихолевой кислоты на молекулярную структуру холестерина методом спиновой метки.....	63
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>67</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>83</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>84</b>
<b>ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>85</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**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, неомицин, 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  $\text{CaCl}_2$  – холестерин –  $\text{H}_2\text{O}$ ;

– 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  $\text{CaCl}_2$  – холестерин –  $\text{H}_2\text{O}$ ;

- 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); 1<sup>st</sup> 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.

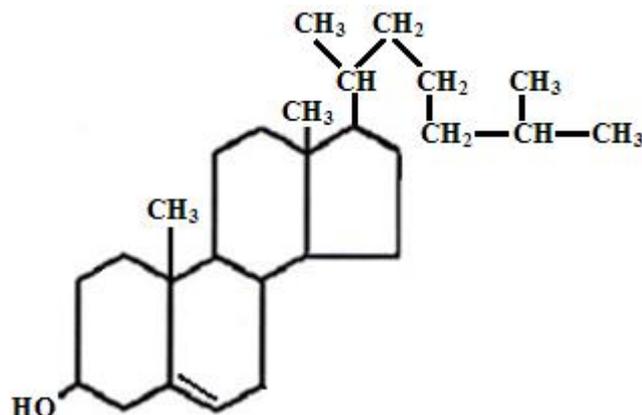
## ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Химико-биологическая характеристика холестерина

В 1769 году французский ученый Пулетье де ла Саль получил из желчных камней плотное белое вещество («жировоск»), обладавшее свойствами жира. В чистом виде холестерин был выделен химиком, членом национального Конвента и министром просвещения Франции Антуаном Фуркруа в 1789 году. В 1815 году Мишель Шеврёль, также выделивший это соединение, неудачно окрестил его холестерином («холе» - желчь, «стерин» - жирный). В 1859 году Марселен Бергло доказал, что холестерин принадлежит к классу спиртов. Это обязывало иметь в химическом названии вещества суффикс «-ол», поэтому в 1900 году французы переименовали холестерин в «холестерол».

Холестерин в организме содержится как в свободной, так и в этерифицированной форме. Кристаллический холестерин представляет собой белое оптически – активное вещество с температурой плавления 150°C. Оно не растворимо в воде, но легко экстрагируется хлороформом, эфиром, бензолом или горячим спиртом. Наиболее давно известным стеринном является холестерин – стерин животного происхождения (от греч. chole – желчь, stergeos – твердый)  $C_{27}H_{45}OH$ . Содержание холестерина в виде эфиров встречается почти во всех органах человека, но особенно в больших количествах в мозге, веществе нервов и клеточных мембранах.

Холестерин – вторичный спирт, содержащий одну двойную связь в кольце В:



Растворимость холестерина в желчи зависит от его концентрации, желчных солей и лецитина. Холестерин и лецитин нерастворимы в водных растворах. В соответствии литературным данным холестерин – лецитин и желчные кислоты образуют растворимые мицеллы.

### **Биологическая роль**

Холестерин был открыт в 18 – ом веке. Это вещество, относящееся к группе жиров, играет огромную роль в строении тканей и жидкостей организма. Также важна его роль и в создании клеточных структур. Он составляет основу ряда гормонов, принимает участие в образовании желчных кислот, является составной частью витамина Д и клеточных мембран. Большое количество потребляемых нами жиров печень перерабатывает в холестерин. Из нее он попадает в желчь, потом адсорбируется кровью, с которой и поступает в ткани. Степень опасности холестерина зависит от его количества в пище и уровня в крови. При повышенном количестве, он откладывается на стенках артерий, которые способствуют образованию атеросклеротических бляшек. Установлено, что количество холестерина на стенках сосудов прямо пропорционально таковому в крови. Повышение содержания свободного холестерина в крови непосредственно связано с потреблением большого количества животных жиров [1-10].

Холестерин в составе клеточной плазматической мембраны играет роль модификатора биослоя, придавая ему определенную жесткость за счет увеличения плотности «упаковки» молекул фосфолипидов. Таким образом, холестерин – стабилизатор текучести плазматической мембраны [11, 12, 13, 14, 15].

Поскольку холестерин плохо растворим в воде, в чистом виде он не может доставляться к тканям организма при помощи, основанной на воде крови. Вместо этого холестерин в крови находится в виде хорошо растворимых комплексных соединений с особыми белками – транспортёрами, так называемыми аполипопротеинами. Такие комплексные соединения называются липопротеинами.

Существует несколько видов аполипротеинов, различающихся молекулярной массой, степенью сродства к холестерину и степенью растворимости комплексного соединения с холестерином (склонностью к выпадению кристаллов холестерина в осадок и к формированию атеросклеротических бляшек). Различают следующие группы: высокомолекулярные (HDL, ЛПВП, липопротеиды высокой плотности) и низкомолекулярные (LDL, ЛПНП, липопротеиды низкой плотности), а также очень низкомолекулярные (VLDL, ЛПОНП, липопротеиды очень низкой плотности) и хиломикроны. К периферийным тканям холестерин транспортируется хиломикроном, ЛПОНП и ЛПНП. К печени, откуда затем холестерин удаляется из организма, его транспортируют аполипротеины группы ЛПВП [16, 17, 18, 19, 20, 21].

Роль, которую играет в развитии атеросклероза общий холестерин, т. е. ЛНП и ЛВП, сегодня совершенно ясна. Насыщение крови чрезмерным количеством холестерина, т. е. откладывание тяжелых воскообразных жиров на стенках сосудов (атеросклероз), зависит не от возраста. Главный его виновник – нездоровый образ жизни.

В первой половине XX в. русский исследователь Н.Н. Аничков искусственно вводил кроликам холестерин, после чего у них развивались тяжелые формы атеросклероза [22]. Позже японские ученые вывели даже специальную породу кроликов с генетическими нарушениями, у которых атеросклероз развивался наиболее быстро. Эти эксперименты в свое время широко дискутировались в прессе, породив теорию «холестериновой болезни», которая возникает от избытка жирной пищи и неизбежно приводит к поражению кровеносных сосудов. Выявлено, что если желчь перенасыщена холестерином, то она становится коллоидной, неустойчивой и в ней образуются холестериновые кристаллы. Выпадение в осадок нерастворимого холестерина, как утверждают авторы, имеет прямую зависимость от эквивалентных соотношений концентрации желчных кислот и лецитина. Этим же автором был установлен предел растворимости холестерина в зависимости от концентрации желчных

солей. На тройной диаграмме по пересечению линий растворимости было установлено, что холестерин – желчные кислоты – лецитин при определенных концентрациях образуют смешанные двойные соли, которые в дальнейшем назывались мицеллы. Благодаря именно этим мицеллам определенное количество нерастворимого холестерина находится в растворенном состоянии. Отсюда и появилось понятие «литогенный индекс». Считалось, что Адмиранду и Смолю удалось установить максимальную растворимость холестерина в смешанных мицеллах желчных солей и лецитина. В 1983 году Н.А. Магер в соавторстве установили, что не весь холестерин транспортируется в составе мицелл, а определенная его часть поступает в желчь в виде лецитин – холестеринных микрокомплексов. С этого момента возник вопрос, происходит ли насыщение холестерина из комплексов мицелл в равной степени или в большем объеме из одного из этих носителей. Исследования, проведенные автором Halregп Z и др., в 1986 году показали тесную связь холестеринных кристаллов с комплексными агрегатами, которые, возможно, приводят к энуклеации холестерина.

В дальнейших исследованиях [23, 24, 25, 26, 27, 28] показано, что причиной образования холестеринных желчных камней является агрегация микрокомплексов в желчи. Осаждение кристаллов холестерина в одних случаях совершается гомогенным способом ядрообразования, в других случаях гетерогенным ядрообразованием, в данном случае центром кристаллизации могут быть минеральные соли, а не холестерин. Масса холестерина, содержащегося в кишечнике, ежедневно увеличивается приблизительно на 1 г в течение суток. В его образовании в организме человека принимают участие главным образом насыщенные жирные кислоты и уксусная кислота, содержащиеся в продуктах животного происхождения. Дело в том, что общий объем веществ у них, включая и жировой обмен неодинаковый, как и двигательная активность. Возможно, они по-разному реагируют на рекомендации, касающиеся питания. Доказано, что чем выше потребление животных жиров с пищей, тем выше уровень холестерина в крови.

В 70 – х годах появилась желчно – кислотная терапия, направленная на растворение холестерина. Наиболее перспективными лекарственными препаратами оказались хенодезоксихолевая (ХДХК) и урсодезооксихолевая (УДХК) кислоты, которые являются основными желчными кислотами [29, 30, 31, 32]. Последние 20 лет благодаря фундаментальным работам Адмиранда и Смолю, Сагеу М.С. [33], а также Х.Х. Мансурова [34, 35, 36] достигнуты значительные успехи в изучении, механизмов холестеринового камнеобразования. В этом направлении большая работа проведена в Институте гастроэнтерологии АН Республики Таджикистан под руководством академика Х.Х. Мансурова и других ученых [37, 38, 39]. Для растворения холестериновых камней авторы брали больных, у которых после тщательного обследования было определено, что желчные камни являются холестериновыми. В результате экспериментальных работ, проведенных авторами, было установлено, что под влиянием хенотерапии в желчи больных постепенно снижалось содержание билирубина и холестерина, и напротив, резко возрастало количество суммарных желчных кислот, то есть постепенно улучшалось физико-химическое и биохимическое состояние желчи у больных ЖКБ. При этом, как утверждают авторы, заметно поднимался холатохолестериновый коэффициент. Полное растворение холестериновых камней небольших размеров, как заметили авторы, происходит через 13 месяцев лечения больных.

Bateson W. с соавторами, 1978 считают, что если через 6 месяцев желчнокислотной терапии удастся констатировать частичное растворение конкрементов, то можно рассчитывать на полное их растворение. Группа Dowling R.H. 1975 обнаружила, что диаметр в 1,5 см является наиболее подходящей величиной для камней. Для растворения холестериновых камней [40, 41, 42, 43] помимо ХДХК широко используется урсодезооксихолевая кислота (УДХК). Урсодезооксихолевая кислота в Японии использовалась как народное средство, лишь с 1975 года в Японии и с 1977 года в странах Запада появились первые сообщения о ее применении в качестве литолитического средства.

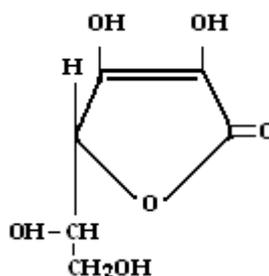
Урсотерапия, как и хенотерапия пригодна лишь для растворения холестериновых камней.

По наблюдениям Х.Х. Мансурова [44], УДХК по сравнению с ХДХК, лучше разнасыщает желчь, особенно в первые три месяца терапии. Большая экспериментальная работа была проведена авторами при сочетании УДХК и ХДХК. Согласно [45] совместное применение УДХК и ХДХК обеспечивает наивысший процент накопления литолитических желчных кислот в желчи. Результаты исследования, проведенные авторами Dowling R. и другие показали, что продолжительное применение УДХК в сочетании ХДХК приводит к растворению не холестериновых компонентов желчных камней. Это так называемые остаточные осколки, состоящие из кальция и нерастворимого карбоната. В 1986 г. появились работы Tristle и др. по растворению холестериновых камней, путем введения литолитических веществ непосредственно в жёлчный пузырь. Для растворения применялся химический препарат метилтетрабутиловый эфир. Метод основан на подкожном введении препарата в желчный пузырь через трубчатый катетер диаметром в + 1,7 мм под контролем флюороскопии или ультрасонографии. После введения препарата, как утверждают авторы, через 2-3 часа происходит значительное растворение холестериновых желчных камней.

Серия экспериментов, проведенных Эндрюсом и Шенгмером на модели, представляющей собой пергаментную диализную мембрану, было установлено, что через мембрану проходят лишь желчные кислоты, а не холестерин. На этой модели авторы доказали, что измененный желчный пузырь действует наподобие диализной мембраны в том плане, что желчные кислоты проходят через воспалительно – измененную слизистую желчного пузыря, а холестерин остается. Следует отметить, что полученные автором данные окончательно утвердили исключительную важность физико-химической стабильности желчи, необходимой для поддержания холестерина в растворенном состоянии. Выявлено, что если желчь перенасыщена холестерином, то она становится коллоидно-неустойчивой и в ней образуются холестериновые кристаллы.

## 1.2. Химико-биологическая характеристика использованных органических кислот в эксперименте

**а) Аскорбиновая кислота (АСК)** [46, 47, 48, 49] (витамин С, γ – лактон 2,3 – дегидро – L – гулоновой кислоты), молекулярный вес 176,13 – бесцветные кристаллы, температура плавления 190 – 192°C. Структурная формула аскорбиновой кислоты:



Аскорбиновая кислота хорошо растворима в воде, хуже в спирте, мало растворима в глицерине и в ацетоне, нерастворима в ароматических и алифатических углеводородах, в галогенуглеводородах и в эфире. Аскорбиновую кислоту получают синтетически из D-сорбита, окисляя последний получают (L – сорбозу), а в дальнейшем при окислении этого продукта получают L – аскорбиновую кислоту.

Витамин «С» с целью влияния на холестерин начали использовать относительно недавно, с 70-х годов. Его гипохолестеринемическое действие появляется, начиная с дозы 1 г в сутки. Предполагается, что основную роль в данном случае играет, антиоксидантное действие витамина С. Вспомним, что без свободно радикального окисления липопротеиды низкой плотности не могут включаться в атеросклеротическую бляшку. Аскорбиновая кислота значительно потенцирует (усиливает) действие всех других антиоксидантов, что позволяет использовать их в комплексе с аскорбиновой кислотой при лечении атеросклероза. В – каротин считающийся, одним из самых сильных природных антиоксидантов вообще не действует при отсутствии витамина С.

Действие витамина С может быть значительно усилено при сочетании его с витамином Р (рутин, кварцетин и другие биофлавоноиды). Добавление витамина Р к аскорбиновой кислоте в равных пропорциях значительно усиливает ее эффективность, иногда даже в 2 – 3 раза. Это позволяет в одних случаях понизить дозу аскорбиновой кислоты, в других – получить более выраженный клинический результат. Нелишне напомнить, что витамин Р сам по себе является антиоксидантом и его потенцирующее действие по отношению к аскорбиновой кислоте обусловлено тем, что он, в основном, замедляет ее окисление в тканях, и снижая проницаемость тканей, уменьшает скорость выведения витамина С из организма.

Антиоксидантное действие аскорбиновой кислоты не является единственным механизмом ее антисклеротического действия. Аскорбиновая кислота является сильным ингибитором гиалуронидазы – фермента, повышающего гидрофильность и общую проницаемость тканей. Блокируя гиалуронидазу, витамин С снижает проницаемость тканей и значительно затрудняет проникновение холестерина в сосудистую стенку. Большинство авторов считают антигиалуронидазный механизм основным механизмом антиатеросклеротического действия аскорбиновой кислоты, но и этот механизм тоже не является единственным.

Известно, что атеросклероз поражает лишь крупные сосуды, стенки которых состоят в основном из коллагеновых волокон. Мелкие сосуды, не содержащие коллагена, атеросклерозу не поддаются. Аскорбиновая кислота является необходимым участником в процессе синтеза коллагеновых волокон. Поэтому введение ее в больших дозах делает коллагеновую стенку крупных сосудов более прочной и менее уязвимой по отношению к холестерину. Аскорбиновая кислота значительно улучшает фосфолипидный обмен. Поэтому она препятствует проникновению холестерина не только в сосудистую стенку, но и в клеточные мембраны, так как снижает их проницаемость для холестерина.

Аскорбиновая кислота принимаемая, в больших дозах может служить лишь профилактическим средством по отношению к развитию общего холестериноза. Обратного развития уже образовавшихся атеросклеротических бляшек она не вызывает и накопившийся в тканях холестерин не выводит.

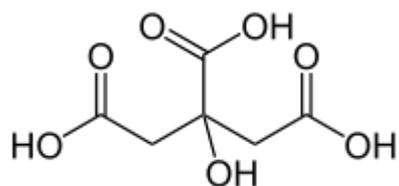
Большие дозы аскорбиновой кислоты (3 – 10 г/сут) значительно повышают выносливость и поэтому широко используются в спортивной практике. Прием аскорбиновой кислоты позволяет значительно сократить сроки восстановления после травм – ушибов, растяжений, вывихов, переломов. Послеоперационное сращивание костей и мягких тканей тоже значительно ускоряется при использовании больших доз аскорбиновой кислоты, особенно в сочетании с витамином Р и хлористым кальцием.

Выделение L – аскорбиновой кислоты в виде ее концентратов из растительного сырья практикуется в меньшем масштабе. Кислотные свойства L – аскорбиновой кислоты характеризуются следующими показателями:  $PKa_1$  4,17,  $PKa_2$  11,57. При действии сильных щелочей Y – лактонное кольцо L – аскорбиновой кислоты гидролитически размыкается с образованием соли кетокислоты. Со слабыми щелочами L – аскорбиновая кислота легко образует нейтральные феноляты без размыкания лактонного кольца; с высшими жирными кислотами (например, с пальмитиновой). L – аскорбиновая кислота образует сложные эфиры, применяемые в качестве жирорастворимых антиоксидантов. Для L – аскорбиновой кислоты характерна способность к обратимым окислительно-восстановительным превращениям с образованием дегидроаскорбиновой кислоты. В этой форме L – аскорбиновая кислота частично находится в организме, в растворах легко окисляется в присутствии воздуха, особенно при каталитическом влиянии меди и серебра, на холоде восстанавливает Фелинга реактив, нейтральный раствор перманганата калия и др., при нагревании с соляной кислотой образует фурфурол.

Способность к окислительно – восстановительным превращениям, сопровождающаяся перенесением атомов водорода к акцепторам, является важнейшей каталитической функцией L – аскорбиновой кислоты, как витамина

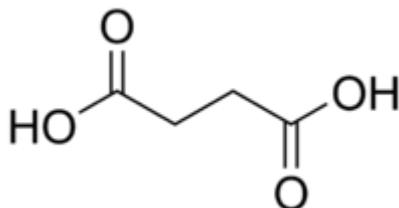
в живом организме. L – аскорбиновая кислота способствует образованию дезоксирибонуклеиновой кислоты. Организм человека и животных не способен сам синтезировать аскорбиновую кислоту, потребность в ней удовлетворяется витамином С, вводимым с пищей. При авитаминозе у человека, обезьян и морских свинок развивается цинга (скорбут). Для количественного определения L – аскорбиновой кислоты применяют йодный или йодатный метод титрования.

**б) Лимонная кислота (ЛК)**  $C_6H_8O_7$ , молекулярный вес 192,1 одноводный кристаллогидрат; температура плавления безводной  $153^{\circ}C$ ; в воде хорошо растворима; константы диссоциации ( $18^{\circ}C$ );  $K_1=8,10$ ,  $K_2=1,7 \cdot 10^{-4}$  и  $K_3=4,0 \cdot 10^{-8}$  [50, 51, 52]. Структурная формула лимонной кислоты:



При нагревании до  $175^{\circ}C$  ЛК переходит в аконитовую и ацетондикарбоновую кислоты, выше  $175^{\circ}C$  образует новую кислоту. При прокаливании ЛК со щелочью образуются соли щавелевой и уксусной кислоты. Лимонная кислота имеет свойства многоосновных кислот, давая три ряда солей и эфиров. Лимонная кислота широко распространена в природе, относительно много ее содержится в некоторых ягодах, фруктах, особенно в цитрусовых (в лимоне 6-8 %). Значительные количества лимонной кислоты содержатся также в листьях хлопчатника и стеблях махорки, откуда ее и выделяют (один из промышленных способов). Лимонную кислоту выделяют в виде лимоннокислого кальция из продуктов переработки хвои, ели или из плодов лимона, а также получают из раствора сахара с помощью некоторых грибков. Лимонная кислота находит значительное применение в фармакологии и пищевой промышленности (в приготовлении напитков, кремов, желе и так далее). В небольшом количестве лимонную кислоту употребляют в производстве некоторых алкидных смол.

в) **Янтарная кислота (ЯК)** продукт, полученный в результате переработки натурального янтаря, молекулярный вес 118,09 г/моль, температура плавления 183<sup>0</sup>С. Это абсолютно безвредное вещество, обладающее особыми полезными свойствами. Оно представляет собой белый кристаллообразный порошок, по вкусу очень напоминающий лимонную кислоту. ЯК получила широкое применение в медицине [53, 54, 55]. Структурная формула янтарной кислоты:



Диапазон действия ЯК очень широк: она стимулирует нервную систему, укрепляет деятельность почек и кишечника, применяется как противострессовое, противовоспалительное и антиоксидантное средство. ЯК используется для лечения различного рода анемий, острых радикулитов, хронических сердечно – сосудистых заболеваний (коронарный атеросклероз и инфаркт миокарда). Действие ЯК легко переносится больными, не оказывая побочного действия, и она может быть применена в поликлинических условиях с благоприятным укрепляющим действием.

Особенно хорошо зарекомендовала себя янтарная кислота как лечебное средство в случае патологии сердечной мышцы. Сама кислота - абсолютно не накапливающееся вещество – обеспечивает естественную нормализацию животного и растительного организмов.

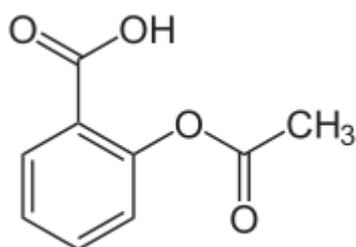
ЯК также применяется при лечении различного рода опухолей. Для этого необходимо делать компрессы из медицинской желчи с добавлением в нее янтарной кислоты. Обычно после непродолжительного лечения опухоли полностью рассасываются.

Благотворное влияние ЯК оказывает на людей, страдающих воспалением щитовидной железы. Наиболее эффективным считается метод втирания в область щитовидной железы янтарного масла (также продукт переработки янтаря). Но

янтарное масло обладает неприятным специфическим запахом, поэтому лучше рекомендуется постоянно носить на шее нитку бус из натурального янтаря и одновременно употреблять раствор янтарной кислоты внутрь. Доктор Я.Ю. Шпирт, который лечил больных с большим сердцем, указывал в своей статье «На пути к долголетию», что ЯК обладает омолаживающим эффектом, то есть ЯК обладает очень важным свойством: она сама находит в организме те участки, которые в ней нуждаются. Людей, регулярно употребляющих ЯК, не покидает чувство бодрости, свежести, повышенной активности, у них всегда хорошее самочувствие, отсутствует слабость, бессонница и неприятные ощущения в области сердца.

ЯК обладает еще одним превосходным свойством, она нейтрализует алкоголь в крови. В процессе эволюции живая природа перепробовала на полезность для жизненно важных процессов самые разнообразные простые и сложные соединения. Очевидно, что для этих целей янтарная кислота оказалась весьма подходящей, и с незапамятных времен широко используется всеми организмами. Она еще 50 млн. лет назад участвовала в обмене веществ живых систем и в значительных количествах сохранилась до наших дней в янтаре. Любой организм и сегодня в неблагоприятных условиях заметно увеличивает производство янтарной кислоты, что позволяет ему успешно сопротивляться вредным воздействиям окружающей среды.

