

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра биохимии

АРТЕМЧУК
Яна Николаевна

**АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ПРОЦЕССОВ
ПОЛ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ФЕНОЛЬНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ РОМАШКИ АПТЕЧНОЙ (MATRICARIA
CHAMOMILLA) В СОЧЕТАНИИ С НИЗКОИНТЕНСИВНЫМ
ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ В ОПЫТАХ IN VITRO**

Дипломная работа

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент Орёл Н.М.

Допущена к защите
« ____ » _____ 2023г.
Зав. кафедрой биохимии

Кандидат биологических наук, доцент
_____ И. В. Семак

Минск, 2023

РЕФЕРАТ

Дипломная работа, 40 с., 8 рис., 9 табл., 42 источников литературы.

РОМАШКА АПТЕЧНАЯ, ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, КАТАЛАЗА, СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, ТБК-АКТИВНЫЕ ПРОДУКТЫ, НИЗКОИНТЕНСИВНОЕ ЛАЗЕРНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ, ПЕЧЕНЬ КРЫС

Объект исследования: гомогенат печени крыс.

Цель работы: установить действие фенольных соединений в сочетании с низкоинтенсивным лазерным излучением (НИЛИ) на активность супероксиддисмутазы, каталазы и содержание ТБК-активных продуктов.

Методы исследования: спектрофотометрические, статистические.

В результате проведенных экспериментов показано, что концентрация фенольных соединений в Ромашке аптечной производства фирмы ООО «НПК Биотест» составляет 5,13 мг/г сухого сырья.

Установлено, что фенольные фракции Ромашки аптечной при внесении их в 10 % гомогенат печени крыс в концентрациях 0,05 и 0,1 мкг/мл снижают активность каталазы на 27,4 % и 33 % и концентрацию ТБК-активных продуктов – на 16,9 % и 60,2 % соответственно, но практически не влияют на активность СОД.

Показано, что воздействие на гомогенат печени крыс непрерывного лазерного излучения, генерируемого аппаратом квантовой терапии «Витязь», в течение 9-ти мин. достоверно повышает активность каталазы на 121,3 % и концентрацию ТБК-активных продуктов – на 164 %, но снижает активность СОД на 25,6 %.

Установлено, что фенолы Ромашки аптечной ослабляют эффекты лазерного излучения на активность ферментов антиоксидантной защиты и процессы перекисного окисления липидов. Это подтверждается тем, что при добавлении фенольной фракции Ромашки аптечной в концентрации 0,1 мг/мл в гомогенат печени крыс в сочетании с лазерным облучением активность каталазы снижается на 64,2 %, а концентрация ТБК-активных продуктов – на 191,3 % по отношению к изменениям, вызванным лазерным излучением соответственно. Фенольные соединения ромашки при их добавлении в сочетании с лазерным облучением частично уменьшают изменения активности СОД, инициированные облучением.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа, 40 старонак, 8 малюнкаў, 9 табліц, 42 крыніц літаратуры.

РАМОНАК АПТЭЧНЫ, ФЕНОЛЬНЫЯ ЗЛУЧЭННІ, КАТАЛАЗА, СУПЕРАКСІДДЫСМУТАЗА, ТБК-АКТЫЎНЫЯ ПРАДУКТЫ, НІЗКАІНТЭНСІЎНАЕ ЛАЗЕРНАЕ ВЫПРАМЕНЬВАННЕ, ПЕЧАНЬ ПАЦУКОЎ

Аб'ект даследавання: гамагенат печані пацукоў.

Мэта даследавання: усталяваць дзеянне фенольных злучэнняў у спалучэнні з нізкаінтэнсіўным лазерным выпраменьваннем (НІЛВ) на актыўнасць супераксіддысмутазы, каталазы і ўтрыманне ТБК-актыўных прадуктаў.

Метады даследавання: спектрафотамэтрычныя, статыстычныя.

У выніку праведзеных эксперыментаў паказана, што канцэнтрацыя фенольных злучэнняў у Рамонку аптэчным вытворчасці фірмы ТАА "НПК Биотест" складае 5,13 мг/г сухой сыравіны.

Устаноўлена, што фенольныя фракцыі Рамонка аптэчнага пры унясенні іх у 10 % гамагенат печані пацукоў у канцэнтрацыях 0,05 і 0,1 мкг/мл зніжаюць актыўнасць каталазы на 27,4 % і 33 % і канцэнтрацыю ТБК-актыўных прадуктаў - на 16,9 % і 60,2 % адпаведна, але практычна не ўплываюць на актыўнасць СОД.

Паказана, што ўздзеянне на гамагенат печані пацукоў бесперапыннага лазернага выпраменьвання, якое генеруецца апаратам квантавай тэрапіі «Віцязь», на працягу 9-ці мін. дакладна павышае актыўнасць каталазы на 121,3 % і канцэнтрацыю ТБК-актыўных прадуктаў - на 164 %, але зніжае актыўнасць СОД на 25,6 %.

Устаноўлена, што фенолы Рамонка аптэчнага аслабляюць эфекты лазернага выпраменьвання на актыўнасць ферментаў антыаксідантай абароны і працэсы перакіснага акіслення ліпідаў. Гэта пацвярджаецца тым, што пры даданні фенольнай фракцыі Рамонкі аптэчнай у канцэнтрацыі 0,1 мг/мл у гамагенат печані пацукоў у спалучэнні з лазерным апрамяненнем актыўнасць каталазы зніжаецца на 64,2 %, а канцэнтрацыя ТБК-актыўных прадуктаў - на 191,3 % у адносінах да змен, выкліканым лазерным выпраменьваннем адпаведна. Фенольныя злучэнні рамонка пры іх даданні ў спалучэнні з лазерным апрамяненнем часткова памяншаюць змены актыўнасці СОД, ініцыяваныя апрамяненнем.

ABSTRACT

Graduate work, 40 pages, 8 figures, 9 tables, 42 sources.

CHAMOMILE PHARMACY, PHENOLIC COMPOUNDS, CATALASE, SUPEROXIDE DISMUTASE, TBA-ACTIVE PRODUCTS, LOW-INTENSITY LASER RADIATION, RAT LIVER

The object of the research: homogenate of rat liver.

The aim of the research: to establish the effect of phenolic compounds in combination with low-intensity laser radiation (LILR) on the activity of superoxide dismutase, catalase and the content of TBA-active products.

Research methods: spectrophotometric, statistical.

As a result of the experiments, it was shown that the concentration of phenolic compounds in the Chamomile pharmaceutical production of the LLC NPK Biotest company is 5.13 mg/g of dry raw material.

It was found that the phenolic fractions of Chamomile when added to 10 % rat liver homogenate at concentrations of 0.05 and 0.1 $\mu\text{g/ml}$ reduce catalase activity by 27.4 % and 33 % and the concentration of TBA-active products by 16.9 % and 60.2 %, respectively, but practically do not affect the activity of SOD.

It has been shown that exposure of rat liver homogenate to continuous laser radiation generated by the Vityaz quantum therapy apparatus for 9 min. significantly increases the activity of catalase by 121.3 % and the concentration of TBA-active products - by 164 %, but reduces the activity of SOD by 25.6 %.

It has been established that the phenols of Chamomile weaken the effects of laser radiation on the activity of antioxidant defense enzymes and the processes of lipid peroxidation. This is confirmed by the fact that when adding the phenolic fraction of Chamomile at a concentration of 0,1 mg/ml in rat liver homogenate in combination with laser irradiation, catalase activity decreases by 64.2 %, and the concentration of TBA-active products - by 191.3 % in relation to changes caused by laser radiation, respectively. Chamomile phenolic compounds, when added in combination with laser irradiation, partially reduce changes in SOD activity initiated by irradiation.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1 Оксидативный стресс	9
1.2. Свободнорадикальное окисление в организме и его роль в патологическом процессе.....	11
1.3 Антиоксидантная система защиты организма.....	10
1.3.1 Ферменты антиоксидантной системы.....	16
1.4 Характеристика перекисного окисления липидов	18
1.5 Общая характеристика Ромашки аптечной.....	19
1.6 Характеристика фенольных соединений в растительном сырье .	17
1.7 Низкоинтенсивное лазерное излучение.....	25
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	27
2.1 Схема проведения эксперимента.....	27
2.2 Выделение фенольных соединений	28
2.3 Получение водной фракции фенолов суспензионной культуры Ромашки аптечной	Ошибка! Закладка не определена.
2.4 Определение концентрации полифенольных соединений в экстракте Ромашки аптечной модифицированным методом Фолина-Чокальтеу	28
2.5 Получение гомогената печени крыс	Ошибка! Закладка не определена.
2.6 Определение содержания белка по методу Петерсона.....	Ошибка! Закладка не определена.
2.7 Определение активности каталазы	Ошибка! Закладка не определена.
2.8 Определение интенсивности накопления ТБК-активных продуктов	33
2.9 Определение активности супероксиддисмутазы.....	34
2.10 Статистическая обработка данных.....	34
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	35

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	39
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	40

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода,
НИЛИ – низкоинтенсивное лазерное излучение,
ПОЛ – перекисное окисление липидов,
СОД – супероксиддисмутаза,
ТБК – тиобарбитуровая кислота,
ТХУ – трихлоруксусная кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Антиоксидантная система представляет собой важнейший и сложный защитный механизм в организме. Его основная роль заключается в противодействии окислительному стрессу, состоянию, возникающему в результате дисбаланса между активными формами кислорода (АФК) и антиоксидантной способностью. Образование АФК является неизбежным процессом жизнедеятельности и индуцируется различными стрессорами, которые вызывают окисление и повреждение клеточных структур. Антиоксидантная система предотвращает и восстанавливает такие повреждения, обеспечивая ферментативную и неферментативную защиту. Ферментативные антиоксиданты, такие как супероксиддисмутаза и каталаза, нейтрализуют АФК посредством метаболических реакций, способствующих их превращению в менее вредные соединения. Для оценки антиоксидантного статуса крайне важно измерить активность данных защитных ферментов, а также концентрацию ТБК-активных продуктов для определения перекисного окисления липидов, возникающего в результате повышения уровня АФК.

Ромашка содержит различные фенольные соединения, включая флавоноиды и фенольные кислоты, которые играют важную роль в антиоксидантной системе. Эти фенольные соединения действуют как поглотители свободных радикалов, тем самым предотвращая повреждение клеточных структур, вызванное окислительным стрессом, и стимулируя активность ферментативных антиоксидантов. Фенольные соединения ромашки, особенно апигенин и кверцетин, являются мощными ингибиторами ферментов, которые способствуют образованию свободных радикалов.

