



УКРАЇНА

(19) UA (11) 65766 (13) U  
(51) МПК  
G01N 1/28 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ЕКСПРЕС-ВИЗНАЧЕННЯ ЗМІН ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МЕМБРАН ТРОМБОЦИТІВ У ХВОРИХ З СУДИННОЮ ПАТОЛОГІЄЮ ГОЛОВНОГО МОЗКУ**

1

2

(21) u201107649

(22) 17.06.2011

(24) 12.12.2011

(46) 12.12.2011, Бюл.№ 23, 2011 р.

(72) ПОСОХОВ ЄВГЕН ОЛЕКСАНДРОВИЧ

(73) ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА

(57) Спосіб експрес-визначення змін фізико-хімічних властивостей мембран тромбоцитів у хворих з судинною патологією головного мозку, що включає введення в досліджувані мембрани набору флуоресцентних зондів, реєстрацію спектрів їх флуоресценції, проведення математичної обробки спектральних даних, який відрізняється тим, що в мембрани вводять набір мультипараметричних флуоресцентних зондів з різною локалізацією в ліпідному бішарі мембран, який включає 2-феніл-9,10-фенантр-1,3-оксазол і ряд орто-гідрокси-2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу, на спектрофлуориметрі

реєструють спектри їх флуоресценції, після чого проводять математичну обробку спектральних даних, яка полягає в тому, що за даними спектрів визначають інтенсивності флуоресценції  $F_\lambda$  для 2-феніл-9,10-фенантр-1,3-оксазолу та 2-(2'-гідрокси-феніл)-5-(4'-диметиламіно-феніл)-1,3,4-оксадіазолу на довжині хвилі  $\lambda$  в діапазоні 375-450 нм, а також значення інтенсивності флуоресценції  $F_B$  та  $F_A$  інших зондів набору, відповідно, на довжинах хвиль А і Б діапазонів, де діапазон А знаходиться в межах 370-425 нм, а діапазон Б - в межах 450-600 нм, обчислюють відношення значень інтенсивності флуоресценції зондів  $F_B/F_A$  і за зміною інтенсивності флуоресценції  $F_\lambda$ , і відношень  $F_B/F_A$  у разі патології у хворого порівняно з аналогічними параметрами, вимірними для даного виду мембран за умов відсутності патологічних змін, роблять висновок про наявність судинної патології, її характер і стадію.

Корисна модель належить до галузі біофізики, біохімії і медичної діагностики й може бути використана для експрес-оцінки змін фізико-хімічних властивостей мембран тромбоцитів хворих з цереброваскулярними порушеннями гіпертонічного й атеросклеротичного генезу.

Найбільш частими етіологічними чинниками різних судинних захворювань є гіпертонічна хвороба й церебральний атеросклероз. Загальноприйнято, що гіперхолестеринемія й артеріальна гіпертензія можуть виступати як найбільш потужні чинники в генезі атеросклерозу [1]. Тромбоцити, беручи участь у транспортуванні холестерину до моноцитів, сприяють утворенню "пінявої клітини" і, таким чином, беруть участь у розвитку атеросклерозу [2]. Крім того, знайдено різне відношення холестерол/фосфоліпіди в мембранах тромбоцитів у хворих з різним генезом дисциркуляторної енцефалопатії (гіпертонічним, атеросклеротичним) [3]. Таким чином, експрес-оцінка стану ліпідного бішару мембран тромбоцитів хворих з судинною патологією може допомогти у визначенні патогенетичних особливостей, диференціально-діагностичних критеріїв, профілактичних і лікувальних заходів.

Відомий спосіб визначення відношення холестерол/фосфоліпіди в мембранах тромбоцитів, який ґрунтується на розділенні ліпідів за допомогою методу тонкошарової хроматографії [4] з подальшим визначенням вмісту фосфоліпідів і холестеролу. Фосфоліпіди визначають за кількістю фосфору [5]: фосфоліпіди осідають трихлороцтовою кислотою, осад піддають мінералізації за допомогою розчину хлорної кислоти. Неорганічний фосфор утворює з молібденовою кислотою фосфорно-молібденову кислоту, яка відновлюється аскорбіновою кислотою в молібденову синь. За інтенсивністю поглинання отриманого розчину при 680 нм роблять висновок про кількість неорганічного фосфору. Кількість холестеролу визначається за методом Златкіса-Зака [6] - колориметричним методом визначення концентрації холестеролу, що ґрунтується на появі червоно-фіолетового фарбування при взаємодії холестеролу з оцтовою і сірчаною кислотами за наявності хлорного заліза.

