

АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ 8-ОКСО-2'-ДЕЗОКСИГУАНОЗИНА В ДНК КЛЕТОК МОЗГА КРЫС ПРИ ИЗУЧЕНИИ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ КОРТЕКСИНА

*Д.С. Есипов, доцент, О.В. Есипова, доцент, *Т.В. Зиневич, старший научный сотрудник, Т.А. Горбачева, магистр, Т.С. Невредимова, аспирант, *А.Л. Крушинский, старший научный сотрудник, *В.С. Кузенков, инженер, **В.П. Реутов, ведущий научный сотрудник

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

* Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

** Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

e-mail: esipov@mail.bio.msu.ru

В работе изучено влияние защитного действия препарата кортексин на мозг крыс линии Крушинского-Молодкиной в условиях экспериментального геморрагического инсульта, вызванного акустическим стрессом. Показано значительное уменьшение отношения 8-оксо-2'-дезоксигуанозина к 2'-дезоксигуанозину в ДНК клеток мозга крыс при применении кортексина.

The protective effect of cortexin was investigated with the use of acoustic stress hemorrhagic stroke model. A significant decrease of 8-oxo-2'-deoxyguanosine to 2'-deoxyguanosine ratio in the DNA molecule was shown using brain slices of cortexin treated Krushinsky-Molodkina rats.

Ключевые слова: кортексин, 8-оксо-2'-дезоксигуанозин, окислительный стресс, обращенно-фазовая ВЭЖХ, амперометрическая детекция, инсульт, акустический стресс.

Key words: cortexin, 8-oxo-2'-deoxyguanosine, oxidative stress, reverse phase HPLC, amperometric detection, hemorrhagic stroke, acoustic stress.

Введение

Актуальность исследования проблемы нарушений мозгового кровообращения обусловлена тем, что церебральный инсульт является одной из лидирующих причин инвалидизации населения [1–3], а когнитивные расстройства, связанные с нарушением мозгового кровообращения, являются наиболее распространенной формой нервно-психических нарушений в пожилом возрасте [4]. Во второй половине XX в. исследователи при создании новых лекарственных препаратов для лечения нарушений мозгового кровообращения все чаще стали обращаться к использованию внутренних регуляторов организма человека. Именно к таким регуляторам относятся пептиды [5]. В медицинской практике в настоящее время широко используются три препарата – церебролизин («Ebewe Pharma», Австрия), актовегин («Nicomed», Австрия) и кортексин («Герофарм», Россия) [6]. Церебролизин является популярным нейропротектором с более чем полувековой историей применения [7]. В его состав входят различные свободные аминокислоты и низкомолекулярные пептиды – всего около 2000 видов молекул. Пептиды в церебролизине составляют 15% от всего объема препарата. В состав второго пептидного препарата актовегина – безбелкового диализата крови телят – входят различные олигопептиды, аминокислоты и олигосахариды [6–8]. Актовегин обладает способностью усиливать потребление кислорода и глюкозы тканями мозга и улучшает энергетический обмен. Третий пептидный препарат – кортексин –

используется в клинической практике менее 10 лет. В его состав входит комплекс сбалансированных пептидов, аминокислот, витаминов и микроэлементов [2]. Состав пептидов кортексина обеспечивает оптимальное для нейронов соотношение этих веществ. Этот препарат легко преодолевает гематоэнцефалический барьер и нормализует медиаторный обмен мозга при лечении заболеваний нервной системы различной этиологии: геморрагических и ишемических инсультах, травме головного мозга, инфекционных и дегенеративных заболеваниях. Пептиды в кортексине составляют 46% от всего объема препарата, что в 3 раза выше по сравнению с церебролизинем [2]. В связи с этим кортексин в настоящее время многими исследователями рассматривается как один из перспективных нейротрофических факторов.

Целью нашей работы было изучение защитного действия пептидного препарата кортексин на модели экспериментального геморрагического инсульта у крыс линии Крушинского-Молодкиной, вызванного акустическим стрессом, путем определения отношения [8-оксоdG]/[dG] в ДНК клеток мозга крыс.

