

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

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

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Дисбаланс прооксидантной и антиоксидантной систем крови  
у больных раком почки

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 А. Н. Путятин  
Рецензент \_\_\_\_\_ 06.07.2020 д-р мед. наук Л.М. Куртасова

Красноярск 2020

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Дисбаланс прооксидантной и антиоксидантной систем крови у больных раком почки» содержит 51 страниц текстового документа, 2 иллюстрацию, 13 таблиц, 55 использованных источников.

АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА, ПРООКСИДАНТЫ, ГЛУТАТИОН, ГЛУТАТИОН-ЗАВИСИМЫЕ ФЕРМЕНТЫ, СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, ЦЕРУЛОПЛАЗМИН, МОЧЕВАЯ КИСЛОТА, ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫЙ РАК.

Объект: кровь условно здоровых доноров, без диагностированного опухолевого процесса и выраженной соматической патологии и больных раком почки.

Цель исследования – оценить состояние прооксидантной и антиоксидантной систем в крови больных почечно-клеточным раком.

Задачи:

1. Определить уровень прооксидантов: диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в крови больных раком почки.
2. Исследовать состояние антиоксидантной системы крови больных раком почки.
3. Оценить состояние про- и антиоксидантной систем крови больных после нефректомии.

В результате проведенного исследования было выявлено, что в организме у больных почечно-клеточным раком наблюдается дисбаланс прооксидантной и антиоксидантной системы, который обусловлен, как гиперпродукцией активных форм кислорода, так и недостаточно эффективным функционированием антиоксидантной системы. В эритроцитах превалирующим продуктом ПОЛ служат диеновые конъюгаты, в плазме крови – малоновый диальдегид.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 Обзор литературы	6
1.1 Почечно-клеточный рак: этиология и патогенез	6
1.2 Активные формы кислорода и источники их образования	8
1.3 Окислительная модификация белков	12
1.4 Перекисное окисление липидов	13
1.5 Антиоксидантная система	15
1.5.1 Ферментативное звено антиоксидантной системы	16
1.5.2 Неферментативное звено антиоксидантной системы	19
2 Материалы и методы	23
2.1 Объект исследования	23
2.2 Определение содержания малонового диальдегида	23
2.3 Определение содержания диеновых конъюгатов	25
2.4 Определение активности супероксиддисмутазы	26
2.5 Определение активности каталазы	27
2.6 Определение содержания восстановленного глутатиона	28
2.7 Методика определения активности глутатион-S-трансферазы	29
2.8 Методика определения активности глутатионпероксидазы	30
2.9 Статистическая обработка результатов	31
3 Результаты и обсуждение	32
3.1 Перекисное окисление липидов и состояние антиоксидантной системы в эритроцитах больных раком почки	32
3.2 Оценка свободно-радикальных процессов в эритроцитах больных раком почки до и после лечения	36
3.4 Оценка свободно-радикальных процессов в плазме крови больных раком почки до и после лечения	41
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	45
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	46

## ВВЕДЕНИЕ

Во всех аэробных организмах в процессе их жизнедеятельности постоянно образуются активные формы кислорода (АФК), которые, являясь метаболитами, обеспечивают протекание многих физиологических процессов. Но, несмотря на то, что свободнорадикальное окисление непрерывно происходит во всех органах и тканях, оно не приводит к повреждениям, так как для каждой биологической структуры характерно поддержание окислительных реакций на стационарном уровне. Эта стационарность достигается за счет эффективной работы антиоксидантной системы (АОС).

В организме человека существует баланс между интенсивностью свободнорадикального окисления и активностью антиоксидантной защиты. Нарушение баланса в результате повышения уровня окислительных процессов, либо недостаточно эффективного функционирования системы антиоксидантной защиты свидетельствует о наличии окислительного стресса, являющегося одним из патогенетических механизмов, приводящих к развитию, так называемых свободнорадикальных патологий, к числу которых относятся и онкологические заболевания. Рост опухоли сопровождается изменением показателей антиоксидантной активности и окислительного стресса в опухоли, что отражается на состоянии органов и тканей организма в целом.

Цель данного исследования – оценить состояние прооксидантной и антиоксидантной систем крови у больных раком почки.