Низкоинтенсивное лазерное излучение привлекает все большее внимание благодаря своим разнообразным полезным эффектам, включая улучшение заживления ран, модуляцию клеточных функций, уменьшение воспалительной реакции и облегчение боли. Широкий спектр биологических применений расширяют сферу применения НИЛИ в исследованиях, вместе с тем лежащие в основе биологические механизмы, участвующие в тканевых реакциях, еще недостаточно изучены. Поэтому важно изучить биохимические процессы, происходящие в организме при комбинированном действии фенольной фракции ромашки и НИЛИ.

По данным литературы низкоинтенсивное лазерное излучение некоторых длин волн и режимов, в частности красной области спектра, способно активировать процессы ПОЛ и воздействовать на ферменты антиоксидантной системы организма [28, 40, 42]. Это его действие мы

использовали в модели изучения антиоксидантных свойств фенольных соединений Ромашки в опытах *in vitro*.

Следовательно, изучение влияния фенольных соединений Ромашки аптечной в сочетании с низкоинтенсивным лазерным излучением на активность каталазы, супероксиддисмутазы и содержание ТБК-активных продуктов важно для понимания потенциальных преимуществ этих средств в защите от повреждений организма, вызванного окислительным стрессом. Такие знания могут иметь значение для разработки новых лекарственных средств для лечения патологических процессов.

Цель дипломной работы: установить действие фенольных соединений в сочетании с низкоинтенсивным лазерным излучением (НИЛИ) на активность супероксиддисмутазы, каталазы и содержание ТБК-активных продуктов.

Для достижения поставленной цели необходимо было выполнить следующие задачи:

1) выделить фенольную фракцию из цветков Ромашки аптечной и определить концентрацию фенольных соединений;

2) установить действие фенольных соединений в концентрациях 0,1 и 0,05 мкг/мл на содержание ТБК-активных продуктов, активность каталазы и супероксиддисмутазы в гомогенате печени крыс;

3) установить действие низкоинтенсивного лазерного облучения на содержание ТБК-активных продуктов, активность каталазы и супероксиддисмутазы в гомогенате печени крыс;

4) установить влияние экстракта фенольных соединений Ромашки аптечной в сочетании с лазерным облучением на концентрацию ТБК-активных продуктов, активность каталазы и супероксиддисмутазы в гомогенате печени крыс.

Дипломная работа выполнена на кафедре биохимии Белорусского государственного университета.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Оксидативный стресс

Окислительный стресс известен как дисбаланс между механизмами антиоксидантной защиты организма и выработкой активных форм кислорода (АФК). Специфическое изменение внутриклеточной среды, вызывающее сдвиг баланса количеств прооксидантных и антиоксидантно-активирующих компонентов и последующая активация окислительных процессов, может служить сигналом для инициирования такого типа реакции [1]. Поддержание нормального функционирования клетки требует равновесного баланса между элементами этой системы.

Причинами возникновения данного механизма нарушения могут быть следующие: нарушение работы митохондрий, аутоиммунные процессы, радиационное излучение и др.

Окислительный стресс вызывается воздействием активных промежуточных продуктов кислорода, таких как супероксидный анион ($O_2^{\cdot-}$), перекись водорода (H_2O_2) и гидроксильный радикал (HO^{\cdot}), которые могут повреждать белки, нуклеиновые кислоты и клеточные мембраны. Все больше данных свидетельствует о том, что совокупный ущерб, наносимый активными формами кислорода, способствует возникновению многочисленных заболеваний [2].

Чтобы противостоять окислительному стрессу, клетки конститутивно экспрессируют ферменты, которые обезвреживают активные формы кислорода и восстанавливают вызванные ими повреждения. Кроме того, все клетки бактерий, дрожжей и млекопитающих обладают адаптивными реакциями на повышенный уровень окислительного стресса, что указывает на то, что эти клетки чувствуют повышенный уровень активных форм кислорода и преобразуют сигнал в повышенную экспрессию защитных активностей [3]. Окислительный стресс является неизбежным побочным продуктом аэробного образа жизни, поскольку $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 образуются всякий раз, когда молекулярный кислород химически окисляет переносчики электронов.

1.2 Свободнорадикальное окисление в организме и его роль в патологическом процессе

Свободные радикалы – это высокореактивные химические соединения, которые могут образовываться в организме в результате нормальных метаболических процессов, токсинов окружающей среды и факторов образа жизни. Свободные радикалы могут повреждать клеточные компоненты, приводя к различным патологическим процессам. Понимание механизма свободнорадикального окисления, или так называемого перекисного окисления липидов, имеет важное значение для разработки эффективных методов лечения заболеваний, связанных с окислительным повреждением.

Обычно низкая концентрация АФК необходима для нормальных физиологических функций, таких как экспрессия генов, рост клеток и защита от инфекции. Иногда они также действуют как стимулирующие агенты для биохимических процессов внутри клеток [4]. Помимо этого, АФК также участвуют в биосинтезе химических веществ, способствующих процессам развития, таких как тироксин и простагландин. АФК также используются иммунной системой. Макрофаги и нейтрофилы вырабатывают АФК для уничтожения бактерий, которые поглощаются организмом при фагоцитозе.

Однако, свободные радикалы обладают высокой реакционной способностью и могут нанести вред практически всем типам биомолекул (белки, липиды, углеводы и нуклеиновые кислоты). Дело в том, что свободные радикалы порождают еще больше свободных радикалов из обычных молекул, создавая цепную реакцию. Окислительный стресс может возникнуть, когда клетка не может адекватно уничтожить избыток образующихся свободных радикалов. Эти свободные радикалы могут повреждать клеточные мембраны и липопротеины в результате процесса, называемого перекисным окислением липидов. Белки также могут быть повреждены АФК, что приводит к структурным изменениям и потере ферментативной активности. Свободные радикалы могут вызывать разрывы нитей ДНК, что может привести к мутации клеток [5]. У организма есть ряд механизмов противодействия этим атакам с помощью ферментов для восстановления ДНК и/или антиоксидантов. При неправильном регулировании окислительный стресс может вызвать целый ряд хронических и дегенеративных заболеваний:

- 1) Пародонтит является одной из наиболее распространенных инфекций полости рта, вызываемых бактериями и их продуктами зубного налета, и характеризуется воспалительным разрушением поддерживающих зуб соединительных тканей и альвеолярной кости [6]. Исследование выявило значительное увеличение общего содержания перекиси липидов в сыворотке

крови и слюнных железах, что было результатом сопутствующего увеличения выработки АФК при пародонтите [7].

2) Рак: свободные радикалы могут повреждать ДНК и вызывать мутагенность и цитотоксичность, и, следовательно, имеют решающее значение для развития рака. Считается, что АФК могут индуцировать мутации и препятствовать репарации ДНК, что инактивирует определённые гены-репрессоры опухолей, приводящих к раку [8].

4) Сердечно-сосудистые заболевания: АФК могут стимулировать окисление липопротеинов низкой плотности, холестерина, производных холестерина, модификации белков, которые могут привести к образованию пенистых клеток и атеросклеротических бляшек и тромбозу сосудов (сердечный приступ и инсульт) [9].

5) Респираторные заболевания: прямое воздействие на легкие 100% кислорода в течение длительного периода разрушает эндотелий и вызывает отек легких. Это опосредуется свободными радикалами. АФК также ответственны за хроническую обструктивную болезнь лёгких, астму и т.д. Сигаретный дым, как таковой, содержит свободные радикалы и, кроме того, способствует образованию большего количества свободных радикалов [5]. Повреждения, причиняемые легким курильщиков, происходят из-за АФК.

Образование свободных радикалов является непрерывным процессом в организме человека, и существует достаточно доказательств их участия во многих патофизиологических состояниях, при которых антиоксиданты противодействуют пагубному воздействию свободных радикалов.

1.3 Антиоксидантная система защиты организма

Существует несколько механизмов противодействия повреждениям, вызванным окислительным стрессом в организме животного. Основными и наиболее заметными защитными механизмами организма являются системы антиоксидантной защиты. Любое вещество, которое задерживает или предотвращает окислительное повреждение молекулы-мишени, считается антиоксидантом. Эти молекулы достаточно стабильны, чтобы нейтрализовать свободные радикалы, отдавая электроны. Антиоксиданты катализируют расщепление или превращение АФК в более стабильные компоненты различными биохимическими путями [10].

Было обнаружено, что антиоксиданты действуют двумя основными путями. Первый – это механизм разрушения цепи, при котором первичный антиоксидант высвобождает электрон для свободного радикала, присутствующего в системах. Второй механизм включает элиминацию инициаторов образования АФК/реакционноспособного азота (вторичных

антиоксидантов) путем подавления катализаторов, инициирующих цепную реакцию. Кроме того, антиоксиданты могут воздействовать на биологические системы посредством различных механизмов, включающих высвобождение электронов, хелатирование ионов металлов, коантиоксиданты или путем поддержания экспрессии генов [11].

1.3.1 Ферменты антиоксидантной системы

Многочисленные ферментативные и неферментативные антиоксиданты, растворимые как в воде, так и в липидах, составляют систему антиоксидантной защиты.

Основные неферментативные антиоксиданты состоят из различных низкомолекулярных соединений, таких как тиоловая (сульфгидрильная) группа, содержащая глутатион, витамины (витамины С и Е), β -каротин, мочевиная кислота, мелатонин и т.д.

Антиоксиданты ферментативной природы обеспечивают первую линию клеточной защиты от окислительного повреждения, вызванного АФК. В организме животных их основными представителями являются: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и др. Как и в случае с другими метаболитами антиоксидантов, вклад этих ферментов в антиоксидантную защиту может быть трудным отделить друг от друга.

СОД (КФ 1.15.1.1). Они представляют собой класс близкородственных ферментов, которые катализируют расщепление супероксидного аниона на кислород и перекись водорода. Присутствуют почти во всех аэробных клетках и во внеклеточных жидкостях. Они содержат ионы металлов, которыми могут быть медь, цинк, марганец или железо. У человека супероксиддисмутаза меди/цинка присутствует в цитозоле, в то время как супероксиддисмутаза марганца присутствует в митохондриях. Во внеклеточных жидкостях также существует третья форма супероксиддисмутазы, которая содержит медь и цинк в своих активных центрах. Супероксиддисмутаза удаляет $O_2^{\cdot-}$ катализируя реакцию дисмутации. В отсутствие супероксиддисмутазы эта реакция протекает неферментативно, но с очень низкой скоростью.

