

## Повышение кислотности эритроцитарного мембранного цитохрома $b_{558}III$ с образованием комплекса с гемоглобином и дисбаланс между эндогенными уровнями металлопротеинов антиоксидантного и прооксидантного действия в крови женщин с раком грудной железы

Г.М.Симонян, Р.М.Симонян, М.А.Бабаян, А.К.Нерсисян, М.А.Симонян

*Институт биохимии НАН РА, Онкологический центр МЗ РА*

*375014, Ереван, ул.П.Севака, 5/1*

**Ключевые слова:** рак грудной железы, кровь, металлопротеины, оксидативный стресс

На различных этапах развития рака грудной железы (РГЖ) женщины уровни ферментов антиоксидантного действия, липидной пероксидации (ее продукта – малонового диальдегида – МДА) в эритроцитах и сыворотке изменяются неоднозначно. В эритроцитах наблюдается понижение эндогенных уровней  $Cu,Zn$ -СОД, каталазы, глутатион пероксидазы, глутатион-S-трансферазы [9,18]. Однако в крови наблюдается и стимулирование образования супероксидных радикалов ( $O_2^{\cdot-}$ ), перекиси водорода и МДА с увеличением уровней  $Cu,Zn$ -СОД, глутатион пероксидазы, хотя уровень каталазы продолжает снижаться [20, 22]. В плазме крови в ходе развития РГЖ наблюдается повышение [17] или понижение уровня МДА с инициированием продуцирования иминоксильного радикала ( $NO\cdot$ ) [10]. Уровень сывороточного церулоплазмينا (ЦП) как белка острой фазы в подавляющем большинстве случаев возрастает на фоне гиперкуперемии [21, 26, 28]. Уровни липопротеинов сыворотки при РГЖ снижены [13], хотя при лечении уровень липопротеинов высокой плотности повышается [19]. Однако лечение РГЖ не всегда эффективно. При комбинированной терапии противоопухолевыми средствами (циклофосфамид, метострексат, 5-флуороурацил) [23] и радиотерапии наблюдается инициирование гидролиза ненасыщенных жирных кислот мембран эритроцитов свободными радикалами с соответственным повреждением их микроструктур и понижением текучести, снижением уровней антиоксидантных систем и увеличением уровня фосфолипидов [24, 27]. К тому же химиотерапия тамоксифеном приводит к нормализации уровней приведенных метаболитов и понижению уровней холестерина и фосфолипидов [23]. Определено, что при злокачественных новообразованиях увеличивается доля метгемоглобина в эритроцитах. Очевидно, что структурно-функциональные компо-

ненты эритроцитов претерпевают ощутимые изменения при РГЖ как результат оксидативного стресса, вызванного нарушением физиологического равновесия между эндогенными уровнями метаболитов – регуляторов метаболизма активных форм кислорода (АФК) не только в эритроцитах, но и в сыворотке крови.

Внимание онкологов обычно сфокусировано на определении состояния ключевых систем антиоксидантного действия, а прооксидантные системы (последние продуцируют  $O_2^{\cdot-}$  и его производные) в основном не учитываются, хотя обе они действуют одновременно и взаимообусловленно.

Целью работы является одновременное и комплексное определение количественных и качественных изменений новых функционально-структурных элементов мембран эритроцитов – цитохромов  $b_{558}$  [7], а также других металлопротеинов крови антиоксидантного и прооксидантного действия при РГЖ.

### Материал и методы

Металлопротеины крови антиоксидантного действия – МАД ( $Cu,Zn$ -СОД, каталаза, полученные из растворимой фракции эритроцитов; ЦП и трансферрин – ТФ – из сыворотки крови) и металлопротеины прооксидантного действия – МПД (цитохром  $b_{558}III$ ,  $b'_{558}III$  и  $b_{558}IV$  – из мембран эритроцитов; супероксидпродуцирующий липопротеин – супрол – из сыворотки крови и цитохром  $b_5$  – из растворимой фракции эритроцитов) получали из венозной крови женщин, больных РГЖ, биотехнологическим способом [8], избегая использования детергента для солубилизации эритроцитарных мембранных белков [6]. Была исследована кровь (по 15 мл) 18 женщин, больных РГЖ, в

