

*ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ*

УДК 577.3

**ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ КРОВИ У САМОК КРЫС ПРИ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ЭСТРОГЕНОВ****Н.С. Кудинов, С.В. Гаташ, О.А. Горобченко, О.Т. Николов, Н.И. Горбенко\****Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, г. Харьков, 61077**\*ГУ "Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины",**ул. Артема, 10, г. Харьков, 61002**e-mail: nikita.kudinov@gmail.com*

Поступила в редакцию 10 ноября 2008 года.

Принята 24 ноября 2008 г.

Инсулинорезистентность и гиперинсулинемия принадлежат к характерным признакам не только сахарного диабета 2 типа и ожирения, но также присутствуют при гиперлипидемии, атеросклерозе и процессах старения. Фармакотерапия метаболического синдрома должна быть направлена на повышение чувствительности тканей к инсулину, т.к. инсулинорезистентность является важнейшей его составляющей. В настоящее время проводятся исследования фармакологических агентов, в частности относящихся к классу флавоноидов, с целью использования их при лечении сахарного диабета и метаболического синдрома. Кверцетин, как представитель данного класса препаратов представляет интерес в качестве потенциального фармакологического агента. Доклиническое изучение препаратов удобно проводить на экспериментальных моделях заболевания у крыс. Хроническое введение сахарозы овариэктомизированным крысам способствует развитию инсулинорезистентности, гипертриглицеринемии, оксидативного стресса, т.е. позволяет воссоздать основные признаки постменопаузального метаболического синдрома человека, что и было использовано в данной работе для создания экспериментальной модели метаболического синдрома. Исследование влияния препарата, содержащего кверцетин, на агрегацию тромбоцитов крови проводили на экспериментальной модели метаболического синдрома у крыс массой 290-300 г популяции Вистар. В качестве показателей характера влияния препарата кверцетина на протекание заболевания были взяты прирост массы тела, прирост массы матки крыс, степень и скорость агрегации тромбоцитов, а также диэлектрическая проницаемость обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) крови крыс. Измерения степени и скорости агрегации тромбоцитов проводили методом фотоэлектроколориметрии. Действительную ( $\epsilon'$ ) часть комплексной диэлектрической проницаемости ОТП измеряли на СВЧ-диэлектрометре резонаторного типа на частоте 9,2 ГГц. В результате проведения исследования было выявлено, что овариэктомия даже при условии стандартной диеты приводит к повышению скорости АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Установлено, что при инсулинорезистентности имеет место понижение диэлектрической проницаемости ОТП, что является результатом увеличения количества тромбоцитов в крови. Применение исследуемого препарата дозой 10 мг/кг не влияло как на скорость, так и на степень АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. В то же время, у животных, которые получали препарат в количестве 50 мг/кг, наблюдалась нормализация этих показателей.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** обогащенная тромбоцитами плазма, агрегация тромбоцитов, фотоэлектроколориметрия, инсулинорезистентность, диэлектрическая проницаемость, СВЧ-диэлектрометрия.

Известно, что инсулинорезистентность и гиперинсулинемия принадлежат к характерным признакам не только сахарного диабета 2 типа и ожирения, но также присутствуют при гиперлипидемии, атеросклерозе и процессах старения [1, 2]. Принимая во внимание ведущую роль инсулинорезистентности в обсуждении компонентов метаболического синдрома, его фармакотерапия должна быть направлена на повышение чувствительности тканей к инсулину.

В настоящее время проводятся исследования фармакологических агентов, в частности относящихся к классу флавоноидов, с целью использования их при лечении таких широко распространенных заболеваний, как сахарный диабет и метаболический

синдром [3-8]. Кверцетин, как представитель данного класса препаратов, широко исследуется на предмет его влияния на организм подопытных крыс с моделью метаболического синдрома [9-17]. Кверцетин — мощный антиоксидант, который присутствует в растениях в виде гликозидов, одним из которых является рутин [18, 19]. Установлено, что кверцетин оказывает множество положительных эффектов на организм, включая защитное действие на сердечно-сосудистую систему, противоопухолевый, противовоспалительный и антиаллергический эффекты, противовирусную активность и противовоспалительное действие [18]. Его антиоксидантное действие обуславливается способностью «гасить» образующиеся в результате перекисного окисления свободные радикалы. Он устраняет продукты перекисного окисления липидов, защищает липидный слой клеточных мембран от повреждения, причем блокирование свободнорадикальной липопероксидации связано не только со структурными особенностями препарата, но и с его способностью взаимодействовать с мембранами и проникать через их липидный слой. В связи с этим целесообразно проведение дополнительных экспериментов для выявления пригодности изучаемого препарата в качестве фармакологического агента.

