10. Bautista J., Corpus R., Ramos R., Cremades O., Gutierrez J. F., Alegre S. Brain mitochondrial complex 1 inactivation by oxydative modification. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2000, vol. 275, no. 3, pp. 890–894.

11. Beppu M., Inoue M., Ishikawa T., Kikugawa K. Presence of membrane-bound proteinases that preferentially degrade oxidatively damaged erythrocyte membrane proteins as secondary antioxidant defense. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, vol. 1196, no. 1, pp. 81–87.

УДК 618.2

ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОГО СТРЕССА НА ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ И ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

Анна Сергеевна Чумакова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Астраханский государственный университет, Российская Федерация, 414000, г. Астрахань, пл. Шаумяна, 1, foolcketch81@mail.ru

Наталья Валерьевна Рябыкина, кандидат биологических наук, старший преподаватель, Астраханский государственный университет, Российская Федерация, 414000, г. Астрахань, пл. Шаумяна, 1, physiology-agu@mail.ru

На трех этапах постнатального онтогенеза обнаружены возрастные различия интенсивности свободнорадикальных процессов, которые заключаются в повышении уровня белковой пероксидации у старых крыс. У неполовозрелых и половозрелых животных свободнорадикальное окисление носит разнонаправленный тканезависимый характер. На модели острого эмоционально-болевого стресса показана достоверная стресс-индуцированная активация перекисной деструкции белков, которая наиболее выражена в печени неполовозрелых крыс и старых животных. Стрессирование неполовозрелых, половозрелых и старых животных привело к увеличению процесов перекисной деструкции белков как легких, так миокарда и печени. Исключением было перекисное окисление белков половозрелых крыс, у которых перекисное окисление белков существенно уменьшилось. Выявлено влияние возрастного фактора на стрессорную динамику перекисной деструкции белков во всех органах. Результаты исследования говорят о большой возрастной вариабельности в условиях физиологической нормы интенсивности перекисной модификации белков в плазме крови по сравнению с другими изучаемыми тканями. Установлено, что у неполовозрелых и половозрелых животных антиоксидант проявил свое стресс-протекторное действие в исследуемых тканях. У старых животных α-токоферол в ряде органов (миокард, печень) оказывает прооксидантное действие.

Ключевые слова: эмоционально-болевой стресс, перекисное окисление липидов, перекисное окисление белков, возраст, печень, легкие, плазма крови, миокард, свободные радикалы, старение

INFLUENCE OF THE SHARP EMOTIONAL AND PAINFUL STRESS ON TISSUE-SPECIFIC AND AGE FEATURES OF FREE RADICAL PROCESSES AT DIFFERENT STAGES OF POSTNATAL ONTOGENESIS

Chumakova Anna S., Ph.D. (Biology), Senior Researcher, Astrakhan State University, 1 Shaumyan Sq., Astrakhan, 414000, Russian Federation, foolcketch81@mail.ru

Ryabykina Natalya V., Ph.D. (Biology), Senior Lecturer, Astrakhan State University, 1 Shaumyan Sq., Astrakhan, 414000, Russian Federation, physiology-agu@mail.ru

At three stages of postnatal ontogenesis found age differences of the intensity of free radical processes, which are to improve the level of protein peroxidation in aged rats. In immature and mature animals free radical oxidation is dependent on the multidirectional nature of the tissue. A model of acute emotional pain stress showed a significant stress-induced activation of peroxide

degradation of proteins, which is most pronounced in the liver of immature rats and old animals. Of stressing immature, mature and old animals resulted in increased protein degradation processes of peroxide both light myocardium and liver. The exception was the peroxidation of proteins of adult rats that peroxidation of proteins significantly decreased. The influence of the age factor in the dynamics of the stressor peroxide degradation of proteins in all organs. The results suggest a large variability in the age under physiological norm intensity peroxide modification of proteins in blood plasma compared to the other tissues studied. It is established that in immature and mature animals antioxidant showed his stress protective effect in the studied tissues. In old animals α-tocopherol in a number of organs (myocardium, liver) has prooxidant action.

