

**ОЦЕНКА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ
ФИБРОБЛАСТОВ ДЕРМЫ ЧЕЛОВЕКА В СВОБОДНОМ СОСТОЯНИИ
И В СОСТАВЕ БИОМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЗОНДОВОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ**

А. В. Бутенко*, С. В. Пинчук, И. Д. Волотовский

УДК 535.37

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларусь, Минск, Беларусь;
e-mail: annabutenka@tut.by*

(Поступила 9 марта 2023)

Исследованы ключевые биофизические характеристики фибробластов кожи человека в свободном состоянии и в составе биомедицинского клеточного продукта (клетки с носителем — гелем “Коллост”) с использованием проточной цитометрии и флуоресцентных зондов. Получены данные о сохранении интактного состояния фибробластов в комплексе с носителем, а именно содержания в цитоплазме клеток ионизированного кальция, активных форм кислорода и уровня микровязкости липидного бислоя клеточных мембран. Показано, что гель “Коллост” не индуцирует окислительный стресс в фибробластах, мембранные клетки не повреждаются и не увеличивается содержание в цитоплазме фибробластов ионов кальция, микровязкость липидного бислоя мембран не изменяется, что имеет важное значение для использования носителя геля “Коллост” для формирования биомедицинского клеточного продукта и его последующего использования в клеточной терапии.

Ключевые слова: фибробласти кожи человека, биомедицинский клеточный продукт, гель “Коллост”, проточная цитометрия, микровязкость липидного бислоя мембран, активные формы кислорода, внутриклеточный ионизированный кальций.

The key biophysical characteristics of human skin fibroblasts in a free state and as a part of a biomedical cell product (cells with a carrier “Collost” gel) were studied using flow cytometry and fluorescent probes. Data were obtained on the preservation of the intact state of fibroblasts in combination with the carrier, namely, the content of ionized calcium, reactive oxygen species in the cytoplasm of cells and the level of microviscosity of the lipid bilayer of cell membranes. It is shown that the “Collost” gel does not induce oxidative stress in fibroblasts, cell membranes are not damaged and there is no increase in the content of calcium ions in the cytoplasm of fibroblasts, the microviscosity of the lipid bilayer of membranes does not change, which is important for the use of the “Collost” gel carrier for the formation of a biomedical cell product and its subsequent use in cell therapy.

Keywords: human skin fibroblasts, biomedical cell product, “Collost” gel, flow cytometry, microviscosity of the lipid bilayer of membranes, reactive oxygen species, intracellular ionized calcium.

Введение. В последние годы бурно развивается клеточная и тканевая инженерия, направленные на восстановление утраченных функций органов и тканей организма. Проблема лечения ожогов в комбустиологии чрезвычайно актуальна. Обычно ожоговые пациенты получают общее и местное лечение, включающее в себя повязки с различными препаратами. Пристальное внимание комбустиологов привлекают методы лечения ожогов с использованием клеточных технологий.

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ASSESSMENT OF THE HUMAN SKIN FIBROBLASTS
IN A FREE STATE AND AS PART OF A BIOMEDICAL CELL PRODUCT USING PROBE
FLUORESCENCE**

A. V. Butenko*, S. V. Pinchuk, I. D. Volotovski (*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; e-mail: annabutenka@tut.by*)

После нанесения на рану клетки должны находиться в оптимальном структурно-функциональном состоянии, сохраняя жизнеспособность и биологическую активность. Раневые покрытия и носители должны быть морфологически сходными с поврежденными тканями организма, стабильными во времени, биосовместимыми при условии биодеградации носителя, способными поддерживать баланс, который обеспечивает жизнеспособность, пролиферацию и адгезию клеток, сохраняет функциональные специфические свойства клеток. Вышеперечисленным критериям удовлетворяет коллаген как носитель для биомедицинского клеточного продукта (БМКП).

Наиболее активно для восстановления повреждений кожного покрова человека используют коллагеновый гель с фибробластами [1]. Коллаген I типа самый распространенный фибрillлярный белок внеклеточного матрикса, основной компонент соединительной ткани. Благодаря превосходной биосовместимости коллаген является одним из наиболее известных белков [2]. Его высокая пластичность, оптимальная механическая прочность и способность поглощать жидкости делает его идеальным биополимером-носителем. Коллаген также является одним из наиболее известных белков, который обнаружен во внеклеточном матриксе и экспрессируется во всех тканях организма человека, таких как сухожилия, связки, кости, дерма, дентин и кровеносные сосуды и др. [3—5].

В Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларусь совместно с Белорусской медицинской академией последипломного образования разработан БМКП на основе фибробластов и кератиноцитов человека. БМКП представляет собой иммобилизованные кератиноциты и фибробlastы дермы человека в соотношении 1:4 в 1 %-ном коллагеновом "Коллост-геле", который наносится послойно на раневое покрытие из хитозана [6]. Гель "Коллост" (ООО "Биофармхолдинг", Россия) — 7 или 15 %-ный стерильный биопластический коллагеновый продукт нового поколения, получаемый из кожи телят, содержит коллаген I типа, который по биохимическому составу и структуре близок к человеческому коллагену с полностью сохраненной нативной структурой. Гель "Коллост" широко используется в медицине для заполнения дефектов кожи, костей, раневых поверхностей и др. Исследования по использованию геля "Коллост" направлены на изучение его токсичности, совместимости, иммуногенности, эффективности заживления раневого дефекта [7, 8].

Цель настоящей работы — изучение биофизического состояния фибробластов кожи человека в смеси с гелем "Коллост" в составе БМКП. Оценивалось влияние коллагенового носителя на содержание внутриклеточного ионизированного кальция, активных форм кислорода (АФК) и микровязкость липидного бислоя клеточных мембран с использованием спектральных подходов — проточной цитометрии и флуоресцентных зондов.

Эксперимент. *Приготовление культуры фибробластов.* Культуру фибробластов кожи человека готовили по разработанной нами методике [9]. Кожный лоскут помещали в 0.2 %-ный раствор диспазы и инкубировали при +37 °C в течение 12 ч, затем пинцетом удаляли эпидермис, дерму измельчали и помещали экспланты в стерильную стеклянную чашку Петри. В чашку добавляли ростовую среду, состоящую из DMEM (Lonza, Канада), 20 mM аскорбиновой кислоты (Sigma, США), антибиотика-антимикотика (StemCellTechnologies, Канада), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Lonza, Бельгия). Клетки культивировали при +37 °C в атмосфере, содержащей 5 % CO₂, в течение 14—20 дней до образования вокруг экспланта монослоя фибробластов. Для перевода клеток в суспензию монослой обрабатывали 0.25 %-ным раствором трипсина в 0.02 %-ном растворе ЭДТА. Оценку жизнеспособности фибробластов проводили по их способности накапливать краситель трипановый синий. В живые клетки краситель не проникает.

Фибробlastы 3-5 пассажа, переведенные в суспензию в фосфатном буфере, смешивали с гелем "Коллост" (конечная концентрация 1 %) [6], инкубировали в течение 30 и 60 мин при 37 °C. Далее клетки отмывали от геля в фосфатном буфере и с использованием флуоресцентных зондов определяли в них содержание внутриклеточного ионизированного кальция, АФК и микровязкость липидного бислоя мембран.

Содержание внутриклеточного ионизированного кальция в цитоплазме клеток определяли методом проточной цитометрии с использованием Ca²⁺-чувствительного флуоресцентного зонда Fluo-3-AM [10, 11]. Молекулы зонда проникают в клетки, где подвергаются гидролизу клеточными эстеразами с образованием полярного и непроницаемого для плазматической мембраны Fluo-3. При связывании Fluo-3 с Ca²⁺ значительно увеличивается квантовый выход флуоресценции зонда [12], что позволяет использовать его в качестве флуоресцентного зонда.

Для нагрузки флуоресцентным зондом клетки ($2 \cdot 10^5$ кл.) инкубировали в течение 15 мин при +37 °C в 0.2 мл фосфатного буфера, pH 7.1 в присутствии 2 мкМ Fluo-3-AM (краситель растворя-

ли в ДМСО в концентрации 0.5 мМ). Далее клетки отмывали от несвязавшегося зонда и переводили в среду α-MEM без сыворотки.

Интенсивность флуоресценции Fluo-3 в клетках измеряли на проточном цитометре FACSCanto II (Beckton Dickinson, США) при возбуждении излучением аргонового лазера (488 нм) и регистрации в канале FITC (530/30 нм). Перед измерением на проточном цитофлуориметре в суспензию клеток добавляли пропидиум йодид (5 мкг/мл) для выявления популяции клеток в состоянии некроза. Данная популяция характеризуется интенсивной флуоресценцией клеток в канале PerCP-Cy5 проточного цитометра. Интенсивность флуоресценции определяли как среднее значение этого показателя не менее чем в 10000 клетках.

