

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинская биология

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Е.И. Шишацкая  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Анализ продуктов окислительной модификации липидов и белков в крови  
больных колоректальным раком

06.04.01 – Биология

06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

|              |               |                                 |                       |
|--------------|---------------|---------------------------------|-----------------------|
| Руководитель | _____         | <u>доцент, канд. биол. наук</u> | <u>Н.М.Титова</u>     |
|              | подпись, дата | должность, ученая степень       | инициалы, фамилия     |
| Выпускник    | _____         |                                 | <u>В.В. Борисова</u>  |
|              | подпись, дата |                                 | инициалы, фамилия     |
| Рецензент    | _____         | <u>профессор, д-р мед.наук</u>  | <u>Л.М. Кургасова</u> |
|              | подпись, дата | должность, ученая степень       | инициалы, фамилия     |

Красноярск 2020

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Анализ продуктов окислительной модификации липидов и белков в крови больных колоректальным раком» содержит 57 страниц текстового документа, 13 иллюстраций, 4 таблицы, 54 использованных источника.

**АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ, КАРБОНИЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ БЕЛКОВ, ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ, ДИЕНОВЫЕ КОНЬЮГАТЫ, МАЛОНОВЫЙ ДИАЛЬДЕГИД, ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС, ПРООКСИДАНТЫ, РАК ПРЯМОЙ КИШКИ.**

Объем исследований – эритроциты: 50 пациентов с раком прямой кишки и 70 условно здоровых людей.

**Цель работы** – изучить содержание карбонильных производных белков, диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в крови больных раком прямой кишки

### **Задачи:**

1. Определить содержание карбонильных производных белков в крови общей группы до и после лечения онкобольных;
2. Исследовать содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в крови общей группы больных раком прямой кишки до и после лечения;
3. Выявить изменения исследуемых показателей на разных стадиях развития колоректального рака до и после лечения.

Рост заболеваемости раком прямой кишки и смертности от него делает **актуальным** исследование проблемы и поиск новых методов лечения.

Результаты проведенного исследования демонстрируют, что у больных как до, так и после лечения интенсивно протекают процессы свободнорадикального окисления липидов и белков, причем выраженность изменений более значима у больных до лечения рака прямой кишки.

## СОДЕРЖАНИЕ

|  |    |
|--|----|
| РЕФЕРАТ .....  | 2  |
| ВВЕДЕНИЕ .....   | 5  |
| 1 Обзор литературы.....  | 7  |
| 1.1 Активные формы кислорода – источники, свойства, биологические функции.....   | 7  |
| 1.2 Антиоксидантная защита тканей.....   | 12 |
| 1.3 Свободнорадикальное окисление белков.....  | 17 |
| 1.4 Перекисное окисление липидов.....  | 22 |
| 1.5 Колоректальный рак.....  | 26 |
| 2 Материалы и методы.....  | 29 |
| 2.1 Объект исследования .....  | 29 |
| 2.2 Определение карбонильных производных белков.....   | 29 |
| 2.3 Определение уровня диеновых конъюгатов.....  | 31 |
| 2.4 Определение концентрации малонового диальдегида.....   | 32 |
| 2.5 Определение содержания гемоглобина.....  | 34 |
| 2.6 Определение содержания общего белка .....  | 35 |
| 2.7 Статистическая обработка результатов.....  | 36 |
| 3 Результаты и обсуждения.....   | 37 |
| 3.1 Уровень продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов в эритроцитах общей группы больных колоректальным раком.....               | 37 |
| 3.2 Содержание продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов в эритроцитах больных раком прямой кишки по стадиям до лечения .....    | 41 |
| 3.3 Содержание продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов в эритроцитах больных раком прямой кишки по стадиям после лечения ..... | 42 |
| 3.4 Уровень продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов в плазме крови общей группы больных колоректальным раком.....              | 44 |

|   |    |
|---|----|
| 3.5 Содержание продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов в плазме крови больных раком прямой кишки по стадиям до лечения .....    | 46 |
| 3.6 Содержание продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов в плазме крови больных раком прямой кишки по стадиям после лечения ..... | 47 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....   | 50 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....   | 51 |

## ВВЕДЕНИЕ

В каждом аэробном организме в процессе его жизнедеятельности непрерывно образуются активные формы кислорода (АФК), которые, являясь метаболитами, обеспечивают протекание многих физиологических процессов. Однако избыточная продукция свободных радикалов и других активные формы кислорода (АФК) приводит к развитию патологических процессов [1].

На сегодняшний день установлено, что ткани, органы, пораженные воспалением, образуют повышенные количества активных форм кислорода. АФК инициируют свободнорадикальные реакции, которые рассматриваются как главное звено в прогрессировании различных заболеваний, в том числе и колоректального рака [2].

Свободные радикалы и другие активные формы кислорода играют огромную роль в регуляции основных функций клетки. Мишенью АФК служат клетки и клеточные структуры, в которых идут процессы окисления высокомолекулярных соединений, таких как белки, липиды и нуклеиновые кислоты. При ярко выраженном окислительном стрессе повреждение макромолекул приобретает необратимый характер, который влечет за собой гибель клеток [3].

В результате свободнорадикального окисления белков нарушается их конформация, что может привести к образованию токсичных продуктов, например, карбонильных производных белков [1].

Одним из основных субстратов свободнорадикального окисления являются полиненасыщенные жирные кислоты, которые находятся в составе фосфолипидов мембран клеток и липопротеинов плазмы крови. Перекисным окислением липидов (ПОЛ) называют процесс, который приводит к возникновению ряда токсичных продуктов, таких как диеновые конъюгаты и малоновый диальдегид.

Интенсификация свободно-радикального окисления приводит к нарушению структуры липидов и белков в клеточных мембранах, изменение вязкости билипидного слоя, конформации мембранных белков, что приводит к изменению активности ферментов и функционирования ионных каналов [4].

Цель данного исследования – изучить содержание карбонильных производных белков, диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в крови больных раком прямой кишки.

Исходя из цели, были сформулированы следующие задачи:

- 1) Определить содержание карбонильных производных белков в крови общей группы до и после лечения онкобольных;
- 2) Исследовать содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в крови общей группы больных раком прямой кишки до и после лечения;
- 3) Выявить изменения исследуемых показателей на разных стадиях развития колоректального рака до и после лечения.

Магистерская диссертация выполнена на базе Сибирского федерального университета Института фундаментальной биологии и биотехнологии кафедры медицинской биологии и является частью комплексного исследования по изучению процессов свободнорадикального окисления липидов и белков в норме и при различных патологиях.

## 1 Обзор литературы

### 1.1 Активные формы кислорода – источники, свойства, биологические функции

Активные формы кислорода (АФК) являются побочными продуктами нормального клеточного метаболизма. Низкое и умеренное количество АФК оказывают благотворное влияние на некоторые физиологические процессы, включая уничтожение вторгающихся патогенов, заживление ран и восстановление тканей.

АФК действуют как важные сигнальные молекулы. Неконтролируемая генерация АФК представляет серьезную проблему для гомеостаза и вызывает окислительное повреждение тканей. АФК производятся в ответ на ультрафиолетовое (УФ) излучение, курение, потребление алкоголя, прием нестероидных противовоспалительных препаратов и многие другие экзогенные агенты. Нарушение нормального клеточного гомеостаза с помощью окислительно-восстановительной сигнализации способствует заболеванию практически во всех органах [4].

Активные формы кислорода — это свободные радикалы, имеющие на внешней электронной оболочке один неспаренный электрон. Донорами электронов могут служить металлы с переменной валентностью (железо, медь и т.д.), находящиеся в составе большого количества ферментов.

Эти кислородно-центрированные малые молекулы неустойчивы и очень реакционноспособны, взаимодействуя с белками, липидами, углеводами и нуклеиновыми кислотами внутри клеток и приводя к необратимой инактивации молекул-мишеней [5]. В невозбужденном состоянии кислород является стабильным радикалом, неспаренные электроны которого имеют параллельные спины. В результате такой конфигурации снижается реакционная способность молекулярного кислорода по отношению к органическим соединениям.

Одними их важнейших активных форм кислорода служат супероксидный анион радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ) и гидроперекисный радикал ( $HO_2^{\cdot}$ ), которые проявляют токсическое действие почти на все типы клеток вследствие повреждения компонентов клеточных мембран, ДНК [2]. Наиболее опасным является супероксид, потому что он инициирует образование других видов АФК таких как: гидроксильный радикал ( $HO^{\cdot}$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ), синглетный кислород ( $^1O_2$ ), нитрил-радикал (оксид азота ( $NO^{\cdot}$ )), пероксинитрит ( $ONOO^{\cdot}$ ) [3, 4, 5].

Основными источниками АФК в клетках являются:

1. Дыхательная цепь митохондрий. Происходит утечка электронов из электрон-транспортной цепи и их прямое взаимодействие с молекулярным кислородом.

2. Пероксисомы, в которых локализовано множество ферментов, связанных с метаболизмом перекиси водорода.

3. Гладкий эндоплазматический ретикулум. В нем находится ряд цитохром-зависимых оксигеназ, продуцирующих супероксидный анион-радикал в ходе каталитических процессов [5].