Известно, что хроническое введение сахарозы овариэктамированным крысам способствует развитию инсулинорезистентности, гипертонии, гипертриглицеринемии, оксидативного стресса, т.е. позволяет воссоздать основные признаки постменопаузального метаболического синдрома человека [20] и может быть использовано для создания экспериментальных моделей метаболического синдрома. Такие модели удобно использовать для исследования влияния различных фармакологических препаратов на физиологические и биохимические проявления метаболического синдрома в доклинических условиях.

Одним из независимых факторов риска сердечно-сосудистых осложнений при условии инсулинорезистентности есть протромботическое состояние, обусловленное нарушением баланса между про- и антикоагулянтами, а также высокой реактивностью тромбоцитов. Показано, что у пациентов с инсулинорезистентностью, как при наличии сахарного диабета, так и в его отсутствие, наблюдается повышенный уровень ингибитора-1 активатора плазминогена (PAI-1) [21], фибриногена [22] и тромбоксана В<sub>2</sub> [23], а также увеличение массы тромбоцитов, их адгезивной и агрегационной способностей [24]. Поэтому исследование состояния системы свертывания крови при метаболическом синдроме представляет важную задачу, решение которой будет способствовать совершенствованию диагностики и лечения данного заболевания.

В связи с вышеизложенным, целью данной работы было исследование влияния кверцетина на степень и скорость АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, а также на диэлектрические свойства ОТП самок крыс при инсулинорезистентности в условиях дефицита эстрогенов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Доклиническое изучение квертина (фармпрепарат, в состав которого входят кверцетин и вспомогательные вещества), проводили на экспериментальных моделях метаболического синдрома у самок крыс массой 290-300 г популяции Вистар из питомника ДУ Института проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины. Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и пищевом режиме, рекомендованных для данного вида животных. Исследования проводились согласно национальным Общим этическим принципам экспериментов на животных, которые согласовываются с положениями

Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей [25].

Инсулинорезистентность вызвали введением сахарозы (300 г/л с питьевой водой на протяжении 8 недель). Дефицит эстрогенов осуществляли двусторонней овариэктомией под легким эфирным наркозом [25].

Препарат вводили перорально с помощью зонда в виде водной суспензии дозами 10 и 50 мг кверцетина на кг массы тела в течение 8 недель, начиная с первого дня эксперимента. Контрольная крыса по аналогичной схеме получала плацебо (состав плацебо аналогичен составу кверцетина за исключением кверцетина)

Все экспериментальные животные были распределены следующим образом: 1 - интактный контроль; 2 - овариэктомия; 3 - овариэктомия + сахарозная диета + плацебо; 4 - овариэктомия + сахарозная диета + кверцетин (50 мг/кг массы тела).

Замер массы тела крыс производили непосредственно перед декапитацией. Массу матки крысы определяли взвешиванием после декапитации крыс. Полученную кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата Na (соотношение 4:1), затем центрифугировали при 1000 об/мин до 10 мин для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) и затем при 3000 об/мин в течение 10 мин для получения безтромбоцитарной плазмы [26, 27]. За ходом агрегации наблюдали при помощи фотоэлектроколориметра, фиксируя исходный уровень оптической плотности (или светопропускания) ОТП относительно безтромбоцитарной плазмы при перемешивании [28, 29]. Затем в ОТП добавляли агрегирующий агент (последовательно 50 мкл  $\text{CaCl}_2$  и 100 мкл АДФ на 1 мл образца) и регистрировали кинетику изменения оптических свойств среды. После окончания процесса агрегации образец центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин для осаждения тромбоцитов и получения плазмы после центрифугирования (ППЦ).