Концентрация свободных ионов кальция в цитоплазме клеток рассчитана по формуле

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d(F - F_{\min})/(F_{\max} - F),$$

где F — интенсивность флуоресценции Fluo-3 в интактных клетках; F_{\max} — интенсивность флуоресценции Fluo-3 в клетках в условиях насыщения ионами кальция; F_{\min} — интенсивность флуоресценции Fluo-3 в клетках в отсутствие ионов кальция; K_d — константа диссоциации Fluo-3 и Ca^{2+} . Значения F , F_{\max} и F_{\min} определяли на основании измерений (рис. 1) и рассчитывали по формулам: $F = F_2 - F_1$, $F_{\max} = F_3 - F_1$, $F_{\min} = (F_3 - F_1)/40$, где F_1 — интенсивность флуоресценции клеток в отсутствие зонда, F_2 — интенсивность флуоресценции клеток, нагруженных Fluo-3, F_3 — интенсивность флуоресценции нагруженных Fluo-3 клеток в присутствии 5 мкМ ионофора A-23187. Константу диссоциации принимали равной 390 нМ при 20 °C [13, 14].

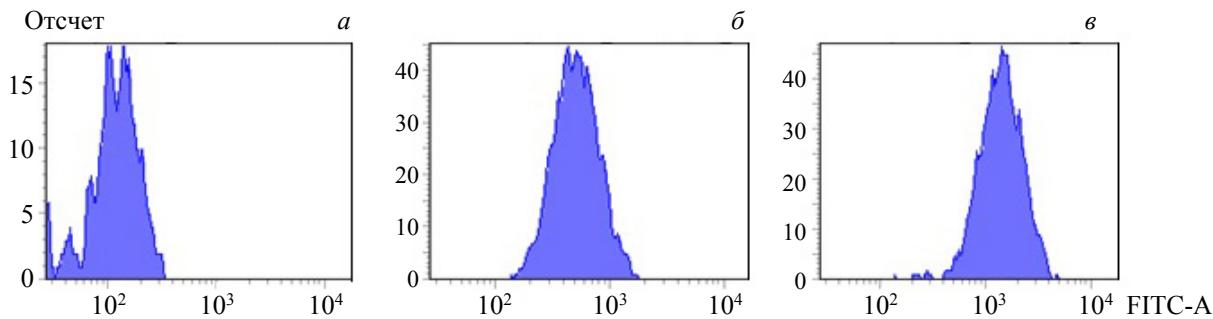


Рис. 1. Цитометрические данные, отражающие содержание внутриклеточного ионизированного кальция в дермальных фибробластах после их инкубации в “Коллост”-геле:
 a — клетки в среде MEM, β — клетки+Fluo-3-AM, γ — Fluo-3-AM+ионофор A-23187

Вязкость липидного бислоя клеточных мембран оценивали по степени поляризации флуоресцентного зонда 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена (ДФГТ). Для этого в суспензию клеток ($2 \cdot 10^5$ — $3 \cdot 10^5$ кл/мл) в фосфатный буфер добавляли 1 мкМ ДФГТ и инкубировали в темноте в течение 60 мин при +37 °C. Флуоресценцию ДФГТ регистрировали при 430 нм ($\lambda_{\text{возб}} = 362$ нм) на спектрофлуориметре Solar CM2203 (Беларусь).

Степень поляризации флуоресценции рассчитывали по формуле:

$$P_{\text{ДФГТ}} = (I_{\parallel} - GI_{\perp})/(I_{\parallel} + GI_{\perp}),$$

где I_{\parallel} и I_{\perp} — интенсивность флуоресценции ДФГТ, когда поляризатор на возбуждение ориентирован параллельно и перпендикулярно поляризатору на регистрацию; G — фактор, отражающий различную чувствительность прибора для вертикально и горизонтально поляризованного света [15].