г) **Ацетилсалициловая кислота (АЦК)** брутто формула –  $C_9H_8O_4$ . Она представляет собой белые мелкие игольчатые кристаллы или легкий кристаллический порошок, малорастворимый в воде при комнатной температуре, растворимый в горячей воде, легко растворимый в спирте, растворах едких и углекислых щелочей [46, 53]. Структурная формула ацетилсалициловой кислоты:



Ацетилсалициловая кислота впервые была синтезирована Шарлем Фредериком Жераром в 1853 году. В 1897 года Феликс Хоффман, работавший в лабораториях фирмы Bayer AG, первый раз получил образцы ацетилсалициловой кислоты в форме, возможной для медицинского применения. Bayer зарегистрировала новое лекарство под торговой маркой аспирин. Изначально был известен лишь жаропонижающий эффект аспирина, позднее выяснились также его болеутоляющее и противовоспалительное свойства. Впервые годы аспирин продавался как порошок, а с 1904 года в форме таблеток. В 1983 году в медицинском журнале «New England Journal of Medicine» появилась публикация исследований, в которой было доказано новое важное свойство препарата при постоянном его употреблении – в 2 раза уменьшается риск инфаркта миокарда.

Важной особенностью ацетилсалициловой кислоты является её способность оказывать антиагрегатное действие, то есть препятствовать спонтанной и индуцированной агрегации тромбоцитов. Ацетилсалициловая кислота является единственным антиагрегатным препаратом, эффективность которого при назначении в острый период ишемического инсульта подкреплена данными доказательной медицины. Ацетилсалициловая кислота является эффективным, вполне доступным средством, имеющим широкое применение в качестве противовоспалительного, жаропонижающего, анальгезирующего средства и в амбулаторной практике.

Аспирин также снижает риск заболеть раком, в частности, молочной железы и толстой кишки. Растворимость ацетилсалициловой кислоты в воде и водных средах сильно зависит от уровня pH. При pH=2 её растворимость в воде не превышает 60 мкл/л, однако быстро увеличивается по мере повышения значения pH (увеличение щёлочности) [46, 53].

### 1.3. Спиновые метки

Первые экспериментальные работы по применению метода спиновых меток в исследованиях биополимеров были выполнены профессором Г.И. Лихтенштейном и его сотрудниками в СССР и в лаборатории Х. Мак – Коннела в США [56, 57, 58, 59, 60, 61]. С тех пор этот метод нашел широкое применение в различных областях молекулярной биологии, физико-химии полимеров и т. д. [62, 63, 64, 65-69].

Суть метода заключается в том, что в полимерную матрицу вводят стабильный нитроксильный радикал (НР), спектр ЭПР которого чувствителен к конформационной подвижности макромолекулы.

В советской литературе принято называть спиновыми метками НР, которые химически присоединяются к молекулам матрицы (полимерам и др.) [70, 71, 72, 73-79]. Радикалы, которые физически взаимодействуют с молекулами матрицы, называют спиновыми зондами.

Вследствие анизотропии д-фактора  $\chi$  – анизотропии сверхтонкого взаимодействия электронного спина с ядром атома спектр ЭПР нитроксильного радикала зависит от его ориентации во внешнем магнитном поле. Статистические изменения ориентации радикала модулируют магнитные взаимодействия. Поэтому форма спектра ЭПР зависит от вращательной подвижности радикалов. По форме спектра, регистрируемого в стандартных условиях (первая гармоника сигнала поглощения, ненасыщающие значения микроволновой мощности), можно оценить время корреляции вращательных движений  $\tau_c$  радикала [80, 81, 82, 83, 84, 85], [86, 87, 88, 89, 90] в диапазоне  $\tau_c = 10^{-3} - 10^{-11}$  с.

Перечислим основные задачи, для решения которых могут эффективно использоваться спиновые метки в твердых полимерах. Таковыми являются: сравнение вращательной подвижности различных структурных элементов макромолекул – средних, боковых и концевых групп; определение влияния гибкости химических связей на частоты и анизотропию фрагмента цепи, содержащего спиновую метку; установление взаимосвязи движения

низкомолекулярных частиц (зондов) с подвижностью элементов макромолекул (меток) [81, 91-94].

Остановимся на некоторых работах, иллюстрирующих возможности метода и возникающие при этом проблемы.

В работе [95] проведено сравнительное исследование влияния встраивания и выведения холестерина на микровязкость фосфолипидного бислоя и активность ферментов плазматической мембраны клеток некоторых асцитных опухолей и нормальных клеток, а также выполнение возможного цитостатического действия встраивания холестерина в опухолевые клетки.

Методом спиновых меток в работе [96] выявлены количественные изменения липидного состава плазматической мембраны микоплазмы при увеличении возраста культуры: снижение содержания общих липидов, гликолипидов, фосфолипидов и каротиноидов, увеличение содержания холестерина, а также увеличение молярного соотношения холестерин / фосфолипиды.

Таким образом, метод спиновых меток позволяет получить важные сведения о молекулярной структуре холестерина. Исходя из этого, в наших работах впервые методом спиновой метки с использованием нитроксильного радикала (I) было установлено, что нитроксильный радикал взаимодействует с молекулой холестерина.

### **1.3.1. Сведения об использовании метода спиновых меток в биологических объектах**

Одной из предпосылок при создании метода спиновых меток послужили работы по синтезу нового класса пиперидиновых и пирролидиновых иминоксильных стабильных радикалов, проведенные по инициативе профессора М.Б. Неймана в 1959–1963 гг. в Институте химической физики АН СССР профессором Э.Г. Романцевым с сотрудниками.

Эти радикалы имели одинаковые химические и физические свойства и были стабильными в индивидуальном состоянии за счет исторических факторов и сопряжения. Все они являются парамагнитными и обладают синглетными спектрами ЭПР в кристаллическом состоянии, триплетными спектрами в растворах и более сложной сверхтонкой структурой (СТС) при сильном разбавлении и отсутствии кислорода. Для всех перечисленных радикалов были известны лишь радикальные реакции, сопровождающиеся потерей неспаренного электрона. Новый класс стабильных нитроксильных радикалов 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил (I) был выделен в 1962 г. Розанцевым З.Г. с сотрудниками [97, 98]. С получением этих радикалов были открыты первые нерадикальные реакции свободных радикалов без затрагивания свободной валентности. Создание нового класса стабильных нитроксильных радикалов заложило основу для возникновения и развития метода спиновых меток и зондов [99, 100, 101, 102].

Более подробно структура и свойства биологических объектов была изучена в работах [103, 104, 105, 106]. Поскольку физическим и химическим свойствам нитроксидов посвящено большое число обзорных работ, мы лишь вкратце остановимся на их стабильности, методах синтеза и радикальных реакциях, а также применении для изучения структуры белков и полимеров [107, 108, 109-113]. Нитроксильные радикалы, которые применяются для различных исследований, являются стабильными и могут быть хранимы как обычные органические соединения. Высокая стабильность нитроксидов объясняется следующими факторами: делокализацией свободной валентности и пространственным экранированием парамагнитного реакционного центра.

Как известно, нитроксильные радикалы представляют собой стабильные свободные радикалы и во многих реакциях участвуют без затрагивания свободной валентности. Однако они могут терять парамагнетизм при взаимодействии с некоторыми биологическими системами, а также в условиях ряда реакций непарамагнитных групп спиновых меток. Реакции нитроксидов с участием неспаренного электрона подробно обсуждались в работах [80, 100].

Такие реакции можно разделить на следующие основные группы: диспропорционирование – свободно – радикальная реакция по атому кислорода.

1. Разрыв связи углерод-азот.
2. Одноэлектронное окисление.
3. Одноэлектронное восстановление.
4. Реакция с сильными кислотами.
5. Свойства нитроксидов.

Для восстановления нитроксильных радикалов необходимо присутствие не только донора электронов, но также и протонов. Этим объясняется высокая устойчивость нитроксильных радикалов по отношению к щелочным металлам, с некоторыми они взаимодействуют при повышенных температурах в растворителях, способствующих переносу электронов [114].

Восстановление нитроксильных радикалов протекает только в кислой среде или при использовании в качестве восстановителей соединений, обладающих подвижным водородом. Восстановителем, прежде всего, является водород, ретивированный с помощью различных каталитических систем. В качестве восстановителей используют обычно органические соединения, которые обладают низким окислительным потенциалом, например, гидразин и его производные. С помощью различных методов восстановления нитроксильных радикалов удалось синтезировать большое число микроксиламинов в ряду гидрированного пиррола и пиридина.

При этом особое значение имела открытая авторами реакция без затрагивания свободной валентности. Работы по изучению физических свойств иминоксильных радикалов, выполненные в Институте химической физики профессором А.Л. Бучаченко с сотрудниками, а также за рубежом группами Мак – Коннелла и Кивельсона, заложили физические основы метода спин – меток. Метод спин – меток в большей степени зависит от возможности специфического присоединения иминоксильных радикалов к определенным группам белка. Поэтому большей частью применяются метки, содержащие в качестве активной группы фрагменты известных реагентов, избирательность действия которых

проверена на большом экспериментальном материале [115, 116, 117]. В настоящее время имеется широкий ассортимент спиновых меток, более или менее специфически реагирующих функциональными группами. В каждой метке можно условно выделить три основные части:

1. парамагнитный фрагмент, пирролидиновое или пиперидиновое иминоксильное кольцо или комплекс переходного металла, дающий интенсивный сигнал ЭПР;

2. химический активный остаток, при помощи которого осуществляется ковалентное или координационное присоединение к определенной группе;

3. соединяющую группу атомов, строение которой (длина, гибкость, гидрофобность, полярность) во многом определяет метка после присоединения к матрице исследуемого вещества.

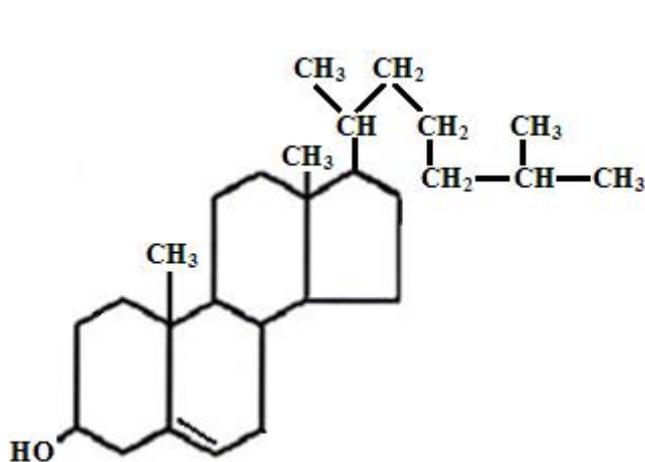
Парамагнитные производные окиси азота были известны еще в XVIII и XIX вв. Большой вклад в создании и изучении стабильных радикалов этого рода внесли труды Виланда, Хюккеля, Мейера, Кеньона, Бснфилда. В 1959 г. О.Л. Лебедев и С.Н. Казарновский получили радикал тетраметилпентаметиленокись азота [118], а в 1961 г. Гофман и Гендерсон синтезировали ди-трет-бутил азотокись [119].

Суть метода заключается в том, что в макромолекулы исследуемого объекта вводят стабильный нитроксильный радикал, спектр ЭПР которого чувствителен к конформационной подвижности макромолекулы. В научной литературе принято называть спиновыми метками нитроксильный радикал, который химически присоединяется к молекулам исследуемого объекта. Вследствие анизотропии  $d$  – фактора,  $c$  – анизотропии сверхтонкого взаимодействия электронного спина с ядром атома спектр ЭПР нитроксильного радикала зависит от его ориентации во внешнем магнитном поле. Статистические изменения ориентации радикала модулируют магнитные взаимодействия [120, 121, 122-126].

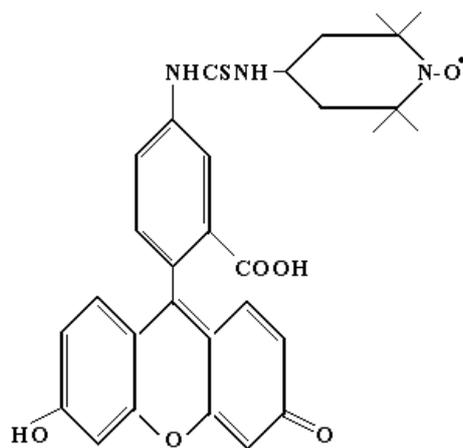
## ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. 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):



(1)



(2)

### 2.2. Физико-химические методы исследования

Измерения pH проводились на приборе pH – метр, производства METTLER TOLDO. Показания преломления (n) – измерялись на приборе марки ИРФ – 454 БМ. Растворимость холестерина в жидкой фазе определялась фотоколориметрическим методом на ФЭК марки КФК – 2МП. Влияние вышеуказанных органических кислот на молекулярную структуру холестерина определялось с использованием метода спиновой метки на приборе ЭПР марки РЭ – 1306.

### 2.3. Методика определения растворимости холестерина

Растворимость холестерина в жизненно важных органических кислотах (лимонной, янтарной, аскорбиновой) определялась ферментативным – колориметрическим методом по Ильку, реакция Либермана – Бухарда [127]. Принцип метода определения холестерина заключается в том, что при гидролизе эфиров холестерина эстеразой образуется свободный холестерин. Образовавшийся и имеющийся в пробе холестерин окисляется кислородом воздуха под действием холестеролоксидазы с образованием перекиси водорода, окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски при длине волны 500 нм прямо пропорционально концентрации общего холестерина в пробе [128]. По следующей методике: после измерения рН и показателя преломления растворов, в шесть плоскодонных колб (50 мл), содержащие по 50 мг кристаллического холестерина, добавляли определенные количества указанных органических кислот. Термостатирование образцов проводилось при температуре  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  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 1мл 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. Содержание холестерина определялось по формуле:

$$X \text{ (м/моль/л.)} = A_{\text{оп}} / A_{\text{ст}} \times 5,17$$

где  $A_{\text{оп}}$  - показание ФЭК образца,  $A_{\text{ст}}$  - показание ФЭК стандарта.

#### 2.4. Методика исследования системы $\text{CaCl}_2$ – холестерин – $\text{H}_2\text{O}$

Известно, что одной из причин дестабилизации жёлчи при ЖКБ является перенасыщение ее холестерином, следствием чего является образование холестериновых камней. Холестериновые камни в основном состоят из холестерина и солей кальция. Исследование системы  $\text{CaCl}_2$  – холестерин –  $\text{H}_2\text{O}$  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 [129].

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. Содержание хлорида кальция после определения холестерина вычисляли по формуле:

$$X = (A - B) \cdot 100$$

где  $X$  – содержание хлорида кальция в %,  $A$  – масса осадка,  $B$  – содержание холестерина.

Состав твердой фазы в тройной диаграмме  $\text{CaCl}_2$  – холестерин –  $\text{H}_2\text{O}$  устанавливали по пересечению лучей Шрейнемакера на тройной диаграмме Гиббса и химическим методом.

## 2.5. Метод спиновых меток

Число нитроксильных радикалов, присоединившихся к образцу, определяли путем сравнения спектра ЭПР меченого волокна со спектром эталонного водно – глицеринового раствора при температуре 77 К, используя формулу:

$$R_{\text{обр}} = R_{\text{эт}} \frac{h_{\text{обр}} (\Delta H_{\text{обр}})^2}{h_{\text{эт}} (\Delta H_{\text{эт}})^2}$$

где  $R_{\text{эт}}$ ,  $R_{\text{обр}}$  – концентрации спин – меток в этаноле и образце соответственно;  $h_{\text{эт}}$ ,  $h_{\text{обр}}$  – амплитуда центрального компонента спектра ЭПР этанола и образца;  $\Delta H_{\text{эт}}$ ,  $\Delta H_{\text{обр}}$  – ширина центральной компоненты спектра ЭПР этанола и образца.

Как уже отмечалось, параметры вращательной подвижности нитроксильных радикалов зависят от состояния и подвижности молекул окружающей среды.

В зависимости от значения времени корреляции  $\tau$  (соответственно частоты  $\mathcal{V}$ ) вращения радикала различают быстрые движения ( $\mathcal{V} \simeq 10^{10} - 5 \cdot 10^8 \text{ сек}^{-1}$ ), медленные движения ( $\mathcal{V} \simeq 5 \cdot 10^8 - 10^7 \text{ сек}^{-1}$ ), а также сверхмедленные движения ( $\mathcal{V} < 10^7 \text{ сек}^{-1}$ ) [57].

В области быстрых вращений частота вращения вычисляется по одной из следующих формул:

$$\mathcal{V}_{(+1)} = 1/\tau_{c(+1)} = \frac{2 \cdot 10^8}{\left( \sqrt{\frac{h_0}{h_{(+1)}}} - 1 \right) \Delta H_o} \text{сек}^{-1},$$

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

$$\gamma_{(\pm 1)} = \frac{1,2 \cdot 10^{10}}{\left( \sqrt{\frac{h_{(+1)}}{h_{(-1)}}} - 1 \right) \Delta H_{(+1)}} \text{сек}^{-1}.$$

где  $\Delta H_0$  и  $\Delta H_{+1}$  – ширина центральной и высокопольной компоненты спектра ЭПР в гауссах;  $h_0$ ,  $h_{+1}$ ,  $h_{-1}$  – амплитуда центральной, высокопольной и низкопольной компоненты спектра;  $\tau_c$  – время корреляции вращательной диффузии радикала.

## 2.6. 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 « $\tau_c$ », определяемой по формуле:

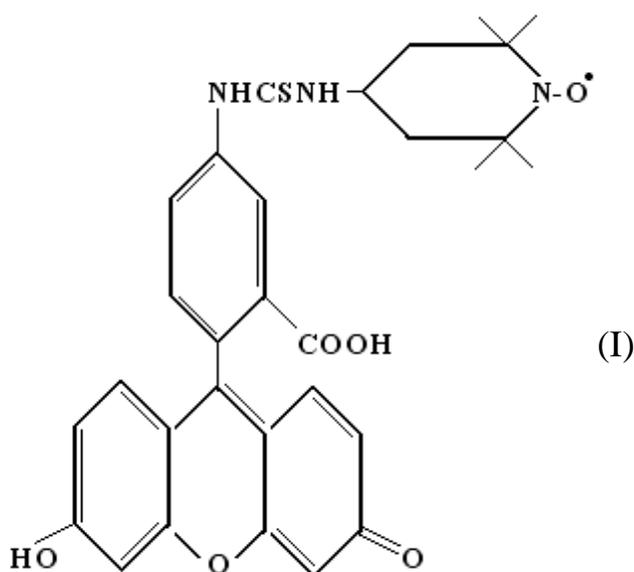
$$\gamma_{(-1)} = 1/\tau_{c(-1)} = \frac{3,6 \cdot 10^9}{\left( \sqrt{\frac{h_0}{h_{(-1)}}} - 1 \right) \Delta H_0} \text{сек}^{-1},$$

где  $\Delta H_0$  – ширина центрального компонента 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  $\tau$  увеличивается. Поэтому измерение этого параметра позволяет оценить эффективный молекулярный объём 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.

В качестве спиновых меток использовали нитроксильный радикал (I) с изотиоцианатной группой, имеющей следующую структурную формулу:



Нитроксил с изотиоцианатной группой можно применять для карбамоилирования аминогрупп [130]. Этот реагент значительно стабильнее соответствующего изоцианата и впервые получен Стоуном и др. [131]. В дальнейшем в тексте этот радикал будет обозначен (I).

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

## ГЛАВА III. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 3.1. 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.

Например, ферменты оказываются активными только при определенном для каждого фермента значении рН. Так фермент пепсин, участвующий в реакции расщепления жиров в желудке, проявляет максимум активности при рН=1,5, т. е. в очень кислой среде. Содержащийся в слюне фермент пталин, ускоряющий процесс осахаривания крахмала, наиболее активен при рН=6,7, т. е. почти в нейтральной среде. При отклонении величины рН от оптимальных значений активность ферментов сильно снижается или даже вовсе прекращается [132, 133]. В этом отношении огромное значение имеет влияние препаратов и пищевых продуктов на величину рН основных физиологических жидкостей организма и, в частности, на величину рН физиологической воды, крови, желчи и лимфы.

Если взять во внимание тот факт, что человеческий организм состоит из 70 – 75 % воды, которая является основным растворителем всех веществ, то становится понятным, какова роль значения рН физиологической воды, так как от кислотно-щелочной реакции организма зависят многие положительные и отрицательные свойства крови, желчи, лимфы и в целом состояние организма.

Измерение рН проводилось по методике указанной в главе II Материалы и методы исследования.

В качестве биосреды использовали аптечный физиологический раствор, который широко используется в медицине. Значения рН физиологической воды в организме имеют огромное значение, так как от кислотно-щелочной реакции организма зависят многие положительные и отрицательные свойства крови, желчи, лимфы, и в целом состояние организма. Следует отметить, что указанные органические кислоты в достаточном количестве содержатся в пищевых продуктах. В соответствии с литературными данными человек ежедневно употребляет в зависимости от сезона года от 50 до 250 мг хорошо усваиваемых 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.

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  $20^{\circ}\text{C}$ . Таким образом, использованные в данной работе кислоты снижают рН раствора до определенного уровня.

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. Полученные результаты приведены [134] в таблице 1 и изображены на рисунках 1, 2, 3.