Результаты и их обсуждение

Генетическая линия крыс Крушинского-Молодкиной (К-М), созданная на основе многолетней селекции животных Л.В. Крушинским, Л.Н. Молодкиной и Д.А. Флессом, а также разработанные аудиогенные модели геморрагического инсульта, судорожного припадка и сердечно-сосудистых нарушений, являются удобными объектами для исследований различных факто-

ров, препятствующих или способствующих развитию стрессорных нарушений [1, 2]. Эксперименты, проведенные на крысах этой линии, показали, что в результате длительного применения прерывистых звуковых раздражителей (аудиогенная модель) возникает резкое возбуждение мозга, которое сопровождается двигательными и вегетативными нарушениями, острыми нарушениями кровообращения и гибелью части животных от кровоизлияний в мозг [1, 9, 10].

В поведенческих исследованиях установлено [9], что кортексин уменьшает вероятность развития двигательных нарушений, вызванных геморрагическим инсультом. Несмотря на то, что контрольные животные и животные, получавшие пептид кортексин, достоверно не различались по частоте нарушений движений после акустического стресса, тем не менее, была отмечена тенденция к снижению частоты тяжелых нарушений и увеличение частоты случаев со средними нарушениями. Вместе с тем, было установлено значительное достоверное снижение смертности в опытной группе животных по сравнению с контрольными (0% – опытно., 46.2% – контр. соответственно, $p < 0.01$).

В настоящих исследованиях мы использовали крыс-самцов линии К-М в возрасте 4.5 месяцев. Для эксперимента были выбраны взрослые крысы К-М, поскольку геморрагические инсульты чаще всего происходят во второй половине жизни, и поэтому моделировать их целесообразно не на молодых, а на взрослых животных. Кроме того, работа на животных одной возрастной группы дает возможность сравнения эффективности влияния различных факторов.

Описание опытных групп животных

Были использованы 4 группы животных: 1) контрольная группа А (группа интактных животных) – животные, не подвергавшиеся действию акустического раздражителя, которым вводили физиологический раствор; 2) опытная группа А(К) – животные, не подвергавшиеся действию акустического раздражителя, которым вводили кортексин; 3) контрольная группа Б – животные, подвергшиеся действию акустического раздражителя, которым вводили физиологический раствор; 4) опытная группа Б(К) – животные, подвергшиеся действию акустического раздражителя, которым вводили кортексин.

Животные опытных групп А(К) и Б(К) внутрибрюшинно получали нейропептид кортексин, растворенный в физиологическом растворе, в дозе 0.2 мг/1000 г, за 60 мин до акустического стресса. Контрольные животные (группы А и Б) получали в это же время в виде внутрибрюшинных инъекций физиологический раствор в эквивалентном объеме.

В проведенных исследованиях было обнаружено, что кортексин оказывает защитное действие практически на всех структурно-

функциональных уровнях при развитии у крыс линии Крушинского-Молодкиной геморрагического инсульта.

Исследование окислительного статуса (отношения [8-охо-dG]/[dG] в ДНК) в клетках мозга экспериментальных животных

Одной из причин гибели нейронов при всех патологиях, в том числе, при геморрагическом инсульте, является окислительный стресс, вызываемый действием свободных радикалов. В настоящее время предложено несколько механизмов, приводящих к увеличению образования свободных радикалов при кровоизлиянии в мозг. Разрыв кровеносных сосудов при геморрагическом инсульте приводит к тому, что во внесосудистое пространство попадает кровь, а вместе с ней и продукты ее распада. Например, повышается содержание свободного железа из-за разрушения гемоглобина, освобожденного вследствие лизиса красных кровяных телец [11]. Свободное железо может значительно увеличить выработку OH^\bullet по реакции Фентона ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$).

Независимо от механизма образования активных форм кислорода, когда их количество существенно увеличивается, существует высокий риск повреждения нейронов из-за высокой восприимчивости мозга к окислительному стрессу, которая объясняется несколькими причинами: 1) мозг представляет только 2% веса тела, но он потребляет около 20% кислорода, необходимого организму (156 ммоль/100 г/мин); 2) мозг сравнительно плохо обеспечен защитными антиоксидантными ферментами и веществами; 3) в мозге содержатся в относительно высоких концентрациях легко переокисляемые липиды, такие как полиненасыщенные жирные кислоты, которые представляют собой одну треть жирных кислот мозга; 4) многие области мозга обогащены железом [12].