Keywords: emotionally painful stress, lipid peroxidation, protein peroxidation, age, liver, lungs, blood plasma, myocardium, free radicals and aging

По-прежнему актуальной для современной биологии и медицины остается проблема стресса и его влияния на различные функциональные системы организма. Стресс рассматривается как способ достижения резистентности организма к действию экстремальных факторов различного генеза [11; 14]. Вместе с тем, стресс может стать фактором, оказывающим повреждающее действие на органы и системы, ведущим к развитию заболеваний [13].

Важным проявлением стресс-реакции и адаптационной перестройки является совершенствование деятельности регуляторных механизмов, участвующих в поддержании оптимального уровня интенсивности обменных процессов на уровне целостного организма [15]. При этом, несомненно, должны существовать органоспецифические особенности в осуществлении мобилизации различных механизмов при стрессе и проблема реализации стресс-реакции на уровне отдельных органов и тканей остается актуальной. В частности, малоизученным остается вопрос об изменениях метаболических процессов при развитии стресс-реакции.

Как известно, одним из ведущих повреждающих факторов при стрессе, детерминирующих развитие вторичных изменений органов и тканей, является интенсификация свободнорадикального окисления, которая наряду с этим рассматривается как один из универсальных физиологических процессов – окисление биологических субстратов при действии АФК [2; 7; 9; 10].

Известно, что при различных видах стрессорного воздействия, таких как иммобилизация, акустический и эмоционально-болевой стресс, в организме происходят патологические изменения за счет свободнорадикального окисления биомолекул активными формами кислорода (АФК) [1; 4; 16]. По данным современной литературы, при стрессе под действием АФК окислению подвергаются в первую очередь не только липиды, но и белки плазматических мембран, что приводит к деполимеризации и лизису клетки [8; 12]. Однако в литературе имеются лишь единичные сведения о значимости процессов окислительной модификации белков, усиление которых наряду с перекисным окислением липидов играет важную роль в развитии стрессорного повреждения клеток и тканей [3; 5; 6].

В то же время малоизученным остается вопрос о возрастных и тканеспецифических особенностях свободнорадикальных процессов и антиоксидантной системы организма при стрессе. Поскольку антиоксидантные возможности отдельных органов различны, то и динамика обусловленных стрессом изменений процессов свободнорадикального окисления будет в них неодинакова. В связи с вышеизложенным возрастает интерес к физиологическому действию антиоксидантов, которые находят широкое применение в физиологии и медицине в связи с их способностью ингибировать процессы окисления в организме и тем самым создавать оптимальные условия для гомеостаза и адаптации клеток и тканей при стресс-индуцирующих воздействиях разного генеза [5; 7].

Целью данного исследования было изучение возрастной динамики и тканеспецифических особенностей перекисного окисления белков (ПОБ) при остром эмоционально-болевом стрессе (ЭБС) и введении природного антиоксиданта α-токоферола (витамин Е) в эксперименте.

Материалы и методы исследований

Исследования проводились на белых крысах-самцах в трех сериях опытов на трех возрастных группах животных: 1 – неполовозрелые семинедельного возраста массой 64 г; 2 – половозрелые животные четырехмесячного возраста средней массой 153 г; 3 – старые животные восемнадцатимесячного возраста средней массой 385 г. Животные были разделены на следующие группы: 1) интактные животные; 2) животные, подвергавшиеся эмоционально-болевому стрессу; 3) крысы, получавшие масляный раствор α-токоферолацетата в течение 14 дней per os в дозе 1 мг / 100 г массы тела; 4) крысы, подвергавшиеся эмоционально-болевому стрессу с предварительном введением α-токоферола в той же дозе. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к пище и воде. По окончании опытов животных декапитировали.