Исходя из цели, сформулированы следующие задачи:

1. Определить уровень прооксидантов: диеновых конъюгантов и малонового диальдегида в крови больных раком почки.
2. Исследовать состояние антиоксидантной системы крови больных раком почки.
3. Оценить состояние про- и антиоксидантной систем крови больных после нефрэктомии.

Работа выполнена на базе кафедры медицинской биологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, лаборатория клинической патофизиологии и аллергологии Красноярского научного центра СО РАН «НИИ медицинских проблем Севера» и является частью комплексных исследований по изучению механизмов развития оксидативного стресса при различных патологиях.

# 1 Обзор литературы

## 1.1 Почечно-клеточный рак: этиология и патогенез

Почечно-клеточный рак (ПКР) составляет 2–3% всех эпителиальных опухолей с самым высоким уровнем заболеваемости в западных странах, ежегодный прирост составляет 1,5–5,9% [1, 2].

Частота заболеваемости среди мужчин в 1,5 - 2 раза выше, чем среди женского населения. Пик заболеваемости приходится на возрастной промежуток 60–70 лет [3].

К этиологическим факторам относятся такие составляющие жизни как:

- Курение – в ряде исследований показано возрастание риска на 30–60% у курящих по сравнению с некурящими.
- Ожирение увеличивает частоту заболеваемости раком почки на 20%.
- Артериальная гипертензия увеличивает риск развития заболевания на 20%.
- Лекарственные препараты – длительное применение мочегонных препаратов увеличивает риск развития рака почки на 30% и более.

Наличие рака почки в анамнезе у родственников первой степени также повышает риск ПКР [1, 4].

Также в последнее время, в связи с возросшим интересом к активным формам кислорода, к факторам риска относят перекисное окисление липидов. В обычном состоянии продукты перекисного окисления липидов (далее – ПОЛ) используются в организме для синтеза различных биологически активных веществ – простагландинов, тромбоксанов, стероидных гормонов и т.д. Однако при развитии патологического процесса баланс образования и расходования перекисей может нарушаться, метаболиты накапливаются в тканях и биологических жидкостях, что приводит к серьезным нарушениям.

Попадая в почку с кровотоком, активные формы кислорода подвергаются обезвреживанию с преимущественным вовлечением в этот процесс супероксиддисмутазы (далее – СОД) и глутатионового звена антиоксидантной системы (далее – АОС). И только гидроксильный радикал инактивируется встроенными в мембрану антиоксидантами - токоферолом, ретиналом, убихиноном и др.

Как показывают исследования, наиболее чувствительны к действию свободных радикалов оказались эндотелиальные, мезангиальные, клетки гломерулярной базальной мембраны.

Почечно-клеточный рак – наиболее распространенный вариант рака почки у взрослых, встречается примерно в 85% случаев. Развивается он из проксимальных почечных канальцев, которые образуют фильтрационную систему почек.

Почечно-клеточный рак, в зависимости от типа клеток, из которых он образуется, подразделяется на различные гистологические варианты.

Светлоклеточный почечно-клеточный рак – наиболее распространенный вариант рака почки (70–85%). Учитывая гистологические особенности, существует шкала оценки степени злокачественности опухоли, которая позволяет прогнозировать вероятность прогрессирования с развитием метастазов или рецидива [5].

Папиллярный почечно-клеточный рак – встречается в 10–15% случаев. Выделяют 1-й и 2-й типы, различающиеся между собой прогнозом течения заболевания.

Рак собирательных трубочек Беллини/медуллярный почечно-клеточный рак: редкие и очень агрессивные варианты опухоли почки. Особенностью этого гистологического варианта опухоли является его связь с серповидно-клеточной анемией. Как правило, учитывая такую взаимосвязь, медуллярная карцинома может развиваться у молодых людей 20–30 лет [2, 6].

Хромофобный почечно-клеточный рак – основным отличием данного гистологического варианта является благоприятный прогноз локализованных форм и низкий потенциал образования метастазов.

На ранних стадиях рак почки протекает бессимптомно. Клинические симптомы рака почки, такие, как гематурия, пальпируемая опухоль, боли в поясничной области, в настоящее время встречаются относительно редко. Бессимптомно протекающие опухоли почки чаще всего выявляют случайно при УЗИ и/или КТ. Наиболее часто изменяются следующие лабораторные тесты[7].