возрасте 38–55 лет с давностью заболевания 2–3 года. Выделение и очистка металлопротеинов включает ионообменную хроматографию белковых фракций эритроцитарных мембран, растворимой фракции эритроцитов и сыворотки на целлюлозах DE-52 и KM-52 ("Whatman", Англия), сефадексе DEAE A-50 ("Pharmacia", Швеция) и биогеле P-100 ("Reanal", Венгрия). Количество металлопротеинов определяли путем измерения величины плотности максимального оптического поглощения, характерного для цитохромов  $b_{558}$  при 530 нм ( $\beta$ -полоса), цитохрома  $b_5$  – 525 нм, супрола – 430 или 280 нм, ЦП – 610 нм и ТФ – 470 нм. Супероксиддисмутазную активность фракции и  $O_2^-$ -продуцирующую активность цитохрома  $b_{558}III$  определяли методом нитротетразолиевого синего (НТС) путем расчета процента ингибирования (в случае СОД) или прироста (в случаях супрола и цитохрома  $b_{558}III$ ) величины плотности максимального оптического поглощения формазана (при 560 нм), образовавшегося при восстановлении НТС супероксидными радикалами. За единицу СОД-активности или  $O_2^-$ -продуцирующей активности принимали то количество фракции, которое вызывает 50% ингибирование или стимулирование образования формазана соответственно. Каталазную активность фракций определяли перманганатометрическим методом путем расчета величины расщепленной  $H_2O_2$  (М) определенным количеством фракции за 1 мин при 20°. За единицу ката-

лазной активности принимали то количество фракции, которое вызывает расщепление в этих условиях 0.1 М  $H_2O_2$ . Удельную активность каталазы, СОД и  $O_2^-$ -продуцирующей активности цитохрома  $b_{558}III$  определяли в расчете на 1 мл эритроцитов, а супрола – на 1 мл сыворотки.

Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Specord UV-VIS" (Германия). Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера.

## Результаты и обсуждение

### Количественные и качественные изменения цитохромов $b_{558}III$ и $b'_{558}III$ в эритроцитарных мембранах при РГЖ.

По сравнению с мембранами эритроцитов практически здоровых женщин (доноров) мембраны эритроцитов у женщин при РГЖ после промывания сохраняют красноватый оттенок. При этом суммарная фракция цитохромов  $b_{558}$  мембран эритроцитов имеет оптический спектр поглощения, существенно отличающийся от спектра цитохромов  $b_{558}$  мембран эритроцитов женщин-доноров (рис.1). После восстановления цитохромов  $b_{558}$  мембран эритроцитов женщин при РГЖ характерные поглощения ( $\alpha$ - и  $\beta$ -полосы) на оп-

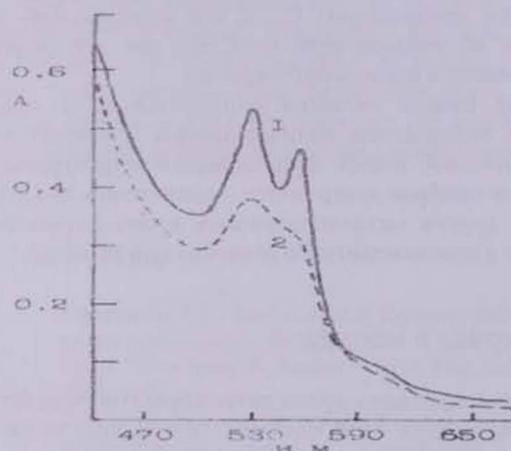


Рис.1. Оптические спектры поглощения суммарной фракции эритроцитарных мембранных цитохромов  $b_{558}$  до (1) и после проведения ионообменной хроматографии на целлюлозе KM-52 (2). 2 – это суммарная фракция цитохромов  $b_{558}III$  и  $b'_{558}III$  до пропускания через DE-52. После восстановления (1) дитионитом натрия получается спектр, в основном похожий на спектр восстановленного гемоглобина, но не цитохрома  $b_{558}$ , а после восстановления (2) получают характерные для цитохромов  $b_{558}$  максимальные оптические поглощения ( $\alpha$ -полоса – при 558 нм,  $\beta$ -полоса – при 530 нм), рисунки этих спектров не приводятся.