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

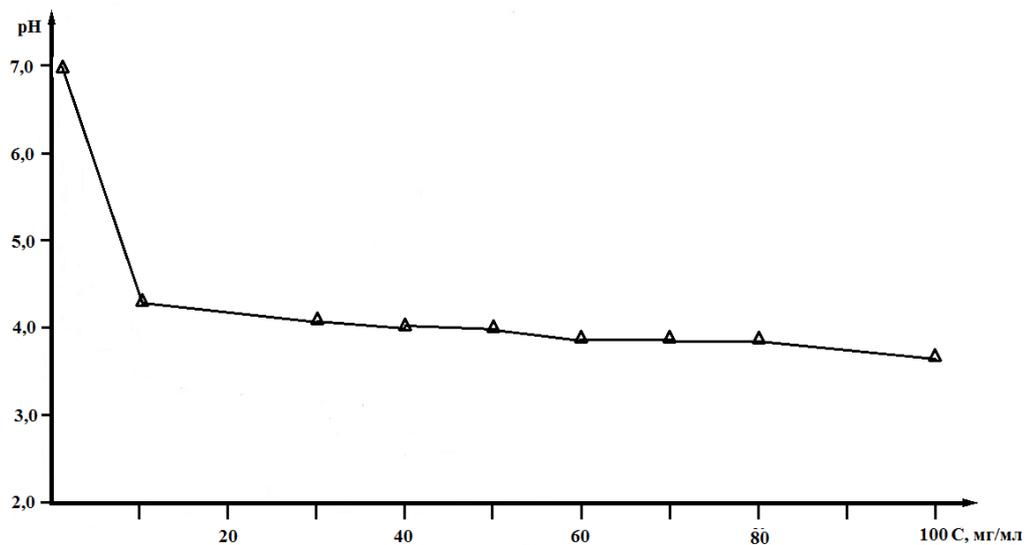


Рисунок 1. Изменение рН физраствора в зависимости от концентрации лимонной кислоты

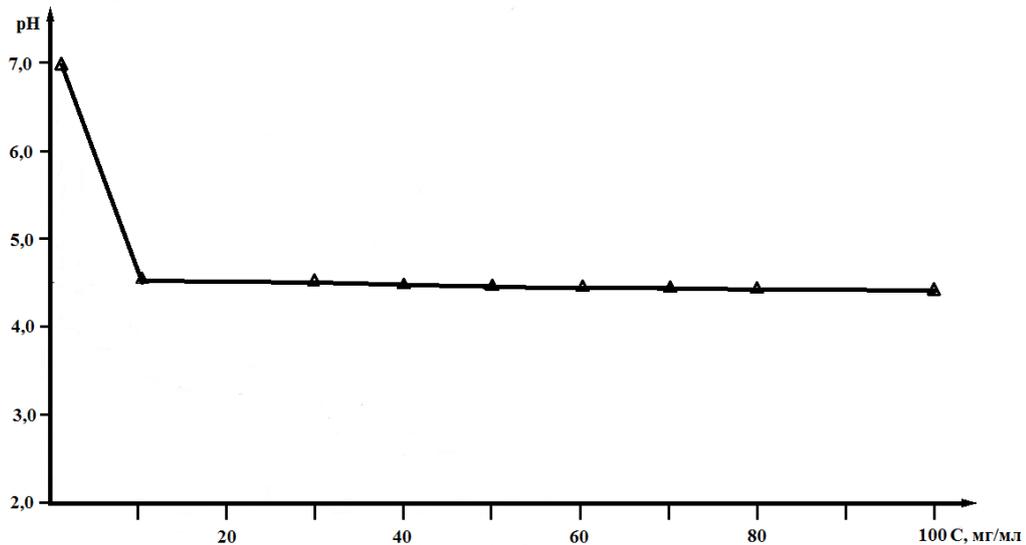


Рисунок 2. Изменение pH физраствора в зависимости от концентрации аскорбиновой кислоты

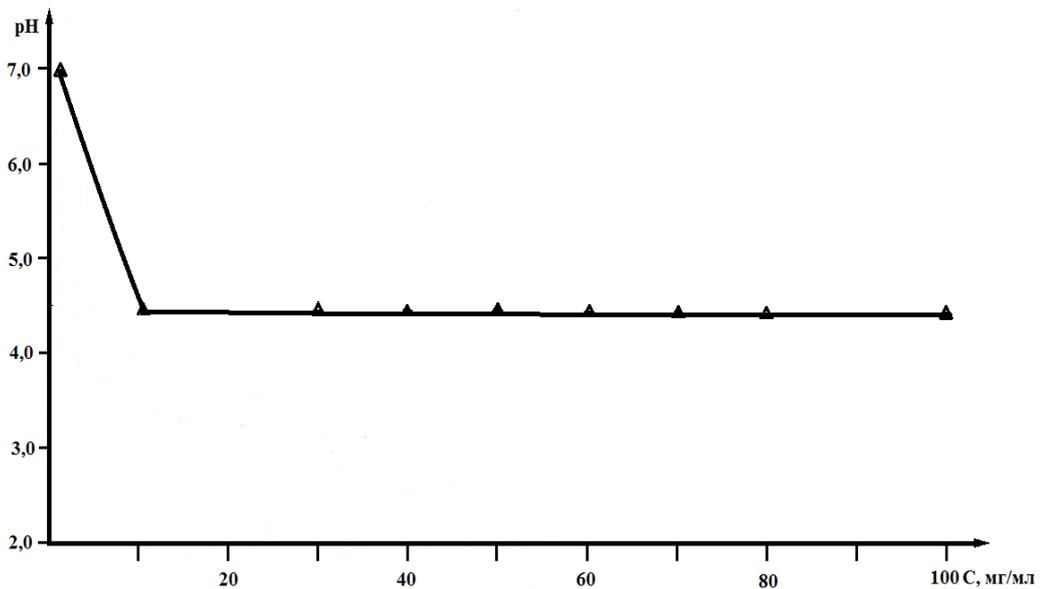


Рисунок 3. Изменение pH физраствора в зависимости от концентрации янтарной кислоты

Показатель преломления ( $n$ ) меняется от 1,3350 до 1,3345. С увеличением концентрации лимонной кислоты до 20 мг, показание pH снижается от 4,12 до 4,03. Далее, при концентрации 30, 40, 50 мг лимонной кислоты pH 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 pH – 3,83 сохраняется до концентрации 100 мг. При концентрации лимонной кислоты 100 мг значение pH от 3,83 снижается до 3,77. Постоянство pH при её концентрации от 60 до 80 мг для лимонной кислоты свидетельствует о возможности в системе фазы образования.

Аналогичный эксперимент проводился с янтарной и аскорбиновой кислотами. Как видно из (рис. 3) при добавлении 10 мг янтарной кислоты рН физраствора от 6,97 снижается до рН – 4,37, т. е. от нейтральной среды резко переходит к слабокислой. Дальнейшее увеличение концентрации янтарной кислоты от 10 мг до 50 мг рН физраствора меняется незначительно. Происходит, незначительное изменение рН от 4,37 до 4,21. Далее при увеличении концентрации янтарной кислоты от 60 мг до 100 мг значение рН практически не меняется. Аналогичный характер изменений рН физраствора наблюдался при добавлении аскорбиновой кислоты, рН 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.

### **3.2. Изменения рН и показателя преломления в смесях аскорбиновой, лимонной, янтарной и ацетилсалициловой кислот в зависимости от их концентраций в среде физраствора**

Большой интерес представляло изучение рН 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 рН организм человека, если при этом учесть, что вода в организме человека составляет 70 % от веса его тела. С химической точки зрения вода является основным растворителем ингредиентов организма. В нашем организме вода разделяется на следующие фракции:

1. внутрисосудистая; 2. межклеточная; 3. внутриклеточная.

В настоящее время известно, что все физиологические изменения, которые происходят в организме, связаны с физико-химическим состоянием основных субстантов организма. К этим субстантам по праву можно отнести физиологическую воду, то есть любое положительное или отрицательное

изменение в организме прямо или косвенно влияет на физико-химическое состояние воды в организме. К такому показателю изменений по праву можно отнести значение показателя водорода. Установлено, что физиологические процессы, могут протекать нормально только при определенных для каждого процесса концентрациях ионов водорода, т. е. 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. В этой связи исследование влияния различных концентраций смеси жизненно важных органических кислот (лимонной, аскорбиновой, янтарной и ацетилсалициловой) на значения концентраций ионов водорода физиологического раствора имеет, несомненно, большое значение для современной медицины. Значения показателя рН физраствора, который является основным растворителем всех веществ в организме, также зависит кислотно-щелочная реакция жизненно важных субстантов, в том числе и холестерина.

Нами исследовано изменение рН физраствора при добавлении смеси янтарной – лимонной, янтарной – аскорбиновой и аскорбиновой – лимонной кислот при температуре  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Соотношение смеси кислот брали при композициях (1:1) 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг. Полученные результаты представлены в таблице 2 и на рисунке 4. Как видно из рисунка 4 при композициях (1:1) 10 мг (янтарной кислоты), 10 мг (лимонной кислоты) значение рН равно 4,22, а при 40 мг, рН – 3,87 и при 60 мг рН – 3,77. 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 подобные изменения, как и в случае с лимонной кислотой.

Полученные результаты представлены в (табл. 2) и изображены на (рис. 4). Как показали, результаты эксперимента в смеси янтарной и лимонной кислот при содержании этих кислот в сумме 10 мг показания рН от нейтральной среды

переходит в слабокислую среду, то есть от 6,97 до 4,22. С увеличением концентрации указанных кислот в смеси значение рН меняется в пределах от 4,22 до 3,66. Подобная тенденция изменения значения рН также наблюдалась в смеси лимонной и аскорбиновой кислоты.

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

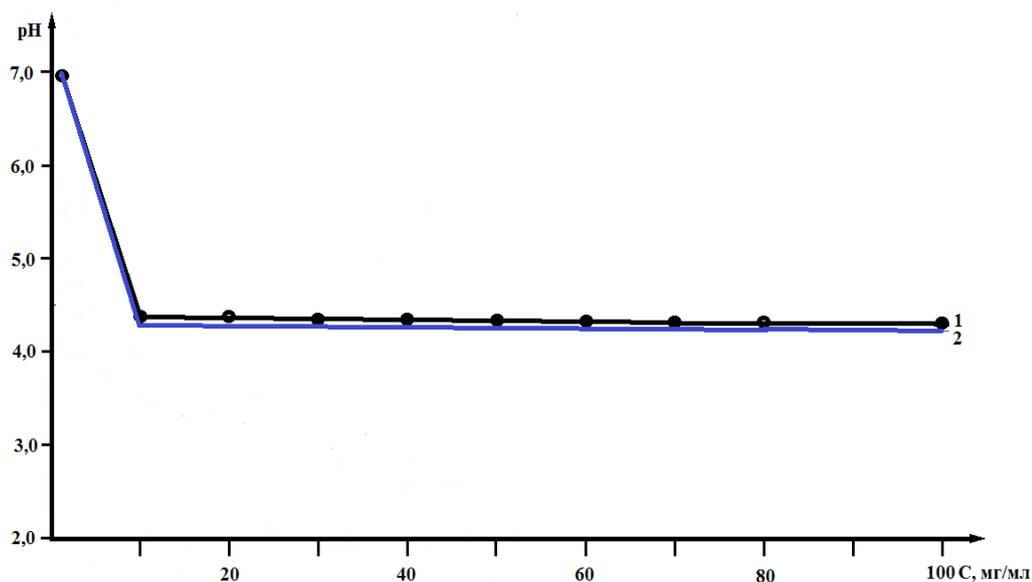


Рисунок 4. Изменение рН физраствора при добавлении смеси органических кислот, кривые: 1. лимонная – янтарная; 2. лимонная – аскорбиновая

Таким образом, установлено, что значения рН физраствора независимо от композиции концентрации указанных кислот, остаются на одном и том же уровне, как и в случаях, когда эти кислоты брались в отдельности.

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→ 4,0. Такая тенденция сохраняется и в эксперименте, когда использовались смеси органических кислот.

Как показали результаты исследований, во всех трёх композициях органических кислот наблюдалось умеренное изменение рН физраствора от нейтральной среды в слабокислую, а также происходит минимальное изменение показателя преломления. В то же время, характер изменения рН физраствора в присутствии лимонной кислоты отличается от влияния янтарной и аскорбиновой кислот. Такое отличие проявляется в том, что с увеличением концентрации лимонной кислоты среда физиологического раствора становится более кислой.

Совершенно иная картина представляется в случаях с янтарной и аскорбиновой кислот, то есть, концентрация ионов водорода в физрастворе от количества янтарной и аскорбиновой кислоты, изменяет рН физраствора от 6,97 до рН  $4,1 \pm 0,1$ . Далее с увеличением концентрации указанных органических кислот показатель ионов водорода (рН) практически сохраняется на том же уровне, как и в случае, когда использовалось минимальное количество указанных кислот.

Большой интерес представляло изучение изменений концентрации ионов водорода физраствора в равных соотношениях смеси органических кислот. Из полученных результатов эксперимента было определено, что изменения рН физраствора независимо от композиции органических кислот значения рН и показателя преломления практически остаются на одном и том же уровне, как и в случае, когда мы изучали их в отдельности. Полученные результаты, несомненно, имеют большой интерес для современной медицины.

### 3.3. 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 [135]. 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 с тем, что холестерин в физиологическом растворе в присутствии указанных кислот образует двойные соли, что способствует растворимости холестерина. Для исследования использовалось определенное количество холестерина. Объем физраствора 50 мл, температура  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . Изучение растворимости холестерина в различных концентрациях указанных выше органических кислот проводилось по методике глава II Материалы и методы исследования. Полученные результаты представлены в таблице 3 и на рисунке 5.

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. 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. Исследование растворимости холестерина в янтарной кислоте показало, что растворимость холестерина при концентрации 10 мг янтарной кислоты имеет значение 0,0056 мг/%. В тоже время с увеличением концентрации янтарной кислоты до 20 мг, 30 мг, 40 мг растворимость холестерина увеличивается незначительно (табл. 3, рис. 5).

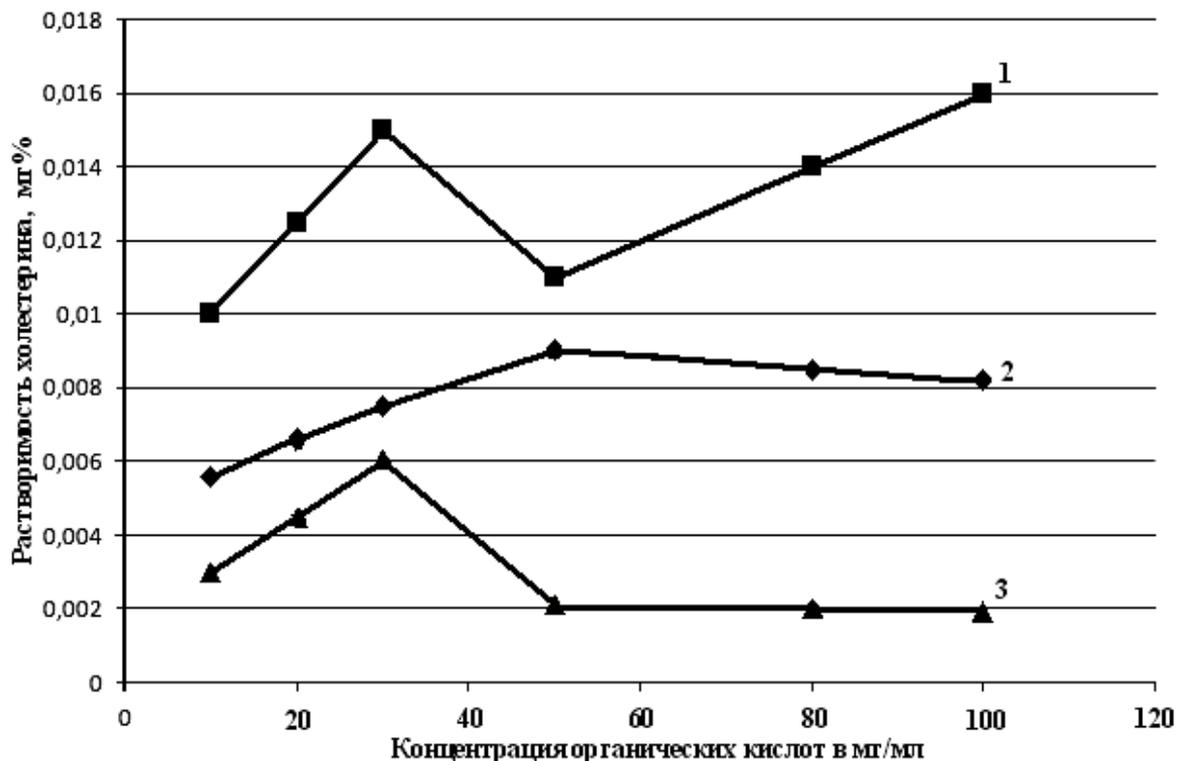


Рисунок 5. Растворимость холестерина в зависимости от концентрации кислот в физрастворе в условиях *in vitro*, кривые: 1. лимонная; 2. янтарная; 3. аскорбиновая

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.

Таким образом, как показали результаты исследований растворимости холестерина в органических кислотах (лимонной, янтарной, аскорбиновой кислот) в среде физиологического раствора имеет прямую зависимость от концентрации указанных органических кислот. Полученные результаты по растворимости холестерина в этих органических кислотах, безусловно, представляют определенный интерес для медицины. Если учесть, что концентрация свободного холестерина в крови при различных заболеваниях выражается в мил. мол./л. или же мкг./л., то полученные результаты в определённой степени дают возможность корректировать концентрацию холестерина в крови при использовании пищевых органических кислот.

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.

### 3.4. Исследование системы $\text{CaCl}_2$ – холестерин – $\text{H}_2\text{O}$

Известно, что одной из причин дестабилизации жёлчи при ЖКБ, является перенасыщение ее холестерином, следствием чего и является образование холестериновых камней. Холестериновые камни в основном состоят из холестерина и солей кальция.

В связи с этим для понимания механизмов дестабилизации стабильной желчи и образования холестериновых камней изучение системы  $\text{CaCl}_2$  – холестерин –  $\text{H}_2\text{O}$  представляет большой интерес.

Система  $\text{CaCl}_2$  – холестерин –  $\text{H}_2\text{O}$  исследовалась 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, как описано в главе II Материалы и методы исследования.

Состав твердой фазы в тройной диаграмме  $\text{CaCl}_2$  – холестерин –  $\text{H}_2\text{O}$  устанавливали по пересечению лучей Шрейнемакера на тройной диаграмме Гиббса и химическим методом.

Результаты исследования системы  $\text{CaCl}_2$  – холестерин –  $\text{H}_2\text{O}$  приведены [129] в таблице 4.

Таблица 4

Результаты исследования системы  $\text{CaCl}_2$ 

Состав жидкой фазы, %		Остаток, %		Состав твердой фазы, %
$\text{CaCl}_2$	Холестерин	$\text{CaCl}_2$	Холестерин	
0	-	-	-	Холестерин 0,5 $\text{H}_2\text{O}$
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	Холестерин 0,8 $\text{CaCl}_2$
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. 6). 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 %  $\text{CaCl}_2$  растворимость повышается, затем снижается и далее опять увеличивается.

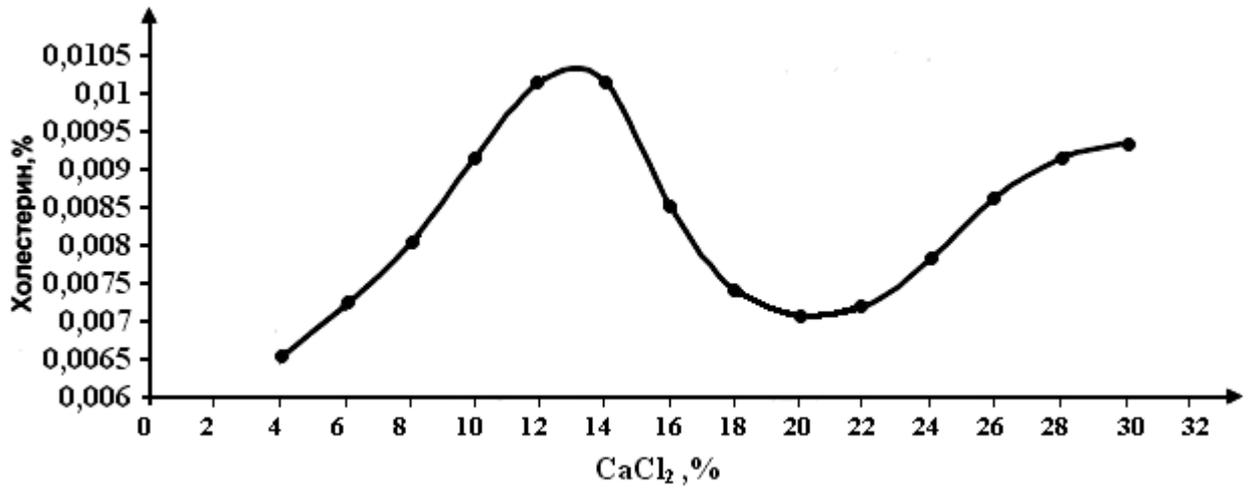


Рисунок 6. Изменение растворимости холестерина в системе  
CaCl<sub>2</sub> – холестерин – H<sub>2</sub>O

Как видно из рисунка 6 кривая растворимости состоит из двух ветвей. Излом на кривой растворимости свидетельствует о фазе образования в системе.

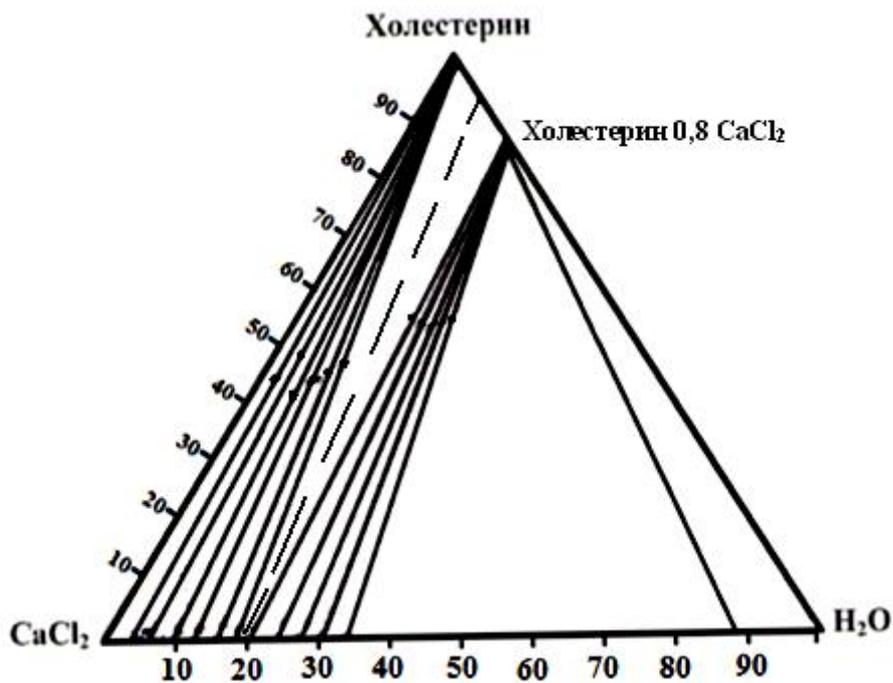


Рисунок 7. Диаграмма Гиббса системы CaCl<sub>2</sub> – холестерин – H<sub>2</sub>O при температуре 20<sup>0</sup>С

На диаграмме Гиббса (рис. 7) из – за низкой растворимости холестерина CaCl<sub>2</sub> расположен на линии H<sub>2</sub>O – CaCl<sub>2</sub>.

Из диаграммы видно, что при концентрациях хлорида кальция 1 – 20 % лучи Шрейнемакера указывают на чистый холестерин, то есть в этих пределах концентраций  $\text{CaCl}_2$  никаких изменений в твердой фазе не происходит. Однако в пределах концентрации  $\text{CaCl}_2$  от 23 % и выше лучи указывают на образование двойной соли:  $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{OH} \cdot 0,8 \text{CaCl}_2$ .

Таблица 5

Химический и теоретический анализ твердых фаз, выделенных из системы  $\text{CaCl}_2$  – холестерин –  $\text{H}_2\text{O}$

Формула соединения	Масса, % теорет.		Масса, % найдено	
	$\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{OH}$	$\text{CaCl}_2$	$\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{OH}$	$\text{CaCl}_2$
$\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{OH} \cdot 0,8 \text{CaCl}_2$	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  $\text{CaCl}_2$  – холестерин –  $\text{H}_2\text{O}$  показало, что при концентрации  $\text{CaCl}_2$  от 0 до 20 % холестерин не взаимодействует с  $\text{CaCl}_2$ , что видно на диаграмме Гиббса. В случае концентрации выше 20 % лучи Шрейнемакера указывают на образование с холестерином двойной соли:  $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{OH} \cdot 0,8 \text{CaCl}_2$ . Из приведенных исследований следует, что с образованием солей холестерина его растворимость уменьшается. Не исключено, что аналогичные процессы могут происходить в жёлчи и других биологических жидкостях. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при изучении вышеуказанных систем образуется две фазы: холестерин  $0,5 \text{H}_2\text{O}$  и холестерин  $0,8 \text{CaCl}_2$ .