Содержание АФК оценивали с использованием зонда CM-H2DCF-DA. Клетки в фосфатном буфере инкубировали с зондом (3 мкМ) в течение 30 мин в темноте при +37 °C. За это время молекула CM-H2DCFDA гидролизовалась внутриклеточными эстеразами до не проникающего через плазматическую мембрану полярного соединения CM-H2DCF, которое при окислении АФК до DCF приобретает способность к флуоресценции. Далее клетки отмывали в фосфатном буфере от несвязавшегося зонда и регистрировали их флуоресценцию в канале FITC проточного цитометра. Для исключения популяции некротических клеток использовали пропидиум йодид. Для моделирования окислительного стресса в суспензию клеток добавляли 100 мкМ перекиси водорода, инкубировали клетки в темноте и измеряли на проточном цитометре через 15 и 30 мин.

Результаты и их обсуждение. Как известно, коллаген обладает гемостатической, адсорбционной активностью, может использоваться провизорным матриксом, облегчающим миграцию клеток при регенерации тканей. Он контролирует уровень биохимических и клеточных процессов во время заживления ран, стимулируя в целом репарационные процессы. Медицинское изделие гель “Коллост” (ООО “Биофармхолдинг”, Россия) получают из децюлляризованной дермы крупного рогатого скота путем многостадийной щелочной очистки. Выпускают гель в виде 7 и 15 %-ного раствора в растворе глюкозы [15].

Выступая в роли внеклеточного матрикса, “Коллост” обеспечивает направленное движение эпителиальных клеток и фибробластов, их оптимальную миграцию и ориентацию, необходимую для формирования новой ткани; фибробласти, кровеносные и лимфатические сосуды, нервные волокна из окружающей здоровой ткани, внедряясь в коллагеновую матрицу, распространяются строго по ней, в результате биопластический материал, постепенно рассасываясь в процессе заживления, формирует новый аутодермальный слой, исключая беспорядочный рост грануляционной ткани, что препятствует возникновению рубцов [8, 16].

В клетке одним из наиболее важных вторичных мессенджеров являются ионы кальция. Наибольшей аффинностью к ДНК обладают ионы кальция, которые стабилизируют изолированные митотические хромосомы. Хелатирование кальция может приводить к нарушению митоза, блокируя сепарацию сестринских хроматид, а увеличение их содержания стимулирует запуск клеточного цикла (при оплодотворении). Также велика роль ионов кальция при переходе клетки из метафазы в анафазу. Изменение их внутриклеточной концентрации играет ключевую роль в запуске и регуляции общих и специализированных клеточных функций. В покое концентрация свободного Ca^{2+} в цитоплазме $\sim 10^{-7}$ М. Множество внутриклеточных процессов от митоза до апоптоза регулируется кальцием.

Концентрация внутриклеточного кальция (рис. 2) в контроле составила 145 ± 4 нМ, после инкубации 30 мин в геле “Коллост” 144 ± 3 нМ. Содержание кальция после 60 мин инкубации составило 140 ± 5 нМ (рис. 2), что согласуется с литературными данными. Полученные результаты показывают, что мембранны клеток в коллагеновом геле не повреждаются и находятся в оптимальном структурно-функциональном состоянии.

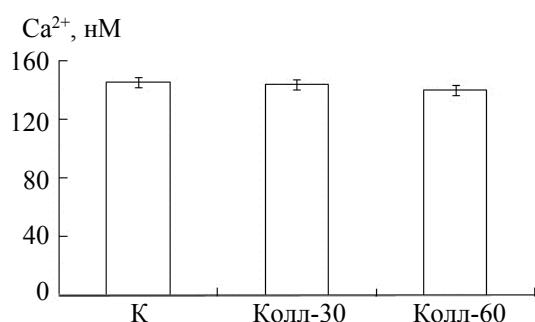


Рис. 2. Содержание внутриклеточного ионизированного кальция в дермальных фибробластах человека после инкубации в “Коллост”-геле: К — контроль, Колл-30 — инкубация в “Коллост”-геле 30 мин, Колл-60 — инкубация в “Коллост”-геле 60 мин

Известно, что для нормального функционирования клетки необходим определенный уровень микровязкости липидного бислоя мембран. Микровязкость липидного бислоя плазматической мембраны клеток оценивали с использованием флуоресцентных зондов по степени поляризации ДФГТ. ДФГТ практически не флуоресцирует в воде, но проявляет сильную флуоресценцию, будучи встроенным в липидную мембрану, легко встраивается в липидный бислой и по поведению не отличается от липида [15]. На рис. 3 представлены степени поляризации (P) флуоресценции ДФГТ при различных температурах в дермальных фибробластах человека. Как видно, в клетках $P = 0.222 \pm 0.018$ при температуре $+37^\circ\text{C}$, что близко к степени поляризации флуоресценции данного зонда в мембранах лимфоцитов человека [15].