В ядрах нейронов и других клетках мишенями окислительного повреждения при токсическом воздействии активных форм азота и кислорода является ДНК. В самой же ДНК наиболее уязвимыми мишенями являются гуаниновые основания. Среди многих продуктов окислительного повреждения ДНК наиболее изученным является 8-оксо-2'-дезоксигуанозин (8-охо-dG), что обусловлено его мутагенностью, а также высокой чувствительностью его измерений, а отношение [8-охо-dG]/[dG] является одним из важнейших показателей степени повреждения ДНК на молекулярно-биологическом уровне [13].

Ранее [14] нами был описан простой в исполнении метод определения отношения [8-охо-dG], образующегося в ДНК в результате действия окислительного стресса, вызванного активными формами азота (NO^\bullet и продуктами его превращения) и кислорода (O_2^\bullet и продуктами его превращения), к [dG] в ДНК с помощью обращено-фазовой (ОФ) ВЭЖХ в сочетании с

амперометрической детекцией, который может быть использован в исследованиях, связанных с окислительным стрессом.

В этой статье мы сообщаем о результатах определения отношения [8-охо-dG]/[dG] в ДНК, выделенной из мозжечка крыс линии Крушинского-Молодкиной контрольных и опытных групп, на модели экспериментального геморрагического инсульта при изучении защитного действия пептидного препарата кортексин.

Результаты, полученные в настоящем исследовании (таблица, рис.), показывают, что введение кортексина интактным животным уменьшает отношение [8-охо-dG]/[dG] примерно в 3 раза, а введение его животным, подвергнутым действию звукового раздражителя, в 1.4 раза. В условиях стресса отношение [8-охо-dG]/[dG] увеличивается в 1.7 раз по сравнению с первой контрольной группой, а действие кортексина снижает данное значение до уровня, близкого к исходному.

Результаты, полученные в настоящем исследовании (таблица, рис.), показывают, что введение кортексина интактным животным уменьшает отношение [8-охо-dG]/[dG] примерно в 3 раза, а введение его животным, подвергнутым действию звукового раздражителя, в 1.4 раза. В условиях стресса отношение [8-охо-dG]/[dG] увеличивается в 1.7 раз по сравнению с первой контрольной группой, а действие кортексина снижает данное значение до уровня, близкого к исходному.

Таблица. Результаты определения абсолютного и относительного содержания 8-охо-dG и dG в ДНК, выделенной из клеток мозга крыс разных групп*, по данным ОФ-ВЭЖХ

Группы животных	А	А(К)	Б	Б(К)
dG (площадь пика S, мВ×с)**	4769.43	6599.43	7092.69	5976.23
dG (количество, мкмоль)	0.33	0.46	0.49	0.41
8-охо-dG (площадь пика S, нА×с)***	103.32	56.25	267.63	163.19
8-охо-dG (количество, пмоль)	310	169	803	490
8-охо-dG/dG (пмоль/мкмоль)	939	367	1639	1195
dG (площадь пика S, мВ×с)**	4493.56	3453.65	14279.90	6352.59
dG (количество, мкмоль)	0.45	0.35	1.43	0.64
8-охо-dG (площадь пика S, нА×с)***	259.74	55.66	1378.95	466.10
8-охо-dG (количество, пмоль)	331	71	1757	594
8-охо-dG/dG (пмоль/мкмоль)	737	205	1230	935

Эксперимент № 1

Эксперимент № 2

* А – интактные животные; А(К) – интактные животные, которым вводили кортексин; Б – животные, подвергавшиеся действию акустического раздражителя, которым вводили физиологический раствор; Б(К) – животные, подвергшиеся действию акустического раздражителя, которым вводили кортексин.