## **ГЛАВА IV. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРИРОДНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ НА НАДМОЛЕКУЛЯРНУЮ СТРУКТУРУ ХОЛЕСТЕРИНА МЕТОДОМ СПИНОВОЙ МЕТКИ**

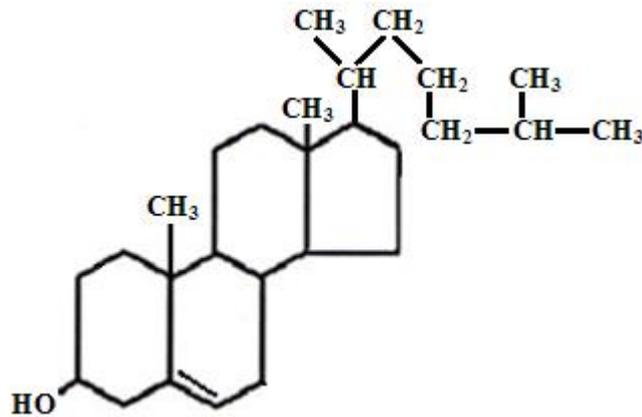
Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса начиная с 50-х годов развивалась стремительными темпами, и в настоящее время можно с уверенностью сказать, что этот метод широко применяется во многих аспектах.

Метод ЭПР внес решающий вклад в выяснение структуры свободных радикалов, парамагнитных комплексов металлов и молекул в возбужденных триплетных состояниях. В непрерывном поиске новых применений этот метод оказался мощным инструментом исследования в самых различных областях химии и физики таких, как кинетика радикальных реакций, механизмы полимеризации, перенос энергии в молекулярных кристаллах и структура жидких кристаллов. В настоящее время широкое применение метода отмечено и в биологических исследованиях [136, 137].

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) используется при решении биохимических и биомедицинских задач как высокочувствительный метод обнаружения свободнорадикальных частиц. Метод ЭПР используется для обнаружения и идентификации промежуточных соединений свободнорадикальной природы в метаболических реакциях, для изучения стабильных парамагнитных частиц природного происхождения, например, ионов переходных металлов, для обнаружения свободных радикалов, образующихся при действии проникающей радиации, а также для исследования биологических систем при помощи введенных в них парамагнитных зондов (метод спиновых меток).

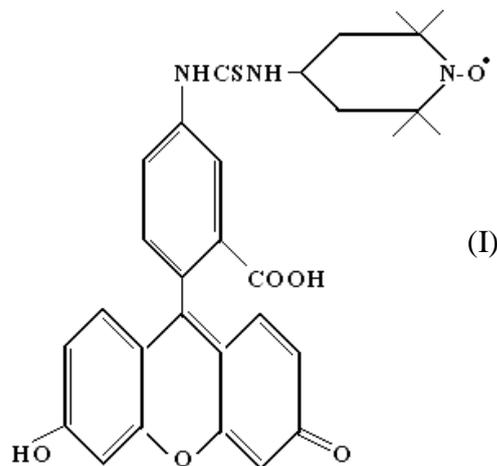
#### 4.1. Исследование молекулярной структуры холестерина методом спиновой метки

С химической точки зрения, холестерин является ненасыщенным спиртом, поэтому было бы правильнее называть это соединение холестеролом (так холестерин называют за рубежом). Молекула холестерина образована четырьмя кольцами атомов углерода: три кольца содержат по 6 атомов углерода и одно – 5 атомов. К кольцам присоединяется небольшая цепочка, тоже состоящая из атомов углерода. Структурная формула холестерина, содержащая одну двойную связь в кольце В:



В настоящее время в научной литературе отсутствуют данные об исследованиях в этаноловом растворе надмолекулярной структуры холестерина методом «спиновой метки».

Для решения поставленной задачи в структуру холестерина вводят метку нитроксильного радикала (I). Структурная формула нитроксильного радикала (I):



Суть метода заключается в том, что в макромолекулу исследуемого объекта вводят стабильный нитроксильный радикал и на приборе ЭПР снимают его спектр, который чувствителен к конформационной подвижности макромолекулы. Как было отмечено, первые экспериментальные работы по применению метода спиновых меток в исследованиях биологических объектов и биополимеров были выполнены авторами [57, 60]. С тех пор этот метод нашел широкое применение в различных областях медицины и молекулярной биологии. Для решения поставленной задачи вводят в структуру холестерина нитроксильный радикал в среде этанола.

В научной литературе принято называть спиновыми метками нитроксильные радикалы, которые химически присоединяются к молекулам исследуемого объекта. Вследствие анизотропии д-фактора ч-анизотропии сверхтонкого взаимодействия электронного спина с ядром атома спектр ЭПР нитроксильного радикала зависит от его ориентации во внешнем магнитном поле. Статистические изменения ориентации радикала модулируют магнитные взаимодействия. Поэтому виды спектров ЭПР зависят от вращательной подвижности радикалов. По виду спектра, регистрируемого в стандартных условиях (первая гармоника сигнала поглощения, ненасыщающие значения микроволновой мощности), можно оценить время корреляции вращательных движений  $\tau_c$  радикала [56, 57] в диапазоне  $\tau_c = 10^{-3} - 10^{-11}$  с.

При изучении влияния структуры микроокружения на вращательную диффузию нитроксильных радикалов авторы обычно пользуются следующими параметрами: временем корреляции вращательной диффузии ( $\tau_c$ ); частотой вращения радикала ( $\nu=1/\tau$ ); анизотропией вращения ( $\epsilon$ ); эффективной энергией ( $E_{эфф}$ ) или энтальпией ( $\Delta H_{эфф}^\ddagger$ ) и энтропией ( $\Delta S_{эфф}^\ddagger$ ) активации; определяемой уравнением, выражающим зависимость ( $\nu$ ) от температуры:

$$\nu = \frac{kT}{h} \exp \frac{\Delta S_{эфф}^\ddagger}{RT} \exp \frac{-\Delta H_{эфф}^\ddagger}{RT}$$

Для изучения надмолекулярной структуры холестерина в присутствии нитроксильной спиновой метки, навеску образца (холестерин) 25 мг помещали в пробирку, содержащую 1мл этанолового раствора спин-метки с концентрацией  $4 \cdot 10^{-3}$  М. Смесь инкубировали в течение двух суток при комнатной температуре. 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 (рис. 8) записывали при следующих условиях: затухание СВЧ мощность 5дБ; амплитуда развертки магнитного поля 200 Э; скорость развертки магнитного поля 40 Э/мин; амплитуда ВЧ модуляции 0,3 Э [138-139] постоянная времени 0,1 с, частота модуляции 100 кГц. Время корреляции вращения спиновых меток в исследуемых образцах определялось по формуле [57]:

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

где  $\Delta H_0$  – ширина центрального компонента в гауссах;  $h_0$  и  $h_{-1}$  – интенсивности компонент спектра с  $M = 0, +1$  и  $-1$ ;  $\nu=1/\tau$  – величина условно называемая «частотой вращения» радикала. Полученные результаты представлены на рисунке 8.

На этом рисунке приведены спектры ЭПР нитроксильного радикала: (а) – в виде порошка; (б) – нитроксильный радикал в этаноловом растворе с концентрацией  $4 \cdot 10^{-3}$  М; (в) – нитроксильный радикал в этаноловом растворе с концентрацией  $4 \cdot 10^{-3}$  М в присутствии холестерина.

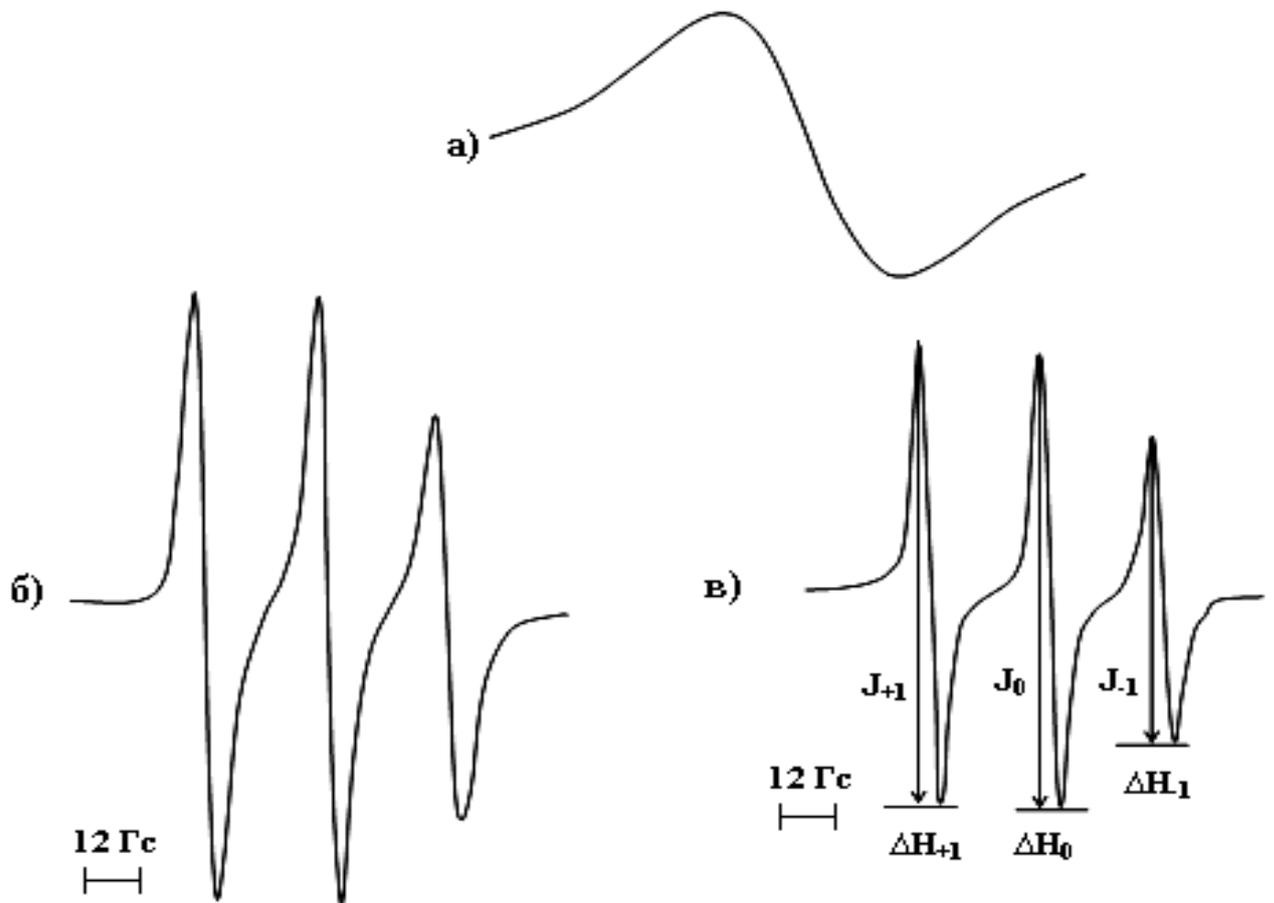


Рисунок 8. Спектр ЭПР нитроксильного радикала (I): а) в виде порошка, б) спектр нитроксильного радикала в этаноле с концентрацией  $4 \cdot 10^{-3}$  М, в) спин – меченый холестерин в среде этанола

Как видно из рисунка 8. (б) спиновая метка радикала (I) в растворе вращается свободно с временем корреляции  $\tau_c \geq 1,54 \cdot 10^{-8}$  с и все 3 компонента сигнала ЭПР по интенсивности почти одинаковы и симметричны. Для спин-меченного холестерина спектр ЭПР отличается (в), то есть затормаживается, в этом случае время корреляции  $\tau_c \leq 9,9 \cdot 10^{-7}$  с. Эти факты свидетельствуют о том, что холестерин в этих условиях образует молекулярные агрегаты, на это указывает образование бляшек на спектре (в).

## **4.2. Исследование влияния ацетилсалициловой и янтарной кислот на молекулярную структуру холестерина методом спиновой метки**

Ацетилсалициловая кислота (АЦК), аспирин представляет собой белые мелкие игольчатые кристаллы или легкий кристаллический порошок, малорастворимый в воде при комнатной температуре, растворимый в горячей воде, легко растворимый в спирте, растворах едких и углекислых щелочей. 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.

Весь механизм сложен и до сих пор не до конца изучен, но известно, что ацетилсалициловая кислота безошибочно концентрируется там, где наблюдается скопление, например, тромбоцитов вокруг коллагеновых волокон и, преобразуясь в метаболиты, выводится организмом. Коротко механизм действия аспирина можно описать как действие тромбксана, образующегося в кровеносном сосуде вокруг коллагеновых волокон, который усиливает отлипание сгустка и предупреждает рост тромба за счет сцепления между собой растущих отростков тромбоцитов. В этот сгусток начинают вплетаться эритроциты, протекающие в потоке крови, вследствие чего в сосуде растет тромб.

Обычно в здоровом сосуде действию тромбксана противостоит простациклин, который вырабатывают стенки сосудов. Равновесие между ними позволяет крови поддерживать нормальное состояние. Но поврежденный сосуд или заболевание создает дисбаланс, увеличивающий вязкость крови и образование сгустков. В дальнейшем это приводит к закупорке, инфаркту или инсульту. Но аспирин, поступая в кровь, вмешивается в процесс, препятствуя образованию тромбксана. В частности, салициловая кислота, связываясь с различными веществами и ферментами, преобразует их в метаболиты, которые быстро выводятся из организма. Одновременно другие ферменты тромба атакует

уксусная кислота, что налаживает выработку организмом простаглицина. Так опасность закупорки сосуда значительно уменьшается. Тромбоциты еще около недели не смогут восстановить способность слипаться в тромб. Тем самым становится эффективнее лечение основного источника заболевания.

Янтарная кислота (ЯК) – продукт, полученный в результате переработки натурального янтаря. Это абсолютно безвредное вещество, обладающее особыми полезными свойствами. Она представляет собой белый, кристаллообразный порошок, по вкусу очень напоминающий лимонную кислоту. Диапазон действия ЯК очень широк: она стимулирует нервную систему, укрепляет деятельность почек и кишечника, применяется как антистрессовое, противовоспалительное и антиоксидантное средство. 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. В то же время, в литературе практически отсутствуют данные о влиянии аспирина и янтарной кислоты на физико-химические свойства холестерина.

Исследование влияния ацетилсалициловой и янтарной кислот на молекулярную структуру холестерина методом спиновых меток проводилось по методике, указанной в главе II Материалы и методы исследования. Для проведения экспериментальных работ навеску образца (холестерин) 25 мг помещали в пробирку, содержащую 1мл 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 янтарной и ацетилсалициловой кислоты. Спектры ЭПР (первую гармонику сигнала поглощения) регистрировали на радиоспектрометре РЭ – 1306. По 25 мг спин – меченый образец помещался в стандартных стеклянных ампулах с внутренним диаметром 3,0 мм. Спектры ЭПР образцов (рис. 8, 9) записывали при следующих условиях: затухание СВЧ мощность 5дБ; амплитуда развертки магнитного поля 200 э; скорость развертки магнитного поля 40 э/мин; амплитуда ВЧ модуляции 0,3 Э [138 - 139] постоянная времени 0,1 с; частота модуляции 100 кГц.

Полученные результаты исследования [140, 141] влияния янтарной и ацетилсалициловой органических кислот на параметры спектров ЭПР спин-меченного холестерина представлены на таблице 6 и в рисунке 9. Здесь (табл. 6)  $J_{+1}$  – интенсивность высокопольной,  $J_{-1}$  – интенсивность низкопольной,  $J_0$  – интенсивность центральной, интенсивность исследуемых систем резко отличаются друг от друга.

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	$\Delta H_{+1}$ , Гс	$\Delta H_{-1}$ , Гс	$\Delta H_0$ , Гс	$\tau_c$ 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	$1,46 \cdot 10^{-8}$

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 значение 114 мм и 26 мм.

Аналогичные изменения наблюдаются в значениях  $\Delta H_0$ ,  $\Delta H_{+1}$ ,  $\Delta H_{-1}$  – 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 высокопольной линий, что свидетельствует о иммобилизации метки вследствие образование агрегатов холестерина в исследуемом растворе. В изучении молекулярной структуры биологических объектов методом спиновой метки одним из основных показателей является время корреляция ( $\tau_c$ ).

Как видно из рисунка 9 вид спектров отличается друг от друга, например, спиновая метка в этаноловом растворе (а) вращается свободно с временем корреляции  $1,54 \cdot 10^{-8}$  с, а в системе III НР+ЭТ+ХЛ оно равно  $9,9 \cdot 10^{-7}$  с. Однако, при добавлении янтарной кислоты в этаноловый раствор, содержащий холестерин и радикал, время корреляция  $\tau_c$  соответственно равно  $1,76 \cdot 10^{-8}$  с, а в присутствии ацетилсалициловой кислоты оно равно  $1,46 \cdot 10^{-8}$  с.

Как показали, результаты экспериментов увеличение спектральных параметров в исследуемых системах свидетельствует о подвижности спиновой метки с временной корреляцией  $\tau_c \leq 1,76 \cdot 10^{-8}$  с и  $1,54 \cdot 10^{-8}$  с. 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.

Кроме того, увеличение интенсивности сигнала сопровождается сужением спектральных линии (параметров  $\Delta H_{+1}$ ,  $\Delta H_0$ ,  $\Delta H_{-1}$ ). Этот факт объясняется появлением мелкомасштабных движений, приводящих к усреднению дипольных взаимодействий [138 - 139]. Эффект сужения параметров  $\Delta H_{+1}$ ,  $\Delta H_0$ ,  $\Delta H_{-1}$ , по-видимому, связан с движением протонов среди окружающих нитроксильный фрагмент радикала, которые частично усредняют взаимодействие магнитных диполей неспаренного электрона и протона, характеризующееся  $\tau_c \leq 10^{-8}$  с.

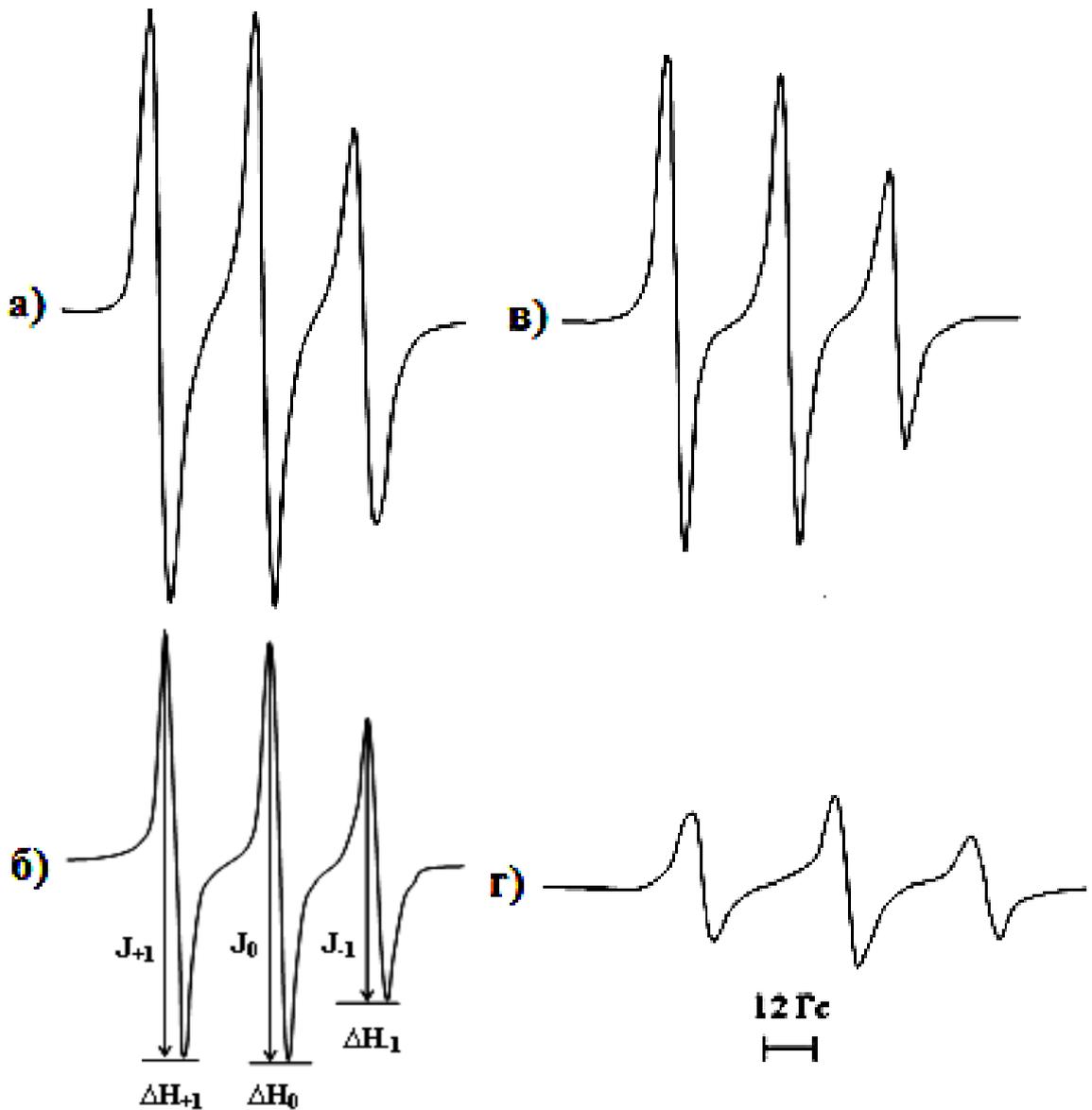


Рисунок 9. Спектры ЭПР: а) спиновой метки радикала (I) в этаноле; б) спин-меченого холестерина с радикалом (I); в) спин-меченого холестерина при погружении в янтарную кислоту; г) спин-меченого холестерина при погружении в ацетилсалициловую кислоту при температуре 300 К

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

#### **4.3. 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 годов. 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. Антиоксидантное действие аскорбиновой кислоты не является единственным в механизме ее антисклеротического действия. Аскорбиновая кислота является также сильным ингибитором гиалуронидазы – фермента, повышающего гидрофильность и общую проницаемость тканей. Блокируя гиалуронидазу, витамин С снижает проницаемость тканей и значительно затрудняет проникновение холестерина в сосудистую стенку. Большинство авторов считают антигиалуронидазный механизм основным механизмом антиатеросклеротического действия аскорбиновой кислоты, но и он не является единственным.

Известно, что атеросклероз поражает лишь крупные сосуды, стенка которых состоит в основном из коллагеновых волокон. Мелкие сосуды, не содержащие коллагена, атеросклерозу не поддаются. Аскорбиновая кислота является необходимым участником в процессе синтеза коллагеновых волокон. Поэтому введение ее в больших дозах делает коллагеновую стенку крупных сосудов более прочной и менее уязвимой по отношению к холестерину. Аскорбиновая кислота значительно улучшает фосфолипидный обмен и этим она 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. Для проведения эксперимента мы использовали пищевую лимонную кислоту марки «х.ч.», аптечную аскорбиновую кислоту и кристаллический холестерин. Исследования и расчёты проводились по методике, использованной для изучения ацетилсалициловой кислоты [142].

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 главе II Материалы и методы исследования.

Для проведения экспериментальных работ навеску образца (холестерин) 25 мг помещали в пробирку, содержащую 1мл спиртового раствора спин – метки с концентрацией  $4 \cdot 10^{-3} \text{M}$  с погружением в лимонную кислоту при комнатной температуре. Полученные нами результаты представлены в таблице 7 и на рисунке 10. Как видно из рисунка и таблицы, 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, её значение ( $J_{+1}$ )=191 мм, а в отсутствии лимонной кислоты в системе II НР+ЭТ+ХЛ, оно равно – 154 мм.