Проте, значні затрати часу, зумовлені специфікою біохімічного аналізу, і порівняно висока трудомісткість біохімічного аналізу перешкоджають

(13) U

(11) 65766

(19) UA



використанню цього способу дослідження ліпідного складу тромбоцитів в діагностичних цілях. Крім того, обговорюваний спосіб не дозволяє зробити висновок про локалізацію патологічних змін у різних областях мембран тромбоцитів.

Відомі способи оцінки ліпідного складу тромбоцитів, що ґрунтуються на оцінці активації в них перекисного окиснення ліпідів [7]. Спосіб полягає в тому, що збільшення вмісту холестеролу в мембранах тромбоцитів призводить до зростання числа місць зв'язування для ендопероксидів [8]. Стан вільнорадикального окиснення ліпідів в мембранах тромбоцитів оцінюється за вмістом у них малонового діальдегіду [9], дієнових кон'югатів (ДК) [10] і шифових основ [11].

Недоліками цього способу є:

- значні затрати часу, обумовлені специфікою біохімічного аналізу, і порівняно висока трудомісткість біохімічного аналізу;

- спосіб не дозволяє робити висновок про локалізацію патологічних змін у різних областях мембран тромбоцитів.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб визначення змін фізико-хімічних властивостей ліпопротеїнів крові й мембран різних клітин методом флуоресцентних зондів [11, 12], що включає введення в досліджувані мембрани набору флуоресцентних зондів, реєстрацію спектрів їх флуоресценції, проведення математичної обробки спектральних даних і знаходження залежності виміряних спектральних параметрів від патології гіпертонічного або атеросклеротичного ґенезу.

Положення й інтенсивність смуг флуоресценції цих зондів залежать від параметрів навколишнього середовища молекул зондів: від його полярності, в'язкості, здатності до утворення міжмолекулярних водневих зв'язків.

Спосіб включає введення в досліджувані мембрани мультипараметричних флуоресцентних зондів АНС і ДМХ, реєстрацію спектрів їх флуоресценції, проведення математичної обробки спектральних даних, яка полягає в тому, що за спектрами визначають інтенсивності флуоресценції ( $F$ ) зондів на довжинах хвиль: 470 нм для АНС і 500 нм для ДМХ, за зменшенням  $F_{470}$  для АНС і за збільшенням  $F_{500}$  для ДМХ порівняно з аналогічними параметрами, виміряними для контрольних мембран даного виду з низьким вмістом холестеролу, роблять висновок про зміну вмісту холестеролу в мембранах.

Основним недоліком застосування ДМХ для моніторингу мембран тромбоцитів є те, що цей зонд слабо й повільно проникає в мембрани тромбоцитів, у зв'язку з чим спостерігається дуже низький рівень інтенсивності флуоресценції, що не дозволяє використовувати цей зонд у масових медико-біологічних дослідженнях мембран тромбоцитів;

Також, у ході застосування АНС для моніторингу мембран тромбоцитів не виявлено чутливості флуоресцентних параметрів зонда до специфічних змін цих мембран при гіпертонічній хворобі й атеросклерозі;

Крім того, зонди АНС і ДМХ локалізуються в області полярних голівок фосфоліпідів ліпідного

бішару, отже, застосування цих зондів не дозволяє проводити моніторинг змін в інших, більш гідрофобних, областях ліпідних мембран: в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів і в центрі ліпідного бішару.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення такого способу визначення змін фізико-хімічних властивостей мембран тромбоцитів у хворих з судинною патологією головного мозку різного ґенезу, який, за рахунок використання набору інших мембранних зондів, дозволить проводити експрес-моніторинг змін у всіх областях ліпідного бішару мембрани тромбоцита, точніше встановити локалізацію змін у ліпідному бішарі, підвищити достовірність визначення змін у мембранах тромбоцитів за рахунок зіставлення даних для зондів з різною локалізацією в ліпідному бішарі мембран.