4. Плазмалемма макрофагов и эндотелиоцитов.

5. Атоокисление гемоглобина [6].

Активные формы кислорода могут инициировать свободнорадикальное окисление белков и липидов и повреждение ДНК, ведущие к мутагенезу, канцерогенезу и гибели клеток [7].

### **Супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ )**

Известно, что супероксидный анион ( $O_2^{\cdot-}$ ) является одноэлектронным восстановительным продуктом  $O_2$  и затем восстанавливается до пероксида водорода ( $H_2O_2$ ), а затем гидроксильный радикал ( $HO^{\cdot}$ ) образуется из  $H_2O_2$  и  $O_2^{\cdot-}$ . Эти реакционноспособные формы кислорода



индуцируют окислительный стресс, включающий перекисное окисление липидов.

Супероксид анион продуцируется NADPH-оксидазной системой в ходе иммунного ответа, при котором фагоциты интенсивно и в больших количествах поглощают кислород (дыхательный «взрыв»), производя супероксид  $O_2^{\cdot-}$  за счет окисления цитозольного NADPH:



NADPH-оксидаза обеспечивает быстрое образование супероксидного анион-радикала в результате активизации неспецифической защиты организма для уничтожения бактерий. Антимикробная защита – главная биологическая роль  $O_2^{\cdot-}$  [8, 9].

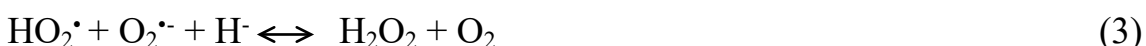
Также имеется другой путь генерации супероксидного радикала – реакция, катализируемая ксантиноксидазой. В оксидазной форме фермент, окисляя гипоксантин в ксантин, а ксантин в мочевую кислоту, в качестве акцептора электронов использует молекулярный кислород, в результате чего происходит образование  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  [10]. Ксантиноксидазная реакция также служит источником гидроксил-радикала, возникающего при дальнейшем восстановлении  $H_2O_2$ .

В физиологических условиях  $O_2^{\cdot-}$  является относительно слабым окислителем и из-за наличия заряда плохо проходит через плазматическую мембрану [4,8].

### **Гидропероксильный радикал ( $HO_2^{\cdot}$ )**

Служит более сильным окислителем, по сравнению с супероксидным анион-радикалом. Вступает в реакции с линолевой, линоленовой, арахидоновой кислотами, окисляя их до гидроперекисей. При сдвигах pH в кислую сторону (закисление среды), например в фагосомах, уровень  $HO_2^{\cdot}$  увеличивается во много раз.

Образование гидроксиоксид-иона и его протонированной формы – перекиси водорода происходит в результате одноэлектронного восстановления супероксидного радикала [9]. При нейтральном значении рН реакция протекает в две стадии:



Так же гидропероксильный радикал образуется при взаимодействии перекиси водорода с органическими радикалами или с супероксидным анион-радикалом:



Так как гидропероксильный радикал не имеет заряда, он может легко проникать через биологические мембраны, и беспрепятственно проходить между компонентами клетки, вступать в реакцию с ненасыщенными жирными кислотами и с некоторыми аминокислотами [5].

### **Пероксид водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Обладает довольно большим периодом полураспада и распространяется на сравнительно большие расстояния в водных растворах. Причиной этого является то, что она обладает более низкой реакционной способностью, чем другие представители АФК [11]. Перекись водорода H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> принимает участие в регуляции сигнальных ферментов и факторов транскрипции. Так же данная молекула имеет важное значение в пролиферации клеток, их дифференцировке, миграции и апоптозе. Является субстратом для миелопероксидазы [12].

Образованию перекиси водорода способствует спонтанная дисмутация супероксидного анион-радикала. Эта реакция катализируется супероксиддисмутазами (СОД) :



Пероксид водорода образуется так же при спонтанных взаимопревращениях супероксидного и гидропероксильного радикала:



$\text{H}_2\text{O}_2$  наиболее стабильная и наименее реакционноспособная молекула [13,14].

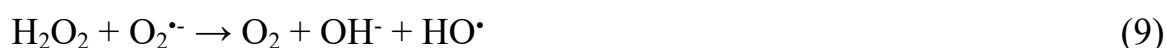
Защита от разрушающего действия  $\text{H}_2\text{O}_2$  реализуется ферментом каталазой, которая быстро превращает перекись водорода в кислород и воду :



Каталаза является тканеспецифичным ферментом и в наибольших количествах обнаружена в печени и эритроцитах [14].

### **Гидроксильный радикал ( $\text{HO}\cdot$ )**

Это один из самых реакционноспособных и токсичных соединений из всех представителей АФК. Генерация  $\text{HO}\cdot$  обнаружена в реакциях Хабер-Вейса между  $\text{O}_2\cdot$  с  $\text{H}_2\text{O}_2$  в присутствии ионов металла переменной валентности (железа или меди):



Образование  $\text{HO}\cdot$  возможно также в реакции Фентона – взаимодействие перекиси водорода с  $\text{Fe}^{2+}$

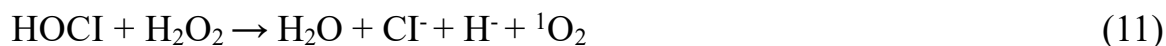


Следует отметить о существовании предположения о том, что нейтрофилы и моноциты человека могут генерировать гидроксильный радикал по механизмам, зависимым от миелопероксидазы [15].

### **Синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ )**

Синглетный кислород – это молекула, которая находится в двух стабильных состояниях молекулярного кислорода с наиболее высокой энергией, по сравнению с основным, триплетным состоянием. Предполагается, что молекулы синглетного кислорода определяют механизм

запуска апоптоза. У большинства клеток основным источником синглетного кислорода служит спонтанная дисмутация супероксидных анионов. Существует предположение, что генерация синглетного кислорода осуществляется нейтрофилами в процессе «дыхательного взрыва»:



Во многих исследованиях обнаружилось, что взаимодействуя с органическими веществами, синглетный кислород проявляет очень высокую окислительную активность [16].

### **Нитрил-радикал (NO<sup>•</sup>)**

Во время бактериальной инфекции организма клетки иммунной системы образуют большое количество оксида азота (NO<sup>•</sup>) и супероксид аниона за счет активации NO-синтазы и NADPH-оксидазы. В результате взаимодействия оксида азота с супероксидным радикалом образуется токсичное и реакционноспособное соединение пероксинитрит (ONOO<sup>-</sup>).

NO<sup>•</sup> служит кратковременной сигнальной молекулой, которая играет важную роль в различных физиологических процессах, включая регуляцию тонуса кровеносных сосудов, воспаление, функции митохондрий и апоптоз. NO<sup>•</sup> также служит мощным иммунорегуляторным фактором и оказывает влияние на цитоплазматический окислительно-восстановительный баланс по генерации пероксинитрита ONOO<sup>-</sup> после его реакции с супероксид (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Возможно, именно с пероксинитритом связывают разрушающее действие NO биологических макромолекул, в первую очередь белков [3,17].

## **1.2 Антиоксидантная защита тканей**

Защита организма от окислительного стресса осуществляется благодаря наличию многокомпонентной антиоксидантной системы (АОС), включающей низкомолекулярные антиоксиданты и антиоксидантные ферменты.

Среди низкомолекулярных антиоксидантов выделяют гидрофильные и гидрофобные. К гидрофильным антиоксидантам относятся восстановленный глутатион (GSH) и аскорбиновая кислота, защищающие вещества матрикса митохондрий, а гидрофобные антиоксиданты защищают клеточные мембраны. Работа антиоксидантов заключается в том, что они служат ловушками для свободных радикалов, восстанавливают активные формы кислорода и продукты окислительной модификации [18].

В системе антиоксидантной защиты важную роль отводят глутатиону, так как он является главным восстановителем и его уровень более высок по сравнению с большинством органических соединений. Глутатион действует на трех линиях ферментативной защиты (восстановление перекиси водорода, гидропероксидов и обезвреживание вторичных метаболитов ОМ); важно отметить, что GSH-зависимые ферменты выполняют свои функции практически во всех частях клетки.

Следует отметить, что огромную роль играют антиоксидантные ферменты. Существует три линии защиты: супероксиддисмутаза (СОД); глутатионпероксидаза (GPO) и каталаза; глутатионтрансфераза [19].

### **Супероксиддисмутаза**

СОД – фермент, выступающий на первой линии антиоксидантной защиты, так как устраняет супероксидный радикал, синтезирующийся самым первым, ещё на стадии одноэлектронного восстановления кислорода. То есть данный фермент обрывает цепочку свободнорадикальных превращений в самом её начале, на стадии зарождения. Этот энзим катализирует реакцию дисмутации супероксидного анионрадикала в кислород и перекись водорода.

У млекопитающих главным цитозольным ферментом СОД является Cu,Zn-зависимая супероксиддисмутаза, которая состоит из двух одинаковых субъединиц. В состав каждой субъединицы в области активного центра

входит один атом меди и один атом цинка. Медь активно участвует в дисмутации супероксидного анион-радикала, в свою очередь цинк стабилизирует белковую молекулу [7].