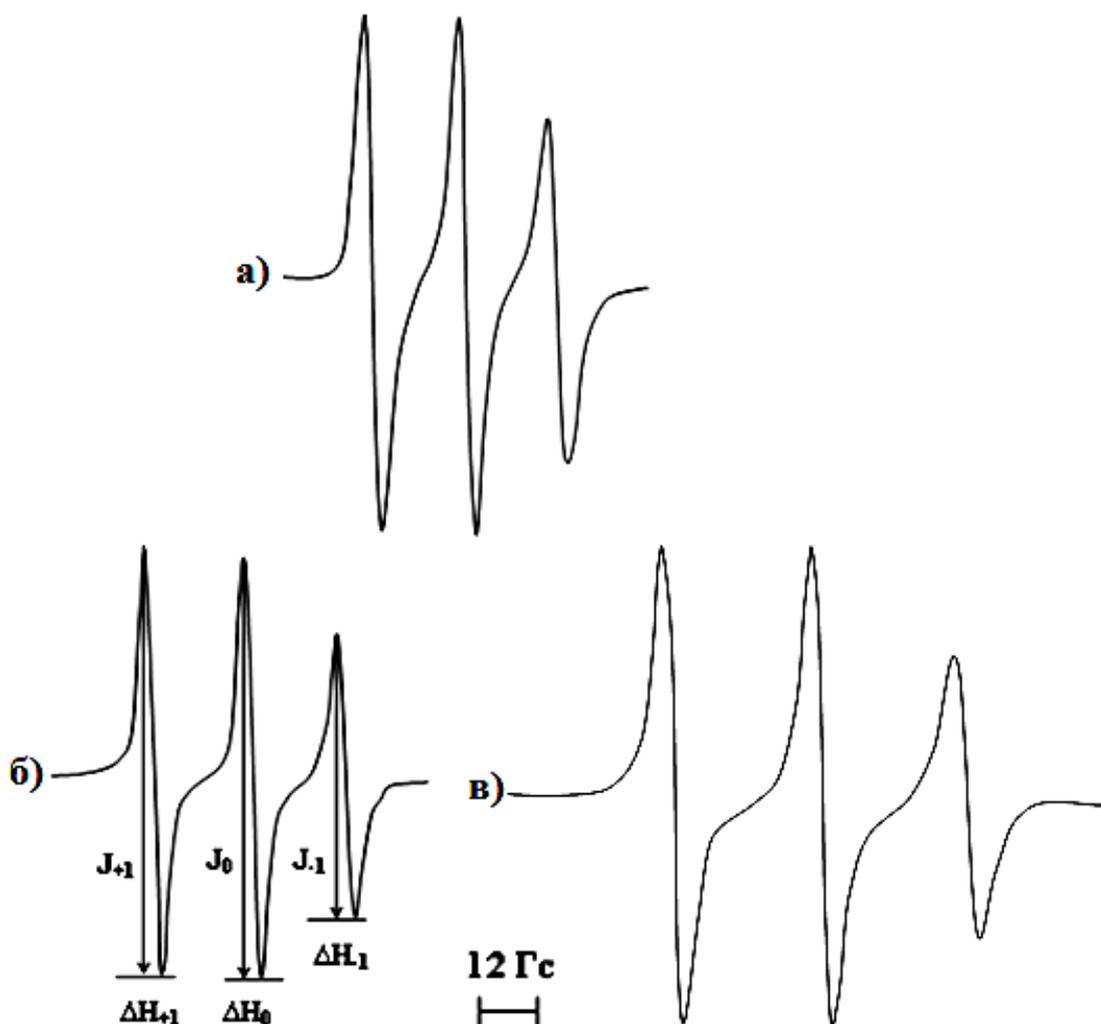
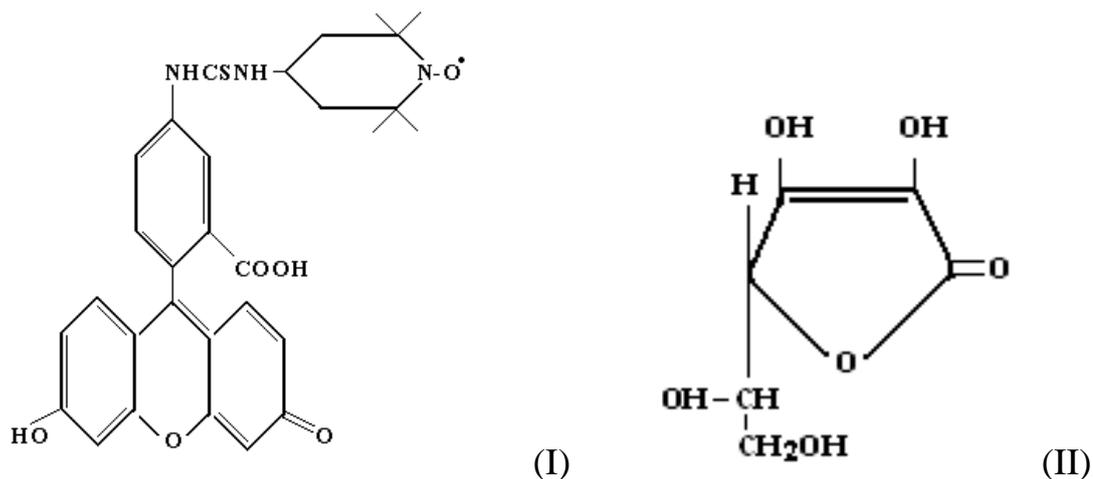


Рисунок 10. Спектры ЭПР: а) спиновой метки радикала (I) в этаноле; б) спин – меченого холестерина с радикалом (I); в) спин – меченого холестерина при погружении в лимонную кислоту

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

Аналогично по этой же методике было изучено и влияние аскорбиновой кислоты на молекулярную структуру холестерина. Для проведения этих экспериментов были использованы: спиновая метка нитроксильного радикала (I), медицинская аскорбиновая кислота (II) и кристаллический холестерин.



Химическая структура спиновой метки нитроксильного радикала (I) и аскорбиновой кислоты (II).

Для снятия спектров ЭПР (первая гармоника сигнала поглощения) навеску образца (аскорбиновую кислоту 25 мг) помещали в пробирку, содержащую 1 мл этанолового раствора спин метки с концентрацией  $4 \cdot 10^{-3} \text{M}$ . Смесь инкубировали в течение двух суток при комнатной температуре. Спектры ЭПР были сняты при следующих условиях: затухание СВЧ мощность 5дБ, амплитуда развертки магнитного поля 200 э, скорость развертки магнитного поля 40 э/мин, амплитуда ВЧ модуляции 0,3 Э, постоянная времени 0,1с, частота модуляции 100 кГц. Спектры ЭПР образцов представлены на рисунке 11.

На рисунке 11 приведен спектр ЭПР: (а) нитроксильного радикала (I) в сухом, порошковом виде, (б) нитроксильный радикал в этаноловом растворе с концентрацией  $4 \cdot 10^{-3} \text{M}$ , (в) спин-меченная аскорбиновая кислота в этаноловом растворе. Система I НР+ЭТ (б) в этаноловом растворе, как видно из спектра (б) спиновая метка радикала в этаноловом растворе вращается свободно со временем корреляции  $\tau_c \geq 10^{-8} \text{с}$ .

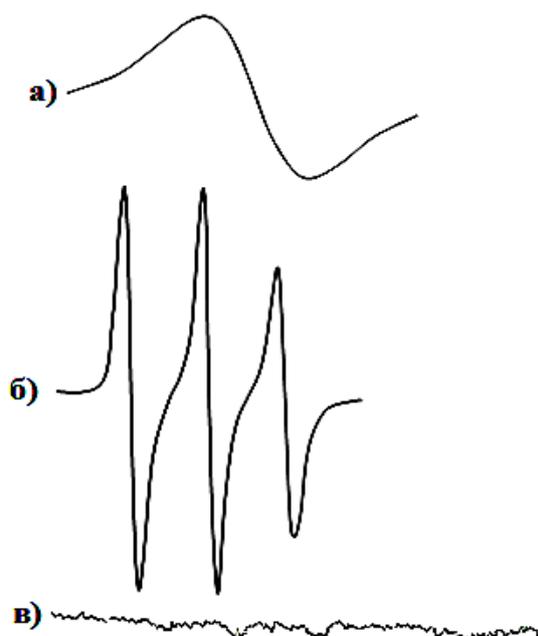


Рисунок 11. Спектры ЭПР спиновой метки радикала (I): а) в виде порошка; б) спин – меченого радикала в этаноле; в) спин – меченого радикала при погружении в аскорбиновую кислоту

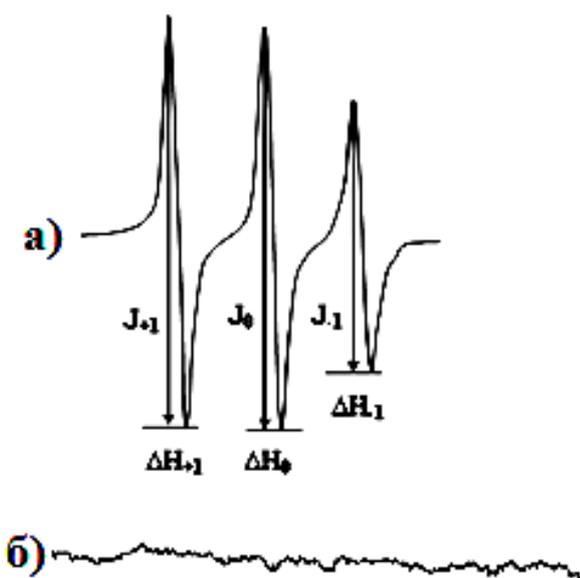


Рисунок 12. Спектры ЭПР: а) спин – меченого холестерина с радикалом (I) в этаноле; б) спин – меченого холестерина при погружении в аскорбиновую кислоту

Однако при погружении аскорбиновой кислоты в этаноловый раствор спиновой метки радикала (I), спектр ЭПР полностью исчезает (рис. 11 (в)).

Аналогичное исследование проводилось также с погружением аскорбиновой кислоты в спиновую метку радикала (I) в присутствии холестерина в этаноловом растворе, система VI НР+ЭТ+ХЛ+АСК. Полученные результаты представлены на рисунке 12.

Как показали, результаты исследований в присутствии аскорбиновой кислоты в системе VI НР+ЭТ+ХЛ+АСК наблюдается исчезновение спектра ЭПР (рис. 12 (б)). Исчезновение спектра ЭПР свидетельствует о том, что активная группа аскорбиновой кислоты восстанавливает нитроксильный фрагмент радикала (N-O $\cdot$ ), который в конечном итоге приводит к нейтрализации свободного нитроксильного радикала и исчезновению свободной валентности.

#### **4.4. Исследование влияния хенодезоксихолевой кислоты на молекулярную структуру холестерина методом спиновой метки**

В настоящей работе метод нитроксильных спиновых меток был использован для исследования количественного воздействия холестерина и хенодезоксихолевой кислоты в этаноле, проявляющий диэлектрические свойства подобно биологическим мембранам. Главной идеей, составляющей основу нашего подхода, является холестерин, растворенный в этаноле со спиновой меткой с последующим обнаружением и определением с помощью ЭПР. Дополнительное сведение о растворе хенодезоксихолевой кислоты, легко наблюдалось в ЭПР спектре (рис. 13).

Известно, что большинство патологических изменений в организме человека непосредственно связано со стабильностью желчи и крови. Стабильность указанных биожидкостей имеет прямую зависимость от динамического равновесия основных их компонентов. Нарушение эквивалентности компонентов в желчи и крови приводит к её дестабилизации, которая сопровождается изменением физико-химических параметров, приводящих в дальнейшем к процессу коагуляции и, соответственно, к различным видам заболеваний. Одним из таких компонентов, являются биологический холестерин и ХДХК, которые составляют основу

липопротеидов [143, 144, 145 - 148]. В настоящее время известно, что в желчи одновременно существуют две формы коллоидных частиц: везикулы (ХЛ – ФЛ) и мицеллы (ХЛ – ФЛ – ЖК), благодаря которым холестерин в желчи находится в растворенном состоянии. Авторами [149, 150, 151] впервые с позиции коллоидной химии было высказано, что в желчи могут быть и другие варианты существования везикулы (ХЛ – ЖК), (ФЛ – ЖК) и эти везикулы, возможно, являются промежуточными частицами в образовании мицелл. Для того чтобы убедиться в правоте подобных высказываний, нами методом спиновых меток проведено экспериментальное исследование [152, 153, 154].

Для решения поставленной задачи были использованы: нитроксильный радикал, этанол, кристаллический холестерин и хенодезоксихолевая кислота. Для проведения исследований навеску образца (холестерин) 25 мг помещали в пробирки, содержащие 1 мл этанолового раствора спиновой – метки с концентрацией  $4 \cdot 10^{-3} \text{М}$ . Смесь инкубировали в течение двух суток при комнатной температуре, затем к содержимому пробирки добавляли по 0,3 мг =  $3 \cdot 10^{-4} \text{М}$ , 1 мг =  $2,2 \cdot 10^{-3} \text{М}$  и 1,3 мг =  $3,3 \cdot 10^{-3} \text{М}$  хенодезоксихолевой кислоты. 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 [155] постоянная времени 0,1 с; частота модуляции 100 кГц.

Результаты исследования влияния различных концентраций ХДХК методом спиновых меток на структуру холестерина приведены на таблице 8 и рисунке 13. Как видно на таблице 8 и в рисунке 13 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 системе II НР+ЭТ+ХЛ при концентрации ХДХК  $3 \cdot 10^{-4} \text{М}$  наблюдается увеличение спектральных параметров, что характеризует уширение, то есть заторможенность сигнала с временной корреляцией ( $\tau_c \leq 10^{-9} \text{с}$ ).

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	$2A'z$ , Гц	$\Delta H_{+1}$ , Гц	$\Delta H_{-1}$ , Гц	$\Delta H_0$ , Гц	$\tau_c$ сек.
1	Радикал + этанол + холестерин ( $4 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )	154	103	1,47	152	32,4	2,66	2,22	1,73	$9,9 \cdot 10^{-7}$
2	Радикал + этанол + холестерин + ХДХК ( $3 \cdot 10^{-4} \text{M}$ )	115	71	1,54	110	33,7	1,77	1,77	2	$0,134 \cdot 10^{-9}$
3	Радикал + этанол + холестерин + ХДХК ( $2,2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )	195	120	1,58	190	33,3	1,77	1,33	2,05	$0,148 \cdot 10^{-9}$
4	Радикал + этанол + холестерин + ХДХК ( $3,3 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )	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  $2,2 \cdot 10^{-3} \text{M}$  и  $3,3 \cdot 10^{-3} \text{M}$  отмечено (рис. 13. (в), (г)) увеличение интенсивности сигнала, которое сопровождается незначительным сужением спектральных линий (параметров  $\Delta H_{+1}$ ,  $\Delta H_0$ ,  $\Delta H_{-1}$ ) образцов с увеличением их амплитуды. Этот факт объясняется появлением мелкомасштабных движений [56, 149], приводящих к усреднению диполь – дипольных взаимодействий [156, 157, 158-165]. Эффект сужения (параметров  $\Delta H_{+1}$ ,  $\Delta H_0$ ,  $\Delta H_{-1}$ ), по – видимому, связан с движением протонов среди окружающих нитроксильный фрагмент радикала, которые также частично усредняют взаимодействие магнитных диполей неспаренного электрона и протона, усредняя при этом взаимодействие магнитных диполей неспаренного электрона и протона.

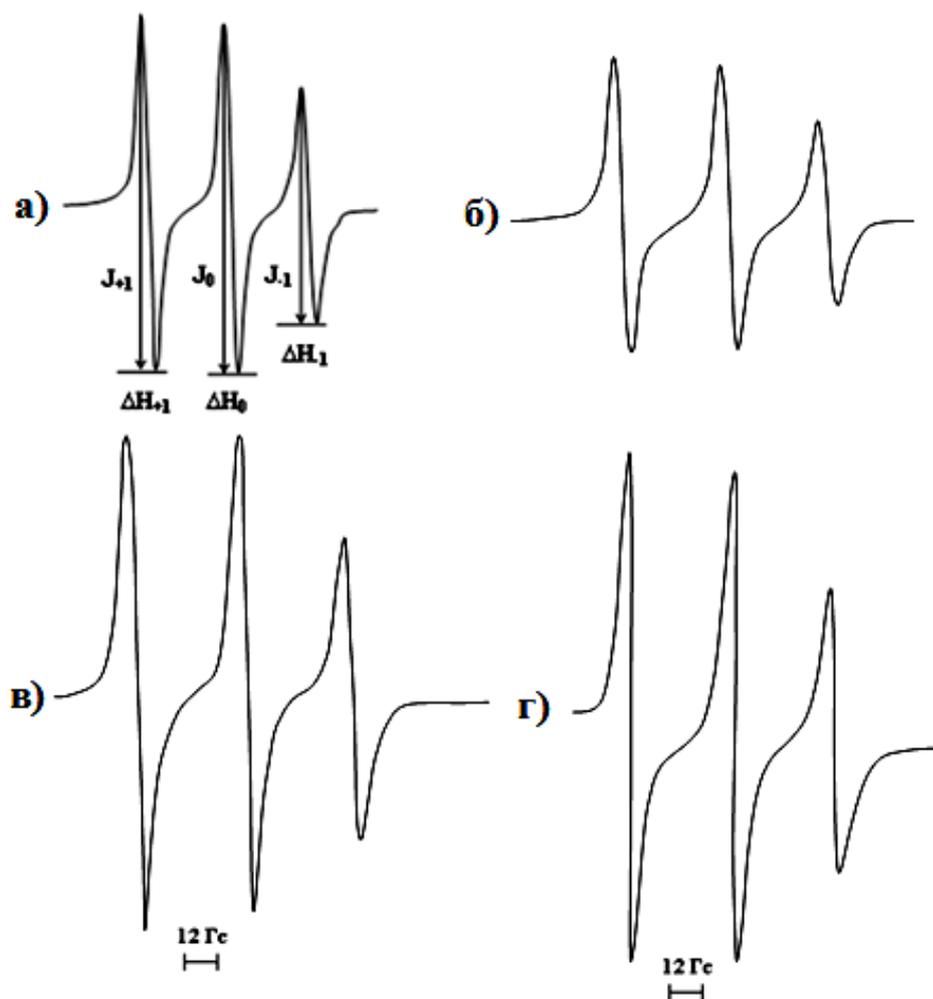


Рисунок 13. Спектры ЭПР: а) радикал + этанол + холестерин ( $4 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ); б) радикал + этанол + холестерин + ХДХК ( $3 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ); в) радикал + этанол + холестерин + ХДХК ( $2,2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ); г) радикал + этанол + холестерин + ХДХК ( $3,3 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

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.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Холестерин это вещество, относящееся к группе жиров, играет значительную роль в строении тканей и жидкостей организма. В теле человека холестерин является «сырьем» для производства стероидных гормонов, в частности, половых: прогестерона, тестостерона и эстрогена. Без холестерина невозможно образование витамина D, недостаток которого вызывает у малолетних детей рахит. Поскольку холестерин столь важен для нормальной жизни организма, поступление его с пищей дополняется непрерывным синтезом клетками нашего организма. В первой половине XX в. русский исследователь Н.Н. Аничков искусственно вводил кроликам холестерин, после чего у них развивались тяжелые формы атеросклероза.

Позже, японские ученые вывели даже специальную породу кроликов с генетическими нарушениями, у которых атеросклероз развивался наиболее быстро. Эти эксперименты в свое время широко дискутировались в прессе, породив теорию «холестериновой болезни», которая возникает от избытка жирной пищи и неизбежно приводит к поражению кровеносных сосудов. Исследования и расчеты показывают, что только 1/3 всего необходимого холестерина наш организм получает с пищей, а 2/3 производятся его клетками. Общее количество ежедневно потребляемого организмом холестерина оценивается в 1,2 г. Его обычная нормальная концентрация в кровяном русле составляет 0,5–1,0 мг/мл. Известно, что наш организм сам вырабатывает холестерин, которым так часто пугают диетологи.

Наконец, из холестерина в печени образуются желчные кислоты, которые необходимы для переваривания жиров. Большое количество потребляемых нами жиров печень перерабатывает в холестерин. Из нее он попадает в желчь, потом адсорбируется кровью, с которой поступает в ткани. Степень опасности холестерина зависит от его количества в пище и уровня в крови. При повышенном количестве он откладывается на стенках артерий и способствует образованию

атеросклеротических бляшек. Установлено, что количество холестерина на стенках сосудов прямо пропорционально таковому в крови.

Повышение содержания свободного холестерина в крови непосредственно связано с потреблением большого количества животных жиров. Выявлено, что если желчь перенасыщена холестерином, то она становится коллоидной, неустойчивой и в ней образуются холестериновые кристаллы. Выпадение в осадок нерастворимого холестерина, как утверждают авторы, имеет прямую зависимость от эквивалентных соотношений концентраций желчных кислот и лецитина. В настоящее время известно, что все физиологические изменения, которые происходят в организме связаны с физико-химическим состоянием основных субстантов организма, в первую очередь, к такому показателю по праву можно отнести значение водорода.

Установлено, что физиологические процессы могут протекать 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. В этой связи исследование влияния широко распространённых жизненно важных кислот (лимонной, аскорбиновой, янтарной, ацетилсалициловой кислот) на значение концентрации ионов водорода физиологического раствора имеет, несомненно, большое значение в современной медицине.

От значения показателя рН физраствора, который является основным растворителем всех веществ в организме, зависит кислотно-щелочная реакция жизненно важных субстантов и в том числе холестерина. Например, известно, что коллоидальная устойчивость желчи и крови, которая близка к нейтральной среде, имеет прямую зависимость от значения рН. Сдвиг значения рН в кислую или в щелочную сторону становится одним из факторов выпадения холестерина в осадок. В этой связи поставленная нами задача изучения изменения рН в физрастворе в присутствии различных концентраций жизненно важных органических кислот, таких как: аскорбиновая, янтарная, ацетилсалициловая и

лимонная является актуальной и своевременной. Как показали результаты наших исследований, добавление лимонной кислоты (10 мг) в физиологический раствор уменьшает значение рН от 6,97 до 4,11, т. е. практически, от нейтральной среды переходит в слабокислую.

При этом показатель преломления ( $n$ ) меняется от 1,3350 до 1,3345. Далее с увеличением концентрации лимонной кислоты до 20 мг показание рН меняется в пределах десятой доли, т.е. от 4,12 снижается до 4,03. При концентрации 30, 40, 50 мг лимонной кислоты рН от 4,03 снижается до 3,83. Увеличение концентрации лимонной кислоты в пределах от 60 до 80 мг, показатель иона водорода практически не изменяется, а показание рН равно 3,83 сохраняется до концентрации 100 мг. Постоянство рН при концентрации от 60 до 80 мг лимонной кислоты свидетельствует о возможности фазы образования в системе. Аналогичная тенденция изменения значения рН наблюдалась при различных концентрациях янтарной кислоты (рис. 3). Подобные изменения показателя рН были отмечены в присутствии различных концентраций лимонной и аскорбиновой кислоты (рис. 1, 2).

Как показали результаты исследований добавление минимальной концентрации указанных кислот ощутимо влияет на значения концентрации ионов водорода физиологического раствора, то есть значение рН от нейтральной среды переходит в слабокислую 6,97 – 4,6 – 3,8. Установлено, что более ощутимое влияние на значение рН физраствора оказывает лимонная кислота. Соответственно, представлял большой интерес определение, как влияет смесь этих кислот на значение рН физраствора. При этом, учитывая тот факт, что в употребляемых пищевых продуктах, указанные кислоты находятся совместно в различных количественных соотношениях.