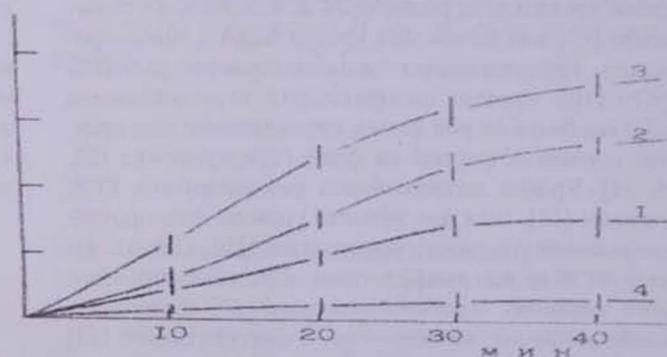


Рис.2. Кинетические кривые образования формазана: в отсутствие цитохрома  $b_{558}$  и NADPH ( $NADPNa_2$ ) (1); в присутствии 0.1 мМ цитохрома  $b_{558}III$  из мембран эритроцитов донорской крови женщины и 0.1 мМ NADPH (2); в присутствии 0.1 мМ NADPH и 0.1 мМ цитохрома  $b_{558}$  из мембран эритроцитов женщины при РГЖ (3); после добавления к (1–3) Cu,Zn-СОД в количестве  $5 \times 10^{-8}$  М (4).

тическом спектре поглощения не появляются в отличие от спектра цитохромов  $b_{558}$  донорской крови [7]. Это свидетельствует о том, что лигандное окружение цитохрома  $b_{558}$  донорской крови несколько отличается от такового у цитохромов  $b_{558}$  при РГЖ. Эти изменения вызваны гемоглобином, который, видимо, входит в комплексное соединение с цитохромом  $b_{558}$ , изменяя окислительно-восстановительные свойства последнего. После удаления следов гемоглобина (путем ионообменной хроматографии на целлюлозе КМ-52 суммарной фракции цитохромов  $b_{558}$  при РГЖ) оптический спектр поглощения суммарной фракции цитохромов  $b_{558}III$  и  $b'_{558}III$  совпадает с аналогичным спектром цитохромов  $b_{558}III$  и  $b'_{558}III$  (последний является цитохромом  $b_{558}III$  высококислого характера [4]), полученных из мембран эритроцитов донорской крови (рис.1). Однако доля цитохрома  $b'_{558}III$  при РГЖ по сравнению с цитохромом  $b_{558}III$  донорской крови увеличена на  $60.0 \pm 5.8\%$  ( $P < 0.03$ ). Это выявляется после пропускания фракции цитохромов  $b_{558}III$  и  $b'_{558}III$  через целлюлозу DE-52. Можно констатировать, что цитохром  $b_{558}III$  в мембранах эритроцитов при РГЖ "подкисляется" и превращается в цитохром  $b'_{558}III$  (последний элюируется с колонки с целлюлозой DE-52 только 0.5% неионным детергентом, растворенным в 0.8 M натрий-ацетатном буфере, pH 5.6). Другие факторы: повышение ионной силы, изменение pH элюационного раствора или использование органических растворителей не способствуют процессу элюирования цитохрома  $b'_{558}III$  не только из колонки с DE-52, но и с DEAE A-50 [4]). Возможно, это связано с повышением перекисного окисления фосфолипидных остатков мембран эритроцитов и с увеличением доли метгемоглобина при злокачественных новообразованиях [12], что делает возможной "интервенцию" гемоглобина в глубь эритроцитарных мембран с вхождением в комплекс (нестабильный) с цитохромом  $b_{558}$ , являющимся новым функционально-структурным элементом мембран эритроцитов [7].