Моделью эмоционально-болевого стресса служило электрокожное раздражение, для чего использовали прямоугольную камеру с решетчатым металлическим полом, соединенным с источником переменного тока фиксированного сопротивления, получаемого с помощью лабораторного автотрансформатора. Крысу помещали в установку на 5 мин. для ознакомления с ней, а затем подавали электрический ток с напряжением 40 V в течение 15 мин. с интервалом 30 с. Животных забивали под нембуталовым наркозом (в дозе 5 мг / 100 г массы тела внутрибрюшинно) сразу после извлечения из камеры. После декапитации забирали кровь, вскрывали грудную и брюшную полости и отпрепаровывали легкие, сердце и печень с последующими гомогенизацией и экстрагированием ткани для биохимического анализа. Критериями развития стресса у животных служили относительная масса надпочечников и количество эозинофильных гранулоцитов в крови.

Для определения перекисного окисления белков использовали 0,05–0,10 мл плазмы крови или гомогената ткани, осаждение белков сыворотки крови осуществляли с помощью 20%-го раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). К денатурированным белкам приливали равный объем (1мл) 0,1 М 2,4-денитрофенилгидразина (2,4-ДФГ), растворенного в 2 М HCl. В контрольную пробу вместо 2,4-ДФГ добавляли равный объем 2 М HCl. Инкубацию осуществляли при комнатной температуре в течение 1 ч, затем пробы центрифугировали при 3000 g в течение 15–20 мин. Осадок промывали 3 раза раствором «этанол – этилацетат» (1 : 1). Полученный осадок подсушивали с целью устранения оставшегося растворителя «этанол – этилацетат» и затем растворяли в растворе мочевины. Мочевину приливали к осадку в объеме 2,5 мл и выдерживали в кипящей бане в течение 5 мин. до полного растворения. Оптическую плотность образовавшихся денитрофенилгидразонов измеряли при длине волны 540 нм. Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием критерия t/p Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение

На модели ЭБС, вызванного электрокожным раздражением (ЭКР) выявлены изменения показателей стресс-реактивности экспериментальных животных, свидетельствующие о развитии стресса при тридцатиминутном действии электрического тока: количество эозинофильных гранулоцитов достоверно снизилось по сравнению с контролем с 513, 3 ± 17,7 до 431,4 ± 21,3 ($P < 0,02$), также наблюдалось увеличение относительной массы надпочечников на 9,8 %.

При биохимическом анализе изученных тканей на содержание в них продуктов ПОБ обнаружено значительное увеличение интенсивности ПОБ в крови у контрольных животных второй (на 75 %) и третьей (на 27 %) групп животных по сравнению с неполовозрелыми крысами (табл.).

В то же время, видимых изменений контрольных значений изучаемого параметра в печени, легких и миокарде животных разных возрастных групп не выявлено, однако наблюдали незначительное, но достоверное повышение интенсивности ПОБ

у половозрелых в сравнении с крысятами в печеночной ткани его снижение у взрослых крыс по сравнению с первой и третьей возрастными группами в легочной ткани.

На основании полученных данных можно судить о большей возрастной вариабельности в условиях физиологической нормы интенсивности ПОБ в плазме крови в отличие от других тканей животных.

Таблица

Интенсивность окислительной модификации белков (нмоль / ч) в тканях крыс разных возрастных групп на модели эмоционально-болевого стресса (M ± m)