Действительную ( $\epsilon'$ ) часть комплексной диэлектрической проницаемости ОТП и ППЦ измеряли на СВЧ-диэлектрометре резонаторного типа на частоте 9,2 ГГц [30]. Температуру измеряли с помощью медь-константовой термодпары с точностью  $\pm 0,1$  °С. Относительная ошибка измерений диэлектрической проницаемости составляла 0,2 %. Значения  $\epsilon'$  находили по градуировочным кривым, полученным для веществ с известными значениями диэлектрических констант [31].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из основных составляющих метаболического синдрома является ожирение, которое тесно связано с инсулинрезистентностью и дислипидемией. В качестве показателей характера влияния препарата кверцетина на протекание заболевания были взяты прирост массы тела, прирост массы матки крыс, степень и скорость агрегации тромбоцитов, а также диэлектрическая проницаемость ОТП и ППА, полученных из крови тех же крыс.

Оценка прироста массы тела экспериментальных животных (табл. 1) выявила, что овариэктомия как в совокупности с высокосахарозной диетой, так и без нее вызывала повышение данного показателя, что, вероятно, есть результат увеличения массы жировой ткани. Это совпадает с экспериментальными и клиническими данными, которые свидетельствуют о непосредственном влиянии дефицита эстрогенов на развитие ожирения [32, 33].

Применение препарата, содержащего кверцетин, в обеих дозах не предотвращало рост массы тела у овариэктомизированных самок, что, вероятно, объясняется достаточно высоким содержанием сахарозы в составе данной серии исследованного препарата.

Таблица 1.

Влияние кверцетина на прирост массы тела и матки у овариэктомированных крыс, которых держали на высокосахарозной диете, ( $X \pm S_x$ , n = 6)

Показатель	Контроль	Овариэкто- мия	Овариэктомия + сахараза + плацебо	Овариэктомия + сахараза + Кверцетин (10 мг/кг)	Овариэктоми я + сахараза + Кверцетин (50 мг/кг)
Прирост массы тела, %	11,3±2,1	21,8±2,11 <sup>1</sup>	28,4±5,6 <sup>1</sup>	20,57±4,78 <sup>1</sup>	34,47±11,97 <sup>1</sup>
Масса матки, мг	363±47	114±23 <sup>1</sup>	117±28 <sup>1</sup>	90,3±7,3 <sup>1</sup>	81,5±10,4 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> – Статистически значимые отличия по сравнению с данными для группы «контроль»,  $p < 0,05$ .

Подтверждением воссоздания эстрогендефицитного состояния у экспериментальных животных было почти трехкратное снижение массы матки после двусторонней овариэктомии (табл. 1), тогда как введение препарата в обеих дозах не влияло на массу данного органа. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии эстрогеноподобного эффекта у кверцетина при его использовании в дозах 10 или 50 мг/кг.

В результате проведенных исследований установлено, что овариэктомия даже при условии стандартной диеты приводит к повышению скорости АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (табл. 2), что, вероятно, обусловлено эстрогендефицитным состоянием животных. Также, наблюдается понижение действительной части комплексной диэлектрической проницаемости ( $\epsilon'$ ) ОТП и ППА у крыс с дефицитом эстрогенов по сравнению с контролем (рис. 1). Удержание овариэктомированных животных на высокосахарозной диете приводило к еще более существенному повышению скорости агрегации, а также к увеличению степени агрегации тромбоцитов. Кроме того, для этой группы крыс, страдающих инсулинорезистентностью, характерно наименьшее значение  $\epsilon'$  ОТП. Величина действительной части комплексной диэлектрической проницаемости  $\epsilon'$  на частоте 9,2 ГГц (в области дисперсии молекул воды) пропорциональна количеству свободной воды в исследуемом образце. Понижение этой величины для ОТП обусловлено большей концентрацией тромбоцитов в плазме по сравнению с контролем. О вкладе тромбоцитов в значение диэлектрической проницаемости ОТП можно судить по разности диэлектрических проницаемостей ППА и ОТП. Для группы крыс с инсулинорезистентностью эта разность максимальна, а, следовательно, и концентрация тромбоцитов в плазме крови крыс данной группы наибольшая.