К признакам, косвенно указывающим на возможный рак почки, относятся:

- Кровь в моче
- Наличие припухлости в поясничной области, выявляемой пальпацией
- Ухудшение общего состояния, слабость, потеря аппетита, похудание
- Беспричинное повышение температуры тела
- Анемия
- Увеличение артериального давления
- Болезненность в области почки
- Варикоцеле (варикозное расширение вен семенного канатика)

## **1.2 Активные формы кислорода и источники их образования**

Активные формы кислорода (АФК) образуются в клетке в процессе различных окислительно-восстановительных реакций. Свободные радикалы обладают высокой реакционной способностью и легко переходят из одной формы в другую, окисляя при этом различные молекулы. Концентрация АФК в клетке очень мала. Высокие концентрации АФК в клетке – признак оксидативного стресса и причина гибели клеток. Последствия оксидативного



стресса, обусловленного АФК, включают в себя перекисное окисление липидов клеточных мембран, разрыв нитей ДНК, окисление белков[8,14].

Важнейшими АФК считаются: супероксидный радикал  $O_2^{\cdot-}$ , синглетный кислород  $^1O_2$ , гидроксильный  $\cdot OH$  и пероксидный  $HO_2^{\cdot}$  радикалы, перекись водорода  $H_2O_2$ , пероксидный ион  $HO_2^-$ , гипохлорит  $HOCl$ . При снижении эффективности антиоксидантных систем организма АФК могут оказывать повреждающее воздействие на клетки и вызывать различные заболевания[9].

Активные формы кислорода возникают не только спонтанно, но и ферментативно (НАДФН-оксидаза дыхательного взрыва в плазматической мембране и ксантинооксидаза в гиалоплазме).

АФК генерируются во всех частях клетки. Наибольший вклад вносит дыхательная цепь митохондрий [11].

Митохондриальная респираторная цепь является основным источником супероксидного анион-радикала, который способен быстро дисмутировать в другие формы свободных радикалов (рис. 1). Внутренняя митохондриальная мембрана содержит ряд ферментных комплексов, утечка электронов из которых приводит к образованию супероксидного анион-радикала.

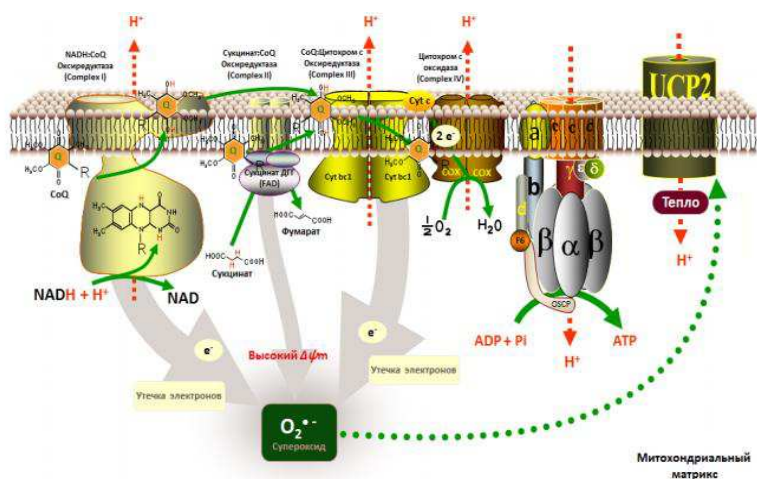


Рисунок 1 – Генерация АФК в дыхательной цепи [11]

Респираторный взрыв - процесс, посредством которого фагоцитарные клетки выполняют свою главную функцию – фагоцитоз, во время которого происходит активация НАДФН-оксидазы и выделения супероксидного анион-радикала во внеклеточное пространство или фагосомы [10,12].

Существует ряд различных ферментов, работа которых приводит к образованию свободных радикалов, к ним относят: липооксигеназы, миелопероксидазы, NO-синтазы и многие другие.

Липооксигеназы являются ферментами, содержащими негемовое железо, катализирующие диоксигенацию полиеновых жирных кислот, что приводит к образованию гидроперекисей.

Миелопероксидаза – фермент, локализованный в лизосомах нейтрофилов, макрофагов и моноцитов. Этот фермент хлорирует  $H_2O_2$  до высокореактивного  $HOCl$ . Последний реагирует с  $H_2O_2$  с образованием синглетного кислорода и хлорид-иона. Синглетный кислород, сам по себе, не является свободным радикалом, но обладает свойствами, аналогичными АФК, благодаря своей электронной структуре [13,9].