Можно констатировать, что при РГЖ происходят следующие качественные изменения: "покраснение" мембран эритроцитов с комплексообразованием гемоглобина с цитохромом  $b_{558}$  и повышение кислотности цитохрома  $b_{558}$ . При этом эндогенный уровень суммарной фракции цитохрома  $b_{558}$  мембран эритроцитов при РГЖ заметно повышен ( $91.6 \pm 5.5\%$ ,  $P < 0.03$ ) до проведения хроматографии, хотя уровень цитохрома  $b_{558}IV$  основного характера [7] заметных изменений по сравнению с аналогичными показателями донорской крови не претерпевает (таблица).

**Стимулирование NADPH-зависимого продуцирования  $O_2^-$  цитохромом  $b_{558}III$  мембран эритроцитов при РГЖ in vitro.**

В присутствии NADPH ( $NADPN_{a_2}$ ) цитохром  $b_{558}III$  (0.1 M) продуцирует  $O_2^-$  в аэробных условиях in

vitro при 20°. Это выражается в увеличении плотности максимального оптического поглощения формазана (при 560 нм), образующегося при восстановлении НТС супероксидными радикалами, продуцируемыми цитохромом  $b_{558}III$  (рис.2). Уже через 30 мин продуцирование  $O_2^-$  в присутствии цитохрома  $b_{558}III$  при РГЖ на  $36.0 \pm 2.2\%$  ( $P < 0.05$ ) больше, чем при цитохроме  $b_{558}III$  мембран эритроцитов женщин-доноров. Известно, что цитохромы  $b_{558}$ , локализованные в мембранах лимфоцитов и фагоцитирующих лейкоцитов [11] являются компонентами NADPH-зависимых оксидоредуктаз и участвуют в продуцировании  $O_2^-$ , а этот процесс стимулируется промоторами опухолей [16]. Однако удельное содержание цитохромов  $b_{558}$  в мембранах эритроцитов в 80–100 раз превышает содержание цитохромов  $b_{558}$ , локализованных в мембранах лимфоцитов и других клетках плазмы, вместе взятых. Причем, уровень цитохромов  $b_{558}III$  в мембранах эритроцитов рыб значительно выше уровня цитохромов  $b_{558}$ , локализованных в мембранах эритроцитов млекопитающих [3]. Можно заключить, что при РГЖ еще одним фактором качественного изменения цитохрома  $b_{558}III$  является повышение продуцирования  $O_2^-$ .

**Дисбаланс между эндогенными уровнями продуцирующих и утилизирующих супероксидные радикалы металлопротеинов крови женщин, больных РГЖ.**

При РГЖ из металлопротеинов прооксидантного действия только уровни цитохромов  $b_5$  и  $b_{558}IV$ , а также супрола снижаются. Уровни же остальных металлопротеинов ощутимо возрастают по сравнению с показателями здоровых женщин (таблица). Наблюдается заметное повышение уровней суммарной фракции цитохромов  $b_{558}$  ( $b_{558}III$  и  $b'_{558}III$ ) при РГЖ. Суммарный уровень прооксидантного действия металлопротеинов (цитохром  $b_5$ , супрол и цитохром  $b_{558}$ ) до проведения хроматографии был повышен на  $27.1 \pm 2.3\%$  ( $P < 0.02$ ) за счет эритроцитарных мембранных цитохромов  $b_{558}$ . По сравнению с показателями донорской крови, суммарный уровень МАД повышен на  $115.8 \pm 12.2\%$  ( $P < 0.05$ ), и снижен только уровень Cu,Zn-СОД. Однако уровень МПД эритроцитов при РГЖ выше уровня МПД эритроцитов донорской крови на  $56.2 \pm 3.4\%$  ( $P < 0.03$ ). Нетрудно заметить, что в эритроцитах при РГЖ существует определенный дисбаланс между МПД и МАД, при котором эндогенный уровень  $O_2^-$ -продуцирующих систем повышен. Это, возможно, приводит к стимулированию липидной пероксидации супероксидными радикалами и  $H_2O_2$  [15] как продукта ферментативного дисмутирования  $O_2^-$  [14]. Вероятно, это вызывает повышение кислотности цитохрома  $b_{558}III$  и превращает его в цитохром  $b'_{558}III$ , который имеет сильнокислый характер. При РГЖ адаптационные механизмы организма против этого вырабатывают соответствующее повышение уровня каталазы. В аналогичных условиях в сыворот-