** По данным УФ-детектора.

*** По данным амперометрического детектора.

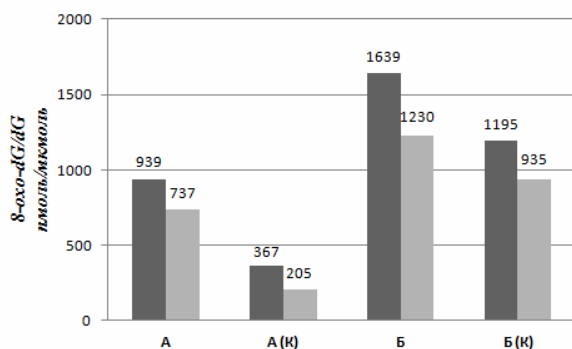


Рис. Отношение [8-охо-dG]/[dG] в ДНК, выделенной из мозга крыс разных групп, определенное с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в сочетании с амперометрической детекцией.

Полученные данные указывают на положительную динамику действия препарата в условиях стрессового воздействия, приводящего к

геморрагическому инсульту у испытуемых животных.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что кортексин снижает отношение [8-охо-dG]/[dG] в ДНК не только при развитии геморрагического инсульта (отмечена тенденция снижения), но и в ДНК интактных животных. Установлено также, что кортексин защищает клетки мозга от окислительного стресса, вызванного акустическим воздействием на крыс, генетически предрасположенных к геморрагическому инсульту и изначально имеющих повышенный уровень 8-охо-dG.

Таким образом, нами продемонстрировано, что под влиянием кортексина в ДНК снижается отношение [8-охо-dG]/[dG], что может свидетельствовать о благотворном действии кортексина на генетический аппарат клеток. А это, в свою очередь, указывает на то, что кортексин

может положительно влиять на отдаленные последствия, которые иногда проявляются спустя годы после геморрагического инсульта или травмы головного мозга у пациентов, которым не вводили кортексин. В то же время, те пациенты, которым вводили кортексин, могут иметь другое качество и продолжительность жизни благодаря тому, что у них будет более сохранным генетический аппарат клеток.

Экспериментальная часть

В работе использовались следующие реагенты и растворители: ацетат натрия, ацетат аммония, ацетат цинка (ч.), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, изоамиловый спирт (ч.), хлороформ (х.ч.), хлорид натрия (Химмед, Россия), Трис-НСI, SDS (Reanal, Венгрия), EDTA (Chemika, Швейцария), НСI (Реахим, Россия), сахароза (Хеликон, Россия), Triton X-100 (Ferak, Германия), ацетонитрил (HPLC-R, Biosolve, Нидерланды), этанол (SERVA, Германия), $LiClO_4$ (Merck, Германия).

Для проведения выделения и гидролиза ДНК и РНК использовались следующие ферменты и буферные растворы: РНКаза А (Qiagen, Германия), нуклеаза Р1 (USBiological, США), протеиназа К (10 мг/мл), щелочная фосфатаза (Fermentas, Литва), буфер I: (рН 8.0) 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСI, 10 мМ EDTA, буфер для нуклеазы Р1: $\times 10$ 0.05 М $(AcO)_2Zn$, 0.3 М AcONa, 0.5 М NaCl, буфер для щелочной фосфатазы FastAP™: $\times 10$ 100 мМ Tris-НСI (рН 8.0 при 37°C), 50 мМ $MgCl_2$, 1 М KCl, 0.2% Triton X-100 и 1 мг/мл BSA.

Для приготовления систем с требуемым рН использовали рН-метр «Schott» (Германия). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Helios α «Unicam» (Великобритания) в интервале длин волн 220–300 нм. Образцы осаждали на центрифуге Sigma 202 МК, ротор 12045 «Sigma» (США). Образцы высушивали на аппарате Speed Vac Concentrator «Savant» (США). Инкубацию образцов проводили в термостате Thermostat 5320 «Eppendorf» (Германия).

Объекты исследования

В молекулярно-биологических экспериментах использовали крыс-самцов линии Крушинского-Молодкиной в возрасте 4.5 месяцев массой 260 ± 40 г. Стандартизацию животных осуществляли в результате отбора крыс линии К-М по возрасту, массе тела, полу. Крысы содержались в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, с естественной сменой дня и ночи, $t = 20^\circ C$, по 6-7 животных в клетке. Для молекулярно-биологических исследований было взято по 2 животных для каждого эксперимента.

Схема проведения эксперимента

Опытные животные (группы А(К) и Б(К)) получали внутривентриально нейропептид кортексин («Герофарм», Россия), растворенный в физиологическом растворе, в дозе 0.2 мг/1000 г.