Синтазы оксида азота представляют собой гемсодержащие монооксигеназы, которые генерируют  $NO^\bullet$ . NO-синтазы катализируют окисление L-аргинина до промежуточного N-гидрокси-L-аргинин с последующим образованием L-цитруллина и  $\cdot NO^\bullet$ . Оксид азота является слабым окислителем, но при сочетании с  $O^{2\cdot}$  переходит в высокоактивный свободный радикал –  $OONO$ . Оксид азота и  $OONO$ , взаимодействуя между собой, генерируют очень стабильные нитрит и нитрат ионы, которые накапливаются в клетках, что приводит к образованию высокореактивных промежуточных соединений, таких как  $\cdot NO_2$ ,  $N_2O_3$  или  $\cdot NO$ . Эти продукты вызывают нитрование и нитрозилирование важных биологических макромолекул – ДНК, РНК, белков и липидов, тем самым нарушая их функцию [14].

Ионы переходных металлов, такие как железо  $Fe^{2+}$  и медь  $Cu^+$  способны вступать в реакцию Фентона, которая генерирует гидроксильный радикал из

$H_2O_2$  при окислении до  $Fe^{3+}$  и  $Cu^{2+}$  соответственно. Вступая в реакции перекисного окисления липидов металлы, ускоряют окисление биологических макромолекул [10,15].

Долгое время считали, что АФК являются исключительно токсичными метаболитами, что требует наличия в клетке мощной антиоксидантной системы для борьбы с ними. По мере изучения их функциональной роли стало ясно, что АФК не всегда пагубно влияют на клетку. АФК могут принимать участие в физиологических процессах клетки - участвуют в процессах фагоцитоза, необходимы для синтеза ряда соединений, выполняют мессенджерные функции.

Таблица 1 – АФК – структура, источники образования, биологическая роль

Название	Структура	Образуется	Биологическая роль
<b>Первичные радикалы</b>			
Супероксид	$OO^{\cdot -}$	НАДФН-оксидаза	Антимикробная защита
Нитроксид	$NO$	NO-синтаза	Фактор расслабления сосудов
Убихинол	Q	Дыхательная цепь митохондрий	Переносчик электронов
<b>Молекулы, образующие свободные радикалы</b>			
Перекись водорода	$HOOH$	Супероксиддисмутаза, оксидазы	Субстрат миелопероксидазы
Гидроперекиси липидов	$LOOH$	Циклооксигеназа	Фактор Расслабления сосудов

#### Вторичные радикалы

Название	Структура	Образуется в реакции
Радикал гидроксила	$\cdot OH$	$Fe^{2+} + HOOH \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + OH$ $Fe^{2+} + ClO^- \rightarrow Fe^{3+} + Cl^- + OH$
Липидные радикалы	$LO^{\cdot}$ $L^{\cdot}$ $LOO^{\cdot}$	$Fe^{2+} + LOOH \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + LO^{\cdot}$ $LO^{\cdot} + LH \rightarrow LH + L^{\cdot}$ $L^{\cdot} + O_2 \rightarrow LOO^{\cdot}$

### 1.3 Окислительная модификация белков

В организме человека окисление белков может происходить ферментативно и неферментативно. И если ферментативное окисление является каталитической функцией многих ферментов и зачастую служит частью физиологических процессов нашего организма, то неферментативное – вызывает нежелательные эффекты, приводящие к различным патологиям[16].

Основными факторами, влекущими за собой окислительную модификацию белков (ОМБ), являются АФК. Аминокислоты и состоящие из них белковые макромолекулы, подвержены окислительному действию свободных радикалов, что приводит к различным вариантам изменения их физико-химических свойств: модификации аминокислотных остатков, образованию карбонильных групп, формированию белок-белковых сшивок и S-S-мостиков[19].

В условиях окислительного стресса наиболее часто ОМБ подвергаются такие аминокислоты, как аргинин, лизин, пролин. Изменения, индуцируемые АФК в белках, затрагивают не только первичную структуру, но и способны изменять вторичную и третичную структуру белков, что сопровождается нарушением структуры белковой глобулы с образованием крупных белковых агрегатов за счет межмолекулярных связей, в связи с чем данные белки более подвержены протеолизу и конформационным изменениям. К наиболее подверженным ОМБ относят протеины, насыщенные тиоловыми группами. Следствием ОМБ является инактивация различных ферментов[17,19].