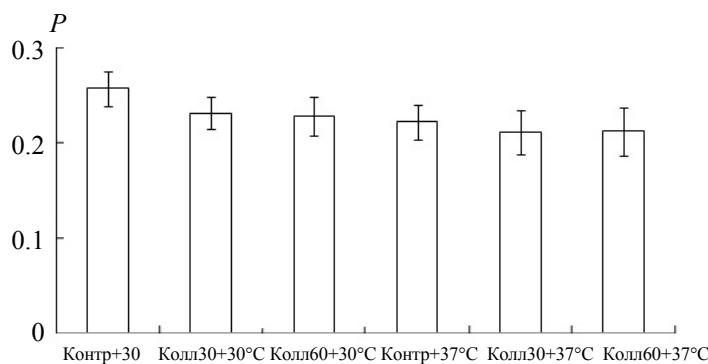


Рис. 3. Влияние температуры на степень поляризации (P) флуоресценции ДФГТ в дермальных фибробластах человека: Контр+30 °C — контроль, Колл30+30 °C — инкубация в “Коллост”-геле 30 мин, Колл60+30 °C — инкубация в “Коллост”-геле 60 мин, Контр+37 °C — контроль при +37 °C, Колл30+37 °C — инкубация в “Коллост”-геле 30 мин при +37 °C, Колл60+37 °C — инкубация в “Коллост”-геле 60 мин при +37 °C

При снижении температуры среды до +30 °C, которое сопровождается увеличением микровязкости липидного бислоя, степень поляризации флуоресценции ДФГТ увеличивается до 0.257 ± 0.018 . После инкубации клеток в течение 30 мин в “Коллост”-геле при +37 °C $P = 0.211 \pm 0.023$, при +30 °C $P = 0.231 \pm 0.017$ ($p < 0.05$). После инкубации клеток в течение 60 мин в геле “Коллост” при температуре +37 °C $P = 0.212 \pm 0.025$, при +30 °C $P = 0.228 \pm 0.002$. Увеличение микровязкости мембран происходит в результате структурных и функциональных изменений клеток. Согласно полученным данным, вязкость липидного бислоя мембран фибробластов достоверно не изменяется после взаимодействия клеток с гелем “Коллост”.

Важнейшей особенностью функционирования животных клеток является участие АФК в большинстве или во всех регуляторных и обменных процессах. В частности, АФК способны влиять на синтез низкомолекулярных антиоксидантов и ферментов антирадикальной защиты [17—19], регулировать пролиферативную активность различных типов клеток [20, 21].

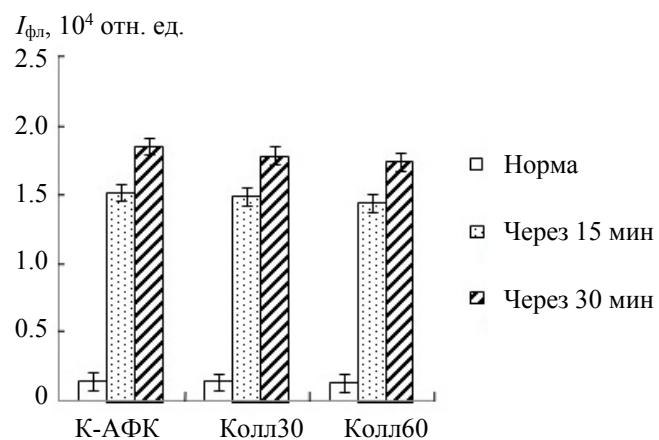


Рис. 4. Содержание АФК в дермальных фибробластах человека при моделировании окислительного стресса перекисью водорода до и после инкубации в “Коллост”-геле в течение 30 и 60 мин: К-АФК — контроль, Колл30 — инкубация 30 мин, Колл60 — инкубация 60 мин

В контроле (К-АФК) содержание АФК составило 1457 отн. ед. После 30 мин инкубации в геле “Коллост” (Колл30) 1396 отн. ед., через 60 мин (Колл60) 1335 отн. ед. После добавления 100 мкМ перекиси водорода для моделирования окислительного стресса через 15 мин инкубации показатели в контроле составили 15164 отн. ед., в пробе Колл30 14905 отн. ед., Колл60 14376 отн. ед. Спустя 30 мин после добавления перекиси водорода уровень АФК в контроле составил 18518 отн. ед., Колл30 17806 отн. ед., Колл60 17386 отн. ед.