Контрольные животные (группы А и Б) получали в это же время в виде внутривентриальных инъекций физиологический раствор в эквивалентном объеме.

Кроме того, экспериментальные животные (группы Б и Б(К)) были подвергнуты акустическому стрессу. Животное помещали в камеру. Звуковое раздражение начинали с 1.5-минутного непрерывного воздействия сильного электрического звонка (110–115 дБ). Затем в течение 15 мин следовала серия чередующихся сильных и слабых (80–90 дБ) звуковых сигналов длительностью 10 секунд с 10-ти-секундными интервалами между ними. Далее следовал трехминутный перерыв, в течение которого звонок в экспериментальной камере был выключен. После трехминутного перерыва в камере снова включали звонок, который непрерывно давал в течение одной минуты сильный звуковой сигнал (110–115 дБ).

Выделение ДНК из мозжечка крыс

Образцы мозга восьми крыс (мозжечок) замораживали при $-20^\circ C$, лиофилизовывали полностью и хранили в холодильнике при $-20^\circ C$.

Восемь образцов мозжечка крыс, по 100 мг каждого, помещали в 8 эппендорфов, прибавляли 400 мкл буфера I, гомогенизировали. После гомогенизации к 400 мкл гомогената мозга добавляли 20 мкл 20% SDS, 40 мкл раствора протеиназы К и 4 мкл раствора РНКазы А. Образцы перемешивали на аппарате «Вортекс», а затем помещали в термостат на 2 ч при $55^\circ C$. После инкубации добавили 40 мкл 3 М $LiClO_4$ и 40 мкл 3 М ацетата натрия и перемешивали (раствор А).

К раствору А добавляли 600 мкл смеси хлороформ–изоамиловый спирт, 24:1, и центрифугировали при 13 000 об/мин и $-30^\circ C$ в течение 10 мин, отбирали супернатант. Данную процедуру повторяли 2 раза. Затем к водной смеси добавляли 5-ти-кратный объем охлажденного до $-20^\circ C$ 96% этанола. Образцы выдерживали ночь при $-20^\circ C$ и центрифугировали при 6000 об/мин и $-30^\circ C$ в течение 10 мин. Затем сливали супернатант, и в эппендорфы приливали охлажденный до $-20^\circ C$ 75% этанол (1 мл). Образцы перемешивали на аппарате «Вортекс», а затем центрифугировали при 13 000 об/мин и $-30^\circ C$ в течение 10 мин. Супернатант сливали. Осадки высушивали в течение 30 мин и затем растворяли в 200 мкл дистиллированной воды. Концентрацию ДНК в растворах определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм.

Гидролиз ДНК

Из полученных растворов отбирали аликвоты, содержащие по ~ 4 о.е. (0.15 мг) ДНК, и разбавляли дистиллированной водой до объема 200 мкл. К полученным растворам добавляли по 20 мкл буфера для нуклеазы Р1, перемешивали.

Растворы прогревали 3 мин при 95°C, затем их резко охлаждали до 4°C, добавляли 5 мкл (5 ед. акт.) нуклеазы Р1 и инкубировали при 55°C в течение 2 ч. После чего добавляли буфер для щелочной фосфатазы (22 мкл) и по 1 мкл (1 ед. акт.) щелочной фосфатазы. Инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Полученные растворы прогревали 3 мин при 80°C и центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 5 мин. Гидролизаты анализировали с помощью ОФ-ВЭЖХ, используя ультрафиолетовую и амперометрическую детекцию. Времена удерживания dG и 8-охо-dG: ~6.3 мин и ~7.2 мин, соответственно.

Проведение ОФ-ВЭЖХ в сочетании с амперометрической детекцией

Аналитическую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) проводили на хроматографе «Beckman-Gold» (США), оснащенном насосом «Beckman-126», инжектором

«Beckman» с объемом петли 250 мкл, УФ-детектором «Beckman-166», с переменной длиной волны и электрохимическим детектором фирмы «Химвавтоматика» (Россия). Хроматографию проводили на колонке Диасфер-110-С18 (5 мкм, 4.0×250 мм) фирмы «Биохиммак» (Россия) в системе 0.1 М ацетат аммония (рН 7.0) с градиентом концентрации ацетонитрила от 5 до 15% за 20 мин, скорость потока 0.8 мл/мин. Детекцию осуществляли на УФ-детекторе при 254 нм и на амперометрическом детекторе при постоянном напряжении на электроде +0.4 В.