Каталаза (КФ 1.11.1.6, оксидоредуктаза H_2O_2) представляет собой тетрамер из четырех полипептидных цепей, каждая длиной более 500 аминокислот, содержит четыре порфириновые гемовые (железные) группы, которые позволяют ферменту вступать в реакцию с перекисью водорода. Каталаза может разлагать перекись водорода (H_2O_2) в реакциях, катализируемых двумя различными режимами ферментативной активности: каталитическим

режимом активности ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$) и пероксидатическим режимом активности ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow \text{A} + 2\text{H}_2\text{O}$). Скорость разложения H_2O_2 , вызванная каталитической активностью каталазы, протекает по типу реакции первого порядка и зависит от концентрации H_2O_2 .

Каталаза – необычный фермент, поскольку, хотя перекись водорода является ее единственным субстратом, его кофактор окисляется одной молекулой перекиси водорода, который впоследствии регенерируется путем переноса связанного кислорода ко второй молекуле субстрата.

Все прокариоты и эукариоты содержат каталазу. В основном, он содержится в пероксисомах всех типов клеток млекопитающих, за исключением эритроцитов, где H_2O_2 продуцируется различными оксидазами. Считается, что каталаза помогает механизмам антиоксидантной защиты клеток, предотвращая накопление H_2O_2 , поскольку H_2O_2 является субстратом для определенных реакций, в результате которых образуется чрезвычайно реакционноспособный гидроксильный радикал.

Были проведены многочисленные исследования функции каталазы в защите клеток и тканей от окислительного стресса. Избыточная экспрессия каталазы делает клетки более устойчивыми к токсичности H_2O_2 и повреждениям, опосредованным окислителями. Пациенты с дефицитом каталазы фенотипически нормальны, за исключением повышенной склонности к развитию прогрессирующей гангрены полости рта в результате повреждения тканей H_2O_2 , продуцируемого бактериями, продуцирующими пероксид, такими как стрептококки и пневмококки, а также фагоцитарными клетками в местах бактериальной инфекции.

Глутатионовая система включает глутатион, глутатионредуктазу, глутатионпероксидазы и глутатион S-трансферазы. Глутатионпероксидаза – это фермент, который катализирует расщепление перекиси водорода и органических гидропероксидов. Глутатионтрансферазы – это еще один класс глутатионзависимых антиоксидантных ферментов, которые проявляют высокую активность в отношении перекисей липидов. Эти ферменты находятся на высоком уровне в печени и также помогают в метаболизме детоксикации.

Глутатионредуктаза (КФ 1.8.1.7, ГР) – важнейший фермент, который восстанавливает дисульфид глутатиона до сульфгидрильной формы с помощью НАДФН-зависимого механизма, важной клеточной антиоксидантной системы. Из-за его значимости фермент был выделен из ряда животных, растений и микробных источников и изучен в попытке идентифицировать и объяснить его структуру, кинетический механизм и молекулярные свойства. Известно, что его кинетический механизм представляет собой модель пинг-понга / последовательного упорядочения. ГР – это флавопротеин, содержащий две молекулы ФАД в качестве протетической группы, которая восстанавливается с

помощью НАДФН. ГР является одним из термостабильных ферментов, относится к защитной системе, защищающей организм от химического и окислительного стресса. Дефицит ГР характеризуется гемолизом из-за повышенной чувствительности мембран эритроцитов к H_2O_2 и способствует окислительному стрессу, который играет ключевую роль в патогенезе многих заболеваний [10].

1.4 Характеристика перекисного окисления липидов

Сложный процесс перекисного окисления липидов затрагивает как растительные, так и животные ткани. Липидные радикалы активируются и разрушаются, предварительно активированный молекулярный кислород включается в липиды, двойные связи в полиненасыщенных липидных ацилах реорганизуются, и в результате мембранные липиды и биомембраны разрушаются. Спирты, кетоны, альдегиды, сложные эфиры и другие соединения образуются в результате развития свободнорадикальных реакций.

Повышенная концентрация конечных продуктов перекисного окисления липидов является наиболее часто приводимым доказательством причастности свободных радикалов к заболеваниям человека. Однако вполне вероятно, что повышенное окислительное повреждение наблюдается при большинстве, если не при всех заболеваниях человека, и играет значительную патологическую роль лишь при некоторых из них. Например, перекисное окисление, по-видимому, играет важную роль при атеросклерозе и в усугублении первоначального повреждения тканей, вызванного ишемическим или травматическим повреждением головного мозга. Окислительный стресс может повредить многие биологические молекулы: действительно, белки и ДНК часто являются более значимыми мишенями повреждения, чем липиды, и перекисное окисление липидов часто происходит на поздних стадиях процесса повреждения [12].

Процесс ПОЛ можно схематично изобразить следующим образом. Двойные сопряженные связи сначала возникают в результате образования липидного радикала. Когда молекулярный кислород атакует молекулу липида, образуется перекисный радикал. Этот радикал может взаимодействовать с другими липидными молекулами и расщеплять их, создавая новый липидный радикал. Относительно стабильная молекула гидропероксида липида является одним из побочных продуктов этого процесса. Кроме того, перекисный радикал может образовывать эндопероксидный радикал липида, в результате разложения которого

образуются различные побочные продукты, включая малоновый диальдегид [13].

Существует множество методов измерения перекисного окисления липидов, но ни один отдельный анализ не является точной мерой всего процесса. Оценивание по количеству продуктов, связанных с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП) – наиболее распространённый способ определения количества конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [12].

1.5 Общая характеристика Ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla*)

Ромашка аптечная – это широко известное лекарственное растение (рис. 1). Оно обладает выраженным успокаивающим, седативным действием, благодаря которому помогает справиться с повышенной тревожностью и стрессом, входит в состав терапевтических сборов для коррекции депрессии. Ромашка также способствует нормализации сердечного ритма, защищая сердце от внешних воздействий; стимулирует мозговую деятельность для нормализации кровообращения. Регулирует работу пищеварительной системы, помогая уменьшить газообразование и образование пузырьков, и защищает слизистые оболочки организма, оказывая антисептическое действие. Укрепляет стенки артерий, тем самым предотвращая развитие атеросклероза, и обладает противоаллергическим действием.

Кроме того, ромашка содержит натуральные спазмолитические и обезболивающие компоненты [14].

Ромашка аптечная (лат. *Matricaria chamomilla*) принадлежит к семейству Сложноцветные (лат. *Compositae*, или *Asteraceae*). Является наиболее известным представителем рода Ромашка (*Matricaria*), который относится к семейству *Asteraceae* (сложные цветы). Растение активно культивируется и встречается по всей Евразии и Северной Америке [15].

Ромашка аптечная — это однолетнее растение с тонкими веретенообразными корнями, плоско проникающими в почву (рис. 1). Ветвистый стебель прямостоячий, сильно разветвленный и достигает высоты 10-80 см. Длинные и узкие листья дву- или трехлопастные. Цветочные головки расположены отдельно, они имеют диаметр 10-30 мм, имеют цветоножки и гетерогамны. Золотисто-желтые трубчатые соцветия с 5 зубцами длиной 1,5-2,5 мм, всегда заканчивающиеся железистой трубкой. 11-27 белых цветков растения длиной 6-11 мм, шириной 3,5 мм расположены концентрически. Сосуд шириной 6-8 мм, вначале плоский, конический, позже конусообразный, полый — последнее является очень важной

отличительной чертой *Matricaria* — и без палочек. Плод — желтовато-коричневая семянка. Формула цветка ромашки аптечной: ложноязычковые краевые цветки — $\uparrow C_{0-\infty} L_{(3)} T_0 P_{(2)}$, трубчатые внутренние цветки — $*C_{0-\infty} L_{(5)} T_5 P_{(2)}$. Цветение происходит в период с мая по июнь. В зависимости от региональных экологических факторов сроки посева и сбора различны [16].

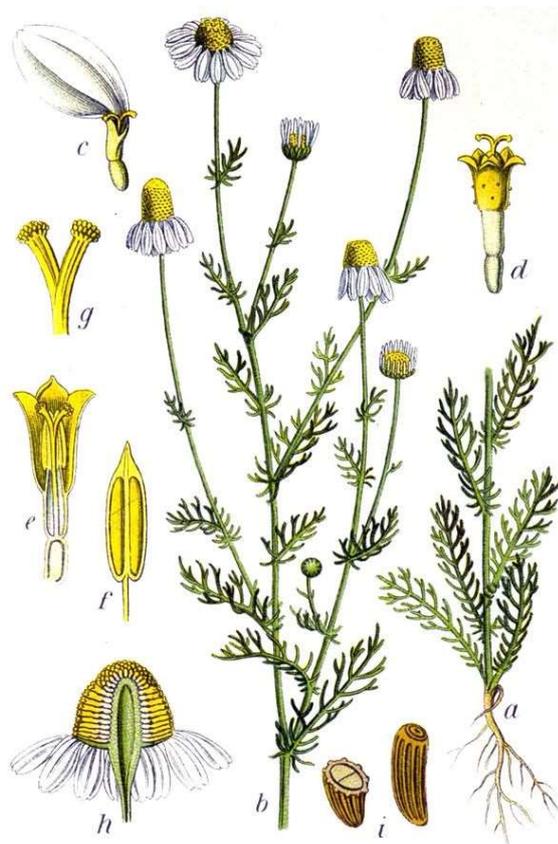


Рисунок 1.1 – Ромашка аптечная [16]

M. chamomilla относится к основной группе культивируемых лекарственных растений. Она содержит большую группу терапевтически интересных и активных классов соединений. Сесквитерпены, флавоноиды, кумарины и полиацетилены считаются наиболее важными компонентами препарата ромашки [17]. Кумарины представлены в *M. chamomilla* герниарином, умбеллифероном и другими второстепенными. (Z)- и (E)-2-β-d-глюкопиранозилокси4-метоксикоричная кислота (GMCA), предшественник глюкозида герниарина были описаны как нативные соединения в ромашке [18]. Одиннадцать биологически активных фенольных соединений, таких как герниарин и умбеллиферон (кумарин), хлорогеновая кислота и кофейная кислота (фенилпропаноиды), апигенин, апигенин-7-О-глюкозид, лютеолин и лютеолин-7-О-глюкозид (флавоны), кверцетин и рутин (флавонолы), а также нарингенин (флаванон) содержатся в экстракте ромашки.