Исследуемая ткань	Возрастные группы	Контроль	Стресс	Стресс + витамин Е	Витамин Е
Плазма крови	1-я	0,011 ± 0,0001	0,015 ± 0,0004*°	0,010 ± 0,0002 *	0,013 ± 0,0002 °*
	2-я	0,019 ± 0,004	0,018 ± 0,002*°	0,013 ± 0,0004 *	0,021 ± 0,003*°
	3-я	0,014 ± 0,0008	0,015 ± 0,0008*°	0,013 ± 0,0009*	0,014 ± 0,0008
Печень	1-я г	0,011 ± 0,0002	0,015 ± 0,0001*°	0,019 ± 0,0001*	0,014 ± 0,0002*
	2-я	0,012 ± 0,0001	0,011 ± 0,0002*°	0,013 ± 0,0001*	0,016 ± 0,0001*
	3-я	0,011 ± 0,0001	0,012 ± 0,0002*°	0,013 ± 0,0004 *	0,013 ± 0,0002*
Легкие	1-я	0,011 ± 0,0001	0,012 ± 0,0001*°	0,014 ± 0,0001*	0,013 ± 0,0002*
	2-я	0,010 ± 0,0001	0,011 ± 0,0002*°	0,013 ± 0,0001*	0,014 ± 0,0002*
	3-я	0,011 ± 0,0001	0,013 ± 0,0003*°	0,012 ± 0,0001*	0,010 ± 0,0003*
Миокард	1-я	0,010 ± 0,0001	0,011 ± 0,0001*°	0,012 ± 0,0001*	0,011 ± 0,0001*
	2-я	0,010 ± 0,0002	0,011 ± 0,0001*°	0,015 ± 0,0002*	0,013 ± 0,0002*
	3-я	0,011 ± 0,0001	0,012 ± 0,0038*°	0,014 ± 0,0001*	0,014 ± 0,0004*

Примечание: * $p < 0,05–0,001$ в сравнении с контрольным значением; ° $p< 0,05–0,001$ в сравнении с воздействием «стресс + витамин Е».

Далее было показано, что острый ЭБС вызывает выраженные изменения ПОБ во всех изучаемых тканях главным образом у неполовозрелых крыс семинедельного возраста, которые выражаются достоверным повышением интенсивности окислительной модификации белков (табл.). Так, в плазме крови и печени крысят ПОБ повышалось после стресса на 26,7 %, а в легких и миокарде – на 8,4 и 9,1 % соответственно. У взрослых крыс четырехмесячного возраста, напротив, ЭКР вызвало снижение уровня окисленных белков в крови и печени в отличие от легочной ткани и миокарда, где наблюдалось незначительное, но достоверное повышение ПОБ. У старых животных (третья группа) увеличение ПОБ при стрессе показано во всех изучаемых тканях (табл.).

Таким образом, можно сделать заключение о большой стресс-реактивности в отношении белковой пероксидации неполовозрелых животных. Кроме этого, наиболее выраженные отличия в значениях изучаемого показателя наблюдаются в плазме крови, как между возрастными группами, так и на фоне стресса при сравнении с контрольными значениями. Последнее можно объяснить достаточно высоким относительным содержанием в крови, как жидкой ткани организма, белковых компонентов различной структуры и функциональной активности, легко доступных свободнорадикальному окислению.

Далее исследования показали, что предварительное введение α-токоферола вызывает снижение стрессорного уровня ПОБ в крови молодых и старых крыс до контрольного уровня, а у второй возрастной группы – на 13,4 % в сравнении со стрессом и на 31,6 % в сравнении с исходным значением, что свидетельствует о выраженном стресс-протекторном действии антиоксиданта на ПОБ в плазме крови.

В других тканях наблюдалось увеличение интенсивности ПОБ на фоне введения витамина Е по сравнению с животными, подвергавшимися действию стресса и не получавших антиоксидант. Причем наиболее выраженный проокстидантный эффект витамина Е, сочетаемый с действием стрессора, обнаружен нами в печени неполовозрелых животных: интенсивность ПОБ у этой экспериментальной группы («стресс + витамин Е») повысилась на 26,6 % по сравнению с группой крыс, подвер-

гавшихся только ЭКР, и на 72,7 % по сравнению с контрольным значением этого показателя у крысят. Такая же, но менее выраженная и достоверная закономерность наблюдалась в печени, легких и миокарде других возрастных групп животных.

Список литературы

1. ***Барабой В. А.*** Перекисное окисление и стресс / В. А. Барабой, И. И. Брехман, В. Г. Голотин, Ю. Б. Кудряшов. – Санкт-Петербург : Наука, 1991. – 148 с.

2. ***Бобырев В. Н.*** Специфичность систем антиоксидантной защиты органов и тканей - основа дифференцированной фармакотерапии антиоксидантами / В. Н. Бобырев, В. Ф. Почернява, С. Г. Стародубцев [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1994. – № 57 (1). – С. 47–54.