Плотность максимальных оптических поглощений металлопротеинов крови и их активности при РГЖ (n=18, P<0.05)

Металлопротеины	Плотность макс.оптич.поглощения		%
	донорская кровь	РГЖ	
Цитохром b <sub>5</sub> (5)*	0.1±0.02	0.06±0.02	-40.1±3.8
Суммарная фракция цитохромов b <sub>558</sub> мембр. эритроцитов до хроматографирования (25)	0.36±0.05 (P<0.02)	0.69±0.05 (P<0.03)	+91.6±5.5 (P<0.02)
Цитохром b <sub>558</sub> IV (25)	0.07±0.02 (P<0.01)	0.06±0.02 (P<0.02)	-14.3±1.7 (P<0.02)
Суммарная фракция цитохромов b <sub>558</sub> III + b' <sub>558</sub> III (25)	0.24±0.02 (P<0.01)	0.56±0.03 (P<0.01)	+133.4±10.3 (P<0.03)
Цитохром b <sub>558</sub> III (25)	0.16±0.01	0.20±0.02	+25.0±2.1
Цитохром b' <sub>558</sub> III (25)	0.1±0.01	0.28±0.06	+180±12.6
Супрол (5)	0.5±0.02	0.45±0.02	-10.1±0.1
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -продуцир.активн. супрола (ед/мл)	28.14±2.5 (P<0.01)	36.4±3.1 (P<0.02)	+29.5±2.4 (P<0.01)
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -продуцир.активн. цит. b <sub>558</sub> III (ед/мл)	6.1±0.4 (P<0.02)	8.3±1.1 (P<0.03)	+36.0±2.2 (P<0.04)
ЦП (2)	0.04±0.01	0.06±0.02	+50.0±3.2
ТФ (6)	0.06±0.01	0.1±0.02	+66.7±3.5
Cu,Zn-СОД (ед/мл) (25)	371.8±15.3 (P<0.03)	116.2±7.7 (P<0.02)	-68.7±4.0 (P<0.02)
Каталаза (ед/мл) (150)	1012.4±45.6	1800.3±73.2	+77.8±5.2

\* в скобках приведен объем фракций (мл)

ке крови наблюдается иная картина сдвигов между уровнями МАД и МПД. На фоне небольшого снижения уровня супрола суммарный уровень МАД в сыворотке крови повышается на 116.7±9.5% (P<0.03). При этом в среднем на 30% увеличивается O<sub>2</sub><sup>-</sup>-продуцирующая активность супрола, скорее всего, из-за активирования супрола ионами Cu<sup>+2</sup> in vivo [2].

Полученные результаты хорошо коррелируют с имеющимися литературными данными. Напомним, что супрол является NADPH-зависимым липопротеином высокой плотности [5], уровень которого снижен при РГЖ. Можно констатировать, что в эритроцитах и сыворотке крови уровень металлопротеинов – регуляторов метаболизма АФК изменяется неоднозначно. Такое явление наблюдается и при раке крови [1]. При РГЖ за счет МАД сыворотки суммарный уровень

антиоксидантной системы крови все же превышает суммарный уровень прооксидантной системы (60,5%). Вероятно, это вызывает “замедление” метаболических процессов в крови с участием O<sub>2</sub><sup>-</sup> из-за нехватки супероксидных радикалов, что необходимо учитывать при терапии РГЖ.