Это было продемонстрировано в одном из исследований по сравнительному анализу состава и содержания флавоноидов и кумаринов в масляном экстракте цветков ромашки. Во всех препаратах были обнаружены кумарины умбеллиферон, герниарин и флавоноиды апигенин и кверцетин [19].

Более 120 химических компонентов были идентифицированы в цветке ромашки в качестве вторичных метаболитов, включая 28 терпеноидов, 36 флавоноидов и 52 дополнительных соединения с потенциальной фармакологической активностью [20]. Компоненты, такие как α -бисаболол и циклические эфиры, обладают противомикробными свойствами, умбеллиферон обладает фунгистатическим действием, тогда как хамазулен и α -бисаболол обладают антисептическими свойствами [21]. Было обнаружено, что ромашка обладает наиболее эффективной антилейшманиальной активностью [22].

1.6 Характеристика фенольных соединений в Ромашке аптечной

Умбеллиферон (7-гидроксикумарин, скимметин) – представляет собой желтое кристаллическое вещество, которое можно растворять в этаноле, хлороформе и уксусной кислоте, но не в воде или диэтиловом эфире. Химическая формула $C_9H_6O_3$.

Семейство растений Umbelliferae – место, где первоначально появился умбеллиферон, давший ему свое название. Умбеллиферон играет решающую роль в синтезе различных природных кумаринов, пиранокумаринов и фурукумаринов, и его можно найти во многих видах растений.

Подсемейство Рутовые, семейства Сложноцветные и Зонтичные растения – все они содержат умбеллиферон в значительных количествах.

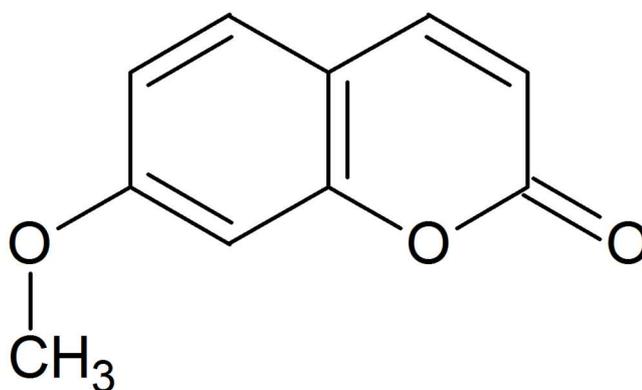


Рисунок 1.2 – Структурная формула умбеллиферона

Так как данное соединение относится к кумаринам, оно обладает антикоагулянтными свойствами. Некоторые кумарины способны повышать чувствительность кожи к ультрафиолетовому излучению благодаря своей фотодинамической активности. Многие кумарины обладают спазмолитическими свойствами; это лежит в основе их мочегонного, желчегонного (оксикумарины), сердечно-сосудистого и гипотензивного действия [23].

Хлорогеновая кислота (3-кофеилхинная кислота) представляет собой сложный эфир, образующийся между кофейной и хинной кислотами, и представляют собой богатую группу растительных полифенолов, присутствующих в рационе человека. Её формула $C_{16}H_{18}O_9$.

Хлорогеновые кислоты имеют различные подгруппы, которые включают кофеилхиновую, *p*-кумароилхиновую и ферулоилхиновую кислоты. Результаты эпидемиологических исследований показывают, что потребление таких напитков, как кофе, чай, вино, различные травяные настои, а также некоторых фруктовых соков связано со снижением риска развития различных хронических заболеваний. Эти напитки содержат углекислый газ, присутствующий в различных концентрациях, и изомерные смеси. Механизм, лежащий в основе специфической пользы для здоровья, включает в себя смягчение окислительного стресса и, следовательно, связанных с ним побочных эффектов, связанных с несбалансированным внутриклеточным окислительно-восстановительным состоянием. Имеются также данные, свидетельствующие о том, что хлорогеновая кислота проявляет противовоспалительную активность, модулируя ряд важных метаболических путей [24].

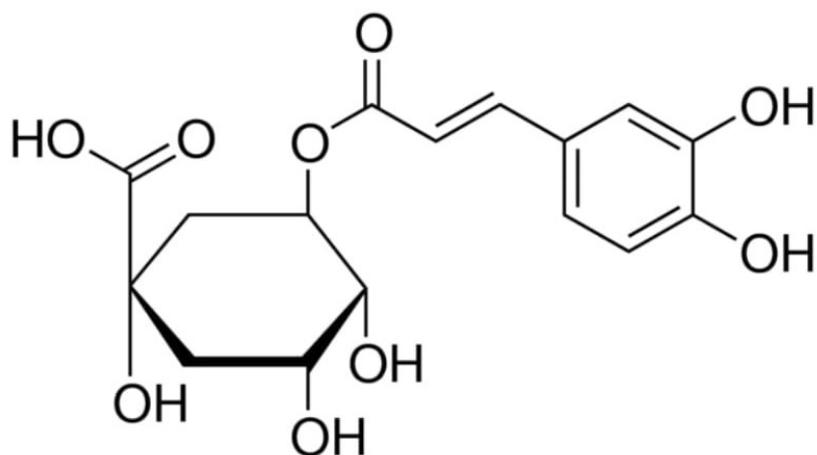


Рисунок 1.3 – Структурная формула хлорогеновой кислоты

Апигенин, химически известный как 4',5,7-тригидроксифлавоон, представляет собой желтый кристаллический порошок, относящийся к классу флавонов, то есть агликон нескольких встречающихся в природе гликозидов. Его формула $C_{15}H_{10}O_5$. Он нерастворим в воде, но растворим в органических растворителях. Апигенину приписываются многочисленные фармакологические свойства, включая противовоспалительное, антиоксидантное, противораковое и т.д.

Исследования показали, что апигенин обладает многочисленными молекулярными мишенями, участвующими в воспалении. Исследования, проведенные *in vivo*, *in vitro* и в клинических испытаниях, показали, что апигенин является мощным терапевтическим средством для лечения таких заболеваний, как ревматоидный артрит, аутоиммунные расстройства, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и различные виды рака. Замедленный клиренс из плазмы и медленное разложение в печени повышают его системную биодоступность и делают его сильным терапевтическим средством в фармацевтических исследованиях [25].

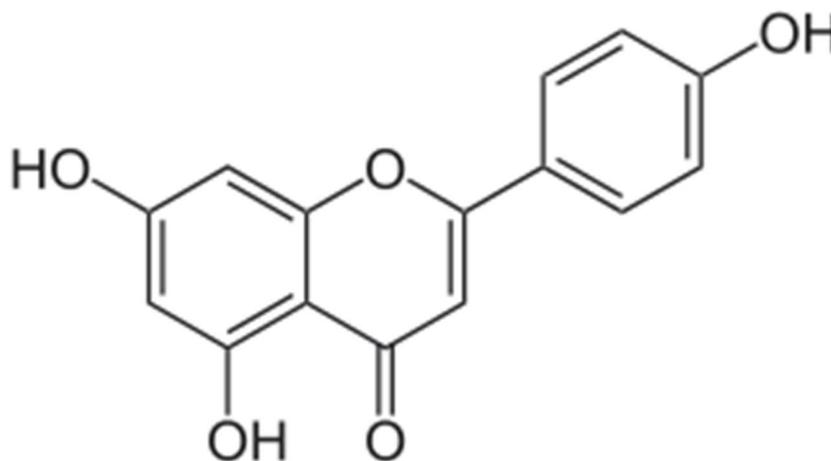


Рисунок 1.4 – Структурная формула апигенина

Лютеолин – это кристаллический флавоон желтого цвета, относящийся к подклассу флавоноидов. Его формула $C_{15}H_{10}O_6$.

Лютеолин чаще всего обнаруживается в листьях, хотя его также можно найти в пыльце амброзии, коре и цветках. Сельдерей, брокколи, артишоки, зеленый перец, петрушка, тимьян, одуванчик, перилла и ромашка являются пищевыми источниками лютеолина [26].

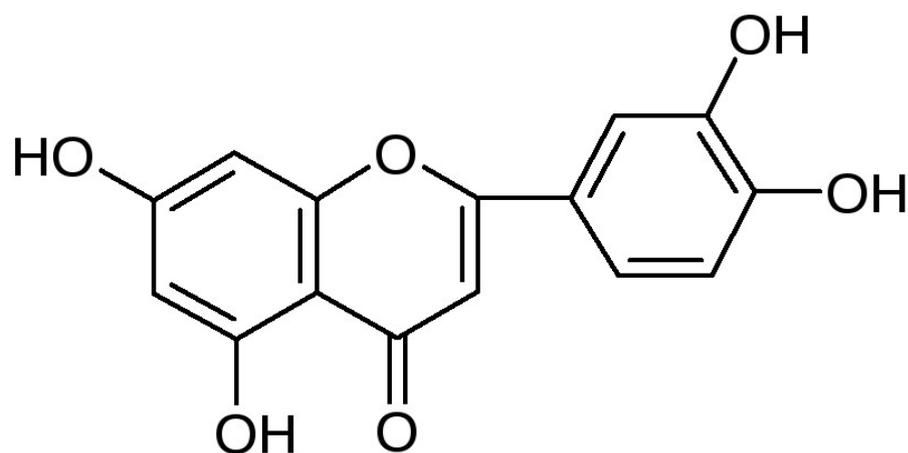


Рисунок 1.5 – Структурная формула лютеолина

Кверцетин – химическое вещество, относящееся к группе флавоноидов. Его формула $C_{15}H_{10}O_7$.

Обладает выраженной способностью ингибировать радикальные процессы в клетках. Однако совсем недавно было ясно продемонстрировано, что кверцетин может действовать как антиоксидант, так и как прооксидант в зависимости от его концентрации и источника радикалов. Кверцетин имеет три структурные группы, которые определяют его способность поглощать радикалы и/или антиоксидантный потенциал: катехольный фрагмент С-кольца, 2,3-двойная связь в сопряжении с 4-оксофункциональностью в А-кольце и 3- и 5-гидроксильные группы в В-кольце [26].