Марганецсодержащая форма СОД локализована в основном в митохондриях, а Cu, Zn-супероксиддисмутаза – в плазме крови.

Существует так называемая антиоксидантная терапия. Показано, что совместное применение супероксиддисмутазы и каталазы в несколько раз эффективнее защищает клетки от окислительной модификации, чем назначение каждого фермента по отдельности.

### **Глутатионпероксидаза (GPO)**

Глутатионпероксидаза – семейство селенсодержащих гомотетрамерных ферментов, в состав которых входит селеноцистеин, глутамин и триптофан.

GPO нейтрализует перекись водорода, превращая ее в воду, и переводит пероксиды липидов в соответствующие спирты, используя в качестве субстрата восстановленный глутатион. Сульфгидрильная группа глутатиона (GSH) служит донором электронов и, окисляясь, образует дисульфидную форму глутатиона, в которой две молекулы глутатиона связаны через S-S мостик [20].

Глутатионпероксидаза находится в цитозоле и матриксе митохондрий [21]. Активность этого фермента зависит от содержания восстановленного глутатиона в клетке, а внутриклеточный уровень данного тиола, в свою очередь, определяется работой глутатионредуктазы и содержанием NADPH, образующемся в пентозофосфатном пути [5].

На сегодняшний день выявлено семь изоформ селенсодержащей глутатионпероксидазы, главным критерием их отличия является внутриклеточная локализация. Наиболее важной клеточной изоформой является GPO-1, имеющая в своем составе 4 субъединицы, каждая из

которых содержит по одному атому селена. Селен окисляется перекисями до SeOH. Далее SeOH взаимодействует с молекулой глутатиона с образованием Se-глутатион, который вступает в реакцию с другой молекулой глутатиона.

### **Каталаза**

Каталаза – это гемсодержащий фермент антиоксидантной системы. Молекулярная масса - 250 кДа. Этот фермент является тетрамером и имеет простетические группы в виде гема на каждую субъединицу, без которых субъединицы теряют каталитическую активность. Каталаза обнаружена во всех живых организмах, даже в растениях и микроорганизмах. В организме млекопитающих максимальная концентрация этого фермента обнаружена в эритроцитах, печени и почках [20].

Функциональная роль каталазы – разрушение перекиси водорода и обеспечении эффективной защиты клеточных структур от разрушающего действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Каталаза катализирует реакцию расщепления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :



Каталаза – фермент, способный долго поддерживать высокую активность и практически не требует энергии активации. Каталаза способна присоединять четыре молекулы NADPH, что предохраняет её от инактивации и повышает ферментативную активность [21].

Однако из-за большой молекулярной массы она плохо диффундирует в клетки, а во внеклеточных жидкостях стремительно теряет свою активность из-за активного воздействия протеаз. Тем не менее, её повышенная концентрация в крови при различных заболеваниях, может служить для защиты от окисления определённых структур. Существует предположение, что Т-лимфоциты способны выделять во внешнюю среду каталазу для их защиты в области очага воспаления [22].

### **Глутатион-S-трансфераза**

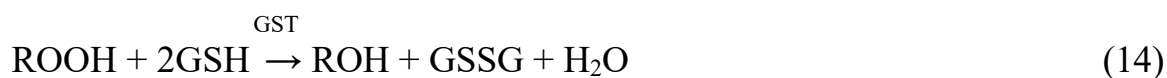
Глутатион-S-трансфераза (GST) является цитоплазматическим белком, принимает участие в конъюгации сульфгидрильной SH<sub>2</sub>-группы с электрофильными атомами углерода, азота, серы и кислорода молекул ксенобиотиков, с отщеплением восстановленного глутатиона. GST присутствует практически во всех органах и тканях, но наибольшая активность обнаружена в печени. Выделяют три субсемейства изоформ GST: цитозольные, митохондриальные и микросомальные.

К цитозольным изоформам GST относятся две основные группы: Y-GST – изоформы, у которых для активации глутатиона используется тирозин, и S/C-GST – изоформы, у которых реакция с глутатионом идет через остаток серина/цистеина.

Микросомальные изоформы представляют собой интегральные мембранные белки, которые участвуют во взаимодействии GSH с электрофильными соединениями.

Митохондриальной изоформой GST человека является изоформа GSTK1-1. Она обнаружена и в пероксисомах человека. Существует множество изоформ GST, что обеспечивает их широкую субстратную специфичность и разнообразие функций [23].

GST использует GSH в роли косубстрата, благодаря чему способна восстанавливать органические гидроперекиси до спиртов:



В целом, окислительный стресс возникает не только при избыточности активных форм кислорода, но и при недостаточности антиоксидантной системы. Другими словами, окислительный стресс – это нарушение баланса между прооксидантами и антиоксидантами организма.

Особую роль в антиоксидантной защите играет протеасома – крупная мультисубъединичная протеаза, которая осуществляет деградацию ненужных и дефектных белков до коротких пептидов [7,8].



### 1.3 Свободнорадикальное окисление белков

Окислительная модификация белков (ОМБ) является одной из главных последствий протекания свободнорадикального окисления (СРО) в живых организмах. Процессы свободно-радикального окисления играют огромную роль в жизнедеятельности клетки, т.к. они лежат в основе метаболизма всех клеток и определяют адаптивность организма к повреждениям. СРО является универсальным звеном в развитии многих патологических состояний. Пероксидное окисление (модификация) белков – один из вариантов свободнорадикального окисления. Нарушение работы антиоксидантной защиты ведет к неадекватному увеличению генерации активных форм кислорода, которые в свою очередь инициируют разветвление процессов СРО в тканях.

Белки структурно более уязвимы к окислительному повреждению, чем другие биомолекулы, благодаря относительно высокой константе скорости для их реакций с большинством свободных радикалов. Окислительная модификация белков вызывает конформационные изменения, что приводит к потере функции протеина [24].

Активные формы кислорода повреждают полипептидные цепи белков, нарушая как первичную, так и вторичную и третичную структуру белков. Белки, поврежденные свободными радикалами, могут быть фрагментированы, подвергнуты аномальной сшивке, а также могут участвовать в образовании токсичных агрегатов с другими поврежденными или с нормальными клеточными белками [25].

Основными мишенями активных форм кислорода служат аминокислотные остатки белков, имеющие SH-группы, такими аминокислотами являются цистеин и метионин. При этом цистеиновые остатки образуют дисульфиды, а метиониновые – сульфоксиды [26].

Модификация белков может происходить через окисление остатков цистеина и образование внутримолекулярных дисульфидных мостиков. Так

же свободнорадикальному окислению может подвергаться тирозиновые остатки [28], образуя сшивки (рис.1)

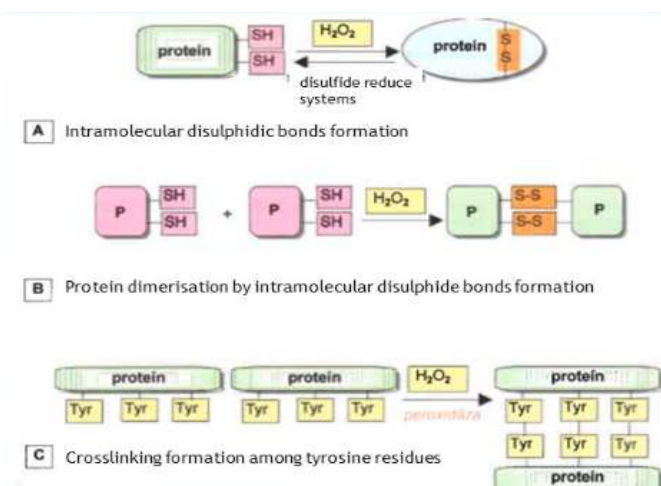


Рисунок 1 – Варианты окислительной модификации белков [29]

Образование карбонильных производные белков (КПБ) происходит при участии таких аминокислотных остатков как пролин, аргинин, треонин, лизин, цистеин и гистидин, а так же при их взаимодействии с продуктами перекисного окисления липидов. Другим путем образования продуктов окислительной модификации белков является гликирование и гликооксидация аминокислотных остатков лизина (рис.2):

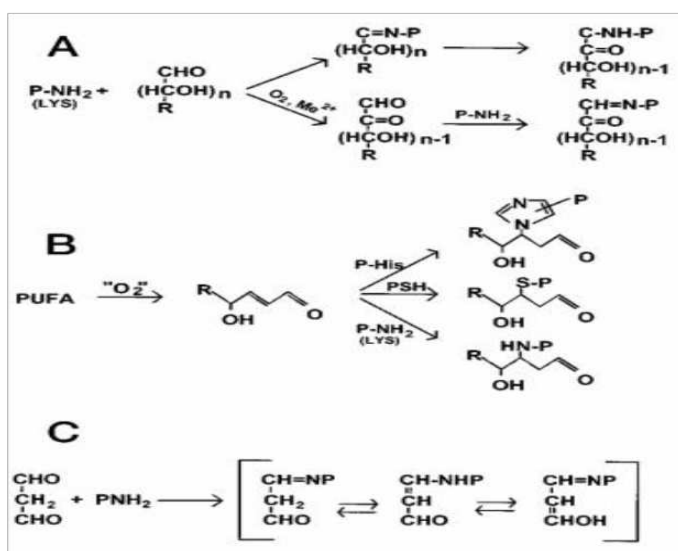


Рисунок 2 – Образование продуктов ОМБ при гликировании, гликооксидации и реакциях с продуктами перекисидации полиеновых жирных КИСЛОТ

Повышенный уровень карбонильных производных белков – одно из важнейших проявлений окислительной модификации белков. Если белки подверглись окислительной модификации, то период их полураспада (полужизни) значительно увеличивается. Высокая концентрация карбонильных групп указывает о развитии свободнорадикального окисления при каком либо патологическом состоянии.