Наиболее легко подвержены окислению АФК сульфгидрильные группы в цистеине и метионине с образованием сульфоновых и дисульфидных групп. Данный вид окисления частично обратим за счет восстановительной функции глутатиона.

Большинство окислительно модифицированных белков не восстанавливаются в результате ферментативной репарации и удаляются из

клетки только за счет протеолиза. Нарушение эффективности внутриклеточного протеолиза или снижение эффективности апоптоза измененных клеток является причиной многих патологических состояний[18,20]. Карбонильные группы и гидроперекиси, образующиеся при окислении белков, могут служить показателями свободнорадикального окисления.

#### **1.4 Перекисное окисление липидов**

Липиды являются основным компонентом клеточных мембран и зачастую легко подвергаются окислению. Особенно чувствительны к перекисному окислению полиненасыщенные жирные кислоты – кислоты с большим числом ненасыщенных связей в их углеродной цепочке[22].

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) – физиологический процесс, постоянно протекающий в живых клетках. Однако избыточное количество АФК запускают каскад реакций, приводящий к дестабилизации и нарушению барьерных функций биологических мембран[24].

ПОЛ – многостадийный процесс, который включает в себя инициацию, развитие и обрыв цепи (рис. 2). Перекисное окисление липидов начинается с внедрения свободного радикала в липидный слой (инициация), который окисляет жирные кислоты с образованием липидного радикала, который, в свою очередь, вступает в реакцию с молекулярным кислородом, растворенным в среде. Таким образом, образуется новый свободный радикал[21]. Этот радикал атакует следующий липид с образованием гидроперекиси липида и нового радикала. Процесс продолжается до тех пор, пока не произойдет обрыв цепи, в котором непосредственное участие принимает антиоксидантная система. Наиболее важным антиоксидантом является витамин Е, поскольку является жирорастворимым витамином, обладает гидрофобными свойствами и способен накапливаться, что позволяет ему быстро и эффективно реагировать с липидными гидроперекисями, чем последние с соседними жирными кислотам [21,25].

Перекисное окисление липидов приводит к поликонденсации-полимеризации липидов, а также к образованию вторичных соединений – альдегидов, среди которых главным образом выделяют цитотоксичный малоновый диальдегид (МДА) и диеновые конъюгаты (ДК). Эти соединения используются в качестве маркеров в анализе перекисного окисления липидов[23].

## СТАДИИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

### 1. ИНИЦИАЦИЯ



### 2. РАЗВИТИЕ ЦЕПИ



### 3. ОБРЫВ ЦЕПИ

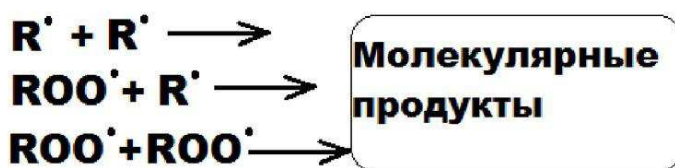


Рисунок 2 – Перекисное окисление липидов [21]

К первичным продуктам перекисного окисления липидов, относятся диеновые гидропероксиды, они являются очень нестабильными молекулами и могут, подвергаясь вторичным реакциям, приводить к образованию эпоксидов, альдегидов, кетонов, спиртов и карбоксильных кислот, которые являются высокотоксичными веществами для организма[26,23].

Малоновый диальдегид образуется в результате перекисного окисления жирных кислот, содержащих три или более двойных связей (линоленовая и арахидоновая кислоты, соответственно). МДА может способствовать перекрестному связыванию и полимеризации компонентов мембран, повреждая их, что приводит к нарушению свойств и функций, таких как текучесть, ионный

транспорт, ферментативная и рецепторная активности, агрегирующая способность детерминантов клеточной поверхности и др[25].

В плазме крови активные формы кислорода вызывают окислительную модификацию липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), в результате чего, последние становятся токсичными и эффективно захватываются макрофагами. Окислительная модификация ЛПНП проявляется в том, что происходит дегградация полиненасыщенных жирных кислот с образованием коротких реакционно-способных фрагментов, которые связываются с аполипротеином В.