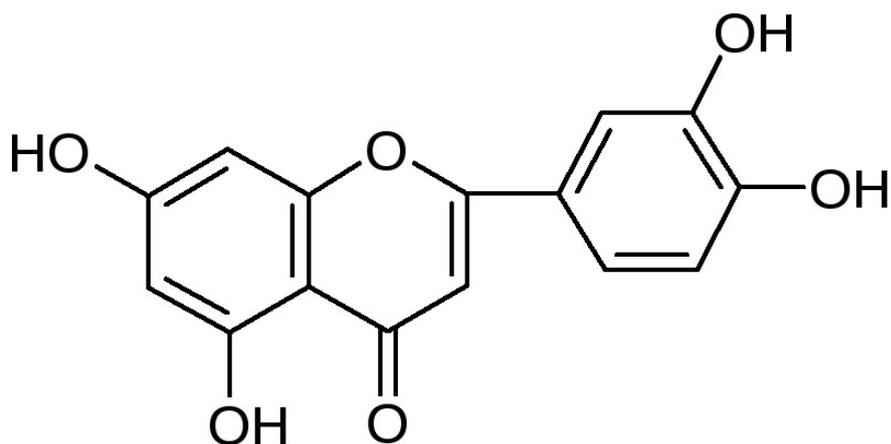


Рисунок 1.6 – Структурная формула кверцетина

1.7 Применение низкоинтенсивного лазерного излучения

Низкоуровневая лазерная терапия, также известная как низкоинтенсивное лазерное излучение, представляет собой вид фототерапии, который стимулирует клеточную активность с помощью маломощных лазеров или светоизлучающих диодов (LED). Красный или инфракрасный свет, излучаемый лазерами, может проходить через кожу и активировать ряд биологических процессов. Чаще всего физиотерапевтические лазеры имеют среднюю мощность от 1 до 100 мВт.

В отличие от других медицинских лазерных методов, НИЛИ использует фотохимический эффект, который подразумевает, что свет поглощается и приводит к химическим изменениям, а не к абляционному или тепловому механизму. Этот метод относится к низкоуровневым, поскольку он не идет ни в какое сравнение с другими видами лазерной терапии, используемыми для абляции, разрезания и термической коагуляции тканей, а также потому, что максимальные уровни плотности энергии минимальны.

Низкоинтенсивное лазерное излучение может оказывать различные эффекты при его воздействии на кожу или ткани, включая:

- 1) улучшение и ускорение клеточного метаболизма, это обусловлено способностью фотонов от лазеров стимулировать синтез АТФ;
- 2) лазеры обладают способностью стимулировать рост новых кровеносных сосудов, усиливать кровоток и повышать насыщение тканей кислородом;
- 3) уменьшение синтеза воспалительных цитокинов и усиление выработки противовоспалительных цитокинов;
- 4) лазеры могут стимулировать синтез коллагена, белка, необходимого для восстановления тканей, а также развития новых клеток;
- 5) анальгезирующее действие.

Показано, что низкоинтенсивное лазерное излучение оказывает значительное влияние на показатели антиоксидантной системы. Несколько исследований продемонстрировали, что низкоинтенсивное лазерное излучение может повышать активность ключевых антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза и каталаза. В дополнение к повышению активности антиоксидантных ферментов, было показано, что НИЛИ также повышает уровень неферментативных антиоксидантов, таких как глутатион и витамины С и Е [27].

Также после воздействия НИЛИ на ткани образуются активные формы кислорода (АФК), может ускоряться перенос электронов по всей дыхательной цепи, а защитные механизмы, снижающие избыточное образование АФК, могут изменяться [28].

В научных исследованиях НИЛИ часто используется для изучения воздействия фототерапии на клетки и ткани человека и животных. Он был изучен на предмет его потенциального терапевтического применения в широком спектре состояний, включая заживление ран, обезболивание, неврологические расстройства и дерматологические состояния.

Исследования показали, что НИЛИ может оказывать положительное влияние на функционирование клеток, способствуя более быстрому и эффективному заживлению поврежденных тканей и уменьшая воспаление. НИЛИ используется для лечения целого ряда состояний, включая боли в опорно-двигательном аппарате и кожные заболевания. Обычно это считается безопасным, неинвазивным и безболезненным методом с небольшим количеством побочных эффектов. Также известно, что воздействие лазерного излучения может быть как стимулирующим, так и подавляющим в зависимости от дозы [27].

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Схема проведения эксперимента

Работа была выполнена на беспородных белых крысах самцах, массой 400-500 г, находившихся на стандартном рационе вивария. Все эксперименты проводили в соответствии с этическими нормами обращения с животными и правилами проведения работ с использованием лабораторных животных в научных исследованиях.

Эксперимент проводили *in vitro*, использовали гомогенат печени крыс.

Было проведено выделение фенольной фракции из сухого сырья Ромашки аптечной фирмы ООО «НПК Биотест».

Проводили исследования эффектов фенольной фракции Ромашки аптечной на активность ферментов антиоксидантной системы печени крыс и состояние перекисного окисления липидов в следующих сериях опытов:

- Серия 1 – в интактном гомогенате печени крыс (контроль);
- Серия 2 – после внесения в гомогенат экстракта исследуемых; фенольных соединений (0,1 и 0,05 мкг/мл);
- Серия 3 – после облучения гомогената низкоинтенсивным лазерным излучением;
- Серия 4 – после лазерного облучения гомогената и внесения экстракта фенольных соединений (0,1 мкг/мл).

Исследования проводили через 20 минут после воздействия.

После внесения исследуемых веществ содержимое хорошо перемешивали и инкубировали при $t = 25^{\circ}\text{C}$. Исследования проводили через 20 мин после инкубации. Исследуемые концентрации фенольных соединений подобраны на основании ранее проведенных исследований на кафедре биохимии.

Для лазерного облучения использовали аппарат квантовой терапии «Витязь», «АКТ-01». Аппарат обеспечивает непрерывное излучение диода красного спектра с длиной волны $\lambda=650\pm 10$ нм и импульсное инфракрасное излучение диода с длиной волны $\lambda=850\pm 10$ нм, длительностью 40 мкс, частотой следования 12500 Гц, пиковой мощностью 10 мВт. Во время работы аппарата одновременно излучают оба лазерных диода суммарной средней мощностью 10 мВт.

Облучение 10% гомогената печени (объем 3 мл, толщина слоя 0,8 см) осуществляли в течение 9 мин в автоматическом режиме: 3 мин облучение, 10 сек, пауза и еще 2 раза в таком режиме. Площадь облучаемого участка $S\approx 1$

см², расстояние до поверхности облучаемого объекта 0,5 см. На 9-й мин воздействия повышение температуры в области воздействия не превышала + 0,1 °С.

2.2 Выделение фенольных соединений

Навеску (5 грамм) сухих листьев ромашки растерли в ступке, понемногу добавляя 70% этанол до конечного объёма 50 мл. Затем полученную смесь перенесли в стакан на 100 мл и выдерживали в термостате (на водяной бане) 40°С – 20 мин., периодически помешивая. Полученный спиртовой экстракт аккуратно перелили в мерный цилиндр на 100 мл.

К оставшемуся растительному остатку добавили 50 мл 70% этанола и повторили процедуру экстракции в термостате. Второй экстракт добавили к первому, остудили до комнатной температуры и довели объем до 100 мл 70% этанолом.

Затем определяли концентрацию полифенольных соединений в экстракте модифицированным методом Фолина-Чокальтеу.

2.3 Получение водной фракции фенолов суспензионной культуры Ромашки аптечной

Водную фенольную фракцию Ромашки аптечной готовили из ранее приготовленной нами этаноловой фракции. Для этого из 50 мл исходной этаноловой фракции выпариванием на водяной бане удаляли этанол, затем после остывания объем экстракта довели дистиллированной H₂O до 50 мл. В полученном водном экстракте содержание полифенолов совпадало с содержанием в спиртовой фракции в пересчете на галловую кислоту.

2.4 Определение концентрации полифенольных соединений в экстракте Ромашки аптечной модифицированным методом Фолина-Чокальтеу [29]

Принцип метода:

Полифенольные соединения окисляются реактивом Фолина-Чокальтеу, состоящим из смеси фосфорно-вольфрамовой (H₃PW₁₂CO₄₀) и фосфорно-молибденовой (H₃PMo₁₂O₄₀) кислот, при этом реактив восстанавливается в смесь оксидов вольфрама и молибдена голубого цвета. Оптическая плотность при 765 нм пропорциональна содержанию фенольных соединений. В качестве стандарта используют галловую кислоту.

Реактивы:

1. Реактив Фолина-Чокальтеу, разбавленный в 10 раз.
2. 7,5% раствор карбоната натрия.
3. Раствор галловой кислоты (1 мг/мл).

Подготовка к выполнению измерений.

Приготовление стандартных растворов галловой кислоты.

Стандартные растворы галловой кислоты готовить согласно схеме, представленной в таблице 2.1.1.

Таблица 2.2.1 – Схема внесения реагентов

№ пробирки	1	2	3	4	5
Основной раствор галловой кислоты, мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Дистиллированная вода, мл	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5

Подготовка проб для анализа.

Экстракт ромашки развели дистиллированной водой в 10 раз.

Проведение анализа.

Все реагенты вносили в пробирки согласно схеме, представленной в таблице 2.2.2

Таблица 2.2.2 – Схема внесения реагентов

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	Примечание
Соответствующий стандартный раствор галловой кислоты, мл (по таблице 1)	Градуировочный график					-	-
	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2		
Определение концентрации фенолов в экстракте ромашки, разведенном в 5 раз, мл	-	-	-	-	-	0,2	-
Разбавленный раствор Фолина-Чокальтеу, мл	1	1	1	1	1	1	Инкубировать 3-8 минут
7,5% раствор Na ₂ CO ₃ , мл	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	Инкубировать 1 час в тёмном месте

Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре Solar PV 1251С в кювете толщиной 1 см при длине волны 765 нм. В качестве раствора сравнения использовали H₂O дист. [30-32].

По полученным данным построили градуировочную кривую, откладывая по оси абсцисс массовую концентрацию галловой кислоты, а по оси ординат оптическую плотность.