Предполагают, что причиной повышенного уровня продуктов ОМБ может являться посттрансляционная окислительная модификация белков, а также высокая степень их протеолитического разрушения. Также могут подвергаться окислению и ферменты протеолиза, что может повлечь за собой аккумуляцию белков [27].

### Окисление белкового скелета

Первым этапом ОМБ является участие  $\text{HO}^\bullet$  в отсоединении водорода от  $\alpha$ -углеродного атома полипептидной цепи с последующим образованием алкильного радикала белка (рис 3, реакция с). Источником гидроксильного радикала  $\text{HO}^\bullet$  служит радиация или металл-катализируемое расщепление (рис 3, реакции a, b)



Рисунок 3 – Окисление белкового скелета свободными радикалами

Алкильный радикал с достаточно легко реагирует с кислородом, образуя алкилперокси-радикальное соединение (реакция d), которое может

перейти в алкилпероксид (реакция e), и далее в алкокси-радикал (реакция h), который затем переходит в гидроксил-производное белка (реакция j) [7].

В условиях отсутствия кислорода окисление белка заканчивается на этапе образования углеродного центра, который может прореагировать с другими радикальными центрами с образованием белковых сшивок  $R_1CCR_2$ .

Агрегации молекул белков способствует образование S-S мостиков между цистеиновыми остатками и 2,2' - бифенильными сшивками тирозиновых остатков белков. Между радикальными центрами аминокислотных остатков могут образовываться ковалентные связи [26].

### Фрагментация полипептидных цепей

Фрагментация полипептидных цепей происходит на этапе, когда образуется алкокси-радикала. Процесс расщепления может идти двумя путями:  $\alpha$ -амидным или диамидным путем. При расщеплении диамидным путем (рис.4, а) пептидная часть со стороны N-концевого участка белка обладает диамидной структурой при C-терминальном конце. В то же время пептидный фрагмент со стороны C-концевого участка обладает изоцианатной структурой при N- терминальном конце [27].

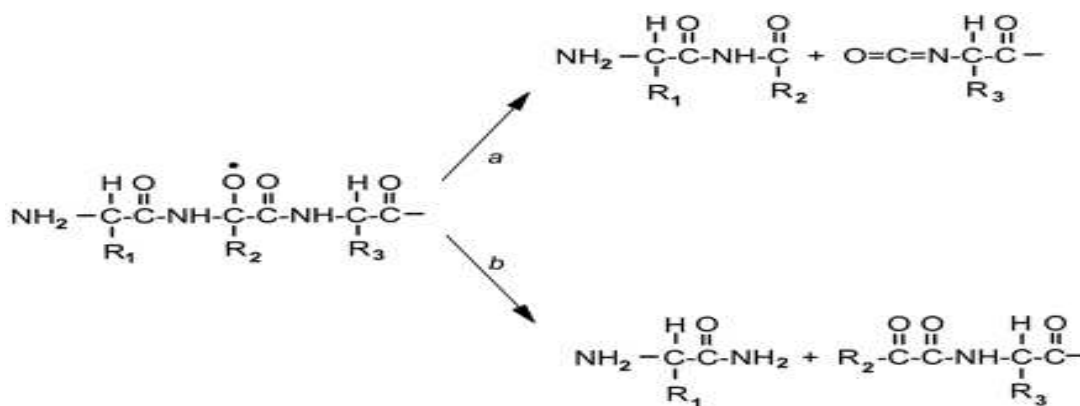


Рисунок 4 – Расщепление белковой цепи по диамидному (а) и  $\alpha$ -амидному (b) путям [27]

Если реакция идет по  $\alpha$ -амидном пути, то пептидный фрагмент, полученный в области N –терминального конца белка, имеет амидную

группу при С-концевом участке, а N-конец пептида со стороны С-терминального участка существует в виде N-α-кетоацилпроизводного. Пептидные участки, образовавшиеся диаמידным путем, подвержены кислотному гидролизу и дают CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> и свободную карбоновую кислоту, а путем α-амидации – NH<sub>3</sub> и свободную α-кетокислоту [7].

Расщепление пептидной связи может происходить также в результате свободно-радикальной атаки глутамиловых, аспартильных и пролильных боковых цепей. ·ОН-зависимое отщепление атома водорода от атома γ-углерода глутамилового остатка, за которой следуют реакции, аналогичные реакциям d, f и h на рис. 3, приведет в конечном итоге к расщеплению пептидной связи механизмом, в котором образуется щавелевая кислота, и N-концевая аминокислота пептида, полученного из С-концевой части белка, будет существовать в виде N-пировильного производного [28,29].

Доказано, что при радиолизе белка образуются пептиды, количество которых примерно равно числу пролиновых остатков в белке. Возможно, окисление пролиновых остатков имеет важное значение в расщеплении белкового скелета, с последующим образованием 2-пирролидона и пептидного фрагмента [26].

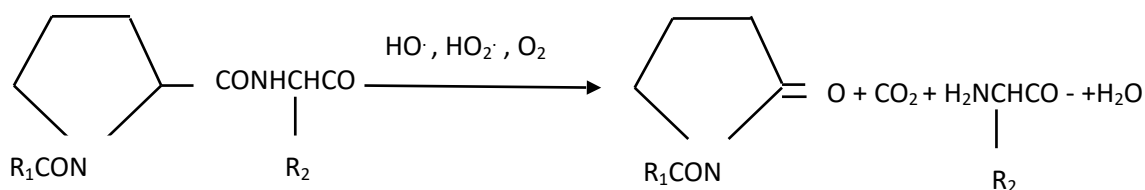


Рисунок 5 – Окисление остатков пролина с образованием 2-пирролидона и пептидного фрагмента [7]

### Окислительная модификация аминокислот

При окислительной модификации белков, образующиеся продукты могут очень сильно отличаться [30].

В первую очередь подвергаться окислительной модификации будут такие аминокислоты как цистеин и метионин, т.к в своей структуре содержат

-SH группы, являющиеся прекрасной мишенью для активных форм кислорода. Следует отметить, что данные аминокислоты требуют на 1-2 порядка меньших концентраций оксиданта [31, 32]. Тем не менее, воздействию АФК, в частности гидроксильного радикала, могут подвергаться любые аминокислотные остатки. Например, аминокислотные остатки триптофана, фенилаланина, тирозина, гистедина выступают в качестве субстрата для атаки гидроксильного радикала. В ходе этого образуются соответствующие гидроксильные радикалы [33].

#### 1.4 Перекисное окисление липидов

Наряду с белками, свободно-радикальному окислению так же подвержены и липиды. Перекисное окисление липидов ( ПОЛ ) — окислительная деградация липидов, происходящая, в основном, под действием активных форм кислорода. Процессы ПОЛ - это свободнорадикальные процессы, которые непрерывно протекают в клетках организма. Главной физиологической задачей перекисного окисления является обновление, распад ненасыщенных структурных липидов, и регуляция проницаемости липидов в биологических мембранах. Его интенсификация может спровоцировать нарушение функции клетки и, как следствие, повлечь за собой развитие патологического процесса [34].

В результате атаки активными формами кислорода от липида отщепляется водород, а затем сам липид переходит в свободно радикальное состояние (L•) и реагируют с молекулярным кислородом, т.е. таким образом, переокисляется (LO•). Данный процесс носит название перекисное окисление липидов.

В основном перекисному окислению подвержены полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), которые служат доступной мишенью для свободных радикалов благодаря наличию более двух несопряженных двойных связей [35,36].

Процесс перекисного окисления липидов проходит в несколько этапов (рис. 4):

1) Инициация: во время работы электрон-транспортной цепи митохондрии происходит утечка электронов на молекулярный кислород, в результате этого образуются активные формы кислорода – супероксидный и гидроксильный радикалы.

2) Элонгация:

а) Гидроксильный радикал вступает в реакцию с полиненасыщенной жирной кислотой и забирает у нее атом водорода, образуя липидный радикал.

б) С этим липидным радикалом связывается молекула кислорода с образованием липид-пероксильного радикала ( $\text{LOO}\cdot$ ).

в) Липид-пероксил присоединяет к себе атом водорода от следующей полиненасыщенной жирной кислоты – образуется новый липидный радикал и липид-пероксид ( $\text{LOOH}$ ), который может распадаться, приводя к развитию новой цепи.