Для вирішення поставленої задачі в способі, прийнятому за найближчий аналог, який включає введення в досліджувані мембрани набору зондів з різною локалізацією в ліпідному бішарі мембран, реєстрацію спектрів флуоресценції, проведення математичної обробки спектральних даних і знаходження залежності виміряних спектральних параметрів від патології гіпертонічного або атеросклеротичного ґенезу, згідно з корисною моделлю, в мембрани вводять набір мультипараметричних флуоресцентних зондів з різною локалізацією в ліпідному бішарі мембран, який включає 2-феніл-9,10-фенантр-1,3-оксазол і ряд орто-гідроксипохідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу, на спектрофлуориметрі реєструють спектри їх флуоресценції, після чого проводять математичну обробку спектральних даних, яка полягає в тому, що за даними спектрів визначають інтенсивності флуоресценції  $F_A$ , для 2-феніл-9,10-фенантр-1,3-оксазолу та 2-(2'-гідроксифеніл)-5-(4'-диметиламіно-феніл)-1,3,4-оксадіазолу на довжині хвилі  $\lambda$  в діапазоні 375-450 нм, а також значення інтенсивності флуоресценції  $F_B$  та  $F_A$  інших зондів набору, відповідно, на довжинах хвиль А і Б діапазонів, де діапазон А знаходиться в межах 370-425 нм, а діапазон Б - в межах 450-600 нм, обчислюють відношення значень інтенсивності флуоресценції зондів  $F_B/F_A$  і за зміною інтенсивності флуоресценції  $F_A$ , і відношень  $F_B/F_A$  у разі патології у хворого порівняно з аналогічними параметрами, виміряними для даного виду мембран за умов відсутності патологічних змін, роблять висновок про наявність судинної патології, її характер і стадію.

Положення й інтенсивність смуг флуоресценції 2-феніл-9,10-фенантр-1,3-оксазолу залежить від полярності й в'язкості мікрооточення цього зонда.

Орто-гідроксипохідні 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу здатні до ізомеризації у збудженому електронному стані з утворенням нормальної ( $N^*$ ) і тауомерної ( $T^*$ ) форм [14]. Положення й інтенсивність смуг флуоресценції кожної з форм залежать від параметрів оточення їх молекул, таких, як в'язкість, полярність, і від здатності утворювати міжмолекулярні водневі зв'язки [15].



У мембранах орто-гідроксипохідні 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу локалізуються відповідно до ліпофільності зондів [16]: 2-(2'-ОН-феніл)-5-(4'-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-феніл)-1,3,4-оксадіазол (зонд D7) - в області полярних голівок фосфоліпідів; 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3,4-оксадіазол (зонд D1) - в області гліцеринових залишків фосфоліпідів; 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол (зонд O1O) - в області гліцеринових залишків фосфоліпідів і в області карбонільних груп фосфоліпідів; 2-(2'-ОН-феніл)-5-(4'-феніл-феніл)-1,3-оксазол (зонд O6O) - в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів; 2-(2'-ОН-феніл)-9,10-фенантр-1,3-оксазол (зонд PH7) - в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів і в центрі ліпідного бішару мембран; 2-феніл-9,10-фенантр-1,3-оксазол (зонд PH1) - у центрі ліпідного бішару мембран.

Використання набору флуоресцентних зондів з різною локалізацією в ліпідному бішарі мембран для визначення змін фізико-хімічних властивостей мембран тромбоцитів у хворих з судинною патологією головного мозку дозволяє:

- здійснювати моніторинг змін у всіх областях ліпідного бішару мембран;
- точніше встановити локалізацію змін у ліпідному бішарі мембран;
- підвищити достовірність визначення змін в мембранах за рахунок зіставлення даних для зондів із різною локалізацією у ліпідному бішарі мембран;
- дозволяє скоротити час дослідження (час вимірювання кожного із зондів близько 2 хв.) і понизити трудомісткість аналізу за рахунок спрощення процедури підготовки зразка порівняно з існуючими біохімічними методами.

Спосіб здійснюють таким чином.

Кожний із флуоресцентних зондів набору (2-феніл-9,10-фенантр-1,3-оксазол і ряд орто-гідроксипохідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу) додають у кількості 10 мкл до 2 мл суспензії мембран тромбоцитів за наявності судинної патології у вигляді ацетонітрильного розчину з початковою концентрацією  $2 \times 10^{-4}$  М. Кінцева концентрація зонда в суспензії досліджуваних мембран складає  $1 \times 10^{-6}$  М (молярне відношення ліпід/зонд складає 1000:1). Після 60-хвилинної інкубації зразка із зондом вимірюють його спектр флуоресценції, вибираючи довжину хвилі збудження в області 330 нм.