3. ***Болдырев А. А.*** Роль свободных радикалов в функциональной активности нейронов / А. А. Болдырев // Успехи функциональной нейрохимии / под ред. С. А. Дамбиновой и А. В. Арутюняна. – Санкт-Петербург : Санкт-Петербургский гос. ун-т, 2003. – С. 301–317.

4. ***Владимиров Ю. А.*** Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. – Москва : Наука, 1972. – 252 с.

5. ***Дубинина Е. Е.*** Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса / Е. Е. Дубинина // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 561–581.

6. ***Зенков Н. К.*** Фенольные биоантиоксиданты / Н. К. Зенков, Н. В. Кондалинцева, В. З. Ланкин, Е. Б. Меньшикова, А. Е. Просенко. – Новосибирск : Сибирское отд-е Российской акад. мед. наук, 2003. – 328 с.

7. ***Кольтовер В. К.*** Свободнорадикальная теория старения: исторический очерк / В. К. Кольтовер // Успехи геронтологии. – 2000. – Вып. 4. – С. 33–40.

8. ***Ланкин В. З.*** Биоантиоксиданты и антиоксидантные ферменты в регуляции перекисного окисления липидов / В. З. Ланкин, А. Х. Коган, А. Л. Ковалевская [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1982. – Т. 93, № 5. – С. 58–60.

9. ***Ланкин В. З.*** Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях / В. З. Ланкин, А. К. Тихазе, Ю. Н. Беленков. – 2-е изд., испр. и доп. – Москва : Научно-исслед. ин-т кардиологии им. Л. А. Мясникова, 2001. – 71 с.

10. ***Теплый Д. Л.*** Нейрофизиологические эффекты витамина Е / Д. Л. Теплый. – Астрахань : ЛЕОН, 2008. – 310 с.

11. ***Чумакова А. С.*** Возрастная динамика и тканеспецифические особенности свободнорадикальных процессов внутренних органов и центральной нервной системы белых крыс / Ю. В. Нестеров, Д. Л. Теплый, А. С. Чумакова// Естественные науки. – 2008. – № 2 (23). – С. 73–76.

12. ***Чумакова А. С.*** Изменения свободнорадикальных процессов в различных органах крыс разного возраста при остром стрессе / А. С. Чумакова, Д. Л. Теплый, Ю. В. Нестеров // Биологические исследования. – 2009. – № 4. – С. 34–37.

13. ***Bautista J.*** Brain mitochondrial complex 1 inactivation by oxydative modification / J. Bautista, R. Corpus, R. Ramos, O. Cremades, J. F. Gutierrez, S. Alegre // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2000. – Vol. 275, № 3. – P. 890–894.

14. ***Beppu M.*** Presence of membrane-bound proteinases that preferentially degrade oxidatively damaged erythrocyte membrane proteins as secondary antioxidant defense / M. Beppu, M. Inoue, T. Ishikawa, K. Kikugawa // Biochim. Biophys. Acta. – 1994. – Vol. 1196, № 1. – P. 81–87.

15. ***Cecchi C.*** Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzneimer's patients / C. Cecchi, C. Fiorillo, S. Sorbi, S. Latorraca, B. Nacmias, S. Bagnoli, P. Nassi, G. Liguri // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – Vol. 33, № 10. – P. 1372–1379.

References

1. Baraboy V. A., Brekhman I. I., Golotin V. G., Kudryashov Yu. B. *Perekisnoe okislenie i stress* [Peroxidation and stress]. St. Petersburg, Nauka Publ., 1991. – 148 p.

2. Bobyrev V. N, Pochernyava V. F., Starodubtsev S. G. Spetsifichnost sistem antioksidantnoy zashchity organov i tkaney – osnova differentsirovannoy farmakoterapii antioksidantami [The specificity of the antioxidant defense systems of organs and tissues – the basis of differentiated pharmacotherapy antioxidants]. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya* [Experimental and Clinical Pharmacology], 1994, no. 57 (1), pp. 47–54.