Как видно из рисунка 4 при добавлении минимальной концентрации смеси указанных кислот значение рН физиологического раствора переходит от нейтральной среды в слабокислую и эти изменения имеют прямую зависимость от концентрации. Полученные экспериментальные данные показали, что изменение

pH физиологического раствора, как в смеси указанных кислот, так и в отдельной кислоте практически одинаково.

Таким образом, как показывают результаты наших исследований, присутствие минимальной концентрации указанных кислот существенно изменяет значение pH физиологического раствора. Эти данные, на наш взгляд, весьма важны при терапии и профилактике различных видов заболеваний, в частности, при ацидозе или алкалозе основных субстантов организма. С другой стороны, полученные нами данные о влиянии указанных органических кислот на концентрацию ионов водорода физраствора, позволят проводить корректировку диеты больных при различных видах заболеваний. Особенно, при назначении больным фруктово-овощной диеты, содержащей достаточное количество указанных жизненно важных органических кислот.

Продолжая решение поставленной нами задачи, большой интерес представляло узнать, а как влияют указанные кислоты на растворимость свободного холестерина. Как подтвердили результаты исследований, максимальная растворимость холестерина была отмечена у лимонной кислоты, где при добавлении 10 мг, оно имело величину 0,01 мг/%, однако далее с увеличением концентрации лимонной кислоты до 100 мг растворимость холестерина практически не изменялась. Исследование растворимости холестерина в янтарной кислоте показало, что растворимость холестерина при концентрации 10 мг равно 0,0056 мг. Далее с увеличением концентрации янтарной кислоты до 20 мг, 30 мг, 40 мг растворимость холестерина увеличивается незначительно, то есть от 0,0066 мг до 0,00905 мг. Такая тенденция повышения растворимости холестерина наблюдалась до 100 мг концентрации янтарной кислоты. Аналогичные изменения наблюдались и в среде аскорбиновой кислоты, где растворимость холестерина от 10 мг до 30 мг плавно увеличивалась от 0,00303 мг до 0,00605 мг/%. Значительное увеличение растворимости холестерина наблюдалось при концентрации аскорбиновой кислоты выше 50 мг, где величина растворимости была равна 0,00214 мг/%. Дальнейшее увеличение

концентрации аскорбиновой кислоты до 100 мг, практически не меняло растворимость холестерина.

Таким образом, как показали результаты исследований, растворимость холестерина в органических кислотах: лимонной, янтарной, аскорбиновой в среде физиологического раствора имеет прямую зависимость от концентрации указанных органических кислот. Результаты, полученные по растворимости холестерина в указанных органических кислотах, несмотря на минимальную растворимость холестерина, имеют большое значение для медицины. При этом если учесть, что концентрация свободного холестерина в крови при различных заболеваниях выражается в мил. моль./л. или же мкг./л., то полученные нами результаты в определённой степени дают возможность корректировать концентрацию холестерина в крови путем использования пищевых органических кислот.

Также представлял большой научный интерес вопрос, о влиянии указанных органических кислот на молекулярную структуру свободного холестерина. Последние годы для определения молекулярной структуры биологических объектов широко используется метод спиновых меток. Первые экспериментальные работы по применению метода спиновых меток при исследованиях биологических объектов и биополимеров, были выполнены профессором Г.И. Лихтенштейном и его сотрудниками в Российской Федерации, также в лаборатории Х. Мак–Коннела в США. С тех пор этот метод широко применяется в различных областях молекулярной биологии, биохимии, медицины, физ-химии полимеров и т. д. Для решения поставленной задачи используется гидрофобная спиновая метка I, которая присоединяется к гидрофобному фрагменту холестерина. Суть нашего подхода заключается в том, что в результате присоединения метки I к холестерину и его агрегатному вращение радикала замедляется и соответственно время корреляции  $\tau$  возрастает. По значению времени корреляции  $\tau$  оценивается молекулярный объём агрегата. В научной литературе спиновыми метками принято называть нитроксильный радикал, который химически присоединяется к молекулам исследуемого объекта.

Вследствие анизотропии д-фактора, ч-анизотропии сверхтонкого взаимодействия электронного спина с ядром атома спектр ЭПР нитроксильного радикала зависит от его ориентации во внешнем магнитном поле. Статистические изменения ориентации радикала модулируют магнитные взаимодействия. Поэтому форма спектра ЭПР зависит от вращательной подвижности радикала. По форме спектра, регистрируемого в стандартных условиях (первая гармоника сигнала поглощения, ненасыщающие значения микроволновой мощности), можно оценить время корреляции вращательных движений  $\tau_c$  радикала в диапазоне  $\tau_c = 10^{-3} - 10^{-11}$  с. Метод спиновых меток основан на том, что величина уширения  $\Delta H_0$  линии ЭПР стабильного иминоксильного радикала в растворе в определенном интервале концентраций ( $10^{-2} - 10^{-1}$  М) связан с константой скорости обменной релаксации (k) при столкновении радикала с парамагнетиком простым соотношением:

$$\Delta H_0 = 6,5 \cdot 10^{-8} \cdot k \cdot C$$

где C – концентрация второго парамагнетика в М,  $\Delta H_0$  выражена в эрстедах, а k – в  $M^{-1} \text{сек}^{-1}$ .

Для данной пары парамагнетиков величина k зависит от их электронного строения, микровязкости и стерических препятствий в районе столкновений. Следовательно, после предварительной эмпирической калибровки, метод может быть использован для экспериментального изучения этих факторов в биологических и медицинских объектах. При изучении влияния структуры микроокружения на вращательную диффузию иминоксильного радикала обычно пользуются следующими параметрами: временем корреляции вращательной диффузии ( $\tau_c$ ); частотой вращения радикала ( $\nu = 1/\tau$ ); анизотропией вращения ( $\epsilon$ ); эффективной энергией ( $E_{\text{эфф}}$ ) или энтальпией ( $\Delta H_{\text{эфф}}^\ddagger$ ) и энтропией ( $\Delta S_{\text{эфф}}^\ddagger$ ) активации, определяемых уравнением, выражающим зависимость  $\nu$  от температуры;

$$\nu = \frac{kT}{h} \exp \frac{\Delta S_{\text{эфф}}^\ddagger}{RT} \exp \frac{-\Delta H_{\text{эфф}}^\ddagger}{RT}$$

Для изучения надмолекулярной структуры холестерина в присутствии нитроксильной спиновой метки, навеску образца (холестерин) 25 мг помещали в пробирку, содержащую 1мл этанолового раствора спин-метки с концентрацией  $4 \cdot 10^{-3} \text{M}$ . Смесь инкубировали в течение двух суток при комнатной температуре. 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 мощность 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. Время корреляции вращения спиновых меток в исследуемых образцах определялось 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  $\Delta H_0$  – ширина центральной компоненты в гауссах;  $h_0$  и  $h_{-1}$  – интенсивность компоненты спектра с  $M = 0, +1$  и  $-1$ ;  $\nu = 1/\tau$  – величина условно называемая «частотой вращения» радикала.

Полученные результаты представлены на (рис. 8) приведены спектры ЭПР нитроксильного радикала (I): а) в виде порошка; б) – нитроксильный радикал в этаноловом растворе с концентрацией  $4 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ; в) – нитроксильный радикал в этаноловом растворе с концентрацией  $4 \cdot 10^{-3} \text{M}$  в присутствие холестерина. Как видно из рисунка 8 (б) спиновая метка радикала (I) в растворе вращается свободно с временем корреляции  $\tau_c \geq 1,54 \cdot 10^{-8} \text{с}$  и все 3 компонента сигнала ЭПР по интенсивности почти одинаковы и симметричны, а для спин-меченого холестерина спектр ЭПР отличается рисунок 8 (в), то есть затормаживается, в этом случае время корреляции  $\tau_c \leq 9,9 \cdot 10^{-7} \text{с}$ . Эти факты свидетельствуют о том, что холестерин в этих условиях образует молекулярные агрегаты, об этом указывает образование бляшек на спектре (рис. 8 (в)). Как один из определяющих

факторов мы на диаграмме внесли значения « $\tau_c$ ». Как видно из рисунка 14 диаграммы значение « $\tau_c$ » для системы I НР+ЭТ равно  $1,54 \cdot 10^{-8}$ с, а для системы II НР+ЭТ+ХЛ =  $9,9 \cdot 10^{-7}$ с. То есть значения времени корреляции « $\tau_c$ » значительно отличаются, что свидетельствует о том, что холестерин в этих условиях образует молекулярные агрегаты, в которых метка замедляет вращательную подвижность.

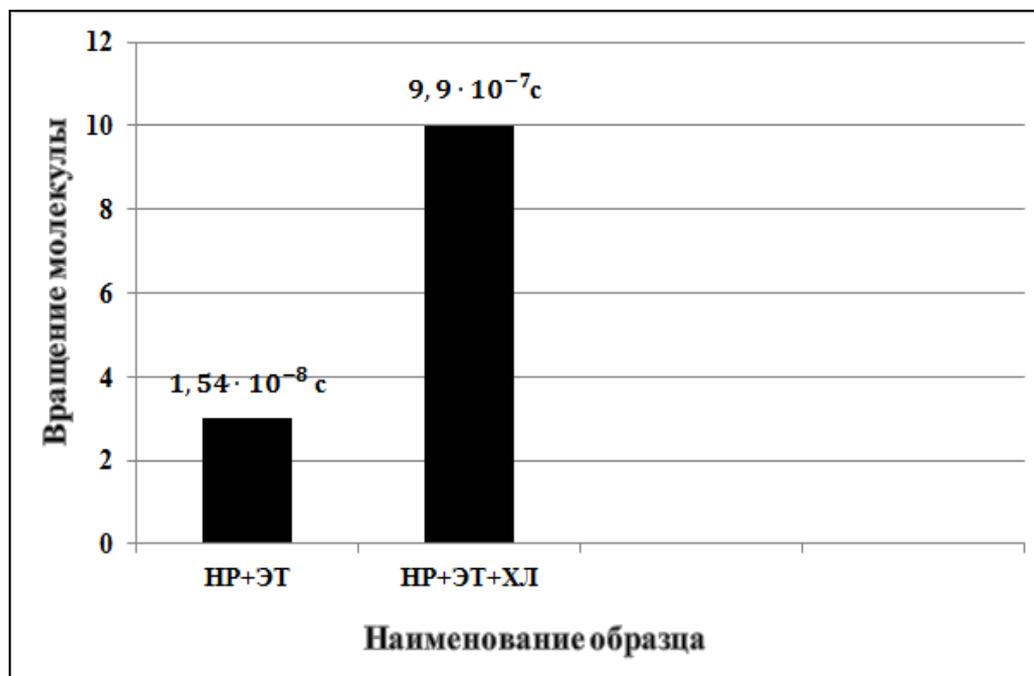
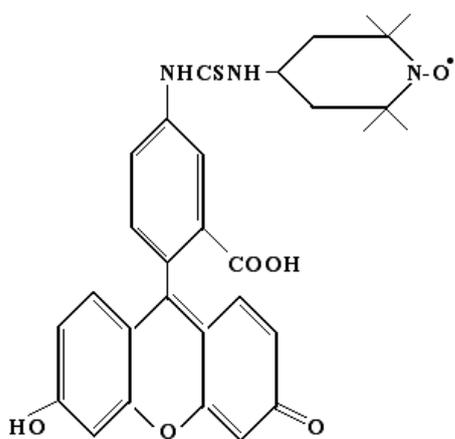
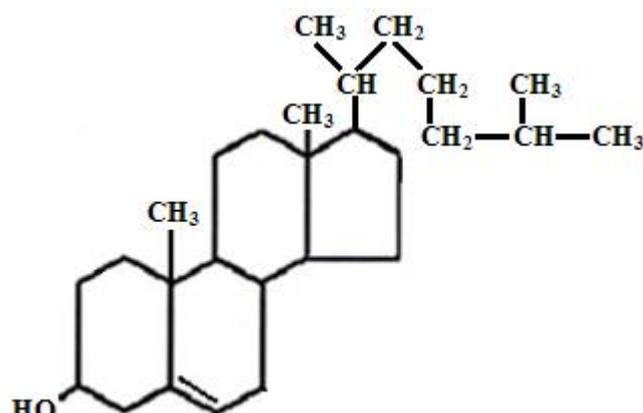


Рисунок 14. Диаграмма времени корреляции вращения молекулы в системах I НР+ЭТ, II НР+ЭТ+ХЛ

Увеличение времени корреляции вращения молекул в системе II НР+ЭТ+ХЛ= $9,9 \cdot 10^{-7}$ с по отношению системы I НР+ЭТ свидетельствует о образовании агрегата холестерина.



(I)



(2)

Структурные формулы: 1) нитроксильного радикала; 2) холестерина.

Убедившись в том, что холестерин в этих условиях образует молекулярные агрегаты, присоединение метки к которым замедляет ее вращательную подвижность. Нами было проведено исследование влияние жизненно важных органических кислот (янтарной, ацетилсалициловой, лимонной и аскорбиновой кислот) на молекулярную структуру холестерина в этаноловом растворе методом спиновой метки. Условия проведения экспериментов указаны в (главе IV Исследование влияния природных органических кислот на надмолекулярную структуру холестерина методом спиновой метки).

На основании проведённых исследований влияния ацетилсалициловой и янтарной кислот на молекулярную структуру холестерина методом спиновой метки было установлено, что спектры отличаются друг от друга (рис. 9). По спектрам ЭПР вычислено время корреляции вращения молекул « $\tau_c$ », например, при погружении спиновой метки в этаноловый раствор (рис. 9 (а)), система I НР+ЭТ вращается свободно с временем корреляции « $\tau_c$ » =  $1,54 \cdot 10^{-8}$  с, для системы II НР+ЭТ+ХЛ,  $\tau_c = 9,9 \cdot 10^{-7}$  с.

Введение в систему II НР+ЭТ+ХЛ, янтарной и ацетилсалициловой кислот отмечается разницей в спектрах ЭПР по всем имеющимся параметрам (табл. 6 и рис. 9), соответственно и по значениям « $\tau_c$ ». Полученные результаты приведены на диаграмме, где отчётливо видна разница в значениях времени корреляции вращения молекулы в системе III НР+ЭТ+ХЛ+ЯК и IV НР+ЭТ+ХЛ+АЦК по сравнению с системой I НР+ЭТ и II НР+ЭТ+ХЛ (рис. 15).

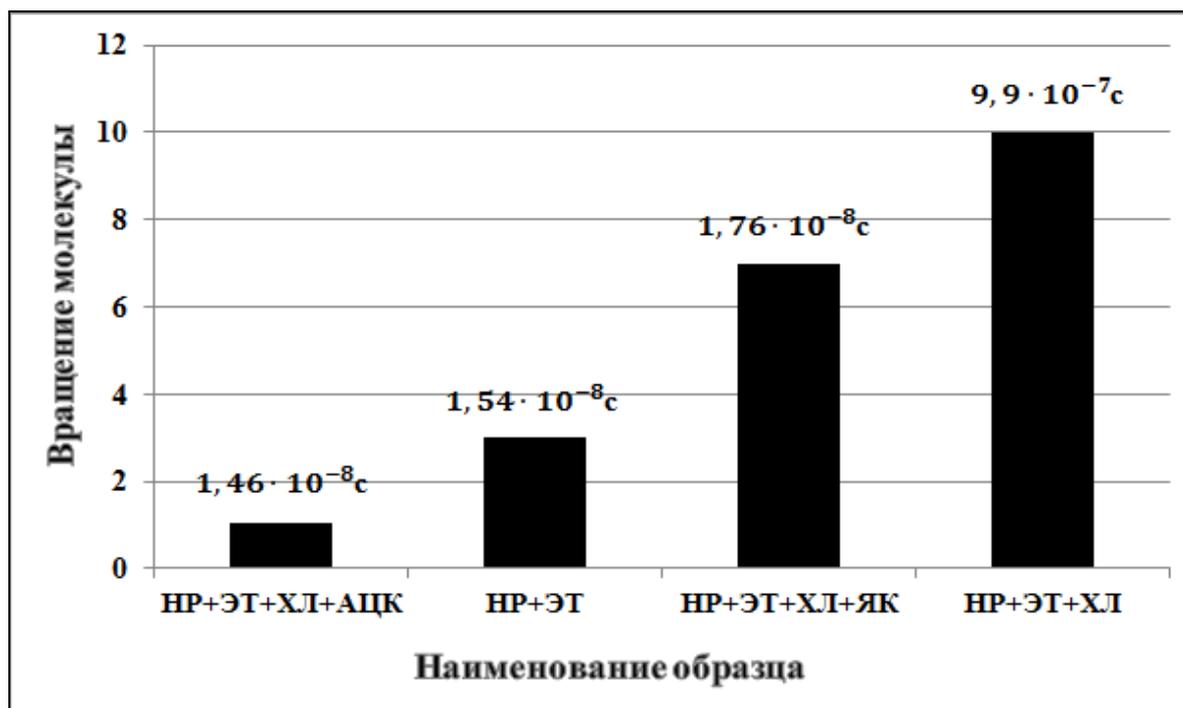


Рисунок 15. Диаграмма времени корреляции вращения молекул в системах

То есть при погружении янтарной кислоты в этаноловый раствор, содержащий холестерин и радикал системы III HP+ЭТ+ХЛ+ЯК, время корреляция «τ<sub>c</sub>» имеет значение  $1,76 \cdot 10^{-8} \text{ с}$ , а в присутствии ацетилсалициловой кислоты, оно равно –  $1,46 \cdot 10^{-8} \text{ с}$ .

Таким образом, как показали результаты исследований, изменение спектральных параметров в исследуемых системах свидетельствует об увеличении подвижности спиновой метки, что характеризуется уширением, то есть заторможенностью сигнала с временной корреляцией  $\tau_c \leq 1,76 \cdot 10^{-8} \text{ с}$  и  $1,46 \cdot 10^{-8} \text{ с}$ . Это увеличение связано с появлением движений высокой амплитуды с  $\tau_c \geq 10^{-8} \text{ с}$ . Аналогичные исследования проводились с лимонной и аскорбиновой кислотами. В систему II HP+ЭТ+ХЛ вводили лимонную систему V HP+ЭТ+ХЛ+ЛК и аскорбиновую кислоту VI HP+ЭТ+ХЛ+АСК. Полученные результаты экспериментов представлены в таблице 7 и изображены в спектрах ЭПР (главу IV Исследование влияния природных органических кислот на надмолекулярную структуру холестерина методом спиновой метки).

Как показали результаты исследований, по характеру спектра ЭПР система V НР+ЭТ+ХЛ+ЛК отличается от системы I НР+ЭТ и II НР+ЭТ+ХЛ, но близка к спектру системы III НР+ЭТ+ХЛ+ЯК. Однако совершенно иная картина наблюдается при изучении системы VI НР+ЭТ+ХЛ+АСК. При добавлении аскорбиновой кислоты в систему II НР+ЭТ+ХЛ спектр ЭПР полностью исчезает (рис. 11 (в)). Исчезновение спектра ЭПР свидетельствует о том, что аскорбиновая кислота полностью поглощает нитроксильный радикал (N-O $\cdot$ ), то есть, происходит его восстановление. Нами впервые в эксперименте методом спиновой метки на приборе ЭПР подтверждено высказывание многих учёных мира об антиоксидантных свойствах аскорбиновой кислоты.

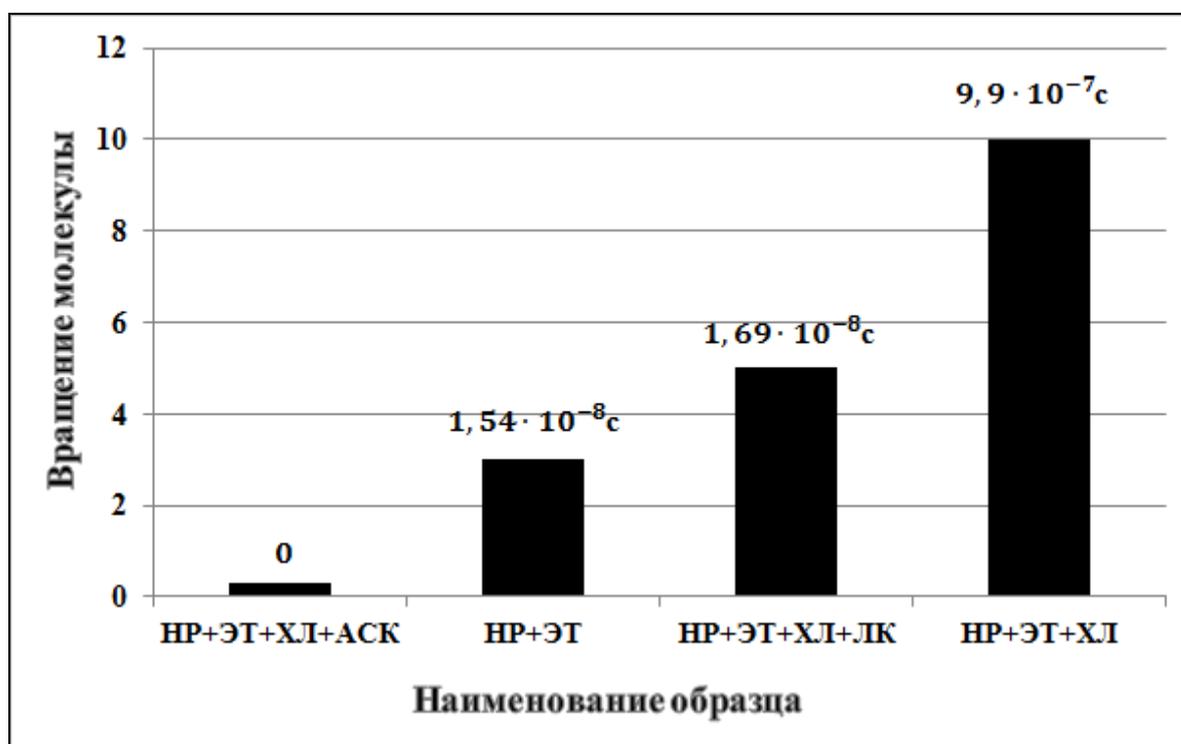


Рисунок 16. Диаграмма времени корреляции вращения молекул в системах

Обобщенные результаты исследований молекулярной структуры холестерина методом спиновой метки при погружении в жизненно важные органические кислоты (янтарную, ацетилсалициловую, лимонную и аскорбиновую) представлены в таблице 9 и указаны на рисунке 17.

Таблица 9

Параметры спектров ЭПР радикала (I) и модифицированного холестерина в среде этанола при погружении в янтарную, ацетилсалициловую, лимонную и аскорбиновую кислоты

№ п/п	Наименование вещества	Спектральные параметры								
		$J_{+1}$ , мм	$J_{-1}$ , мм	$J_0/J_{-1}$	$J_0$ , мм	$2A'z$ , Гс	$\Delta H_{+1}$ , Гс	$\Delta H_{-1}$ , Гс	$\Delta H_0$ , Гс	$\tau_c$ 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	$1,46 \cdot 10^{-8}$
5	Лимонная к-та + хл + радикал	191	108	1,69	183	34,2	4,88	3,55	2,05	$1,69 \cdot 10^{-8}$
6	Аскорбиновая к-та + хл + радикал	-	-	-	-	-	-	-	-	-

На рисунок 17 обобщённые спектры ЭПР и результаты исследований молекулярной структуры холестерина методом спиновой метки при погружении в указанные органические кислоты:

- 1) спектр ЭПР нитроксильного радикала (НР) в этаноле, система I – НР+ЭТ;
- 2) спектр ЭПР нитроксильного радикала с холестерином (ХЛ) в этаноле, система II – НР+ЭТ+ХЛ;
- 3) спектр ЭПР нитроксильного радикала, холестерина и янтарной кислоты (ЯК) в этаноле, система III – НР+ЭТ+ХЛ+ЯК;
- 4) спектр ЭПР нитроксильного радикала, холестерина и ацетилсалициловой кислоты (АЦК) в этаноле, система IV – НР+ЭТ+ХЛ+АЦК;

5) спектр ЭПР нитроксильного радикала, холестерина и лимонной кислоты (ЛК) в этаноле, система V – НР+ЭТ+ХЛ+ЛК;

6) спектр ЭПР нитроксильного радикала, холестерина и аскорбиновой кислоты (АСК) в этаноле, система VI – НР+ЭТ+ХЛ+АСК.