За отриманими спектрами флуоресценції визначають інтенсивності флуоресценції  $F_{\lambda}$  для 2-феніл-9,10-фенантр-1,3-оксазолу та 2-(2'-гідроксифеніл)-5-(4'-диметиламіно-феніл)-1,3,4-оксадіазолу на довжині хвилі  $\lambda$  в діапазоні 375-450 нм, а також значення інтенсивності флуоресценції  $F_B$  та  $F_A$  інших зондів набору, відповідно, на довжинах хвиль А і Б діапазонів, де діапазон А знаходиться в межах 370-425 нм, а діапазон Б - в межах 450-600 нм, обчислюють відношення значень інтенсивності флуоресценції зондів  $F_B/F_A$  і за зміною

інтенсивності флуоресценції  $F_{\lambda}$ , і відношень  $F_B/F_A$  у разі патології у хворого порівняно з аналогічними параметрами, вимірними для даного виду мембран за умов відсутності патологічних змін, роблять висновок про наявність судинної патології, її характер і стадію.

Приклад 1.

Флуоресцентні зонди (2-феніл-9,10-фенантр-1,3-оксазол і ряд орто-гідроксипохідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу) розчиняли в ацетонітрилі до початкової концентрації кожного із зондів  $2 \times 10^{-4}$  М. 10 мкл ацетонітрильного розчину зонда додавали до 2,0 мл суспензії тромбоцитів хворих на церебральний атеросклероз. Флуоресцентні зонди інкубували з тромбоцитами протягом 60 хв. і реєстрували спектри флуоресценції зондів в області 340-600 нм на спектрофлуориметрі Hitachi F4010 (Японія) за ширини щілин монохроматорів збудження і флуоресценції 5 нм і 5 нм, відповідно, та довжини хвилі збудження 330 нм. Після цього з отриманих спектрів флуоресценції знаходили значення інтенсивності флуоресценції зонда D7 на довжині хвилі 435 нм, значення інтенсивності флуоресценції зонда PH1 на довжині хвилі 385 нм і значення інтенсивностей флуоресценції інших зондів (D1, O1O, O6O, PH7) на довжинах хвиль А і Б, які вибирали при 410 і 500 нм відповідно. Для зондів D1, O1O, O6O, PH7 обчислювали відношення інтенсивностей флуоресценції  $F_{500}/F_{410}$ . Аналогічні вимірювання виконували для зразків мембран тромбоцитів у людей без судинної патології, знаходили значення інтенсивності флуоресценції для D7 на 435 нм, значення інтенсивності флуоресценції для PH1 на 385 нм, значення інтенсивностей флуоресценції інших зондів (D1, O1O, O6O, PH7) при 410 і 500 нм й обчислювали відношення інтенсивностей флуоресценції  $F_{500}/F_{410}$ . За різницею відповідних величин інтенсивностей флуоресценції D7, PH1 і відповідних величин відношень  $F_{500}/F_{410}$  зондів D1, O1O, O6O, PH7 для контрольних мембран і для мембран хворих на церебральний атеросклероз оцінювали порушення структури мембран тромбоцитів і локалізацію цих змін у ліпідному бішарі мембран. Отримані результати фіксували в табл. 1 і табл. 2. Обстежено 16 хворих на церебральний атеросклероз: жінок - 9, чоловіків - 7, віком від 60 до 74 років. У хворих спостерігалися стабільно підвищені показники холестеролу (понад 5,2 ммоль/л) і ліпопротеїнів (рівень ЛПНП - понад 4,0 ммоль/л). Як контроль досліджувалися тромбоцити 8 людей (чоловіків - 5, жінок - 3, віком від 18 до 35 років) без судинної патології. Тромбоцити отримували з цитратної плазми (1:9) центрифугуванням при 1000 об/мін протягом 5 хв. з подальшим відмиванням фізіологічним розчином і повторним центрифугуванням за тих самих умов і диспергуванням у 0,15 М фосфатному буфері до кінцевої концентрації суспензії тромбоцитів, що має поглинання при довжині хвилі 405 нм, яке дорівнює 0,24-0,25.