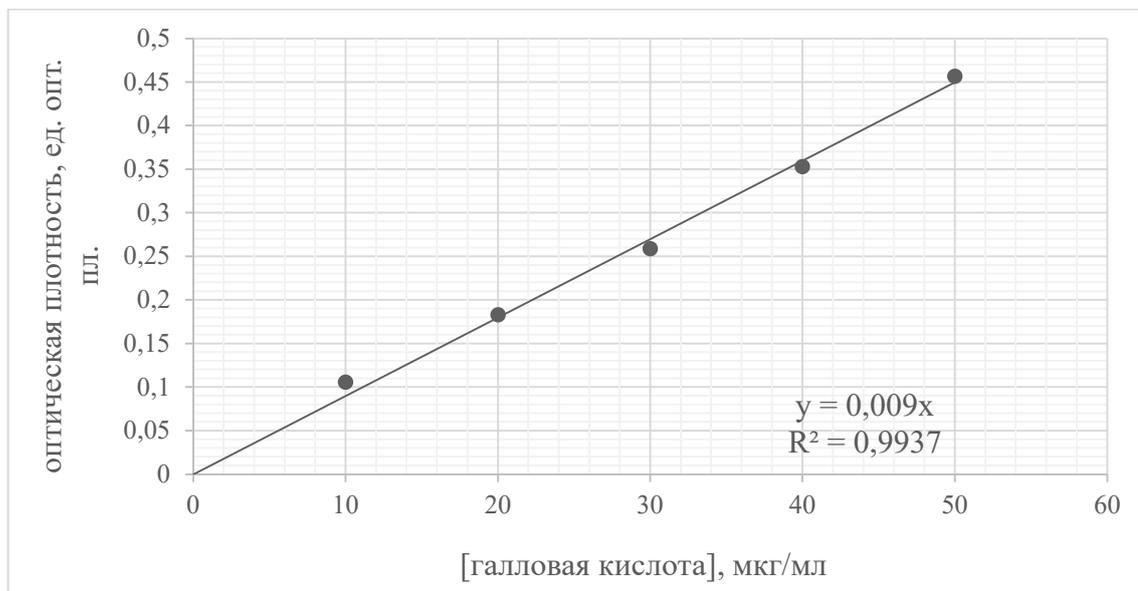


Рисунок 2.1 – Градуировочный график для определения концентрации фенольных соединений

Вычисление результатов определения.

Массовую концентрацию полифенолов определили по градуировочной кривой. Полученный результат умножили на 10, чтобы учесть разведение исходного экстракта.

Исследование провели в 5-х повторах.

2.5 Получение гомогената печени крыс

Извлекали печень подопытных животных. Изолированную печень два раза промывали в 0,1 моль/л фосфатном буфере рН 7,4. Ткань измельчали ножницами в чашке Петри, стоящей на льду, делали навеску 1 г. Гомогенизацию проводили в гомогенизаторе Поттера с притертым тефлоновым пестиком, предварительно добавив 4 мл на 0,1 моль/л фосфатном буфере рН 7,4 и ещё 5 мл через 30 секунд. Затем полученный гомогенат фильтровали через марлю.

Концентрацию белка в гомогенате определяли по методу Петерсона.

2.6 Определение концентрации белка по методу Петерсона [33]

Принцип метода: метод основан на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи.

Реактивы:

1. Раствор сывороточного альбумина, содержащий 100 мкг белка в 1 мл,
2. СТС реактив: 0,1% раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,2% раствор натрия-калия виннокислого, 10% раствор Na_2CO_3
3. 5% раствор додецилсульфата натрия (SDS)
4. 2N реактив Фолина-Чокальтеу
5. Раствор NaOH (0,8 моль/л)

Подготовка к выполнению измерений.

Реагент А: 1 часть СТС-реактива + 1 часть раствора NaOH + 2 части раствора SDS.

Реагент В: 1 часть реактива Фолина-Чокальтеу + 5 частей дистиллированной воды.

Ход работы:

Для построения калибровочного графика готовили шесть стандартных растворов согласно схеме 2.3.

Таблица 2.3 – Схема приготовления стандартных растворов

№ пробирки	1	2	3	4	5	6
Содержание белка, мкг/мл	10	20	40	60	80	100
Объём стокового раствора альбумина (100 мкг/мл), мл	0,4	0,8	1,6	2,4	3,2	4
H_2O , мл	3,6	3,2	2,4	1,6	0,8	0

К 1 мл стандартного раствора исследуемого раствора прилили 1 мл реагента А, перемешали и оставили при комнатной температуре на 10 мин. Затем в пробирку с реакционной смесью добавили 0,5 мл реактива В, тщательно перемешали и через 30 минут определили оптическую плотность раствора 670 нм.

Содержание белка в исследуемых растворах рассчитывали по калибровочному графику.

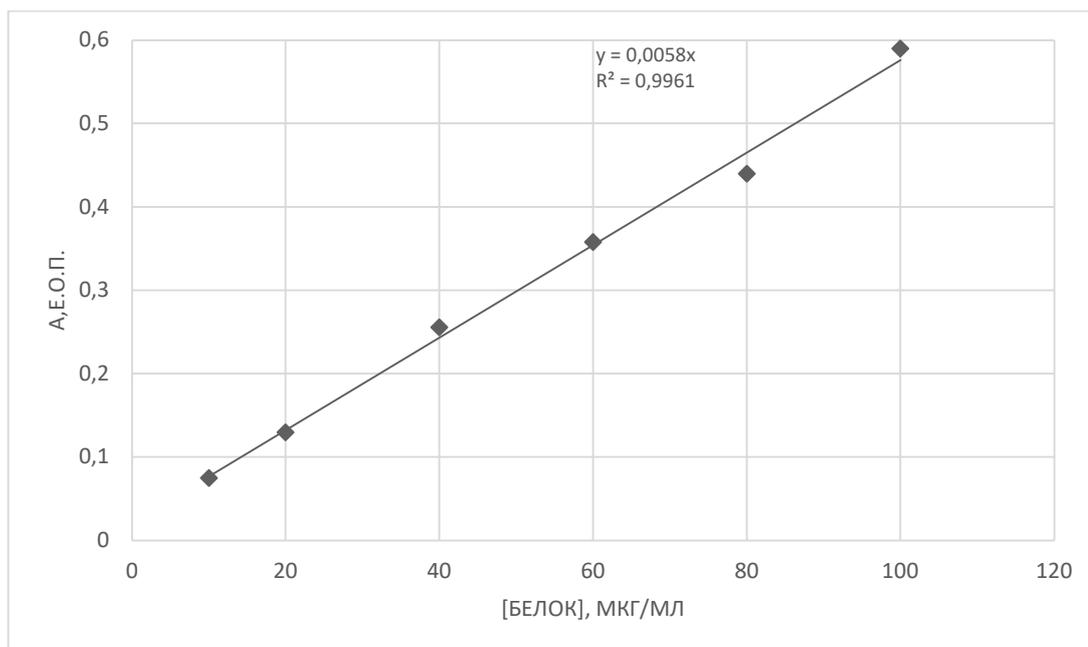


Рисунок 2.2 – Градуировочной график для определения концентрации белка

2.7 Определение активности каталазы [34]

Принцип метода: метод основан на измерении уменьшения величины оптической плотности инкубационной смеси, вызванного разложением каталазой пероксида водорода, имеющего максимум поглощения при 240 нм.

Ход работы: В кварцевую кювету (1 см) вносили 2,7 мл гомогената ткани, разведенного в 200 раз 0,05 моль/л натрий-фосфатным буфером (рН 7,0). Реакцию начинали добавлением 0,3 мл 0,2 моль/л раствора H_2O_2 и следили за поглощением при длине волны $\lambda = 240$ нм в течении 30 с при комнатной температуре, так как скорость разложения H_2O_2 каталазой мало зависит от температуры.

Определяли содержание белка методом Петерсона. Активность фермента рассчитывают по формуле:

$$\text{Активность (моль/мг белка)} = \frac{A}{\varepsilon \cdot l \cdot n},$$

где $A = E_2 - E_1$ (разница плотностей поглощения за 30 с); ε – коэффициент молярной экстинкции H_2O_2 – $43,6 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; l – длина кюветы 1 см; n – концентрация белка в 2,7 мл разведенного гомогената (в мг) [35].

2.8 Определение интенсивности накопления активных продуктов тиобарбитуровой кислоты [36]

Принцип метода: об интенсивности процессов ПОЛ косвенно можно судить по количеству ТБК-активных продуктов. Первичные продукты ПОЛ (гидроперекиси липидов) нестойкие и довольно быстро разрушаются с образованием вторичных продуктов ПОЛ, таких как альдегидов, кетонов, спиртов, эпоксидов. Среди них основным компонентом группы ТБК-активных веществ, которые взаимодействуют с тиобарбитуровой кислотой, является малоновый диальдегид.

Этот тест является неспецифическим и основан на образовании окрашенного комплекса при взаимодействии малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой.

Ход работы:

К 1 мл 10 % гомогената добавляли 1мл 0,1 моль/л Na-фосфатного буфера (рН 7,4), 0,5 мл 30 % раствора ТХУ, 2 мл 0,8 % раствора ТБК. Пробы помещали на 15 мин в кипящую водную баню, выпавший в осадок белок отделяли центрифугированием в течении 10 мин при 1500-3000 об/мин. (Следили, чтобы вода сильно не кипела и не произошло выпаривания. Пробирки прикрыли фольгой).

Полученный супернатант спектрофотометрировали при длине волны λ – 532 нм, против смеси реактивов (2 мл фосфатного буфера рН 7,4, 0,5 мл 30 % раствора ТХУ, 2 мл 0,8 % раствора ТБК).

По величине оптической плотности рассчитывали содержание ТБК-активных продуктов по формуле:

$$\text{Концентрация (моль/мг белка)} = \frac{A}{\varepsilon \cdot l \cdot n},$$

где А – оптическая плотность $\lambda = 532$ нм, Е – коэффициент молярной экстинкции тиобарбитуровой кислоты, $\varepsilon = 1,56 \cdot 10^5$ моль⁻¹см⁻¹, l – ширина кюветы (1 см), n – концентрация белка в пробе в мг (в 1 мл разведенного гомогената).

2.9 Определение активности супероксиддисмутазы

Принцип метода: метод основан на установлении степени торможения реакции окисления кверцетина супероксиддисмутазой.

Для определения активности СОД исследуемый гомогенат печени разводили 0,1 моль/л фосфатным буфером рН 7,8 в 500 раз. Далее проводили определение по методике.