В норме АФК образуется в клетках в количествах, необходимых для реализации их регуляторной функции. Поддержание содержания АФК на необходимом физиологическом уровне, локализация и ограничение зоны их действия в клетках являются ключевыми условиями полноценного функционирования клеток. Важность этого обусловлена также тем, что АФК способны индуцировать свободно-радикальные окислительные процессы в основных клеточных компонентах (перекисное окисление липидов, окисление аминокислотных остатков в белках), что может приводить к снижению функциональной активности, изменению структурно-функциональных характеристик и даже гибели клеток [22]. Образование АФК в клетках может происходить в процессе переноса электронов в митохондриальной дыхательной цепи, в реакциях микросомального окисления при обезвреживании продуктов метаболизма и чужеродных веществ с участием цитохрома Р-450, в реакциях самопроизвольного (неферментативного) окисления веществ, в присутствии ионов металлов с переменной валентностью и др. [23, 24]. Полученные данные свидетельствуют о том, что гель “Коллост” не только не индуцирует окислительный стресс в клетках, наоборот, они становятся более устойчивыми к стрессу.

Заключение. Показано, что гель “Коллост” не индуцирует окислительный стресс в фибробластах, мембранные клеток не повреждаются и не увеличивается содержание внутриклеточного ионизированного кальция, не изменяется микровязкость мембран и активных форм кислорода. Гель “Коллост”, являющийся в нашем случае биодеградируемой матрицей, не влияет на структурно-функциональное состояние фибробластов. Изложенный подход представляется важным для подбора клеток и матрицы при создании биокомпозита — биомедицинского клеточного продукта, который находит все большее применение в клеточной терапии заболеваний человека.

- [1] S. Ahn, H. Yoon, G. Kim, Y. Kim, S. Lee, W. Chun. *Tissue Eng. C, Methods*, **16**, N 5 (2010) 813—820, <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0511>
- [2] A. Rahamanian-Schwarz, M. Held, T. Knoeller, S. Stachon, T. Schmidt, H. E. Schaller, L. Just. *J. Biomed. Mater. Res.*, **102** (2014) 1173—1179, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34793>
- [3] K. Gelse, E. Pöschl, T. Aigner. *Adv. Drug Del. Rev.*, **55** (2003) 1531—1546, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>
- [4] J. Glowacki, S. Mizuno. *Biopolym. Orig. Res. Biomol.* (**2008**) 338—344, <https://doi.org/10.1002/bip.20871>
- [5] L. Cen, W. Liu, L. Cui, W. Zhang, Y. Cao. *Pediatr. Res.*, **63** (2008) 492—496, <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31816c5bc3>
- [6] А. Ч. Часноть, И. Б. Васильевич, З. Б. Квачева, А. В. Бутенко, К. А. Матиевский, В. М. Басалай, Т. Э. Владимирская, В. Н. Подгайский, И. Д. Волотовский. *Мед. журн.*, **3** (2022) 24—29 [A. Ch. Chasnoit, I. B. Vasilevich, Z. B. Kvacheva, A. V. Butenka, K. A. Matievsky, V. M. Basalai, T. E. Vladimirskaia, V. N. Podgaisky, I. D. Volotovsky. *J. Medicine*, **3** (2022) 24—29], <https://doi.org/10.51922/1818-426X.2022.3.24>
- [7] E. Okazaki, L. Chikahisa, K. Kanemarul, Y. Oyama. *Jpn. J. Pharmacol.*, **71** (1996) 273—280, <https://doi.org/10.1254/jjp.71.273>
- [8] C. Cerella, C. Mearelli, S. Coppola, M. D'Alessio, M. De Nicola, M. Diederich, L. Ghibelli. *Apoptosis*, **12** (2007) 2207—2219, <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0134-0>
- [9] З. Б. Квачева, А. В. Бутенко, И. Б. Васильевич, И. Д. Волотовский. Способ получения фибробластов кожи человека для трансплантации в условиях культуры, патент РБ № 18841 (2015)
- [10] A. Minta, J. P. Y. Kao, R. Y. J. Tsien. *Biol. Chem.*, **264** (1989) 8171—8178
- [11] J. P. Y. Kao, A. T. Harootunian, R. Y. Tsien. *J. Biol. Chem.*, **264** (1989) 8179—8184
- [12] O. Thastrup, P. J. Cullen, B. K. Drobak, M. R. Hanley, A. P. Dawson. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87** (1990) 2466—2470