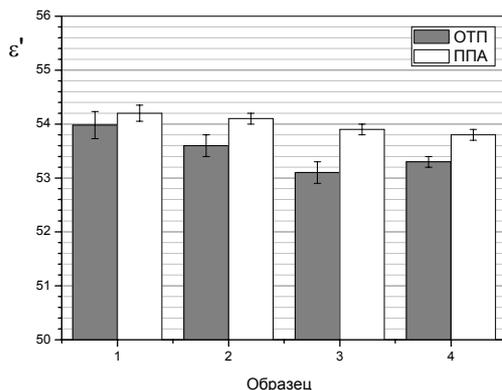


Рис. 1. Значения действительной части ( $\epsilon'$ ) комплексной диэлектрической проницаемости ОТП и ППА самок крыс с дефицитом эстрогенов в крови, находящихся на различной диете: 1 - интактный контроль; 2 - овариэктомия; 3 - овариэктомия + сахарозная диета + плацебо; 4 - овариэктомия + сахарозная диета + кверцетин (10 мг/кг).

Таблица 2.

Влияние кверцетина на показатели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов овариэктамированных крыс, которых держали на высокосахарозной диете, ( $X \pm S_x$ ,  $n = 6$ )

Показатель	Контроль	Овариэктами я	Овари- ектамия + сахароза + плацебо	Овари- ектамия + сахароза + Кверцетин (10 мг/кг)	Овари- ектамия + сахароза + Кверцетин (50 мг/кг)
Индекс агрегации тромбоцитов%	61,8±4,6	64,3±3,8	78,3±3,5 <sup>1,2</sup>	75,2±2,9 <sup>1,2</sup>	56,0±3,6 <sup>3</sup>
Скорость агрегации тромбоцитов у. е.	96,6±5,7	151,2±13,2 <sup>1</sup>	232,0±10,4 <sup>1,2</sup>	213,4±17,2 <sup>1,2</sup>	92,7±8,7 <sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> – Статистически значимые отличия по сравнению с данными для группы «контроль»,  $p < 0,05$ .

<sup>2</sup> – Статистически значимые отличия по сравнению с данными для группы «овариэктамия»,  $p < 0,05$ .

<sup>3</sup> – Статистически значимые отличия по сравнению с данными для группы «овариэктамия + сахароза+плацебо»,  $p < 0,05$ .

Применение исследуемого препарата дозой 10 мг/кг не влияло, как на скорость, так и на степень АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов и приводило к незначительному уменьшению разности между диэлектрическими проницаемостями ОТП и ППА, т.е. к уменьшению количества тромбоцитов в крови. В то же время, у животных, которые получали препарат дозой 50 мг/кг, наблюдалась нормализация этих показателей. Антитромбогенное действие кверцетина можно объяснить его способностью угнетать активность фосфолипазы  $A_2$  и циклооксигеназы – ключевых ферментов синтеза тромбоксана  $A_2$ , который является сильным индуктором агрегации тромбоцитов. Кроме того, кверцетин тормозит гидролиз цАМФ и цГМФ соответствующими диэстеразами, что в свою очередь приводит к пролонгации антитромботического действия простагличина  $I_2$  ( $PGI_2$ ) и оксида азота [34].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что применение препарата, содержащего кверцетин, в дозе 50 мг/кг на протяжении 8 недель у овариэктамированных самок крыс с инсулинорезистентностью, индуцированной высокосахарозной диетой, способствует приближению исследованных параметров агрегации к значениям контрольной группы и, таким образом, улучшению гемореологических свойств крови. Выявленные фармакологические свойства кверцетина обосновывают целесообразность их применения для профилактики сахарного диабета 2 типа и ослабления сердечно-сосудистых патологий у женщин при наличии постменопаузального метаболического синдрома.