3) Обрыв цепи осуществляется тремя основными путями: образованием неактивного продукта в ходе реакции двух радикалов, присоединением двухвалентного железа и других реагентов, а также при включении в работу антиоксидантной системы [37].

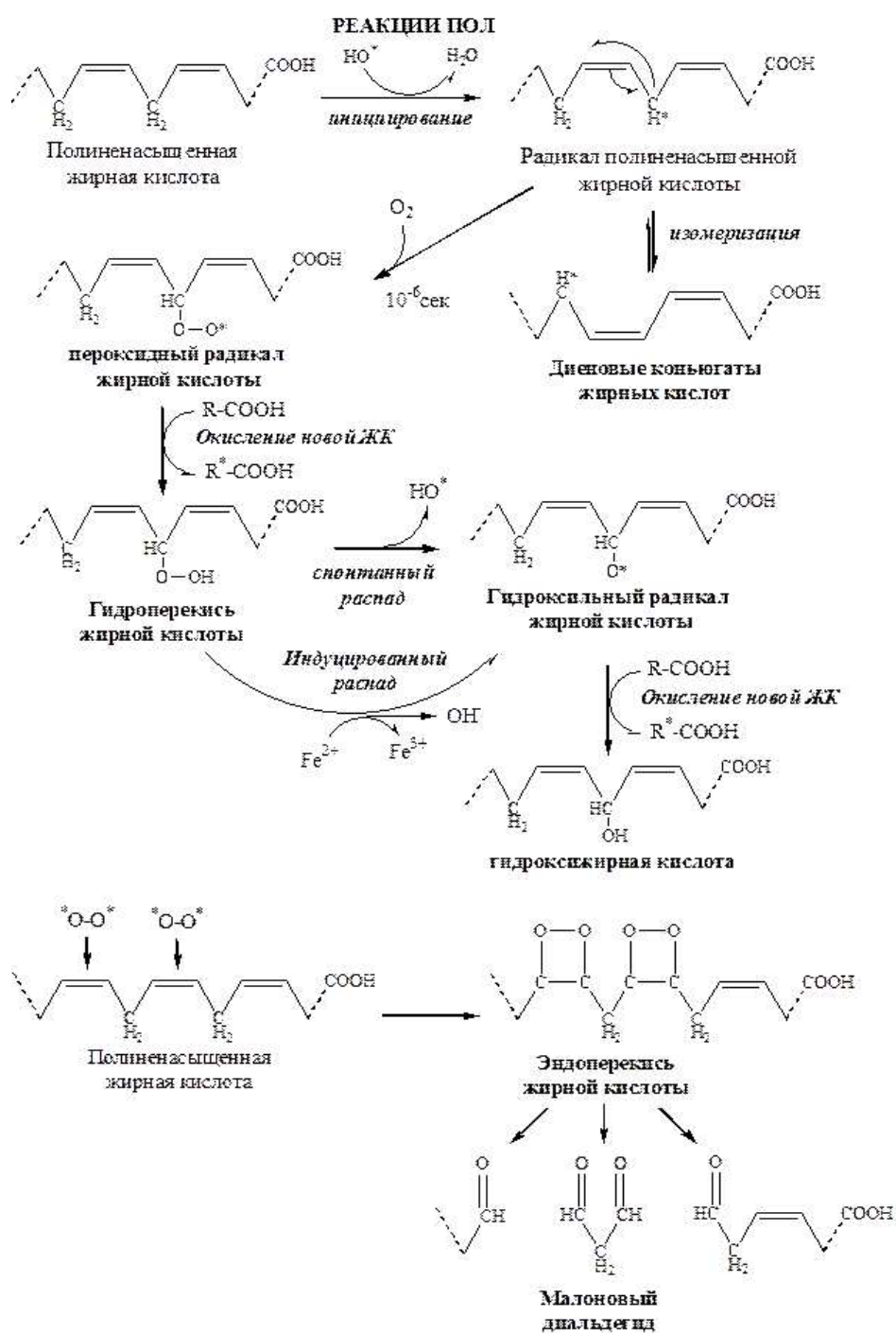


Рисунок 6 – Общая схема перекисного окисления липидов [38]

В ходе перекисного окисления липидов образуются различные продукты, которые подразделяются на: первичные (диеновые конъюгаты, гидроперекиси, эндоперекиси), вторичные (малоновый диальдегид, триеновые конъюгаты), третичные (Шиффовы основания) [35].

### Диеновые конъюгаты (ДК)



ДК - это соединения, относящиеся к первичным продуктам перекисного окисления липидов. Во время перекисного окисления от полиненасыщенной жирной кислоты в  $\alpha$ -положении отрывается атом водорода, двойная связь перемещается и образуются ДК. Диеновые конъюгаты, являясь токсичными продуктами, повреждают липопротеины, белки, энзимы и нуклеиновые кислоты.

Продукты ПОЛ обуславливают конформационные изменения в фосфолипидном бислое мембран. Это вызывает нарушение функций самой мембраны, а также различных органелл клетки. В результате присоединения свободных радикалов жирные кислоты распадаются на множество фрагментов, которые имеют альдегидные группы, обладающие сильной реакционной способностью. Если разрыв жирной кислоты произошел с двух концов, то образуется вторичный продукт – малоновый диальдегид (МДА) [39].

### **Малоновый диальдегид (МДА)**

Малоновый диальдегид (МДА) – это органическое соединение, которое имеет трехчленную углеродную цепь и две альдегидные группы на концах.

Малоновый диальдегид – продукт окислительного повреждения полиненасыщенных жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов. В сыворотке крови липиды входят в состав циркулирующих липопротеиновых частиц – хиломикрон, липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеинов промежуточной плотности (ЛППП), липопротеинов низкой (ЛПНП) и высокой плотности (ЛПВП). Липопротеины играют важную роль в транспорте триглицеридов и холестерина. Особенно подвержены окислительной модификации ЛПНП, так как содержат большое количество линолевой кислоты, являющейся субстратом для перекисного окисления липидов. В результате ОМ образуются модифицированные липопротеины, роль которых доказана в прогрессировании различных патологий [40].

Малоновый диальдегид способен взаимодействовать с N-концевыми аминокислотами белков и с NH<sub>2</sub>-группами фосфолипидов с образованием внутри- и межмолекулярных сшивок.

Малоновый диальдегид может способствовать повреждению компонентов мембран, что приводит к нарушению их свойств и функций, таких как текучесть, транспорт ионов, ферментативная и рецепторная активности.

МДА образуется в ходе пероксидации ксенобиотиков в микросомах печени при наличии металлов переменной валентности, а также ферментативно в присутствии эйкозаноидов. Малоновый диальдегид может реагировать с азотистыми основаниями ДНК и привести к мутагенезу [41].

## 1.5 Колоректальный рак

Большое количество колоректальных опухолей развиваются очень долго, на протяжении многих лет. Началом является образование доброкачественного полипа на слизистой оболочке кишки. Однако, не каждый полип перерождается в злокачественную опухоль, важное значение имеет то, к какому типу относится полип: аденоматозный полип (аденома) — самый «неблагоприятный» полип с онкологической точки зрения, и поэтому аденому часто называют предраковым состоянием; гиперпластические и воспалительные полипы – в основном, не преобразуются в злокачественные [42].

Другим предшественником рака прямой кишки является дисплазия. При дисплазии клетки эпителия толстого и прямого кишечника под микроскопом выглядят не так, как опухолевые, но и уже не как здоровые клетки [43]. Дисплазия обычно развивается у тех больных, кто имеет в анамнезе хронический язвенный колит или болезнь Крона. С течением времени этот хронический воспалительный процесс, может служить отправной точкой к зарождению онкологического заболевания [44].

## Типы колоректального рака

Существует несколько типов рака прямой кишки. В большинстве случаев (95%) это аденокарцинома. Данный тип рака зарождается в железистых клетках, которые выделяют слизь для смазывания внутренней поверхности кишечника [45]. Карциноидная опухоль образуется из специальных гормонпродуцирующих клеток кишечника. Гастроинтестинальная стромальная опухоль развивается из особых клеток стенки толстого кишечника, которые называются интерстициальными клетками Кахаля. Лимфома относится к раку иммунной системы, зарождается в лимфоузлах, но в редких случаях способен развиваться в прямой и толстой кишке. В кровеносных сосудах и мышечной стенке толстого и прямого кишечника может развиваться злокачественная опухоль под названием саркома.