На рисунке 17 показаны обобщенные результаты исследований влияния органических кислот на молекулярную структуру холестерина методом спиновой метки, где отчетливо заметна разница в спектрах ЭПР, изменения выражены в параметрах  $\Delta H_{+1}$ ,  $\Delta H_0$ ,  $\Delta H_{-1}$ , « $\tau_c$ ».

Как видно из данных, приведенных в таблице 9, увеличение спектральных параметров исследуемых образцов свидетельствует о увеличении подвижности спиновой метки, что характеризуется уширением, то есть заторможенностью сигнала с временной корреляцией  $\tau_c \leq 1,76 \cdot 10^{-8}$  с. Это увеличение связано с появлением движений высокой амплитуды с  $\tau_c \geq 10^{-8}$  с.

Из таблицы 9 следует, что увеличение интенсивности сигнала сопровождается сужением спектральных линий (параметров  $\Delta H_{+1}$ ,  $\Delta H_0$ ,  $\Delta H_{-1}$ ) изученных образцов. Этот факт объясняется появлением мелкомасштабных движений, приводящих к усреднению диполь – дипольных взаимодействий. Эффект сужения (параметров  $\Delta H_{+1}$ ,  $\Delta H_0$ ,  $\Delta H_{-1}$ ), по – видимому, связан с движением протонов среди окружающих нитроксильный фрагмент радикала, который частично усредняет взаимодействие магнитных диполей неспаренного электрона и протона и характеризуется  $\tau_c \leq 10^{-8}$  с.

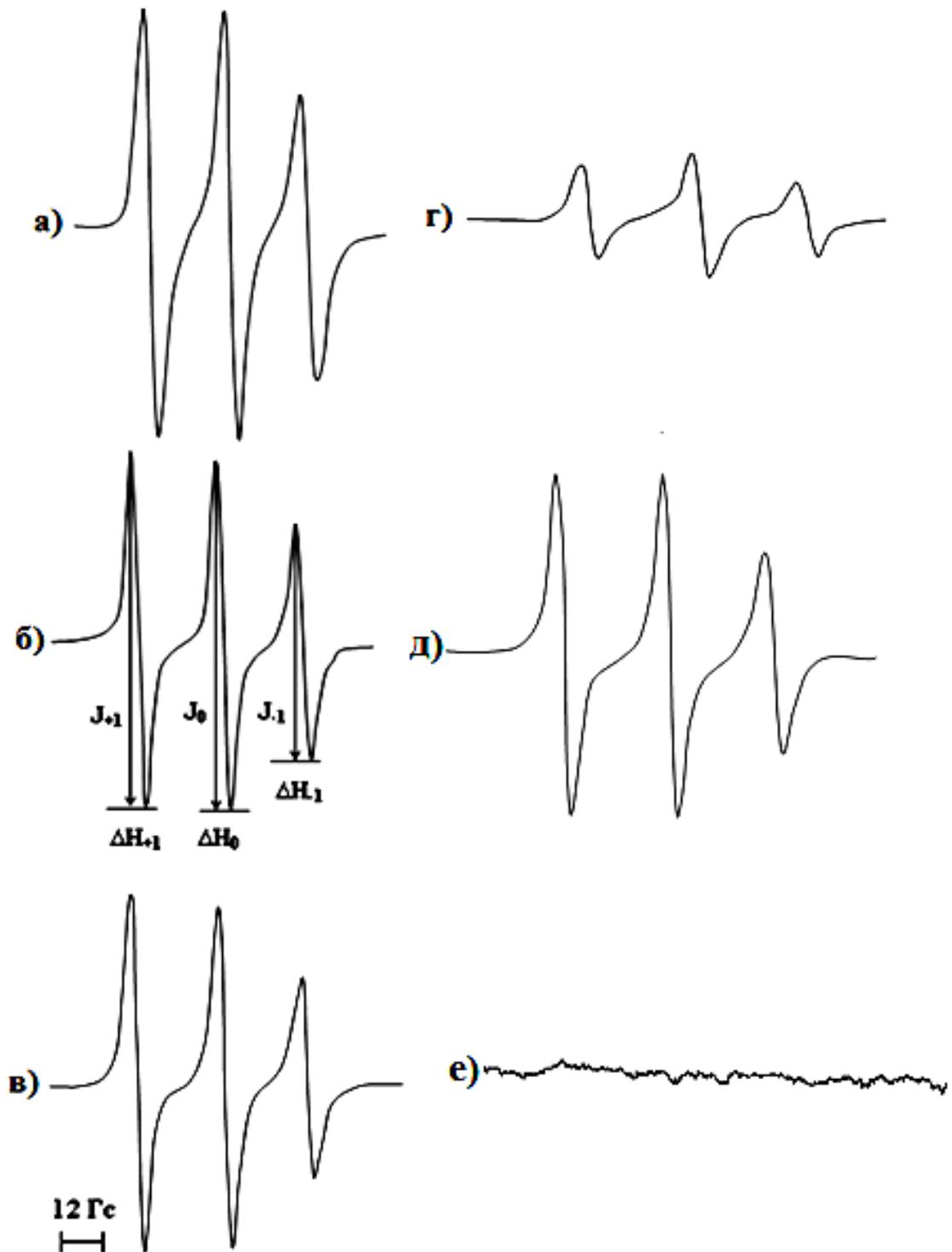


Рисунок 17. Спектры ЭПР: а) спиновой метки радикала (I) в этаноле; б) спин-меченого холестерина радикалом (I); спин-меченого холестерина радикалом (I) при погружении различных органических кислот в этаноловом растворе: в) янтарная, г) ацетилсалициловая, д) лимонная, е) аскорбиновая при температуре 300 К

Как было сказано, что одним из основных показателей меж- и внутримолекулярного взаимодействий молекул является времени корреляция вращения молекул « $\tau_c$ ». Полученные результаты приведены на рисунке 18.

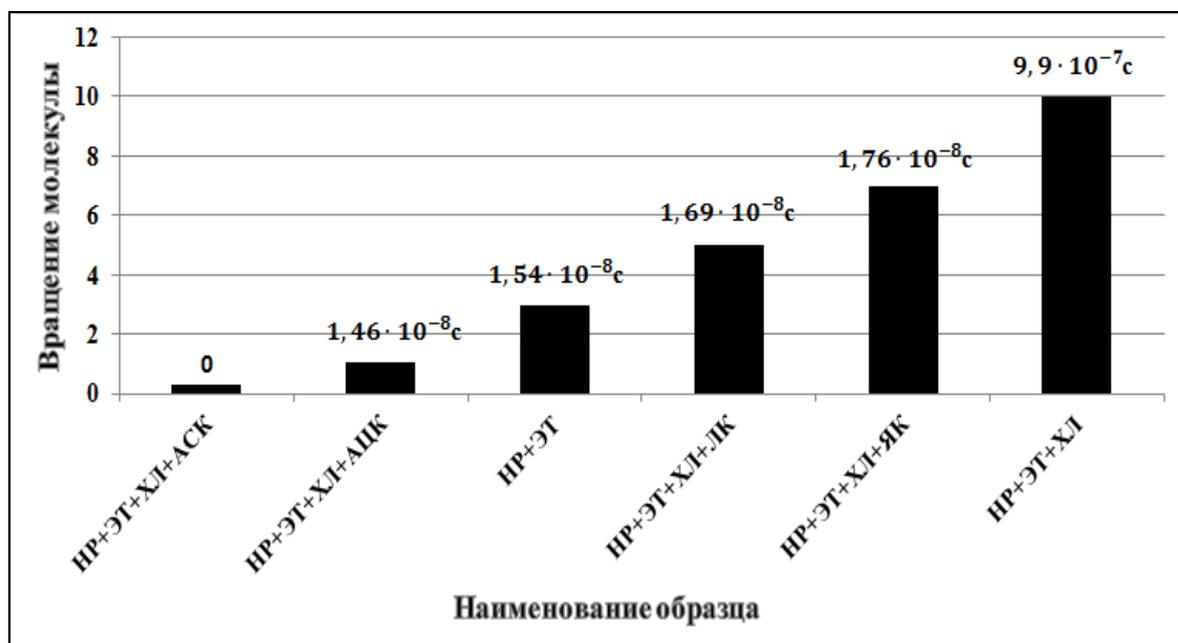


Рисунок 18. Диаграмма времени корреляции вращения молекул в системах

Как видно из диаграмм времени корреляции вращения молекул « $\tau_c$ » при введении в систему II HP+ЭТ+ХЛ органических кислот (лимонной, янтарной и ацетилсалициловой) указывает на то, что эти кислоты влияют на агрегатную структуру холестерина в растворе. Об этом свидетельствуют показания времени корреляции вращения молекул « $\tau_c$ » при сравнении с системой II HP+ЭТ+ХЛ, где значение « $\tau_c$ »= $9,9 \cdot 10^{-7}$ , а при погружении в указанные кислоты эти значения резко уменьшаются (рис. 18). Однако погружение в аскорбиновую кислоту системы II HP+ЭТ+ХЛ приводит значение « $\tau_c$ » к нулю, то есть аскорбиновая кислота поглощает нитроксильный радикал, что ещё раз свидетельствует об антиоксидантном свойстве аскорбиновой кислоты. Таким образом, полученные экспериментальные результаты с использованием метода спиновых меток свидетельствуют о том, что янтарная, ацетилсалициловая и лимонная кислоты влияют на молекулярную структуру холестерина. В отличие от выше указанных кислот, погружение в аскорбиновую кислоту системы II HP+ЭТ+ХЛ приводит к

тому, что спектр ЭПР полностью исчезает, то есть происходит восстановление нитроксильной группы (N–O<sup>•</sup>).

Результаты исследования влияния различных концентраций ХДХК методом спиновых меток на структуру холестерина приведены на таблице 8 и рисунке 13. Как видно на таблице 8 и в рисунке 13 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). 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  $2,2 \cdot 10^{-3} \text{ М}$  и  $3,3 \cdot 10^{-3} \text{ М}$  ХДХК отмечено (рис. 13. (в), (г)) увеличение интенсивности сигнала, которое сопровождается незначительным сужением спектральных линий (параметров  $\Delta H_{+1}$ ,  $\Delta H_0$ ,  $\Delta H_{-1}$ ) образцов с увеличением их амплитуды. Таким образом, из полученных результатов видно, что раствор холестерина в этаноле образует стабильный комплекс с хенодезоксихолевой кислотой. Полученные результаты исследования открыли путь к количественному исследованию таких объектов и их взаимодействие с хенодезоксихолевой кислотой и другими молекулами в модели биологических мембран, 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. В результате проведенных исследований методом спиновой метки впервые было установлено, что ХДХК взаимодействует с холестерином, образуя везикулу ХДХК – ХЛ, что имеет большое значение в современной медицине.

## 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  $\text{CaCl}_2$  – холестерин –  $\text{H}_2\text{O}$ , 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, моделирующем биологические мембраны, представляет интерес для специалистов, работающих в области биомедицины, биохимии и биофизики.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ХЛ – холестерин;

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс;

ХДХК – хенодезоксихолевая кислота;

ЖКБ – желчнокаменная болезнь;

АСК – аскорбиновая кислота;

ЛК – лимонная кислота;

ЯК – янтарная кислота;

АЦК – ацетилсалициловая кислота;

НР – нитроксильный радикал;

СТС – сверхтонкая структура;

ХЧ – химически чистый;

РЭ – радиоспектрометр;

СВЧ – сверхвысокая частота;

ЭТ – этанол;

ФЛ – фосфолипид;

ЖК – желчные кислоты;

Система I НР+ЭТ – нитроксильный радикал погружённый в этанол;

Система II НР+ЭТ+ХЛ – нитроксильный радикал, этанол, холестерин;

Система III НР+ЭТ+ХЛ+ЯК – нитроксильный радикал, этанол, холестерин и янтарная кислота;

Система IV НР+ЭТ+ХЛ+АЦК – нитроксильный радикал, этанол, холестерин и ацетилсалициловая кислота;

Система V НР+ЭТ+ХЛ+ЛК – нитроксильный радикал, этанол, холестерин и лимонная кислота;

Система VI НР+ЭТ+ХЛ+АСК – нитроксильный радикал, этанол, холестерин и аскорбиновая кислота.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Мансуров, Х.Х. Расчеты по определению насыщения желчи холестерином / Х.Х. Мансуров, Ф.Х. Муратов, Ф.Х. Мансурова // Метод рекомендации. – Душанбе. 1985. – С. 14.
2. Джураев, Х.Ш. Изучение рН водных, спиртовых растворов рецепты Авицены используемых при МКБ / Х.Ш. Джураев, Д.А. Азонов // Вестник педагогического университета им. С. Айни. – Душанбе. 2012 – № 12 – С. 107.
3. Джураев, Х.Ш. О плотности и химической растворимости холестериновых камней холелитическими препаратами желчных кислот / Х.Ш. Джураев, Х.Х. Мансуров // Тер. Архив. – Москва. 1986. – Т. 61. – № 6. – С. 65 – 68.
4. Мансуров, Х.Х. Математические методы определения насыщения желчи холестерином как способ оценки риска холелитиаза и проводимого лечения / Х.Х. Мансуров, Ф.Х. Муратов, В.С. Темиркаев // Гастроэнтерология. – Вильнюс. 1983. – С. 242 – 244.
5. Кучанская, А.В. Желчнокаменная болезнь. М.: «Весь». 1999. – С. 104.
6. Kide, A. Inhibition of cholesterol crystal formation by apolipoproteins A-I and A-II in model systems of supersaturated bile / A. Kide, R.C. Holzbach, C.N. Bedrock et al // Science. 1984. – V. 225. – P. 514 – 516.
7. Galinger, S. Biliary proteins and the nucleation defect in cholesterol cholelithiasis / S. Galinger, R.C. Harvey, C.N. Bedrock et al // Gastroenterology. 1987. – V. 92. – P. 867 – 876.
8. Фролькис, А.В. Определение литогенности желчи с помощью системы триангул, координат в диагностике желчнокаменной болезни / А.В. Фролькис, Л.Н. Струнникова // Труды института. – Пермь. 1983. – Т. 158. – С. 55 – 59.
9. Swell, L. Current concepts of the pathogenesis of cholesterol gallstones / L. Swell, D.M. Gregory, A.F. Hofmann et al // Med. Clin. No. Am. 1978. – V. 589. – P. 1447 – 1471.

10. Джураев, Х.Ш. Особенности питания при ЖКБ с позиции древней и современной медицины /Х.Ш. Джураев, Д.А. Азонов // Вопросы питания и регуляции гомеостаза. – Душанбе. 2004. – № 7. – С. 44 – 46.
11. Jost, P. In «Structure and function of biological membranes» / P. Jost, A.S. Waggoner, O.H. Criffith // N.Y. London, Acad. Press. 1971. – P. 83.
12. Антонов, М.П. Сравнительная оценка методов определения содержания холестерина в желчи / М.П. Антонов, Л.Е. Смирнов, О.А. Лаздин // Лаб. дело. 1982. – № 3. – С. 31 – 34.
13. Джураев, Х.Ш. Изучение процессы образования почечных камней с позиции химии в условиях *in vitro* / Х.Ш. Джураев, Х.С. Сафаров // Вестник педагогического университета им. С. Айни. – Душанбе. 2012. – № 12. – С. 96.
14. Джураев, Х.Ш. Химический состав почечных камней / Х.Ш. Джураев, А.А. Саидов // Вестник Таджикистан. – Душанбе. 2012. – № 12. – С. 104.
15. Дедерер, Ю.М. Новый этап в изучении патогенеза холелитиаза / Ю.М. Дедерер, Г.Г. Устинов // Клин. Медицина. 1989. – № 7. – С. 24 – 30.
16. Тертов, В.В. Белок – связанные липиды в ЛПНП человека / В.В. Тертов, В.В. Каплун, А.Н. Орехов // Бюл. экспер. биол. и мед. 1995. – № 8. – С. 155 – 158.
17. Карманский, И.М. Свойства, строение и роль липопротеидов сыворотки крови / И.М. Карманский, Е.Н. Левитова, В.О. Шпикитер // Успехи биологической химии. 1975. – Т. 16. – С. 89.
18. Шерматова, Д.У. Гиполипидемическое действие нового растительного сбора / Д.У. Шерматова, М.К. Курбанов, Х.Ш. Джураев // «Здравоохранение Таджикистана». – Душанбе. 2009. – № 3. – С. 232.
19. Творогова, М.Г. Обратный транспорт холестерина. Кардиология. 2001. – № 2. – С. 66 – 72.
20. Глямжане, И.И. Изменение некоторых показателей перекисного окисления липидов в диагностике кристаллообразования в желчи / И.И. Глямжане, М.И. Крикштопайтис // Гастроэнтерология. – Вильнюс. 1988. – С. 330 – 331.

21. Sukhanov, V.A. Chem. and Phys. Lipids / V.A. Sukhanov, R.I. Zhdanow, V.I. Shvets // 23. 1979. – P. 155 – 162.
22. Титов, В.Н. Кардинальные вопросы патогенеза атаросклероза настоящее и перспективы / В.Н. Титов // (обзор) Терапевтический архив. 2001. 12. – С. 78 – 82.
23. Дедерер, Ю.М. Механизмы образования желчных камней / Ю.М. Дедерер, В.Ц. Прохоров // Хирургия. 1979. – № 4. – С. 107 – 111.
24. Дедерер, Ю.М. Желчнокаменная болезнь / Ю.М. Дедерер, Н.П. Крылова, Г.Г. Устинов // М. 1983. – 113 с.
25. Editorial. Cholesterol nucleation and growth in gallstone formation // New. Eng. J. Med. 1980. – V. 23. – P. 1305 – 1307.
26. Ногаллер, А.М. Исследование химического состава желчи и желчных камней с инфракрасной спектроскопией и дериватографией / А.М. Ногаллер, Г.Е. Дордниен, Т.И. Катаева // Материалы всесоюзного симпозиума «Желчнокаменная болезнь» 1988. – С. 91 – 93.
27. Swell, L. Current concepts of the pathogenesis of cholesterol gallstones / L. Swell, D.M. Gregory, A.F. Hofmann et al. // Med. Clin. No. Am. 1978. – V. 589 (6). – P. 1447 – 1471.
28. Джураев, Х.Ш. Фитотерапия при ЖКБ / Х.Ш. Джураев, М.К. Курбанов // Материалы 1-го международного конгресса. – Душанбе. 2004. – С. 62 – 64.
29. Гребнев, А.Л. Белковый и пигментный обмен в печени у больных желчнокаменной болезнью до и после лечения хено – и урсодезоксихолевыми кислотами / А.Л. Гребнев и др. // Клиническая медицина. 1988. – № 3. – С. 96 – 99.
30. Раджабов, Г.О. Влияние урсодезоксихолевой кислоты сиафор на характер изменения содержания желчных кислот в сыворотки крови у больных с метаболическим синдромом / Г.О. Раджабов, А.Х. Кадыров, М.Н. Ходжимуродов и др. // «Здравоохранение Таджикистана». – Душанбе. 2009. – № 3. – С. 27 – 30.
31. Adler, R.D. Effects of low dose chenodeoxycholic acid feeding on dilary lipid metabolism / R.D. Adler, L.J. Benoit, W.C. Guale, S.M. Grundy // Gastroenterology. 1. 1975. – P. 5 – 9.

32. Petroni, M.L. Ursodeoxycholic acid alone or with chenodeoxycholic acid for dissolution of cholesterol gallstones: a randomized multicentre trial / M.L.Petroni, R.P. Jazrawi, P. Pazzi, A. Lanzini, M. Zuin, M.G. Pigozzi, M. Fracchia, G. Galatola, V. Alvisi, K.W. Heaton, M. Podda, T.C. Northfield // The Briish-Italian Gallstone Study group. *Aliment Pharmacology Therapy*. 2001. 15. – P. 123 – 128.
33. Carey, M.C. Phusico-chemical properties of bile acid and thur salts. In Danielson H. Sioevaikl J Ed sterols and dile acids / M.C. Carey // Amsterdam: Elsevier. 1985. – P. 345 – 403.
34. Мансуров, Х.Х. Современное представление о механизме образования холестериновых желчных камней / Х.Х. Мансуров // *Желчнокаменная болезнь: Всесоюзный симпозиум*. – Душанбе. 1981. – С. 25 – 29.
35. Мансуров, Х.Х. Желчнокаменная болезнь / Х.Х. Мансуров // *Актуальные вопросы патологии печени. Дониш*. – Душанбе. 1985. – С. 6 – 24.
36. Мансуров, Х.Х. Как эффективнее химическим путем растворять желчные камни / Х.Х. Мансуров, Ф.Х. Мансурова // *«Здравоохранение Таджикистана»*. – Душанбе. 1988. – № 1. – С. 26 – 34.
37. Мансуров, Х.Х. О химическом растворении холестериновых камней / Х.Х. Мансуров, Ф.Х. Мансурова // *Клин. Медицина*. 1988. – С. 84 – 89.
38. Mansurov, Ch.Ch. Sediment appearance time and bile pH change in vitro healthy and patients with cholelithiasis / Ch.Ch. Mansurov, H.Sh. Dguraev, F.Ch. Mansigova // *Urso – Chemo – Report*. 1987. – V. 31. – P. 251 – 259.
39. Мансуров, Х.Х. Сравнительное изучение времени появления осадка и рН желчи в норме и у больных холелитиазом / Х.Х. Мансуров, Х.Ш. Джураев, Ф.Х. Мансурова // *Тер. Архив*. – Москва. 1987. – Т. 59. – № 5. – С. 87 – 91.
40. Березкин, П.К. Этиология и патогенез желчных камней. М. 1930. – 88 с.
41. Нусратуллоев, И.Н. Моделирование процесса камнеобразования с помощью агрегатометрии у больных мочекаменной болезнью / И.Н. Нусратуллоев, М.К.Алчинбаев, М.И. Нусратуллоева // *«Здравоохранение Таджикистана»*. – Душанбе. 2009. – № 3. – С. 135 – 138.