## ВЫВОДЫ

Выявлено, что овариэктамия даже при условии стандартной диеты приводит к повышению скорости АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, что, вероятно, обусловлено эстрогендефицитным состоянием животных. Удержание овариэктомированных животных на высокосахарозной диете приводило к еще более существенному повышению скорости агрегации, а также к увеличению степени

агрегации тромбоцитов. Применение исследуемого препарата дозой 10 мг/кг не влияло как на скорость, так и на степень АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. В то же время, у животных, которые получали препарат, содержащий кверцетин, дозой 50 мг/кг, наблюдалась нормализация этих показателей.

Установлено, что действительная часть комплексной диэлектрической проницаемости ( $\epsilon'$ ) ОТП и ППА понижается у крыс с дефицитом эстрогенов по сравнению с контролем. Для группы крыс с инсулинорезистентностью характерно наименьшее значение  $\epsilon'$  ОТП, а разность между диэлектрической проницаемостью ППА и ОТП максимальна, что свидетельствует о наибольшей концентрации тромбоцитов в плазме крови этих крыс по сравнению с контролем.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. DeFronzo R.A. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dislipidaemia and atherosclerotic cardiovascular disease / R.A. DeFronzo., E. Ferrannini // *Diabetes Care.* – 1991. – Vol. 14, № 2. – P. 173-195.
2. Липсон В. В., Полторак В. В., Горбенко Н. И. Современное средство для лечения сахарного диабета типа II: достижения и перспективы поиска (обзор) // *Хим. фармацевтический журнал.* - 1997. - № 11. - С. 5–9.
3. Воскобой И.В., Македонская М.В., Россошанская С.И., Логвин Е.В. Особенности агрегации тромбоцитов у больных ишемической болезнью сердца. - Сборник научных трудов «Современные проблемы развития регионального здравоохранения». - Казань, 2003. – с.
4. Недосугова Л. В., Волковой А. К., Рудько И. А., Бегляров Д. А., Кубатиев А. А., Балаболкин М, И. Сравнительная оценка эффективности биофлавоноидов Диквертина и Танакана в комплексной терапии СД типа 2 // *Клиническая фармакология и терапия.* – 2000. - №4. – С. 65-67.
5. Тюкавкина Н.А., Руленко И.А., Колесник Ю.А. Природные флавоноиды как пищевые антиоксиданты и биологически активные добавки // *Вопросы питания.* - 1996. - № 2. – С. 33-38.
6. Middleton E., Kandaswami C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer // *Pharmacol. Rev.* – 2000. – Vol. 52, №4. – P. 673-751.
7. J.A. Conquer, G. Maiani, E. Azzini et al. Supplementation with Quercetin Markedly Increases Plasma Quercetin Concentration without Effect on Selected Risk Factors for Heart Disease in Healthy Subjects // *J. Nutrition.* – 1998. – Vol. 128, №3. – P. 593-597.
8. Breinholt V. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat // V. Breinholt, S.T. Lauridsen, L.O. Dragsted // *Xenobiotica.* – 1999. – Vol. 29, №12. – P. 1227-1240.
9. J.A. Conquer, G. Maiani, E. Azzini et al. Supplementation with Quercetin Markedly Increases Plasma Quercetin Concentration without Effect on Selected Risk Factors for Heart Disease in Healthy Subjects // *J. Nutrition.* – 1998. – Vol. 128, № 3. – P. 593-597.
10. I. Huk, V. Brovkovich, V. Nanobash et. al. Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study // *Br. J. Surg.* – 1998. – Vol. 85, № 8. – P. 1080-1085.
11. I. Huk, V. Brovkovich, V. Nanobash et. al. Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study // *Br. J. Surg.* – 1998. – Vol. 85, № 8. – P. 1080-1085.
12. Erden I.M., Kahraman A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet A induced oxidative stress in rats // *Toxicology.* – 2000. – Vol. 154. – P. 21–29.
13. J. Duarte, M. Galisteo, M.A. Ocete, et al. Effect of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status in spontaneously hypertensive rats // *J. Mol. Cell. Biochem.* – 2001. – Vol. 221, № 1-2. – P. 155–160.
14. Igura K., Ohta T., Kuroda Y., Kaji K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro // *Cancer. Lett.* – 2001. – Vol. 171, № 1. – P. 11–16.
15. Mahesh T. Quercetin alleviates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats / T. Mahesh, V.P. Menon // *Phytother. Res.* – 2004. – Vol. 18, № 2. – P. 123-127.
16. Coskum O., Kanter M., Korkmaz A., Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas // *Pharmacol. Res.* – 2005. – Vol. 51, № 2. – P. 117–123.
17. A.S. Dias, M. Porawski, M. Alonso et al. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats // *Journal of Nutrition.* – 2005. – Vol. 135, № 10. – P. 2299-2304.
18. Лоскутов И. А. Некоторые аспекты иммунотропной активности флавоноида кверцетина // Роль молодых ученых и специалистов медиков в совершенствовании медицинской помощи населению: Тез. докл.— Челябинск, 1987.— С. 54–55.
19. Кугач В. В., Никольшина Н. И., Ищенко В. И. Лекарственные формы флавоноидов // *Хим.-фармацевт. журнал.*— 1988.— Т. 22, № 8.— С. 1018–1025.
20. Park S.M., Park C.H., Wha J.D., Choi S.B. A high carbohydrate diet induces insulin resistance through decreased glucose utilization in ovariectomized rats // *Korean J. Intern. Med.* – 2004. – Vol. 19, №2. – P. 87-92.