Таблиця 1

Інтенсивності флуоресценції  $F_\lambda$  зондів D7 і PH1, зв'язаних з мембранами тромбоцитів, у хворих з судинною патологією атеросклеротичного генезу і в контрольній групі

Зонд	$\lambda$ , нм	$F_\lambda$ , умовні одиниці	
		контроль	атеросклероз
D7	435	382	647
PH1	385	275	857

Таблиця 2

Відношення  $F_{500}/F_{410}$  зондів D1, O1O, O6O, PH7, зв'язаних з мембранами тромбоцитів, у хворих з судинною патологією атеросклеротичного генезу і в контрольній групі

Зонд	$F_{500}/F_{410}$	
	контроль	атеросклероз
D1	17,7	52,9
O1O	7,8	17,2
O6O	9,1	11,7
PH7	3,2	7,7

Збільшення величин інтенсивностей флуоресценції зондів D7 і PH1 і збільшення величин відношень  $F_{500}/F_{410}$  зондів D1, O1O, O6O, PH7 для мембран тромбоцитів хворих на церебральний атеросклероз порівняно з відповідними параметрами для контрольних мембран свідчить про зменшення протоніоакцепторної здатності і/або полярності мікрооточення зондів в мембранах тромбоцитів хворих на церебральний атеросклероз унаслідок збільшення вмісту в них холестеролу в усіх областях локалізації зондів у ліпідному бішарі мембран.

#### Приклад 2

Флуоресцентні зонди (2-феніл-9,10-фенантр-1,3-оксазол і ряд орто-гідрокси-2,5-діарил-1,3,4-оксазолу [2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу) розчиняли в ацетонітрилі до початкової концентрації кожного із зондів  $2 \times 10^{-4}$  М. 10 мкл ацетонітрильного розчину зонда додавали до 2,0 мл суспензії тромбоцитів хворих на гіпертонічну хворобу, інкубували 60 хв. і реєстрували спектри флуоресценції зондів, як описано в прикладі 1. З отриманих спектрів флуоресценції знаходили значення інтенсивності флуоресценції зонда D7 на довжині хвилі 435 нм, значення інтенсивності флуоресценції зонда PH1 на довжині хвилі 385 нм і значення інтенсивностей флуоресценції інших зондів (D1, O1O, O6O, PH7) на довжинах

хвиль А і Б, які вибирали при 410 і 500 нм відповідно. Для зондів D1, O1O, O6O, PH7 обчислювали відношення інтенсивностей флуоресценції  $F_{500}/F_{410}$ . Аналогічні вимірювання виконували для зразків мембран тромбоцитів у людей без судинної патології, знаходили значення інтенсивності флуоресценції для D7 на 435 нм, значення інтенсивності флуоресценції для PH1 на 385 нм, для інших зондів (D1, O1O, O6O, PH7) обчислювали відношення інтенсивностей флуоресценції  $F_{500}/F_{410}$ . За різницею відповідних величин інтенсивностей флуоресценції D7, PH1 і відповідних величин відношень  $F_{500}/F_{410}$  зондів D1, O1O, O6O, PH7 для контрольних мембран і для мембран хворих на гіпертонічну хворобу оцінювали порушення структури мембран тромбоцитів і локалізацію цих змін у ліпідному бішарі мембран. Отримані результати фіксували в табл. 3 і табл. 4. Обстежено 14 хворих на гіпертонічну хворобу II стадії: жінок - 9, чоловіків - 5, віком від 60 до 74 років, цифри артеріального тиску складали від 165/95 мм.рт.ст. до 200/110 мм.рт.ст. в період кризових станів. Як контроль досліджувалися тромбоцити 8 людей (чоловіків - 5, жінок - 3, віком від 18 до 35 років) без судинної патології. Зразки тромбоцитів готували до вимірювань, як описано в прикладі 1.