И тем не менее, в физиологических условиях некий уровень продуктов ПОЛ постоянно присутствует в клетках, так как продукты перекисного окисления липидов являются обязательным структурным элементом клеточных мембран. Продукты ПОЛ оказывают влияние на фазовое состояние липидного бислоя, усиливают гидратацию поверхности клетки, модифицируют проводимость мембраны для ионов и малых молекул и др[26].

### **1.5 Антиоксидантная система**

Защиту от агрессивного воздействия кислорода и его производных обеспечивает антиоксидантная система (АОС), которая обеспечивает связывание и модификацию радикалов.

Антиоксиданты – это молекулы, защищающие биологические системы от негативных эффектов, которые могут развиваться при окислительном стрессе[27].

В антиоксидантной системе можно выделить несколько звеньев:

1. Ферменты-перехватчики, к ним относятся, супероксиддисмутаза (дисмутирующая  $O_2^{\cdot -}$  до  $H_2O_2$ ) каталаза и глутатионпероксидаза (конвертирующие  $H_2O_2$  в  $H_2O$ ). Глутатионпероксидаза вместе с глутатион-Странсферазой участвует в детоксификации гидропероксидов жирных кислот;

2. Гидрофильные скавенджеры радикалов - восстановленный глутатион (GSH), аскорбат, урат, тиолы (цистеин, эрготионеин);

3. Липофильные перехватчики радикалов - токоферолы, флавоноиды, каротиноиды, убихиноны, билирубин;

4. Ферменты, осуществляющие восстановление окисленных низкомолекулярных биоантиоксидантов (глутатионредуктаза) или участвующие в поддержании в функционально активном состоянии белковых тиолов (тиоредоксинредуктаза);

5. Ферменты, участвующие в поддержании внутриклеточного стационарного уровня восстановительных эквивалентов (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, катализирующая образование NADPH в пентозофосфатном пути окисления глюкозы);

6. Антиоксидантные белки (церулоплазмин, альбумин, ферритин, трансферрин, лактоферрин и др.), участвующие в хранении, транспорте или обезвреживании ионов металлов переменной валентности.

Антиоксидантную систему организма человека можно условно разделить на: ферментативную антиоксидантную систему и неферментативную АОС. В качестве неферментативной АОС могут выступать: жирорастворимые антиоксиданты (витамин Е,  $\beta$ -каротин, убихиноны), водорастворимые (аскорбат, рутин, глутатион). Гидрофобные антиоксиданты локализованы в биомембранах, гидрофильные - в цитозоле клетки.

Ферментативная АОС включает: супероксиддисмутазу, катализирующую реакцию дисмутации  $O_2^{\cdot-}$  в  $H_2O_2$ , каталазу, разлагающей  $H_2O_2$ , глутатионпероксидазу (GPO), глутатион-S-трансферазу (GST), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, глутатионредуктазу, глутатионзависимые ферменты удаляют органические перекиси [28].

### **1.5.1 Ферментативное звено антиоксидантной системы**

От окислительного стресса клетки защищены взаимодействующими между собой антиоксидантами. Супероксид, высвобождаемый при окислительном фосфорилировании, сначала превращается в пероксид водорода,



а затем восстанавливается с образованием воды. Этот путь детоксикации является результатом работы многочисленных ферментов [30].

Супероксиддисмутаза (СОД КФ 1.15.1.1) – это класс близкородственных металлоферментов, которые катализируют дисмутацию супероксидного анион-радикала на кислород и перекись водорода. Ферменты СОД присутствуют почти во всех аэробных клетках и во внеклеточных жидкостях. У человека присутствуют три формы супероксиддисмутазы. СОД 1 (содержит в активном центре фермента ионы таких металлов как Zn и Cu) состоит из двух идентичных субъединиц с молекулярным весом 16300 Да. Каждая субъединица содержит по одному иону меди и цинка, имеет внутри цепи дисульфидный мостик, одну сульфгидрильную группу и ацетилированную концевую аминокислотную группу, находится в цитоплазме. СОД 2 (в активном центре Mn) в митохондриях. СОД 3 (экстрацеллюлярная форма супероксиддисмутазы) представляет собой гликопротеид, состоящий из двух димеров, соединенных дисульфидным мостиком. Каждая из 4-х субъединиц имеет молекулярную массу около 30 кДа, содержит ионы меди и цинка и является внеклеточным ферментом [31,35].