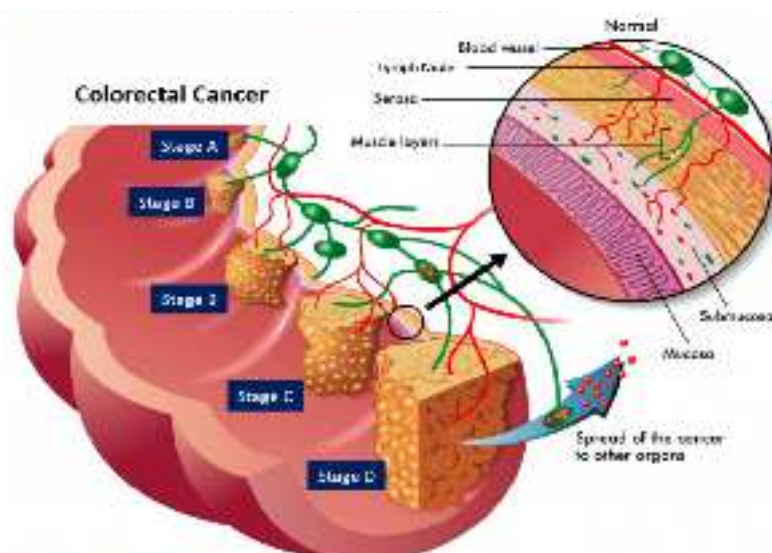


Рисунок 7 – Стадии колоректального рака [46]

0 стадия — опухоль не распространяется за пределы слизистой оболочки прямой кишки. Эта стадия имеет название внутриэпителиальный или преинвазивный рак.

I стадия — злокачественное образование прорастает в мышечный слой слизистой оболочки и доходит до подслизистого слоя. Лимфоузлы на данном этапе пока еще не затрагиваются.

II стадия — опухоль достигает наружного слоя кишки, а затем начинает прорастать сквозь него. В конечном счете, на данной стадии она распространяется в близлежащие органы и ткани.

III стадия — в зависимости от направленности роста новообразования повреждаются регионарные лимфоузлы (до 7) или жировая клетчатка в месте их расположения.

IV стадия — рак метастазирует в далеко расположенные органы (печень, легкие), лимфоузлы и в различные части брюшины [47].

## **2 Материалы и методы**

### **2.1 Объект исследования**

Объектом исследования служила кровь условно здоровых людей (контрольная группа - 70 человек) и людей больных колоректальным раком до и после лечения (50 пациентов). Кровь у больных забиралась в день поступления в стационар и на седьмые сутки после операции. Среди условно здоровых людей 67% мужчины, 33% женщины. Средний возраст здоровых людей составил  $54,5 \pm 1,1$  лет. Среди больных колоректальным раком 57% женщины, 43% мужчины. Средний возраст больных раком составил  $61,7 \pm 1,1$  лет. От каждого пациента было получено подписанное информированное согласие на принятие участия в исследовании. Исследование одобрено Локальными этическими комитетами: ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАН и КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского».

Забор крови производили из локтевой вены натошак, затем кровь центрифугировали при 3000 об/мин, плазма и эритроциты отбирались для определения показателей окислительной модификации белков и липидов.

### **2.2 Определение карбонильных производных белков**

Данный метод основан на реакции между окисленными аминокислотными остатками белков и 2,4-динитрофенилгидразина (2,4-ДНФГ) с последующим образованием производных 2,4-динитрофенилгидразонов (ДНФГ-производные), интенсивность окраски которых фиксировали на спектрофотометре при длине волны 370 нм [48, 49].

Реактивы:

1. 20%-ный раствор ТХУ
2. 2Н раствор HCl

3. 0,2%-ный раствор 2,4-ДНФГ, приготовленный на 2Н HCl

4. Этанол

5. Этилацетат

6. 8М раствор мочевины

Ход определения:

Отмытые и упакованные эритроциты гемолизировались дистиллированной водой (1:50).

Для анализа необходимо приготовить две пробы – контрольную и опытную, в которые поочередно вносили 0,1 мл гемолизата либо 0,1 мл плазмы и 0,9 мл 20%-ого раствора ТХУ для осаждения белков. К денатурированным белкам добавляли: в опытную пробу 1 мл 0,2%-ого 2,4-ДНФГ, а в контрольную только 2н HCl. Затем инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре, образцы центрифугировали на протяжении 20 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадок три раза промывали этанол-этилацетатом в соотношении 1:1 для экстракции липидов и 2,4-динитрофенилгидразина, который не вступил в реакцию с карбонильными группами окисленных белков.

Далее заранее подсушенный осадок растворяли в 2,5 мл 8 М раствора мочевины, выдерживали на водяной бане 5 мин до того момента, пока осадок не растворится. Оптическую плотность динитрофенилгидразонов фиксировали против контроля на спектрофотометре Thermo Scientific Genesys 10s UV-vis при длине волны 370 нм в кювете толщиной 1 см.

Для расчета концентрации карбонильных производных белков использовали коэффициент молярной экстинкции  $22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  и выражали в мкмоль на грамм гемоглобина в эритроцитах и в мкмоль на грамм белка в плазме крови [48, 49] с применением следующих формул:

$$C = \frac{D_{370} \cdot 10^4 \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot m}, \text{ для определения концентрации КПБ в эритроцитах, и}$$

$C = \frac{D_{370} \cdot A \cdot V}{\epsilon_{370} \cdot d \cdot OB}$ , для определения концентрации КПБ в плазме, где:

$D_{370}$  – оптическая плотность образца при длине волны 370 нм,

$V$  - объём опытной пробы ( мл),

$\epsilon_{370}$  -коэффициент молярной экстинкции, равный  $22 \text{ мм}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ,

$d$  - толщина кюветы (1 см ),

$Hb$  - концентрация гемоглобина (г/л),

$OB$  - концентрация общего белка (г/л).

### 2.3 Определение уровня диеновых конъюгатов

Принцип метода основан на том, что в результате  $\pi$ - $\pi$  переходов спектры конъюгированных гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот характеризуются интенсивным поглощением в ультрафиолетовом диапазоне при длине волны 232-234 нм. Экстракция диеновых конъюгатов происходит в гептан-изопропанольной фракции. Так как в гептане в основном происходит экстракция нейтральных липидов, то в изопропаноле – фосфолипидов [48, 50].

*Реактивы:*

1. Гептан-изопропанольная смесь в соотношении 1:1.
2. 0,74%-ный водный раствор хлорида калия (KCl).

*Ход определения:*

Анализ содержания диеновых конъюгатов проводили в эритроцитах и плазме крови. Для этого в гомогенизатор добавляли 0,1 мл упакованных эритроцитов либо 0,1 мл плазмы, вносили 5 мл изопропанола и очень тщательно растирали, пока не получится однородная гомогенная смесь, которую затем переносили в мерную пробирку с добавлением 5 мл гептана.

Содержимое пробирки центрифугировали 10 мин при 1700g. Затем надосадочную жидкость количественно переносили в мерную пробирку и приливали 1/5 объема хлорида калия, чтобы отмыть липидный экстракт от

нелипидных примесей. Далее тщательно перемешивали содержимое пробирки и наблюдали, что образовавшаяся смесь расслаивается на две прозрачные фазы. В гептановой фазе (верхний слой) на спектрофотометре Thermo Scientific Genesys 10s UV-vis измеряли уровень диеновых конъюгатов против гептана в кювете толщиной 1 см [48,50]. Расчет количества ДК в эритроцитах и плазме производили с использованием коэффициента экстинкции  $27000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  и выражали в ммольях на грамм гемоглобина и в ммольях на грамм белка соответственно.

$$C = \frac{D_{232}}{\epsilon_{232} \cdot l \cdot X} * Hb, \text{ для определения концентрации ДК в эритроцитах,}$$

$$C = \frac{D_{232}}{\epsilon_{232} \cdot l \cdot X} * OB, \text{ для определения концентрации ДК в плазме, где:}$$

$D_{232}$  – оптическая плотность образца при длине волны 232 нм,

$\epsilon_{232}$  – коэффициент молярной экстинкции при длине волны =232 нм, равный  $27000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ,

X – фактор разведения, равный 101,

Hb - концентрация гемоглобина (г/л),

ОБ - концентрация общего белка (г/л).

## 2.4 Определение концентрации малонового диальдегида

Принцип метода основан на образовании малонового диальдегида (МДА) результате процессов перекисного окисления липидов. Взаимодействие МДА с 2-тиобарбитуровой кислотой приводит к образованию хромогена с максимумом поглощения в красной области спектра при длине волны 532 нм [48,52].

*Реактивы:*

1. 0,9%-ный раствор NaCl ( физиологический раствор)
2. 30%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ)
3. 0,1 М раствор Na<sub>2</sub>-этилендиаминтетраацетата (ЭДТА)



4. 1%-ный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК), приготовленный на 0,05 н растворе NaOH

5. 0,05 н раствор NaOH

*Ход определения:*

К 0,2 мл упакованных эритроцитов или к 0,2 мл плазмы приливали 0,8 мл 0,9%-ный раствор NaCl и 0,5 мл раствора трихлоруксусной кислоты, тщательно перемешивали и помещали в центрифугу на 15 мин при 1700g. Таким же образом готовили контрольную пробу, но только вместо эритроцитов/плазмы добавляли равное количество дистиллированной H<sub>2</sub>O. После окончания центрифугирования в чистую пробирку переносили 1 мл супернатанта, приливали 0,075 мл ЭДТА и 0,25 мл раствора ТБК, перемешивали и помещали на водяную баню на 15 мин. Затем пробирки охлаждали до комнатной температуры и на спектрофотометре (Thermo Scientific Genesys 10s UV-vis) измеряли оптическую плотность опытного образца против контроля при длине волны равной 532 нм в кюветах с длиной оптического пути 1,0 см.