3. Boldyrev A. A. Rol svobodnykh radikalov v funktsionalnoy aktivnosti neyronov [The role of free radicals in the functional activity of neurons]. *Uspkekhi funktsionalnoy neyrokhimii*

[Successes functional neurochemistry]. Ed. by S. A. Dambinova, A. V. Arutyunyan, St. Petersburg, St. Petersburg State University Publ., 2003, pp. 301–317.

4. Vladimirov Yu. A. *Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskikh membranakh* [Lipid peroxidation in biological membranes]. Moscow, Nauka Publ., 1972, 252 p.

5. Dubinin E. E. Rol aktivnykh form kisloroda v kachestve signalnykh molekul v metabolizme tkaney pri sostoyaniyakh okislitelnogo stressa [Role of reactive oxygen species as signaling molecules in the metabolism of the tissues in conditions of oxidative stress]. *Voprosy meditsinskoy khimii* [Problems of Medical Chemistry], 2001, vol. 47, no. 6, pp. 561–581.

6. Zenkov N. K., Kondalintseva N. V., Lankin V. Z., Menshikov E. B., Prosenko A. E. *Fenolynye bioantioksidanty* [Phenolic bioantioxidants]. Novosibirsk, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences Publ., 2003, 328 p.

7. Koltover V. K. Svobodnoradikalnaya teoriya stareniya: istoricheskiy ocherk [The free radical theory of aging: historical sketch]. *Uspekhi gerontologii* [Advances in Gerontology], 2000, vol. 4, pp. 33–40.

8. Lankin V. Z., Kogan A. K., Kovalevskaya A. L. Bioantioksidanty i antioksidantnye fermenty v reguljacii perekisnogo okislenija lipidov [Bioantioxidants and antioxidant enzymes in the regulation of lipid peroxidation]. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 1982, vol. 93, no. 5, pp. 58–60.

9. Lankin V. Z., Tikhaze A. K., Belenkov Yu. N. *Svobodnoradikalnye protsessy v norme i pri patologicheskikh sostoyaniyakh* [Free-radical processes in normal and pathological conditions], Moscow, Research Institute for Cardiology them L. A. Myasnikov, 2001, 71 p.

10. Teply D. L. *Nejrofiziologicheskie effekty vitamina E* [Neurophysiological effects of vitamin E], Astrakhan, LEON Publ., 2008, 310 p.

11. Chumakova A. S., Nesterov Yu. V., Teply D. L. Vozrastnaya dinamika i tkanespetsificheskie osobennosti svobodnoradikalnykh protsessov vnutrennikh organov i tsentralnoy nervnoy sistemy belykh krys [Age dynamics and tissue-specific features of free radical processes of internal organs and the central nervous system of white rats]. *Nauka* [Science], 2008, no. 2 (23), pp. 73–76.

12. Chumakova A. S., Teply D. L., Nesterov Yu. V. Izmeneniya svobodnoradikalnykh protsessov v razlichnykh organakh krys raznogo vozrasta pri ostrom stresse [Changes of free radical processes in various organs of rats of different ages with acute stress]. *Biologicheskie issledovaniya* [Biological Research], 2009, no. 4, pp. 34–37.

13. Bautista J., Corpus R., Ramos R., Cremades O., Gutierrez J. F., Alegre S. Brain mitochondrial complex 1 inactivation by oxydative modification. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2000, vol. 275, no. 3, pp. 890–894.

14. Beppu M., Inoue M., Ishikawa T., Kikugawa K. Presence of membrane-bound proteinases that preferentially degrade oxidatively damaged erythrocyte membrane proteins as secondary antioxidant defense. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, vol. 1196, no. 1, pp. 81–87.

15. Cecchi C., Fiorillo C., Sorbi S., Latorraca S., Nacmias V., Bagnoli S., Nassi P., Liguri G. Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzneimer's patients. *Free Radic. Biol. Med*., 2002, vol. 33, no. 10, pp. 1372–1379.