Суммируя вышеприведенные данные, можно заключить, что при РГЖ происходят не только количественные, но и качественные изменения металлопротеинов – регуляторов метаболизма АФК. Некоторые из этих изменений, в частности комплексообразование цитохрома b<sub>558</sub> с гемоглобином и частичное превращение цитохрома b<sub>558</sub>III в цитохром b'<sub>558</sub>III, могут служить чувствительным диагностическим тестом при РГЖ женщин на ранних стадиях заболевания.

Поступила 05.09.02

**Էրիթրոցիտային թաղանթային ցիտոքրոմ  $b_{558}III$ -ի թթվայնության աճը, նրա կոմպլեքսագոյացումը հեմոգլոբինի հետ և հակաօքսիդանտային ու պրոօքսիդանտային գործողության մեխանիզմների էնդոգեն քանակների միջև առկա հաշվեկշռի խախտումը կրծքագեղձի քաղցկեղով հիվանդ կանանց մոտ**

Գ.Մ. Միմոնյան, Ռ.Մ. Միմոնյան, Մ.Ա. Բաբայան,  
Ա.Կ.Ներսեսյան, Մ.Ա. Միմոնյան

Կրծքագեղձի քաղցկեղով (ԿՔ) հիվանդ կանանց էրիթրոցիտների թաղանթային ցիտոքրոմ  $b_{558}III$ -ը կոմպլեքսի մեջ է մտնում թաղանթների ներխուժած հեմոգլոբինի հետ, ինչը հանգեցնում է այդ թաղանթների որոշ չափով կարմրեցման (այդ կարմրությունը չի վերանում թաղանթների վազման հետևանքով՝ ի տարբերություն ոչ ուռուցքակիր կանանց էրիթրոցիտային թաղանթների): Դրան զուգընթաց մեծանում է ցիտոքրոմ  $b_{558}III$ -ի թթվայնության աստիճանը, մասամբ վերափոխվելով ավելի բարձր թթվային հատկանիշներ ունեցող ցիտոքրոմ  $b'_{558}III$ -ի: Խթանվում է ցիտոքրոմ  $b_{558}III$ -ի կողմից NADPH-կախյալ մեխանիզմով սուպերօքսիդ ռադիկալների գոյացումը: ԿՔ ժամանակ դիտվում է նաև արյան հակաօքսիդանտային և պրոօքսիդանտային գոր-

ծողության մետաղապրոտեինների էնդոգեն քանակների միջև առկա հաշվեկշռի խախտում. ինչը հանգեցնում է հակաօքսիդանտային գործողության մետաղապրոտեինների գումարային մակարդակի աճի արյան մեջ:

Այսպիսով, ԿՔ հիվանդ կանաց արյան որոշ քաղաղյամասերը (հատկապես էրիթրոցիտներում) կրում են ոչ միայն քանակական, այլև որակական փոփոխություններ՝ ենթարկվելով համապատասխան մակարդակի օքսիդատիվ սթրեսի: Նշված փոփոխությունները, հատկապես որակական, կարող են օգտագործվել որպես նորը ախտորոշիչ չափանիշներ կանանց մոտ ԿՔ-ի գոյացման սկզբնական փուլում:

**Elevation of the acidity of erythrocyte membranes' cytochrome  $b_{558}III$ , forming a complex compound with hemoglobin and change of the balance between endogenous levels of antioxidant and prooxidant action metalloproteins in blood of women with breast cancer**

G.M.Simonyan, R.M.Simonyan, M.A..Babayan,  
A.K.Nersesyan, M.A.Simonyan

By the "intervention" of Hb into erythrocyte membranes a complex compound with cytochrome  $b_{558}III$  is formed in women with breast cancer (BC). As a result the colour of erythrocytes membranes slightly reddens (these membranes do not lose their red colour after washing, as distinct to those of on cancer women). On the other hand, the increase of the acidity of cytochrome  $b_{558}III$  and its conversion to the high acidity  $b'_{558}III$  of cytochrome takes place at BC. Simultaneously, the NADPH-dependent  $O_2^-$ -producing activity of cytochrome  $b_{558}III$  is elevated at BC. Moreover, the disbalance

between endogenous levels of blood antioxidant and prooxidant metalloproteins takes place at BC. As a result, the total levels of antioxidant action metalloproteins are elevated.