21. Nordt T.K., Schneider D.J., Sobel B.E. Augmentation of the synthesis of plasminogen activator inhibitor type-1 by precursors of insulin. A potential risk factor for vascular disease // *Circulation*. – 1994. – Vol. 89, №1. – P. 321-330.
22. Kannel W.B., D'Agostino R.B., Wilson P.W. et al. Diabetes, fibrinogen, and risk of cardiovascular disease; Framingham experience // *Am. Heart J.* – 1990. – Vol. 120, № 3. – P.672-676.
23. Ishii H., Umeda F., Nawata H. Platelet function in diabetes mellitus // *Diabetes Metab. Rev.* – 1992. – Vol. 8, № 1. – P.53-66.
24. Brown S., Hong A.S., De Belder A., et al. Megakaryocyte ploidy and platelet changes in human diabetes and atherosclerosis // *Atheroscler. Tromb. Vasc. Biol.* – 1997. – Vol. 17, №4. – P. 802-807.
25. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные, их разведение, содержание и использование в эксперименте. – К.: Гос. мед. изд-во УССР, 1962. – С. 243 – 277.
26. Маркосян А.А. Физиология тромбоцитов. «Наука», Ленинград, 1970.
27. Вашкинель В.К. Ультраструктура и функция тромбоцитов человека. «Наука», ЛО, 1982.
28. Самаль А.Б. Агрегация тромбоцитов: методы изучения и механизмы, Минск : Университетское издание, 1990.
29. Берковский А.Л., Васильев С.А., Жердева Л.В. и др. Пособие по изучению адгезивно-агрегационной активности тромбоцитов. – М., 2002. – 28 с.
30. Hackl E.V., Gatash S.V., Nikolov O.T. Using UHF-dielectrometry to study protein structural transitions. // *J. Biochem. Biophys. Meth.* - 2005. – V. 63, № 2. - P. 137-148.
31. Шахпаронов М. И., Ахадов Я. Ю. Диэлектрические свойства и молекулярное строение растворов вода-ацетон // *Журн. структур. хим.* – 1965. – Т. 6, № 1. – С. 21-26.
32. Augoulea A., Mastorakos G., Lambrinouadaki I. et al. Role of postmenopausal hormone replacement therapy on body fat gain and leptin levels // *Gynecol. endocrinol.* – 2005. – Vol. 20, № 4. – P. 227-235.
33. Bains R.K., Wells S.E., Flavell D.M. et al. Visceral obesity without insulin resistance in late-onset obesity rats // *Endocrinology*. – 2004. – Vol. 145, №6. – P. 2666-2679.
34. Blasko G., Nemesanszky E., Szabo G., et al. The effect of PGI<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub> analogues with increased stability on platelet cAMP content and aggregation // *Thromb Res.* – 1980. – Vol. 17. – P. 673-681.