Концентрацию МДА рассчитывали, применяя коэффициент молярной экстинкции образовавшегося хромогена, равного  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  и выражали в мкмоль/г Hb в эритроцитах и в мкмоль/г белка в плазме крови [52].

$$C = \frac{D_{532} \cdot V_{\text{ре}} \cdot F \cdot 1000}{V_{\text{ср}} \cdot \epsilon_{532} \cdot d \cdot \text{Hb}}$$
 для определения концентрации МДА в эритроцитах,

$$C = \frac{D_{532} \cdot V_{\text{р.с.}} \cdot F \cdot 1000}{V_{\text{ср}} \cdot \epsilon_{532} \cdot d \cdot \text{ББ}}$$
 для определения концентрации МДА в плазме,

где :

$D_{532}$  – оптическая плотность при длине волны 532 нм,

$V_{\text{р.с.}}$  - объем реакционной смеси (1,325 мл),

F – фактор разведения (7,5),

$\epsilon_{532}$  – коэффициент молярной экстинкции образовавшегося хромогена, равный  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ,

$V_{пр.}$  – объем супернатанта, используемый для определения содержания МДА (1 мл),

$d$  – длина оптического пути кюветы (1 см),

1000/Нб – коэффициент пересчета на г Нб,

1000/ОБ – коэффициент пересчета на г белка.

## 2.5 Определение содержания гемоглобина

*Принцип метода:* Нб крови при взаимодействии с железосинеродистым калием (красная кровяная соль) окисляется в Met-Нб, образующий с ацетонциангидрином гемиглобинцианид (цианметгемоглобин), оптическая плотность которого при 540 нм пропорциональна концентрации Нб в образце крови.

*Реактивы:*

1. Трансформирующий реагент – сухая смесь (натрий углекислый кислый, 1,0 г; калий железосинеродистый, 200 мг);

2. Ацетонциангидрин;

3. Калибровочный раствор гемоглобина с концентрацией 120 г/л

*Ход определения:*

К 5 мл трансформирующего раствора добавляли 0,02 мл гемолизата (разведением не более, чем в 10 раз), хорошо перемешивали. Определение проводили через 10 мин против холостой пробы (трансформирующего раствора), окраска устойчива в течение не менее 1 часа.

*Измерение:*

Определение оптической плотности проводили при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

*Расчёт:*

Содержание гемоглобина рассчитывали по формуле:

$$Hb = \frac{D_o}{D_x} * 120 * F, \text{ где:}$$

Hb – содержание гемоглобина в опытной пробе, г/л;

D<sub>o</sub> – оптическая плотность опытной пробы;

D<sub>x</sub> – оптическая плотность калибровочной пробы;

120 – содержание гемоглобина в калибровочном растворе, г/л;

F – фактор разведения [48].

## 2.6 Определение содержания общего белка

*Принцип метода:* белок образует окрашенный комплекс с ионами меди в щелочной среде. Интенсивность окраски при длине волны 540 нм прямо пропорциональна концентрации общего белка в пробе.

Определяем содержание общего белка в плазме крови с помощью набора «Витал». В который входит:

1. №1 Биуретовый реагент- 2×100 мл

Натрия гидроокись - 0,5 моль/л

Калий-натри виннокислый – 80ммоль/л

Калий йодистый - 75ммоль/л

Сульфат меди – 30 ммоль/л

2. Калибратор 1×2,0 мл

Альбумин сывороточный – 70г/л

Натрий хлористый – 154 ммоль/л

Приготовление рабочего реагента – разводим необходимое количество реагента №1 бидистиллированной или деионизированной водой в 5 раз (1 часть реагента + 4части воды).

Стабильность рабочего реагента составляет не менее 6 месяцев при температуре 18-25°C, в темном месте, в плотно закрытой посуде. Не

использовать рабочий реагент, если его оптическая плотность против воды более 0,2 (кювета -1 см, длина волны 540 нм).

*Ход определения:*

В пробирки вносили рабочий реагент по 5,0 мл (в опытную, калибровочную и холостую). В опытные пробирки добавляли плазму крови по 0,1 мл (100 мкл). Затем в калибровочную пробу вносили калибратор 0,1 мл (100 мкл) и в холостую добавляли 0,1 мл (100 мкл) воды.

Пробы тщательно перемешивали, инкубировали 30 мин при 18-25°C и измеряли оптическую плотность опытной ( $E_{оп}$ ) и калибровочной ( $E_{к}$ ) проб против холостой пробы.

Окраска стабильна не менее 30 минут после окончания инкубации при предохранении от прямого солнечного света.

Далее делали соответствующие расчеты.

Нормы: 65-85 г/л (Эти значения являются ориентировочными).

$$C = \frac{E_{оп}}{E_{к}} \cdot 70 \text{ г/л, где}$$

$E_{оп}$  – оптическая плотность опытной пробы;  $E_{к}$  – оптическая плотность калибратора;  $C$  – концентрация общего белка в г/л

## **2.7 Статистическая обработка результатов**

Полученных в ходе исследования данные обрабатывали с использованием программы Statistica 8 и Microsoft Office Excel 2007 в Windows XP. Обработку результатов производили с помощью подсчета медианы, интерквартильного разброса (С25-С75 процентиля). Достоверность различия двух независимых выборок оценивалась по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни (при  $p < 0,05$ ).

### **3 Результаты и обсуждения**

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты, с 37 по 49 страницу, результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные дают основания полагать, что в эритроцитах больных раком прямой кишки как до, так и после лечения снижено содержание диеновых конъюгатов и достоверно повышен уровень карбонильных производных белков и малонового диальдегида по сравнению с контрольным показателем.

В ходе исследования выявлено, что у больных раком прямой кишки, в плазме крови отмечается высокий уровень карбонильных производных белков, диеновых конъюгатов и малонового диальдегида, маркеров окислительного стресса, как до лечения, так и после лечения.

Уровень продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов на I и II стадии заболевания выше, относительно показателей на III, IV стадии.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Новиков, В. Е. В. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция / В. Е. Новиков, О. С. Левченкова, Е. В. Пожилова // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. - 2014. - Т.12. - Вып.4. - С.13-21. Электронный ресурс [Режим доступа]: <https://cyberleninka.ru/article/v/rol-aktivnyh-form-kisloroda-v-fiziologii-i-patologii-kletki-i-ih-farmakologicheskaya-regulyatsiya>
2. Толпыгина, О. А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты / О. А. Толпыгина. //Бюллетень ВСЦН со РАМН. - 2012. - №2 (84), Часть 2. – С. 178.
3. Кулинский, В. И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В. И. Кулинский //Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 2–7.
4. Мерзляк, М. Н. Активированный кислород и жизнедеятельность растений / М. Н. Мерзляк // Соросовский образовательный журнал. – 1999. –№ 9. – С. 20–26.
5. Донцов, В. И. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / В. И. Донцов [и др.] //Труды ИСА РАН. – 2006. – Т. 19. – С.51.
6. Новиков, В. Е. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция / В. Е. Новиков, О. С. Левченкова, Е. В. Пожилова // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. –Т. 12. - С. 13– 34.
7. Дубинина, Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клетки (жизнь и смерть, созидание и разрушение). – Спб. – 2006. –397 с.
8. Masuoka, N. Superoxide anion scavenging activity of alk(en)yl phenol compounds by using PMS-NADH system / N. Masuoka [et al.] // Helion. - 2016. -

Vol. 2. -№9. - P.1-12. Электронный ресурс [Режим доступа]:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844016305187>

9. Ribeiro, T. P. Iron, copper, and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress/ T. P. Ribeiro [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2015. – V. 80. – p. 67-76.

10. Weiss, S. J. Oxygen, ischemia and inflammation / S. J. Weiss // *Acta Physiol. Scand.* – 1986. – Vol.548. – P. 9-37.

11. Rhee, S. G. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation / S. G. Rhee, Y. S. Bae, S. R Lee // *Science's STKE*. – 2000. – Vol.2000. – P. 53.

12. Haber, F. The catalytic Decomposition of hydrogen Peroxide by Iron Salts / [Электронный ресурс] / F. Haber. - Режим доступа: <http://rspa.royalsocietypublishing.org>.

13. Antunes, F. Quantitative biology of hydrogen peroxide signaling / F. Antunes, P. Matos Brito // *Redox Biology*. - 2017. - Vol. 13. - P.1-7. Электронный ресурс [Режим доступа]:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231717301891>

14. Hyun, B. C. Redox signaling in cardiovascular pathophysiology: A focus on hydrogen peroxide and vascular smooth muscle cells/ C. B. Hyun, J. M. Heath, C. Yabing // *Redox Biology*. - 2016. - Vol.9. - P. 244-253. Электронный ресурс [Режим доступа]:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231716301264>

15. Biondi, R. Detection and scavenging of hydroxyl radical via D - phenylalanine hydroxylation in human fluid/ R. Biondi [et al.] // *Talanta*. - 2018. - Vol. 181. - P.172-181.