Thus, several components of blood (in particular in erythrocytes) are submitted to quantitative and qualitative changes in conditions of corresponding oxidative stress at BC. These changes, in particular the qualitative ones, may be used as a sensitive diagnostic test at the early stage of BC.

## Литература

1. Симосян Г.М. Медицинская наука Армении, 2002, XLP, с.101.
2. Симосян Г.М., Бабаян М.А., Симосян Р.М., Симосян М.А. Биол.ж.Армении, 1999, 52, с.18.
3. Симосян Г.М., Серопян М.А., Симосян М.А. и др. ДНАН РА, 2001, 101, с.183.
4. Симосян М.А., Галоян А.А., Симосян Г.М., Мелконян Р.В. ДНАН РА, 1997, 97, с. 62.
5. Симосян М.А., Карапетян А.В., Бабаян М.А., Симосян Р.М. Биохимия, 1996, 61, с. 932.
6. Симосян М.А., Симосян Г.М., Григорян Г.Г., Симосян Р.М. Способ получения шитохромов типа b из мембран эритроцитов. Лицензия изобр. N 908, Армпатент, 2001.
7. Симосян М.А., Бабаян М.А., Симосян Г.М. Биохимия, 1995, 60, с.1977.
8. Симосян М.А., Симосян Г.М., Мелконян Р.В. Способ получения металлопротеинов. Промышл. собственность (Офиц.бюлл.Армпатента). Ереван, 1977, N 1 (3), с.34.
9. Abiaka C., Al-Awadi F., Al-Sayer H. et al. J.Clin.Lab.Anal., 2002, 16, p.161.
10. Alagol H., Erdem E., Sancak B. et al. Aust.N.Z. J.Surg., 1999, 69, p.647.
11. Batot G., Pacllet M.H., Doussier J., Vergnaud S. et al. Biochim.Biophys.Acta, 1998, 1406(2), p. 188.
12. Della R.F., Granata A., Broccio M., Zizilli A., Broccio G. Anticancer Res., 1995, 15, p.2089.
13. Florenza A.M., Branchi A., Sommariva D. Int. J.Clin.Lab.Anal., 2000, 30, p.141.
14. Fridovich I. Ann.Rev.Biochem., 1995, 64, p. 97.
15. Givotti AW., Thomas J.P. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984, 118, p. 474.
16. Goldstein B.D., Witz G., Amoroso M., Stone D.S., Troll W. Cancer Lett., 1981, 11, p. 257.
17. Gonenc A., Ozkan Y., Torun M., Simsek B. J. Clin. Pharm. Ther., 2001, 26, p. 141.
18. Kumar K., Thanguraju M., Sachdanandam P. Biochem.Int., 1991, 25, p. 371.
19. Ray A., Jain D., Yadav R. et al. Indian J.Physiol.Pharmacol., 2001, 45, p. 337.
20. Ray G., Batra S., Shukla N.K. et al. Breast Cancer Res.Treat., 2000, 59, p. 163.
21. Schapira D.V., Schapira M. Breast Cancer Res.Treat., 1983, 3, p. 221.
22. Savina E.V., Slonimscaya E.M., Kondakova N.V., Garbukov E.Yu. Russ.J.of Oncol., 2001, 1, p. 180.
23. Sumbramaniam S., Sumbramaniam S., Shyamala Devi C.S. Cancer Biochem., Biophys., 1994, 14, p.177.
24. Sumbramaniam S., Sumbramaniam S., Jagadeesan M., Devi C.S. Chemotherapy. 1994, 40, p.427.
25. Thangaraju M., Erhilarasi R., Sachdanandam P. Cancer Biochem. Biophys., 1995, 14, p.297.
26. Vaidya S.M., Kamalakar P.L. Indian J.Med.Sci., 1998, 52, p. 184.
27. Vasigara S.W., Sumbramaniam S., Shyama S., Jagadelsan M., Shyamala Devi C.S. Chemotherapy, 1996, 42, p.65.