Хроматограммы регистрировали с помощью программы «Мультихром» (Ampersand Ltd. версия 1.52ц, Россия) для УФ-детектора и «Z-lab» (Zхром, Россия) для амперометрического детектора.

Обработку результатов экспериментов проводили с помощью программы Excel (Microsoft).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Скворцова В.И. Снижение заболеваемости, смертности и инвалидности от инсультов в Российской Федерации // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуск: Инсульт. 2007. С. 25–29.
2. Скороходов А.П. Кортиксин – пятилетний опыт отечественной неврологии / Под ред. А.А. Скоромца, М.М. Дьяконова. – СПб.: Наука, 2006. С. 68–81.
3. Суслина З.А. Ишемический инсульт: сосуды, сердце, кровь // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуск: Инсульт. 2007. С. 36–38.
4. Яхно Н.Н. Сосудистые когнитивные расстройства // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуск: Инсульт. 2007. С. 44–45.
5. Королева С.В. Взаимодействие кортексина с пептидной системой организма // Пептидная нейропротекция: сб. научн. статей под ред. А.А. Каменского и М.М. Дьяконова. – М.: Наука, 2009. С. 40–73.
6. Каменский А.А. Пептидная нейропротекция: сб. научн. статей под ред. А.А. Каменского и М.М. Дьяконова. – М.: Наука, 2009. С. 7–9.
7. Дьяконов М.М. Пептидная нейропротекция: сб. научн. статей под ред. А.А. Каменского и М.М. Дьяконова. – М.: Наука, 2009. С. 252–256.
8. Реутов В.П., Кузенков В.С., Крушинский А.Л., Кошелев В.Б., Рясина Т.В., Левшина И.П., Шуйкин Н.Н., Косицын Н.С., Айрапетянц М.Г. Развитие стрессорных повреждений у крыс линии Крушинского– Молодкиной, генетически предрасположенных к судорожным припадкам, при действии NO-генерирующего соединения и блокатора NO-синтазы // Вести нац. академии наук Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. 2002. № 1. С. 5–10.
9. Реутов В.П., Кузенков В.С., Крушинский А.Л., Сорокина Е.Г., Гранстрем О.К., Полетаева И.И., Каменский А.А., Кошелев В.Б., Пинелис В.Г. Влияние кортексина на двигательную активность, площадь кровоизлияний и содержание аутоантител к рецепторам глутамата при экспериментальном геморрагическом инсульте // Пептидная нейропротекция: сб. научн. статей под ред. А.А. Каменского и М.М. Дьяконова. – М.: Наука, 2009. С. 21–39.
10. Реутов В.П., Самосудова Н.В., Филиппова Н.А., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Сорокина Е.Г., Пинелис В.Г., Гранстрем О.К., Ларионова Н.П., Чайлахян Л.М. Кортиксин и нитрит в сочетании с кортексином уменьшают отек и разрушение нейронов мозжечка при геморрагическом инсульте // Доклады Академии наук. 2009. Т. 426. № 3. С. 410–413.
11. Wu J., Hua Y., Keep R.F., Schallert T., Hoff J.T., Xi G. Oxidative brain injury from extravasated erythrocytes after intracerebral hemorrhage // Brain Res. 2002. V. 953. P. 45–52.
12. Cherubinia A., Ruggiero C., Polidorib C., Mecocchia P. Potential markers of oxidative stress in stroke // Free Radical Biology & Medicine. 2005. V. 39. P. 841–852.
13. Cooke M.S., Evans M.D. Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease // Faseb J. 2003. V. 17. P. 1195–1214.
14. Есипов Д.С., Сидоренко Е.В., Есипова О.В., Горбачева Т.А., Невредимова Т.С., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Реутов В.П. Определение отношения 8-оксо-2'-дезоксигуанозина к 2'-дезоксигуанозину в ДНК с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в сочетании с амперометрической детекцией // Вестник МИТХТ. 2010. Т. 5. № 3. С. 62–68.