16. Щепин, А. С. Время жизни синглетного кислорода в столкновительных комплексах O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> / А. С. Щепин, С. А. Пешков, Т. В. Пешкова // *Вестник Оренбургского государственного университета*. – 2016. – № 3 (191). – С. 92-97.



17. Борисов, В.Б. Цитохром *bd* защищает бактерии от окислительного и нитрозилирующего стресса: потенциальная мишень для антимикробных препаратов нового поколения / В.Б. Борисов [и др.] // Биохимия. - 2015. - Т. 80. - Вып. 5. - С. 669 – 681. Электронный ресурс [Режим доступа]: <https://elibrary.ru/item.asp?id=23447063>

18. Sarangarajan, R. Antioxidants: Friend or foe? / R.Sarangarajan [and etc]// Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. - 2017. -Vol.10. - № 12. - P. 111–1111. Электронный ресурс [Режим доступа]: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764517311999>

19. Singh, K.Saudi. Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity – Exploring the armoury of obscurity/K.Singh [et al.// Pharmaceutical Journal. - 2018. - Vol.26. - № 2, P.177-190. Электронный ресурс [Режим доступа]: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319016417302219>

20. Lapinski, R. Oxidants and antioxidants of erythrocytes / R. Lapinski, M. Siergiejuk , A. Worowska// Prog Health Sciences. – 2014. - Vol 4, No 1. - P. 212

21. Al-Naama L. M. Association of erythrocytes antioxidant enzymes and their cofactors with markers of oxidative stress in patients with sickle cell anemia/ L. M. Al-Naama// Qatar Med. J. – 2015. – №2. – p. 14.

22. Ighodaro, O.M. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid/ O.M. Ighodaro, O.A. Akinloye// Alexandria Journal of Medicine Available online. - 2017. - P. 1-6. Электронный ресурс [Режим доступа]:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090506817301550>

23. Bhattacharyya, A. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases/ A. Bhattacharyya// Physiol. Rev. – 2014. – V. 94, № 2. – P. 329-354.

24. Вавилов, Н.В. Параметры биологических жидкостей организма,отражающие уровень карбонильного стресса/ Н.В. Вавилов // International student research bulletin. - 2017. - № 4. - С. 802-804. Электронный ресурс [Режим доступа]: <https://elibrary.ru/item.asp?id=29966284>
25. Chang, F. DSSylation, a novel protein modification targets proteins induced by oxidative stress, and facilitates their degradation in cells/ F. Chang [et al.] // Protein & Cell. - 2014. - Vol. 5. - № 2. - P. 124–140. Электронный ресурс [Режим доступа]: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13238-013-0018-8>
26. Uchida, K. A novel mechanism for oxidative cleavage of prolyl peptides induced by the hydroxyl radical / K. Uchida, Y. Kato, S. Kawakishi// BiochemBiophys Res Commun. - 1990. - Vol.169, N.1. – P.265-271.
27. Муравлева, Л. Е. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования/ Л. Е. Муравлева [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 1 – С. 74-78.
28. Stadtman, E. R. Protein oxidation / E.R. Stadtman, R.L. Levine // Annals of N.Y. Academy of Sciences. – 2000 . – Vol. 899. – P. 191-208.
29. Bhattacharyya, A. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases / A. Bhattacharyya // Physiol. Rev. – 2014. – V. 94, № 2. – P. 329-354.
30. Berlett, B. S. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress / B. S. Berlett, E. R. Stadtman // Biol. Chem. – 1997. – V.272, N33. – P.20313-20316.
31. Дубинина, Е. Е. Свободнорадикальные процессы при старении, нейродегенеративных заболеваниях и других патологических состояниях / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина // Биомедицинская химия. – 2007. – Т.53. – Вып. 4. – С . 351-372.
32. Uchida, K. A novel mechanism for oxidative cleavage of prolyl peptides induced by the hydroxyl radical / K. Uchida, Y. Kato, S. Kawakishi // BiochemBiophys Res Commun. - 1990. - Vol.169, N.1. – P.265-271.

33. Dalle-Donne I. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress./ I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini // Clinica Chimica Acta – 2003. - Vol. 329, No.1-2. - P. 23-38.

34. Панарина, О.В. Особенности процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у женщин репродуктивного возраста больных синдромом поликистозных яичников (обзор литературы)/ О.В. Панарина//Acta biomedica scientifica. - 2018. - Т.3. - №3. - С. 88-92. Электронный ресурс [Режим доступа]: <https://elibrary.ru/item.asp?id=35167904>

35. Чебышев, Н. В. Инфекционные и паразитарные болезни развивающихся стран / Н. В. Чебышев, С.Г Пак // ГЭОТАР-Медиа. – М, 2007. – 496 с.

36 . Меньщикова, Е. Б. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков // Фирма «Слова». – М, 2006. – 556 с.

37. Копытова, Т. В. Значение окислительной модификации липопротеинов для диагностики нарушений обменных процессов при хронических распространенных дерматозах / Т. В. Копытова и [др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 8 (1). – С. 82-85.

38. Перекисное окисление липидов. Электронный ресурс [Режим доступа]:<https://poznayka.org/s49227t1.html>

39. Узбеков, М. Г. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психиатрических заболеваниях Сообщение II / М. Г. Узбеков // Социальная и клиническая психиатрия. – 2014. – Т. 24, - № 4. – С. 97–103.

40. Kelly, S. A. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems/ S. A. Kelly, C. M. Navrilla, T. C. Brady // Environ Health Perspect. – 1998. – Vol. 106. – P. 375–384.

41. Ланкин, В. З. Итоги изучения патофизиологических последствий нарушения регуляции свободнорадикальных процессов: тупик или новый импульс?/ В. З. Ланкин, А. К. Тихазе // Медицина и здравоохранение. – 2016. – Т.1. – №3(109). С. – 160 –165.

42. Ланкин, В. З. Итоги изучения патофизиологических последствий нарушения регуляции свободнорадикальных процессов: тупик или новый импульс?/ В. З. Ланкин, А. К. Тихазе // Медицина и здравоохранение. – 2016. – Т.1. – №3(109). С. – 160–165.
43. Набатова, О. С. Влияние лимфотропной полихимиоиммунотерапии колоректального рака на некоторые биохимические показатели крови/ О. И. Кит, И. А. Горошинская и др. // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2013. – №4 (147). – С. 30-35.
44. Животовский, А.С. Колоректальный рак: динамика заболеваемости и смертности в кемеровской области / А.С. Животовский, А.Г. Кутихин, Ю.А.//Медицинский альманах. - 2012. - №2(21). - С. 1-4.
45. Александров, В. Колоректальный рак (некоторые вопросы диагностики и лечения)/ В. Александров, О. Рахимова // Медицинский альманах.-2009.-№11.-С.1-3.
46. Biomarker discovery предлагает более точный прогноз для пациентов с раком кишечника и прямой кишки. Электронный ресурс [Режим доступа]: <https://www.mq.edu.au/newsroom/2015/02/19/biomarker-discovery-offers-clearer-prognosis-for-bowel-and-rectal-cancer-patients/>
47. Зуйков, С.А. Исследование соотношения прооксидантной и антиоксидантной систем при опухолях кишечника /С.А. Зуйков, Б.Г. Борозенко [и др.] // Сибирский онкологический журнал.-2014.-№2(62).-С.-24-27.
48. Титова, Н.М. Оценка структурно-функционального состояния клетки: метод. указания к практическим занятиям/ Н.М. Титова [и др.]. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. – 60 с.
49. Дубынина, Е.Е. Окислительная модификация белков плазмы крови человека, метод ее определения/ Е.Е.Дубынина [и др.]// Вопросы медицинской химии. – 1995. –№1. - С. 24-26.

50. Каган, В. Е. Проблемы анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов / В. Е. Каган, О. Н. Орлов, Л. Л. Прилипко// Биофизика (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР). – М., 1986. – Т. 18. – 136 с.

51. Ко, К. М. Ferric ion-induced lipid peroxidation in erythrocyte membranes : effects of phytic acid and butylated hydroxytoluene / К. М. Ко, D. V. Godin // Mol. and Cell. Biochem. – 1990. – N10. – P.125–131

52. Губский, Ю.И. Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз: монография/ Ю.И.Губский. – Винница: Новая Книга, 2015. – 360 с.

53. Глазкова, М.О. Оценка состояния антиоксидантной системы в эритроцитах больных раком прямой кишки: магистерская диссертация: 06.04.01 – Биология / М.О. Глазкова. – Красноярск, 2019.

54. Кудрявцева, К.А. Оценка состояния антиоксидантной системы в плазме крови больных раком прямой кишки: магистерская диссертация: 06.04.01 – Биология / К.А. Кудрявцева. – Красноярск, 2019.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

 Е. И. Шишацкая

« 13 » июля 2020 г.

### МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Анализ продуктов окислительной модификации липидов и белков в крови  
больных колоректальным раком

06.04.01 Биология  
06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

Научный

руководитель  03.07.2020 доцент, канд. биол. наук Н. М. Титова

Выпускник  03.07.2020 В.В. Борисова

Рецензент  07.07.2020 профессор д-р мед. наук Л.М. Куртасова

Красноярск 2020