Ход работы:

Для опытной пробы в пробирку помещают 0,5 мл фосфатного буфера рН 7,8; 0,5 мл раствора ТМЭД; 0,1 мл в 500 раз разведенного гомогената ткани. Включают спектрофотометр и настраивают на длину волны λ - 406 нм (лампа накаливания, щель 0,15 нм). Содержимое пробирки переливают в кювету, добавляют 0,1 мл кверцетина и через 20 минут, определяют разницу между вторым и первым определением – это D опытной пробы. Для приготовления используют те же реактивы, что и для опытной, однако вместо гомогената приливают 0,1 мл 0,015 моль/л фосфатного буфера рН 7,8. Далее проводят определение D контрольной пробы так же, как описано для опытной пробы.

Степень ингибирования реакции автоокисления кверцетина определяют по формуле:

$$\text{Активность (у.е./ мг белка)} = \frac{(\Delta D_k - \Delta D_o)}{\Delta D_k * n}$$

Где ΔD_k - разница между определениями для контрольной пробы, ΔD_o - разница между определениями для опытной пробы; n – концентрация белка в пробе, 1 у.е. соответствует 50% торможения активности СОД [37].

2.10 Статистическая обработка данных

Для обработки полученных результатов использовалась программа Microsoft Office Excel 2010. В сериях опытов подсчитывали среднее арифметическое (X), стандартную ошибку среднего арифметического ($\pm S_x$) и нормированное отклонение (критерий значимости t). Оценивая результаты опытных серий, считали удовлетворительной достоверность отклонений при уровне значимости $p \leq 0,05$. Коэффициент достоверности находили по таблице Стьюдента, так как в эксперименте количество опытов было меньше 30.

Для серии из 5 определений $t_{0,05} \geq 2,78$ – достоверно.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований было выявлено, что концентрация фенольных соединений в сухом сырье Ромашки аптечной фирмы ООО «НПК Биотест» составляет 5,13 мг/г.

Как известно из литературы экстракт цветков Ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla*) обладает умеренной антиоксидантной и противомикробной активностью, а также значительной антитромбоцитарной активностью *in vitro*. Антиоксидантный механизм экстракта ромашки включает в себя ряд сложных химических реакций, которые удаляют свободные радикалы и предотвращают окислительное повреждение. Антиоксидантную активность оценивали методом спектроскопии электронного спинового резонанса (ЭПР) для этаноловых экстрактов, полученных ультразвуком из нативных и ферментированных образцов. Антиоксидантную активность оценивали для двух различных видов свободных радикалов: гидроксильного радикала и супероксидно-анионного радикала. Способность экстрактов ингибировать гидроксильные радикалы может быть объяснена прямым поглощающим действием и/или ингибированием образования гидроксильных радикалов. Второй механизм реализуется путем хелатирования ионов [38].

Основными компонентами растения являются несколько фенольных соединений, в первую очередь флавоноиды апигенин, кверцетин, патулетин, лютеолин и их глюкозиды. Кверцетин активирует антиоксидантные ферменты и индуцирует их экспрессию, чтобы подавить или предотвратить окислительный стресс. Апигенин относится к структурному классу флавонов и демонстрирует выраженную ингибирующую активность образования АФК [38].

В настоящей работе мы провели исследование антиоксидантной активности в печени крыс при действии фенольной фракции Ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla*) в сочетании с низкоинтенсивным лазерным излучением. Данное исследование выполнено *in vitro* на 10 % гомогенате печени крыс. Для изучения изменений биохимических показателей, происходящих при действии низкоинтенсивного лазерного облучения и водного экстракта фенольных соединений Ромашки аптечной, в качестве тестов были использованы – определение активности СОД и каталазы, а также определение концентрации ТБК-активных продуктов.

В таблице 3.1 представлены данные определения активности каталазы в гомогенате печени крыс при добавлении фенольной фракции Ромашки

аптечной. Как видно, добавление фенолов исследуемого растения в концентрации 0,05 мкг/мл и 0,1 мкг/мл гомогената снижают скорость разложения пероксида водорода на 27,4 % и 33 % соответственно.

Эти результаты не противоречат данным, представленным в работе [39] и показавшим, что фенолы ромашки при внутрибрюшинном введении крысам вызывают понижение активности фермента в печени на 18 %.

Таблица 3.1 – Активность каталазы (мкмоль/мг белка в мин) при добавлении в гомогенат печени крыс фенольной фракции Ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla*)

Серии опытов	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	% к контролю	$t_{0,05}$
Интактный гомогенат (контроль)	0,147 ± 0,02	100	-
Добавление фенольной фракции в концентрации 0,05 мкг/мл	0,135 ± 0,007	72,6	5,0*
Добавление фенольной фракции в концентрации 0,1 мкг/мл	0,124 ± 0,009	67	7,3*

* - изменения достоверны при $p \leq 0,05$.

Как видно из наших результатов, представленных в таблице 3.2, воздействие на гомогенат непрерывного излучения диодов красного и импульсного инфракрасного излучения, генерируемого аппаратом квантовой терапии «Витязь», достоверно повышает активность каталазы на 121,3 %. При добавлении фенольной фракции ромашки в гомогенат печени и лазерном облучении активность фермента остается выше на 57,1 % по отношению к контролю, а в сравнении показателем при лазерном воздействии она снижается на 64,2 %.

Таблица 3.2 – Активность каталазы (мкмоль/мг белка в мин) в гомогенате печени крыс при действии фенольной фракции Ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla*) и лазерном облучения

Серии опытов	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	% к контролю	$t_{0,05}$
Интактный гомогенат (контроль)	9,16 ± 0,06	100	-
Лазерное облучение	20,3 ± 0,1	221,3	29,5*
Добавление фенольной фракции в концентрации 0,1 мкг/мл и лазерное облучение	14,4 ± 0,06	157,1	6,8*

* - изменения достоверны при $p \leq 0,05$.

В работе [40] при изучении влияния фенольных соединений брусники и бессмертника также показано, что они активируют каталазу, и степень изменений выше при введении фенолов брусники. При совместном действии с лазерным излучением фенолы этих растений ослабляют, но полностью не нормализуют эффекты лазерного излучения на изучаемый фермент. Наши результаты согласуются с данными, представленными в этой работе.

Как видно из наших опытов, представленных в таблице 3.3, добавление к гомогенату печени водного экстракта фенолов Ромашки аптечной в концентрации 0,05 мкг/мл понижает концентрацию ТБК-активных продуктов на 16,9 %, а в концентрации 0,1 мкг/мл – на 60,2 %.

Таблица 3.3 – Концентрация ТБК-активных продуктов (нмоль/мг белка) при добавлении в гомогенат печени крыс фенольной фракции Ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla*)

Серии опытов	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	% к контролю	$t_{0,05}$
Интактный гомогенат (контроль)	0,17 ± 0,02	100	-
Добавление фенольной фракции в концентрации 0,05 мкг/мл	0,14 ± 0,06	83,1	3,1
Добавление фенольной фракции в концентрации 0,1 мкг/мл	0,07 ± 0,003	39,8	10,4*
* - изменения достоверны при $p \leq 0,05$.			

Изучение влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на концентрацию ТБК-активных продуктов (табл. 3.4) показало, что лазерное облучение гомогената печени повышает концентрацию ТБК-продуктов на 164,3 %. Это можно объяснить тем, что при воздействии низкоинтенсивного лазерного излучения на органы и ткани, в клетках ускоряется перенос электронов по дыхательной цепи, вырабатываются активные формы кислорода, изменяются защитные механизмы, противодействующие избыточной продукции АФК [28].

Фенолы Ромашки аптечной (табл. 3.4) тормозят процессы ПОЛ в печени крыс, так как при их добавлении в гомогенат в сочетании с лазерным воздействием концентрация ТБК-активных продуктов снижается на 26,6 % по отношению к контролю и на 191,3 % по отношению к изменениям, вызванным лазерным излучением.

Таблица 3.4 – Концентрация ТБК-активных продуктов (нмоль/мг белка) в гомогенате печени крыс при действии фенольной фракции Ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla*) и лазерном облучении

Серии опытов	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	% к контролю	$t_{0,05}$
Интактный гомогенат (контроль)	0,83 ± 0,02	100	-
Лазерное облучение	2,19 ± 0,03	264,3	10,3*
Добавление фенольной фракции в концентрации 0,1 мкг/мл и лазерное облучение	0,61 ± 0,004	73,4	4,8*
* - изменения достоверны при $p \leq 0,05$.			

По данным литературы нам известно, что введение экстракта ромашки оказывает выраженное антиоксидантное действие. Это подтверждается результатами опытов, проведенных *in vivo* и показавшими снижение концентрации ТБК-активных продуктов на 30 % [39].

Как видно из данных в таблице 3.5 фенольные соединения Ромашки аптечной при добавлении в исследуемых концентрациях к гомогенату печени крыс достоверно не изменяют активности СОД. В то же время можно отметить, что при их внесении в концентрации 0,1 мкг/мл активность фермента проявляет тенденцию к снижению.

Таблица 3.5 – Активность СОД (у.е./мин/мг белка) при добавлении в гомогенат печени крыс фенольной фракции Ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla*)

Серии опытов	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	% к контролю	$t_{0,05}$
Интактный гомогенат (контроль)	37,9 ± 1,9	100	-
Добавление фенольной фракции в концентрации 0,05 мкг/мл	35,5 ± 1,58	93,5	1,3
Добавление фенольной фракции в концентрации 0,1 мкг/мл	32,6 ± 1,47	85,9	1,19
* - изменения достоверны при $p \leq 0,05$.			

В результате проведенных нами исследований (табл. 3.6) показано, что лазерное излучение, генерируемое аппаратом «Витязь», при действии на гомогенат печени крыс понижает активность СОД на 25,6 %. Фенольные соединения ромашки при их добавлении в сочетании с лазерным облучением, снижают активность фермента на 35,2 % по отношению контролю, но частично нормализуют изменения ее активности,

инициированные облучением, так как уменьшают активность фермента при расчете к показателю, полученному при действии лазерного излучения на 13,2 %.

Таблица 3.6 – Активность СОД (у.е./мин/мг белка) в гомогенате печени крыс при действии фенольной фракции Ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla*) и лазерном облучении

Серии опытов	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	% к контролю	$t_{0,05}$
Интактный гомогенат (контроль)	37,9 ± 1,9	100	-
Лазерное облучение	28,3 ± 1,08	74,6	4,9*
Добавление фенольной фракции в концентрации 0,1 мкг/мл и лазерное облучение	24,6 ± 1,13	64,8	5,9*
* - изменения достоверны при $p \leq 0,05$.			