Результатом деятельности СОД является интенсификация образования  $H_2O_2$ , и без обезвреживания данного вещества, имело бы место усиление окислительных процессов в клетках. Потому в организме, сразу за дисмутацией супероксидного радикала, идет удаление перекиси водорода, за счет работы фермента каталазы[32].

Каталаза (КФ 1.11.1.6) – фермент состоящий из четырех идентичных субъединиц, каждая из которых содержит в качестве кофактора железопорфириновый комплекс. Локализована каталаза преимущественно в пероксисомах клеток. Она выполняет функцию катализатора разложения перекиси водорода до воды и кислорода. Большая молекулярная масса фермента препятствует его проникновению через клеточную мембрану. Перекись водорода является вредным побочным продуктом многих

нормальных метаболических процессов: чтобы предотвратить повреждение, она должна быть быстро обезврежена [30,33].

Разложение  $H_2O_2$  осуществляется также ферментативным редокс-циклом, который состоит из восстановленного глутатиона, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. Однако, в отличие от каталазы, глутатионовый цикл способен работать при низких концентрациях перекиси.

Глутатионпероксидаза (КФ 1.11.1.9) представляет собой фермент, содержащий четыре селен-кофактора, которые катализируют расщепление перекиси водорода и органических гидропероксидов. У животных имеется, по меньшей мере, шесть разных изоформ глутатионпероксидазы. Глутатионпероксидаза 1 является наиболее распространенной и эффективно обезвреживает перекиси водорода, в то время как глутатионпероксидаза 4 наиболее активна с гидропероксидами липидов. Глутатион-S-трансферазы проявляют высокую активность с пероксидами липидов. Локализованы данные ферменты во всех клетках организма, однако наибольшую активность проявляют в гепатоцитах. Основная функция GST – защита клеток от ксенобиотиков и продуктов ПОЛ посредством их восстановления, присоединения к субстрату молекулы глутатиона или нуклеофильного замещения гидрофобных групп [29].

Энзимы АОС характеризуются высокой избирательностью действия, направленного против определенных радикалов. Такие системы практически всегда выполняют свою функцию внутри клеток, так как большая молекулярная масса ферментов препятствует их выходу из клеток[34].

Помимо клеточных систем, существуют плазменные антиоксиданты, среди которых можно выделить высокомолекулярные вещества: альбумин, трансферин, ферритин, церулоплазмин и др.

Церулоплазми (ЦП) — медьсодержащая оксидаза (КФ.1.16.3.1), относящаяся к  $\alpha$ -2-глобулиновой фракции плазмы крови человека. Состоит ЦП из единичной полипептидной цепи, которая включает 1046 аминокислотных остатков. Молекула содержит 6 доменов, образующих тригональную

структуру, и 6 ионов Cu [37,39]. Ионы меди, представленные в медьсодержащих оксидазах, делят на три типа [41]:

T1 Cu-ион меди первого типа – имеет пик оптического поглощения при 610нм и определяет интенсивный голубой цвет ферментов данного класса. В качестве лигандов иона Cu выявлены 2 остатка His, один Cys и один Met

T2 Cu-ион (так называемых «не синих») ион Cu координирован двумя остатками His и гидроксильной группой или молекулой воды.

T3 Cu-ион (бизядерные) содержит два антиферромагнитно спаренных иона Cu<sup>2+</sup>, каждый из которых связан тремя остатками His, а между этими ионами находится либо OH- группа, либо молекула O<sub>2</sub>.

ЦП, подобно другим медьсодержащим белкам, способен участвовать в окислительно – восстановительных реакциях, причем в последние годы важнейшей физиологической функцией ЦП считается именно антиоксидантная функция. Он способен «перехватывать» свободные супероксидные радикалы, ингибирует активированные процессы перекисного окисления липидов, также предотвращает окисление липидов клеточных мембран [36,38,39].

Антиоксидантное действие церулоплазмينا, осуществляется этим белком, как самостоятельно, так и в комплексе с железопротеинами. В первом случае действие ЦП направлено на нейтрализацию супероксидного анион-радикала; во втором – на причину образования АФК, то есть на ионы металлов переменной валентности [40,42].