Таблиця 3

Інтенсивності флуоресценції  $F_\lambda$  зондів D7 і PH1, зв'язаних з мембранами тромбоцитів, у хворих з судинною патологією гіпертонічного генезу і в контрольній групі

Зонд	$F_\lambda$ , нм	$F_\lambda$ , умовні одиниці	
		контроль	гіпертонія
D7	435	382	84
PH1	385	275	120



Таблиця 4

Відношення F500/F410 зондів D1, O1O, O6O, PH7, зв'язаних з мембранами тромбоцитів, у хворих з судинною патологією гіпертонічного генезу і в контрольній групі

Зонд	F <sub>500</sub> /F <sub>410</sub>	
	контроль	гіпертонія
D1	17,7	50,8
O1O	7,8	15,1
O6O	9,1	6,3
PH7	3,2	2,4

Зменшення величин інтенсивностей флуоресценції зондів D7 і PH1 і зменшення величин відношень F<sub>500</sub>/F<sub>410</sub> зондів O6O, PH7 для мембран тромбоцитів хворих на гіпертонічну хворобу в порівнянні з відповідними параметрами для контрольних мембран свідчить про збільшення протонізаційної здатності і полярності оточення молекул зондів у мембранах тромбоцитів хворих на гіпертонічну хворобу в результаті змін у зовнішніх шарах мембран (в області гліцеринових залишків фосфоліпідів), які призводять до збільшення їх полярності (наприклад, унаслідок збільшення гідратації), що створює перешкоди для проникнення зондів усередину мембран. Збільшення величин відношень F<sub>500</sub>/F<sub>410</sub>, що спостерігається для зондів D1, O1O, було віднесено до можливого накопичення холестеролу в області гліцеринових залишків фосфоліпідів і в області карбонільних груп жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів.

Як випливає з прикладів, запропонований набір зондів є чутливим до змін фізико-хімічних властивостей мембран тромбоцитів, викликаних цереброваскулярними порушеннями гіпертонічного і атеросклеротичного генезу.

Джерела інформації:

1. Ильинский Б.В. Профилактика, ранняя диагностика и лечение атеросклероза. - М.: Медицина, 1977. - 166 с.

2. Replacement of renal function by dialysis. - 5<sup>th</sup> Ed. - Edited by Walter H. Horl, Kluwer Academic Publishers. - 2004-1606 P.

3. Реминяк И.В., Бойко Т.П. Изменение липидного состава мембран тромбоцитов у больных с сосудистой патологией гипертонического и атеросклеротического генеза // Український вісник психоневрологів - 1999. - Т. 7, вип. 4 (22). - с. 14-16.

4. Vercaemst R., Union A., Rosseneu M. Biomedical Sciences and Applications. Separation and quantitation of free cholesterol and cholesteryl esters in a macrophage cell line by high-performance liquid chromatography // J Chromatography B: - 1989. - Vol. 494. - P. 43-52.

5. Bartlett G.R. Phosphorus Assay in Column Chromatography // J Biol Chem.-1959. - Vol. 234. - P. 466-469.

6. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) // Под ред.

М.И.Прохоровой. - Л. - Изд-во ЛГУ.-1982. - С. 54-80.

7. Бышевский А.Ш., Галян С.Л., Полякова В.А. К механизму связи перекисного окисления липидов и гемостаза // Научный вестник ТГМА. - 1999. - 1. с. 10-14.

8. Бышевский А.Ш., Галян С.Л., Дементьева И.А. Тромбоциты (состав, функции биомедицинское значение). - Тюмень, 1996. - 144 с.

9. Стальная И.Д., Горишвили Т.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. - М: Медицина - 1977. - с. 66-68.

10. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных кислот // Современные методы в биохимии - М: Медицина - 1977. - с. 63-64.

11. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. - 1959. - Vol. 37. - P. 911-912.

12. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. - М.: Наука, 1980. - 320 с.

13. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. - М.: Наука, 1989. - 263 с.

14. Дорошенко А.О., Посохов Е.А., Шершуков В.М., Митина В.Г., Пономарев О.А. Реакция внутримолекулярного переноса протона в возбужденном состоянии в ряду орто-гидроксипроизводных 2,5-диарилпиксозола // Химия высоких энергий. - 1997. - Т.31, № 6. - с. 395-402.

15. Doroshenko A.O., Posokhov E.A., Verezubova A.A., Ptyagina L.M., Skripkina V.T., Shershukov V.M. Radiationless deactivation of the excited phototautomer form and molecular structure of ESIP-Compounds // Photochemical and Photobiological Sciences. - 2002. - Vol. 1. - P. 92-99.

16. Посохов Е.А., Бойко Т.П., Абманова Н.А., Бойко Т.П., Дорошенко А.О. Орто-гидроксипроизводные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для медико-биологических исследований // Вестник Харьковского университета. Химия. - 2001. - Вып. 7 (30), № 532. - с. 192-194.