42. Кадыров, А.Х. Сравнительная оценка содержания желчных кислот в сыворотке крови здоровых лиц и больных метаболическим синдромом с проявлением желчнокаменной болезни / А.Х. Кадыров, М.Б. Тошев, Ф.Х. Мансурова, М.Р. Суриев // Материалы VI – Нумановских чтений. 2009. – С. 84 – 89.
43. Сулейманов, С.И. Ранняя диагностика и профилактика мочекаменной болезни. дис. канд. мед. наук. М.; 2007. – С. 63 – 78.
44. Мансуров, Х.Х. О химическом растворении холестерина камней и устранение литогенности желчи ХДХК / Х.Х. Мансуров // Пробл. ГАЭЛ. – Душанбе. «Дониш» 1980. – С. 11 – 18.
45. Мансуров, Х.Х. Влияние длительного применения хенодезохсихолевой кислоты на литогенность желчи и холестериновые камни в желчном пузыре / Х.Х. Мансуров, А.А. Линчевская, Ф.Х. Мансурова // II Всесоюз. съезд гастрологов (Матер. съезда). М., Л., 1978. – Т. 2. – С. 304 – 305.
46. Калинин, Ф.Л. Справочник по биохимии / Ф.Л. Калинин, В.П. Лобов, В.А. Жидков // Изд. «Наукова Думка» Киев. 1971. – 1012 с.
47. Кочетков, Н.К. Химия природных соединений / Н.К. Кочетков, И.В. Торгов, М.М. Ботвинник // Изд-во М. 1981. – С. 270.
48. Мережинский, М.Ф. Основы клинической биохимии / М.Ф. Мережинский, Л.С. Черкасова // Изд. «Медицина» Москва. 1965. – С. 236.
49. Усанович, М.И. Исследование в области теории растворов и теории кислот и оснований / М.И. Усанович // Издательство «Наука» Казахской ССР. Алма – Ата 1970. – 364 с.
50. Никольский, Б.П. Справочник химика / Б.П. Никольский // Том V. М.: Изд. «Химия» 1968. – 976 с.
51. Фердман, Д.Л. Биохимия. М.: Всшая школа, 1966. – С. 318 – 343.
52. Wong, T.L. Biochemistry / T.L. Wong, L.H. Piette, J.R. Little, J.C. Hsia // 11. 1974. – P. 377 – 379.

53. Кнунянц, И.Л. Химический энциклопедический словарь / И.Л. Кнунянц // М.: Изд. Москва. 1983. – 792 с.
54. Березин, И.В. Основы биохимии / И.В. Березин, Ю.В. Савин // Изд. МГУ. 1990. – 254 с.
55. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, пер. с нем. Л.В. Козлова, Е.С. Левиной, П.Д. Решетова // Мир. Москва. 2009. – 469 с.
56. Лихтенштейн, Г.И. Многоядерные окислительно – восстановительные ферменты / Г.И. Лихтенштейн // М.: Наука, 1979. – С. 323.
57. Лихтенштейн, Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии / Г.И. Лихтенштейн // М.: Наука, 1974. – С. 256.
58. Бободжанов, П.Х. Получение спин – меченых препаратов хлопка, шелка и шерсти с помощью новых иминоксильных радикалов на основе трихлортриазина / П.Х. Бободжанов, Г.И. Лихтенштейн // Доклад АН Тадж. СССР. 1974. – Т.17. – № 10. – С. 34 – 37.
59. Лихтенштейн, Г.И. Новая спиновая метка на основе трихлортриазина / Г.И. Лихтенштейн, П.Х. Бободжанов // Биофизика. 1968. – Т.14. – №. 4. – С. 741 – 743.
60. Me Connel, H.M. Spin – labeled Hemoglobin Derivatives in Solution, polycrystalline Suspensions and single Crystals / H.M. Me Connel, W. Deal, R.T. Ogata // Biochemistry. 1969. – V. 8 – № 6. – P. 2580 – 2585.
61. Likhtenshtein, G.I. Nitroxides: Application in Chemistry, Biomedicine, and Materials Science / G.I. Likhtenshtein, J. Yamauchi, S. Nakatsuji, A. Smirnov, R. Tamura // WILEY-VCH, Weinheim. 2008.
62. Юсупов, И.Х. Использование тушения фосфоресценции для оценки локализации триплетных меток в структуре хлопковых волокон / И.Х. Юсупов, Г.И. Лихтенштейн // Биофизика. 2012. – Т. 57. – № 2. – С. 286 – 291.
63. Лихтенштейн, Г.И. Определение расстояния между функциональными белковыми и другими группами. Молекулярная биология. 1968. – № 2. – С. 234 – 240.

64. Куликов, А.В. Исследование надмолекулярной структуры хлопковой целлюлозы методом спиновых меток / А.В. Куликов, И.Х. Юсупов, П.Х. Бободжанов и др. // журнал «Прикладная спектроскопия». 1991. – Т. 55. – № 6. – С. 961 – 965.
65. Лихтенштейн, Г.И. Молекулярная биология / Г.И. Лихтенштейн, Ю.Б. Гребенщиков, Т.В. Авилова // 1972. – № 6. – С. 62.
66. Гринберг, О.Я. Исследование спин – меченного хлопкового волокна методом электронного парамагнитного резонанса двухмиллиметрового диапазона / О.Я. Гринберг, В.И. Криничный, И.Х. Юсупов и др. // Биофизика. 1986. – Т. 31. – № 3. – С. 482 – 485.
67. Марупов, Р. Исследование температурной стабильности хлопковых волокон методом спиновых меток / Р. Марупов, П.Х. Бободжанов, И.Х. Юсупов и др. // Биофизика. 1979. – Т. 24. – № 3. – С. 519 – 523.
68. Bobodzanov, P.Kh. Research of Conformational movement in Cotton Cellulose by method of Nitroxyls Spine Labels / P.Kh. Bobodzanov, J.Kh. Yusupov, R. Marupov // Proceedings of the International Seminar on Polymer Science and Technology, Tehran, I.R. Iran. 1997. – V. I. – P. 202 – 207.
69. Лихтенштейн, Г.И. Всесоюзный семинар по конформационным изменениям биополимеров в растворах / Г.И. Лихтенштейн, Т.В. Авилова, Е.И. Фролов, Л.В. Иванов и др. // Тезисы. Тбилиси. «Мецниереба». 1973.
70. Likhtenshtein, G.I., Labeling, Biophysical, Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine, Meyers, R. (ed.), VCH, New-York. 2000. – V. 7. – P. 138 – 157.
71. Лихтенштейн, Г.И. Молекулярная биология / Г.И. Лихтенштейн, Ю.Д. Ахмедов, Л.В. Иванов, Л.А. Криницкая // 7, 1973.
72. Child, T.F. Study of Molecular Motion and Environment of sorbed Water on Cellulose / T.F. Child, M.M. Pulsed // Polymer., 1972. – V. 13. (6). – P. 259 – 264.
73. Dikalov, S.I. Reassignment of organic A peroxy radical adducts / S.I. Dikalov, R.Ph. Mason // Free radical. Biol. Med. 27: 1999. – P. 864 – 872.

74. Deterding, L.J. Nature of the inhibition of horseradish peroxidase and mitochondrial cytochrome C oxidase by cyanur radical / L.J. Deterding, K.B. Tomer, R.P. Mason // *Biochemistry*. 2000. – V. 39. – P. 4415 – 4422.
75. Gindenmeyer, P.H. A Molecular Theory of Polymer Chain Folding / P.H. Gindenmeyer // *V. Polym. Sci.*, CN 20, 1967. – P. 145 – 158.
76. Котельников, А.И. Прикладная спектроскопия / А.И. Котельников, Г.И. Лихтенштейн, В.Р. Фогель и др. // *Журнал*. 1984. – Т. 60. – С. 564.
77. Парамон, В.Н. Стабильные бирадикалы / В.Н. Парамон, А.И. Кокорин, Г.М. Жидомиров // М.: Химия. 1980. – 380 с.
78. Tsay F., Hong S. Moacanin J., Gupta A. Studies of Magnetic Resonance Phenomena in Polymers. The Effects of Free Volume and segmental Mobility on the Motion of Nitroxide Spin Probes Labels in Poly- methyl methacrylate. - *J. Polym. Sci.: Polym. Phys. Ed.*, 1982. – V. 20. – № 4. – P. 763 – 765.
79. Лихтенштейн, Г.И. Исследование структуры и функций белков методом парамагнитных меток. *Успехи биологической химии*. 1971. – Т. 12. – С. 3.
80. Бучаченко, А.Л. Стабильные радикалы / А.Л. Бучаченко, А.М. Вассерман // М.: Химия. 1973. – С. 347 – 362.
81. Вассерман, А.М. Спиновые метки и зонды в физикохимии полимеров / А.М. Вассерман, А.Л. Коварский // М.: Наука, 1986. – С. 245.
82. Кузнецов, А.Н. Метод спинового зонда. М.: Наука, 1976. – С. 210.
83. Гольданский, В.И. Молекулярная биология / В.И. Гольданский, Ю.Ф. Крупянский, Е.М. Федотов // 1985. – Т.17. – С. 532 – 542.
84. Thomus D.D., Bolton V.R., Hyde J. Rotational diffusion studied by Passage Saturation Transfer Electron Paramagnetic Resonance - *J. Chem. Phys.*, 1976. – V. 65. – № 8. – P. 3006 – 3024.
85. Котельников, А.И. Молекулярная биология / А.И. Котельников, Г.И. Лихтенштейн, В.Р. Фогель // 1983. – Т. 17. – С. 846.

86. Кольтовер, В.К. Спиновые метки и зонды в исследованиях модельных и биологических мембран / В.К. Кольтовер // В кн.: Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. М.: ВИНТИ. 1979. – Т. 11. – С. 10 – 100.
87. Tormala, P. Determination of Glass Transition Temperature of polyethylene glycol by spin probe technique // J.European Pol. 1971. – V. 10. – № 6. – P. 513 – 521.
88. Cameron, G.G. In: Development in polymer Characterisation – 3 / G.G. Cameron, A.T. Bullock // Ed. J. V. Dawkins. Ripple Road: Appl. Sci. Publ. 1982. – P. 107 – 157.
89. Hyde, J.S. - In: Enzyme Structure / Ed.C.H.W. Ilirs, S.N. Timasheff. N.Y.: Acad. Press. (Meth. Enzymol. – Vol. 49 G). 1978. – P. 480 – 511.
90. Molecular motion in polymers gy ESR / Ed.R.F. Vajer, S.E. Keinath. Chur: MMJ Press. 1980. – P. 323.
91. Фрид, Дж. Теория спектров ЭПР нитроксильных радикалов в области их медленного вращения / Дж. Фрид // в кн. «Метод спиновых меток: теория и применение». Пер. с англ. под ред. Э.Г. Розанцев М. Мир. 1979. – С. 207 – 263.
92. Лихтенштейн, Г.И. Исследование микроструктуры белков методом «парамагнитная метка – парамагнитный зонд» / Г.И. Лихтенштейн, Ю.Б. Гребенщиков, П.Х. Бободжанов, Ю.В. Коханов // Молекулярная биология. 1970. – Т. 4. – С. 662.
93. Bobodzanov, P.Kh. Processings of 5-th conference on applied chemistry unit and processes Hungari / P.Kh. Bobodzanov, R. Marupov // 1989. – V. 2. – P. 114 – 117.
94. Bobodzanov, P.Kh. The molecular dynamics study of various – brands of Linen fibre by the spin-label method / P.Kh. Bobodzanov, I.Kh. Yusupov // Abstracts international conference on Nitroxide Radicals. YCNR. Novosibirsk. USSR. 1989. – P. 61.
95. Иванова, Л.И. Влияние холестерина на плазматические мембраны опухолевых и нормальных клеток / Л.И. Иванова // Кандидатская диссертация биол. наук. 1984. – С. 116.

96. Иванова, В.Ф. Роль холестерина в возрастном изменении микровязкости и активности ферментов плазматической мембраны *Acholeplasma laidlawii* / В.Ф. Иванова // Кандидатская диссертация биол. наук. 1984. – С. 37.
97. Neiman, E.G. Rosantsev, Yn. G. Mamedova. Nature. 136. 472. 1962.
98. Розанцев, Э.Г. О реакциях нового органического радикала без затрагивания свободной валентности / Э.Г. Розанцев // Изв. АН СССР. Серия химия. 1963. – С. 1669 – 1672.
99. Берлинера, Л. Метод спиновых меток. Теория и применение / Под ред. Л. Берлинера // Изд. «Мир». Москва. 1979. – С. 639.
100. Розанцев, Э. Г. Свободные иминоксильные радикалы / Э. Г. Розанцев // М. Химия. 1970. – 216 с.
101. Гамильтон, Г.Л. Спиновые метки / Г.Л. Гамильтон, Г.М. Макконнелл // Успехи химии. 1970. – Т. 39. – С. 531 – 559.
102. Лихтенштейн, Г.И. Изучение аллостерических эффектов в гемоглобине методом парамагнитных меток / Г.И. Лихтенштейн, П.Х. Бободжанов, Э.Г. Розанцев, В.И. Сускина // Молекулярная биология. 1968. – Т. 2. – С. 44.
103. Лихтенштейн, Г.И. Исследование структуры и локальных конформационных переходов белков и ферментов методом двойных парамагнитных меток / Г.И. Лихтенштейн, П.Х. Бободжанов // Биофизика. 1968. – Т.13. – № 5. – С. 757 – 764.
104. Сускина, В.И. Новые спин – метки и зонды для биологических исследований / В.И. Сускина, Ю.А. Иванов, Б.И. Каспрук // Изв. АН СССР. Сер. Химия. 1973. – С. 1327 – 1329.
105. Бободжанов, П.Х. Исследование структуры и свойств хлопковой целлюлозы методом ЭПР / П.Х. Бободжанов, И.Х. Юсупов, Р. Марупов и др. // Тез. док. V – Всесоюзной конференции по химии и физике целлюлозы. Ташкент. Изд. ФАН. 1982. – Т.3. – С. 11 – 12.
106. Бободжанов, П.Х. Исследование молекулярной динамики микрокристаллической целлюлозы методом ЭПР / П.Х. Бободжанов, И.Х. Юсупов, Р. Марупов // Журнал. Прикладная спектроскопия. 1992. – Т. 56. – № 3. – С. 424 – 428.

107. Бободжанов, П.Х. Синтез и исследование спин – меченых белков и ферментов / П.Х. Бободжанов // Кандидатская диссертация. – Душанбе. 1972. – С. 48 – 50.
108. Голубев, В.А. Синтез стабильных иминоксильных радикалов / В.А. Голубев // Кандидатская диссертация. М., 1964. – С. 34 – 35.
109. Бучаченко, А.Л. Стабильные радикалы. Москва. Изд-во АН СССР. 1963. – 172 с.
110. Шапиров, А.Б. Новые спин – меченые биологические активные соединения / А.Б. Шапиров, Л.С. Богач, В.М. Чумаков и др. // Изв. АН СССР. Сер. Химия. 1975. – № 9. – С. 2077 – 2081.
111. Макарова, Л.Г. «Методы электронно – органической химии» / Л.Г. Макарова, А.Н. Несмеянов // Ртуть. М. 1965. – С. 55.
112. Розынов, Б.В. Биологически активные стабильные радикалы / Б.В. Розынов, Р.И. Жданов, О.С. Решетова и др. // Изв. АН СССР. Сер. Химия. 1978. – № 8. – С. 1838 – 1844.
113. Куликов, А.В. Использование кривых насыщения для оценки расстояний в биологических объектах по методу двойных спиновых меток / А.В. Куликов, Г.И. Лихтенштейн // Биофизика. 1974. – Т. 19. – С. 420 – 423.
114. Розанцев, Э.Г. Парамагнитные производные окиси азота. Успехи химии. 35. 1966. – С. 1549 – 1593.
115. Жданов, Р.И. Парамагнитные модели биологически активных соединений / Р.И. Жданов // М. Наука. 1981. – С. 280.
116. Жданов, Р.И. Биологически активные стабильные радикалы / Р.И. Жданов, Н.Г. Капитанова, Э.Г. Розанцев // Изв. АН СССР. Сер. Химия. 1980. – № 2. – С. 364 – 367.
117. Розанцев, Э.Г. Новый индивидуальный свободный радикал с первичной аминогруппой / Э.Г. Розанцев, Ю.В. Коханов // Изв. АН СССР. Сер. Химия. 1966. – № 8. – С. 1477 – 1479.

118. Лебедев, О.Л. Труды по химии и химической технологии / О.Л. Лебедев, С.Н. Казарновский // Горький. 1959. – № 3. – 649 с.
119. Hoffman, A. - J. Amer. Chem. Soc. / A. Hoffman, A. Henderson // 1961. 83. – P. 4671 – 4672.
120. Блюменфельд, Л.А. Электронный парамагнитный резонанс / Л.А. Блюменфельд, А.Н. Тихонов // Соросовский Образовательный журнал. 1997. – № 9. – С. 91 – 99.
121. Кокорин, А.И. Изучение методом ЭПР конформационных особенностей нитроксильных радикалов / А.И. Кокорин, Л.С. Богач, А.Б. Шапиров, Э.Г. Розанцев // Изв. АН СССР. Сер. Химия. 1976. – № 9. – С. 1994 – 1999.
122. Моррисет, Дж. В кн. Метод спиновых меток: Теория и применение / Дж. Моррисет // (Перевод с англ. под ред. Э.Г. Розанцева) М. Мир. 1979. – С. 298 – 366.
123. Vyllock, A.T. Structural Studies of Macromolecules by Spectroscopic Methods / A.T. Vyllock, G.C. Smeron // Ed. by J.V. Ivin, New York: Willey. 1976. – P. 15.
124. Тормала, П. В кн.: Структурные исследования макромолекул спектроскопическими методами / П. Тормала, Дж. М. Линдберг // Химия. 1980. – С. 236 – 251.
125. Лебедев, Я.С. ЭПР и релаксация стабилизированных радикалов / Я.С. Лебедев, В.И. Муромцев // М., «Химия». 1972.
126. Goldman, S.A. An ESR Study of anisotropic rotational Reorientation and slow Tumbling in Liquid and frozen media / S.A. Goldman, G.V. Bruno, C.F. Polnaszek, J.H. Freed // J. Chem. Phys., 1972. – V. 56. – № 2. – P. 716 – 735.
127. Колб, В.Г. Справочник по клинической биохимии / В.Г. Колб, В.С. Камышников // Минск. 1982. – С. 366.
128. Камышников, В.С. «Клинико-биохимическая лабораторная диагностика» / В.С. Камышников // Справочник. Минск 2003. – Т. II. – С. 123 – 130.
129. Джураев, Х.Ш. Исследования системы  $\text{CaCl}_2$  – холестерин –  $\text{H}_2\text{O}$  / Х.Ш. Джураев, Ш.А. Холова // «Здравоохранение Таджикистана». – Душане. 2009. – № 3. – С. 197 – 199.

130. Hubbell W.L., Me Connell H.M., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 61, 12 (1968).
131. Hubbell W.L., Me Connell H.M., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 63, 16 (1969).
132. Медведев, П.И. Значение рН. Физическая и коллоидная химия. – Москва. 1957. – С. 104 – 105.
133. Киреев, В.А. Курс физической химии. – Москва. 1955. – 830 с.
134. Холова, Ш.А. Изменение рН показателя преломления физиологического раствора в зависимости от концентрации аскарбиновой, 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.
135. 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.
136. Берлинера, Л. Метод спиновых меток. Теория и применение / Л. Берлинера // Изд. «Мир». – Москва. 1979. – С. 9 – 13.
137. Likhtenshtein, G.I. Biophysical Labeling Methods in Molecular Biology. Cambridge, New York, Cambridge University Press. 1993. – P. 9.
138. Юсупов, И.Х. Исследование молекулярной динамики хлопкового волокна методом спиновой метки / И.Х. Юсупов, П.Х. Бободжонов, Р. Марупов и др. // Высокомолекулярные соединения. 1984. – Т. 26 А. – № 2. – С. 369 – 373.
139. Юсупов, И.Х. Локализация спиновых меток в волокнах хлопка и целлюлозы / И.Х. Юсупов, Г.И. Лихтенштейн, П.Х. Бободжанов, Р. Марупов // Материалы международной конференции «Современные проблемы физики». – Душанбе. 2008. – С. 209 – 217.
140. 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.

141. 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.
142. 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.
143. Doty, J.E. Interaction of chenodeoxycholic acid and dietary cholesterol in the treatment of cholesterol gallstones / J.E. Doty, L. DenBesten, J.J. Roslyn, H.A. Pitt, S.L. Kuchenbecker, V. Porter-Fink // American Journal of Surgery. 1982. 143. – P. 48 – 54.
144. Incardona, J.P. Cholesterol in signal transduction / J.P. Incardona, S. Eaton // Current Opinion of Cell Biology. 2000. 12. – P. 193 – 203.
145. Iser, J.H. Chenodeoxycholic acid: a review of its pharmacological properties and therapeutic use / J.H. Iser, A. Sali // Drugs. 1981. 21. – P. 90 – 119.
146. Rothblat, G.H. Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux / G.H. Rothblat, F.H. Mahlberg, W.J. Johnson, M.C. Phillips // The Journal of Lipid Reserch. 1992. 33. – P. 1091 – 1097.
147. Ohvo-Rekila, H. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes / H. Ohvo-Rekila, B. Ramstedt, P. Leppimaki, J.P. Slotte // Progress of Lipid Research. 2002. 41. – P. 66 – 97.
148. Alan, R. Nutritional Approaches to Prevention and Treatment of Gallstones / R. Alan, M.D. Gaby // Alternative Medicine Review. 2009. 14. – P. 258 – 226.
149. 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.

150. 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.
151. 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.
152. 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.
153. 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.
154. 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.
155. Лихтенштейн, Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии / Г.И. Лихтенштейн // М. Наука. 1974. – С. 254.
156. Hamilton, C.L. «Structural chemistry and molecular biology» / C.L. Hamilton, H.M. Mc Connell // A. Rieh, N. Davidson (Eds). San Francisco, 1958. – P. 115. (Русский перевод: Успехи химии, 39, 3, 1970).
157. Smith, I.C. In «Biological application of ESR spectroscopy» / I.C. Smith, J.R. Bolton, D. Borg, H. Schwarz // (Eds). N.Y., Wiley / Interscience. 1971.

158. Wolkoff , A.W. Bile acid regulation of hepatic physiology: I. Hepatocyte transport of bile acids / A.W. Wolkoff, D.E. Cohen // *American Journal of Physiology*. 2003. 284. – P. 175 – 179.
159. Барков, Е.В. Достижения современной биологии, химии и медицины / Е.В. Барков, А.В. Бутвилов // Республиканской конференции посвященной 100-летию со дня рождения В.А. Бандарин. – Минск. 2009. – 128 с.
160. Mason, R.P. Complement – Reduced Decrease-in Membrane Mobility: Introducing a More Sensitive Index of Spin - Label Motion / R.P. Mason, R.V. Giavedoni, A.P. Balmasso // *Biochemistry*. 1977. – V. 16. – № 6. – P. 1196 – 1201.
161. Wasserman, A.M. The Study of Rotational mobility of stable nitroxide Radicals in Polyvinylacetate – Europ / A.M. Wasserman, T.A. Alexandrowa, A.L. Buchachenko // *Polym. J.*, 1976. – V. 12. – № 9. – P. 691 – 695.
162. Коничев, А.С. Биохимия и молекулярная биология / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова // Дрофа. Москва. 2008. – 359 с.
163. Johnson, M.B. Spin - Label Techniques for Monitoring Macromolecular Rotational Motion: Empirical calibration under Nonideal Conditions. *Biochemistry*. 1979. – V. 18. – № 2. – P. 378 – 384.
164. Likhtenshtein, G. I. Depth of immersion of paramagnetic centers. In: *Magnetic Resonance in Biology* / G. I. Likhtenshtein, L. Berliner, S. Eaton, G. Eaton // Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 2000. P. 1 – 36.
165. Schroeder, F. Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetic pools / F. Schroeder, J.R. Jefferson, A.B. Kier, J. Knittel, T.J. Scallen, W.G. Wood, I. Napala // *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*. 1991. 196. – P. 235 – 252.