Данные, представленные в работах [41, 42] показали, что низкоинтенсивное лазерное облучение при воздействии на биологически активные точки и область печени крыс незначительно повышают активность СОД и каталазы. При этом концентрация малонового диальдегида в этом органе в зависимости от дозы и длительности воздействия достоверно возрастает на 35-55 %.

Результаты исследований, представленные в работе [28] указывают на то, что лазерное излучение красной и инфракрасной области спектра может стимулировать запуск антиоксидантной системы организма, так как его акцепторами являются различные ферменты антиоксидантной системы, в том числе СОД и каталаза, содержащие в активном центре ионы металлов, за счет которых и являются первичными приемниками светового излучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов было показано, что концентрация фенольных соединений в Ромашке аптечной производства фирмы ООО «НПК Биотест» составляет 5,13 мг/г сухого сырья.

Установлено, что фенольные фракции Ромашки аптечной при внесении их в 10 % гомогенат печени крыс в концентрациях 0,05 и 0,1 мкг/мл снижают активность каталазы на 27,4 % и 33 % и концентрацию ТБК-активных продуктов – на 16,9 % и 60,2 % соответственно, но практически не влияют на активность СОД.

Показано, что воздействие на гомогенат печени крыс непрерывного лазерного излучения, генерируемого аппаратом квантовой терапии «Витязь», в течение 9-ти мин. достоверно повышает активность каталазы на 121,3 % и концентрацию ТБК-активных продуктов – на 164 %, но снижает активность СОД на 25,6 %.

Установлено, что фенолы Ромашки аптечной ослабляют эффекты лазерного излучения на активность ферментов антиоксидантной защиты и процессы перекисного окисления липидов. Это подтверждается тем, что при добавлении фенольной фракции Ромашки аптечной в концентрации 0,1 мг/мл в гомогенат печени крыс в сочетании с лазерным облучением активность каталазы снижается на 64,2 %, а концентрация ТБК-активных продуктов – на 191,3 % по отношению к изменениям, вызванным лазерным излучением соответственно. Фенольные соединения ромашки при их добавлении в сочетании с лазерным облучением частично уменьшают изменения активности СОД, инициированные облучением.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Storz, G., & Imlay, J. A. (1999). Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, 2(2), 188–194.
2. Aruoma O, Halliwell B: *Molecular Biology of Free Radicals in Human Diseases*. Saint Lucia: OICA International; 1998.
3. Gonzalez-Flecha B, Demple B: Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1995, 270:13681-13687.
4. Shinde A. et al. Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: a review // *Journal of Dental and Allied Sciences*. – 2012. – Т. 1. – №. 2. – С. 63.
5. Velavan Sivanandham. Free radicals in health and diseases *Pharmacology online* 2011:1062-1077.
6. Gowri Pendyala, Biju Thomas and Suchetha Kumari. The challenge of antioxidants to free radicals in periodontitis. *J Indian Soc Periodontol* 2008; 12(3):79-83. 16.
7. Alok Sharma, Swati Sharma. ROS and Antioxidants in periodontics: A Review. *Inter J Dent Clin* 2011; 3(2):44-47. 17.
8. Diplock AT, Rice-Evans AC, Burton RY et al. Is there a significant role of lipid peroxidation in the causation of malignancy and for antioxidants in cancer prevention? *Cancer Res* 1994; 54:19525-65.
9. Subash Vijaykumar, Saritha G, Fareedulla Md. Role of antioxidants and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Annals of biomedical Res* 2010 ;(3):158-173.
10. Deyashi M., Chakraborty S. B. Pesticide induced oxidative stress and the role of antioxidant defense system in animal body // *Harvest*. – 2016. – Т. 2. – С. 1-14.
11. Kivrak, E., Yurt, K., Kaplan, A., Alkan, I., & Altun, G. (2017). Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 5(4), 167.
12. Halliwell B., Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance // *The American journal of clinical nutrition*. – 1993. – Т. 57. – №. 5. – С. 715S-725S.
13. Биохимия мембран: метод. пособие к лабораторным занятиям для студентов биологического факультета спец. 1 -31 01 01 Биология /авт.-сост. Н.М Орел. – Мн.: БГУ, 2010. – 28с.
14. Mukhammadieva Mashkhura Mustafakulovna, & Saidova Maftuna Kurbonaliyeva. (2022). PHARMACOLOGICAL ACTION OF THE COMPONENTS OF CHAMOMILE PHARMACY AND ITS USE IN COSMETICS. *World Bulletin of Public Health*, 17, 90-93.

15. Pamukov D, Achtardziev CH. Natural pharmacy (in Slova). 1st ed. Bratislava: Priroda; 1986.
16. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview / O. Singh [et al.] // *Phcog Rev.* – 2011. – Vol. 5, № 9. – P. 82.
17. Schilcher H, Kamille D. Handbuch fur arzte, apotheker und andere naturwissenschaftler. 1st ed. Germany: Wissenschaft Verlagsgesellschaft. Stuttgart; 1987.
18. Kanamori H, Terauchi M, Fuse JI, Sakamoto I. Simultaneous and quantitative analysis of glycoside. *Shoyakugaku Zasshi* 1993; 47:34-8.
19. Косман В.М. Сравнительное изучение содержания флавоноидов и кумаринов в некоторых препаратах ромашки аптечной /В.М. Косман, О.Н. Пожарицкая, А.Н. Шиков, В.Г. Макаров //Химия растительного сырья. – 2015. – №1. – С. 107-112.
20. Mann C, Staba EJ. The chemistry, pharmacology and commercial formulations of chamomile. In: Craker LE, Simon JE, editors. *Herbs, Spices and Medicinal Plants- Recent Advances in Botany, Horticulture and Pharmacology.* Phoenix: Oryx Pres; 1986. p. 235-80.
21. Duke JA. *CRC handbook of medicinal herbs.* 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 1985. p. 297-414.
22. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview / O. Singh [et al.] // *Phcog Rev.* – 2011. – Vol. 5, № 9. – P. 82.
23. Repčák M., Imrich J., Franeková M. Umbelliferone, a stress metabolite of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert // *Journal of plant physiology.* – 2001. – Т. 158. – №. 8. – С. 1085-1087.
24. Liang N., Kitts D. D. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions // *Nutrients.* – 2015. – Т. 8. – №. 1. – С. 16.
25. Ali F. et al. Health functionality of apigenin: A review // *International Journal of Food Properties.* – 2017. – Т. 20. – №. 6. – С. 1197-1238.
26. Fiorucci S. et al. Oxygenolysis of flavonoid compounds: DFT description of the mechanism for quercetin // *ChemPhysChem.* – 2004. – Т. 5. – №. 11. – С. 1726-1733.
27. Farivar S., Malekshahabi T., Shiari R. Biological effects of low level laser therapy // *Journal of lasers in medical sciences.* – 2014. – Т. 5. – №. 2. – С. 58.
28. Улащик В.С. Активные формы кислорода, антиоксиданты и действие лечебных физических факторов. // *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры.* – 2013.– № 1.–С. 60-70.
29. Денисенко, Т.А. Особенности взаимодействия 18-молибдодифосфата и реактива Фолина-Чокальтеу с фенольными

соединениями / Т.А. Денисенко, А.Б. Вишникин // Аналитика И Контроль. – 2015. – Т. 19, № 3. – С. 242-251.

30. Middleton, E.Jr. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer / E.Jr. Middleton, C. Kandaswami, T.C. Theoharides // Pharmacol Rev. – 2000, № 52. – С. 673-751.

31. Полифенольные растительные экстракты: влияние на нарушения углеводного обмена у лабораторных грызунов / В.К. Мазо [и др.].

32. Harborne, J.B. The Flavonoids: recent advances / J.B. Harborne // Plant Pigments. – 1988 – С. 299-343.

33. Paterson, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al/ which is more generally applicable / G.L. Paterson // Anal Biochem. – 1977. – Т. 83, № 2. – С. 346-356.

34. Полифенольные растительные экстракты: влияние на нарушения углеводного обмена у лабораторных грызунов / В.К. Мазо [и др.].

35. Северин, С.Е. Практикум по биохимии / С.Е. Северин, Г.Л. Соловьев. – Москва, 1989. – 509 с.

36. Стальная, И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Современные Методы В Биохимии. – 1977 – С. 66-68.

37. Костюк, В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы основаны на реакции окисления кварцетина // Вопросы мед. Химии. – 1990. - т.36, №2 – с. 88-91

38. Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Zeković, Z., Savić, S., Vulić, J., Mašković, P., & Četković, G. (2015). Comparative analysis of antioxidant, antimicrobiological and cytotoxic activities of native and fermented chamomile ligulate flower extracts. *Planta*, 242(3), 721–732.

39. Jabri M. A. et al. Protective effect of chamomile (*Matricaria recutita* L.) decoction extract against alcohol-induced injury in rat gastric mucosa //Pathophysiology. – 2017. – Т. 24. – №. 1. – С. 1-8.

40. Орёл Н.М. Состояние антиоксидантной активности и процессов перекисного окисления липидов в печени крыс при действии лазерного излучения в сочетании с фенолами растительного происхождения в опытах *in vitro* / Н.М. Орёл, А.М. Лисенкова, А.М. Братченя, Д.А. Жолудева //Лазерно-информационные технологии: труды XXX Международной научной конференции 12-17 сентября 2022 г.; г. Новороссийск Краснодарский край/ под редакцией профессора В.Е. Привалова. – Новороссийск: НФ ФГБОУ ВО «Белгородский государственный технологический университет им. В.Г. Шухова», 2022. – С. 36-38.

41. Орёл Н.М. Использование лазерного воздействия на биологически активные точки для коррекции патологий печени /Н.М. Орёл, А.М. Лисенкова, Т.А. Железнякова, И.А. Кобак //Лазеры. Измерения. Информация: Сб. науч. статей международной конф., Санкт-Петербург, 9 июня 2014 г. / С.-Пб. Гос. политехн. ун-т. – С.-Пб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2014. – С 43-44.

42. Орёл Н.М. Перспективы использования лазерных технологий воздействия на биологически активные точки для коррекции нарушений метаболизма при экспериментальных патологиях печени /Н.М. Орёл, А.М. Лисенкова, Т.А. Железнякова, И.А. Кобак // Вестник БГУ, серия 1. – № 2. Мн.: БГУ, 2014. – С. 33-39.