- [13] Н. В. Калмыкова, А. А. Андреев-Андиевский, И. А. Демьяненко, В. И. Манских, Е. А. Лагерева, А. С. Попова, Ю. С. Хац, А. П. Суслов. Биомедицина, 4 (2017) 85—96 [N. V. Kalmykova, A. A. Andreev-Andrievsky, I. A. Demyanenko, V. I. Manskikh, E. A. Lagereva, A. S. Popova, Yu. S. Hats, A. P. Suslov. Biomedicine, 4 (2017) 85—96]
- [14] М. М. Карасев, М. А. Редина, О. В. Белоусова. Фармация и фармакология, 5, № 12 (2015) 12—17 [M. M. Karasev, M. A. Redina, O. V. Belousova. Pharmacy and Pharmacology, 5, N 12 (2015) 12—17], [https://doi.org/10.19163/2307-9266-2015-3-5\(12\)-12-17](https://doi.org/10.19163/2307-9266-2015-3-5(12)-12-17)
- [15] Л. И. Будкевич, В. И. Ковальчук, А. В. Глуткин, М. А. Бразоль, Г. В. Мирзоян, А. А. Гнипов, П. В. Салистый, Ю. В. Чекишев, А. А. Шмырин, Р. Б. Габитов. Рос. Вестн. детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии, 8, № 3 (2018) 34—44 [L. I. Budkevich, V. I. Kovalchuk, A. V. Glutkin, M. A. Brazol, G. V. Mirzoyan, A. A. Gnipov, P. V. Salisty, Yu. V. Chekishev, A. A. Shmyrin, R. B. Gabitov. Russ. Bull. Pediatric Surgery, Anesthesiology and Resuscitation, 8, N 3 (2018) 34—44], <https://doi.org/10.30946/2219-4061-2018-8-3-34-44>
- [16] Г. В. Луценко, М. В. Гречихина, Л. Г. Дьячкова, Н. И. Луцан. Цитология, 49 (2007) 284—291 [G. V. Lutsenko, M. V. Grechikhina, L. G. Dyachkova, N. I. Lutsan. Cytology, 49 (2007) 284—291]
- [17] Р. Г. Winyard, С. Џ. Moody, С. Jacob. Trends Biochem. Sci., 30 (2005) 453—461, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.06.001>
- [18] S. Sharma, O. Dewald, J. Adroque, R. L. Salazar. Free Rad. Biol. Med., 40 (2006) 2223—2231, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.02.019>
- [19] K. Luczak, A. Balcerzyk, M. Soszynski, G. Bartosz. Cell Biol. Int., 28 (2004) 483—486, <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.03.004>
- [20] Т. А. Кулагова, Г. Н. Семенкова, З. Б. Квачева, С. Н. Черенкевич. Цитология, 48 (2006) 900—905 [T. A. Kulagova, G. N. Semenkova, Z. B. Kvacheva, S. N. Cherenkevich. Cytology, 48 (2006) 900—905]
- [21] T. P. A. Devasagayam, J. C. Tilak, T. K. Boloor. J. A. P. I., 52 (2004) 794—804
- [22] В. А. Костюк, А. И. Потапович. Биорадикалы и биоантисиданты, Минск, БГУ (2004) [V. A. Kostyuk, A. I. Potapovich. Bioradicals and Bioantioxidants, Minsk, BSU (2004)]
- [23] Е. А. Черницкий, А. В. Воробей. Успехи соврем. биологии, 101 (1986) 100—114 [E. A. Chernitsky, A. V. Vorobei. Modern Success. Biol., 101 (1986) 100—114]
- [24] П. В. Мокрушников. Тр. Новосибирского гос. архитектурно-строительного ун-та (Сибстрин), 21, № 1 (2018) 17—29 [P. V. Mokrushnikov. Proc. Novosibirsk State University of Architecture and Civil Engineering (Sibstrin), 21, N 1 (2018) 17—29]