### **1.5.2 Неферментативное звено антиоксидантной системы**

Мочевая кислота является конечным продуктом катаболизма пуринов и образуется в высоких концентрациях из-за отсутствия фермента уриказы, которая у прочих млекопитающих окисляет мочевую кислоту до алантоина (более растворимого соединения).

Мочевая кислота может действовать как антиоксидант за счет связывания переходных металлов, таких как железо и, несомненно, является лучшим антиоксидантом и гораздо худшим прооксидантом [50].

Она является слабо кислотой ( $pK_{a1}=5.4$  и  $pK_{a2}= 9,8$ ) и при физиологических значениях pH существует в качестве аниона – дигидроурата натрия, распределенного во внеклеточной жидкости. Мочевая кислота растворима в воде. У людей нет ферментов, способных к дальнейшему окислению мочевой кислоты, и она удаляется из плазмы за счет клубочковой фильтрации.

Восстановленный глутатион (GSH) – низкомолекулярный тиол, преобладающий (90–95 %) во многих растительных, микробных и во всех животных клетках, в которых его молярная концентрация (1–10 мМ) выше, чем концентрация большинства органических веществ. Его прямая функция – обезвреживание свободных радикалов. Является трипептидом (L-гамма-глутамил-L-цистеинилглицин), биосинтез и катаболизм которого описываются так называемым глутамильным циклом.

Глутатион в восстановленной форме, может функционировать как антиоксидант многими способами: химически взаимодействовать с синглетным кислородом, супероксидом и радикалами гидроксила или на прямую разрушать свободные радикалы; стабилизировать мембранную структуру перемещением ацилпероксидов, образующихся путем перекисного окисления липидов (ПОЛ). GSH является коферментом ряда ферментов, активность которых основана на изменении редокс-потенциала глутатиона. Активность глутатионпероксидазы (GPO) и скорость утилизации перекиси водорода напрямую зависят от концентрации восстановленного глутатиона в клетке. Конъюгирование ксенобиотиков и удаление пероксидов липидов клеточных мембран, осуществляемое глутатион S-трансферазой, не происходит без GSH [47].

Главный орган синтеза глутатиона у млекопитающих – печень, которая обеспечивает около 90 % всего циркулирующего глутатиона при физиологических условиях. Уровень глутатиона в печени уменьшается

приблизительно в 2 раза при голодании и быстро увеличивается после еды. Поступление глутатиона из печени в плазму крови и желчь стимулируется некоторыми гормонами, в частности глюкагоном и вазопрессином. Утилизируется глутатион плазмы тканями организма путем транспорта через клеточные мембраны и ресинтеза внутри клетки посредством глутамильного цикла [46,48].

Токоферолы, основные формы витамина E, представляют собой группу жирорастворимых фенольных соединений. Каждый токоферол состоит из хроманольного кольца и 16-углеродной фитильной цепи. В зависимости от количества и положения метильных групп в хроманольном кольце токоферолы обозначаются как  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  и  $\gamma$ . Все токоферолы являются сильными антиоксидантами, однако  $\delta$ -Т и  $\gamma$ -Т более эффективны для улавливания активных форм азота, чем  $\alpha$ -Т. Основными диетическими источниками токоферолов являются растительные масла, такие как кукурузное, соевое, кунжутное, хлопковое [43,45].

Из-за их сильных антиоксидантных свойств, токоферолы позволяют снизить риск развития рака.  $\alpha$ -Т считается классическим витамином E, поскольку он является основной формой токоферолов, обнаруживаемых в крови и тканях, поэтому  $\alpha$ -Т является наиболее широко используемой формой токоферолов для исследований по профилактике рака.

Витамин C является важным микроэлементом, который играет важную роль в многочисленных физиологических процессах в организме человека. В отличие от большинства млекопитающих, у людей отсутствует способность вырабатывать эндогенный витамин C из-за мутации в гене GULO, и поэтому они полностью зависят от рациона питания [44].

Биологическая эффективность витамина C зависит от его окислительно-восстановительной способности, и он действует как кофактор во многих ферментативных реакциях. Аскорбиновая кислота является гидрофильным соединением, то есть работает в водной среде. Это мощный восстанавливающий агент, способный быстро нейтрализовать различные

оксиданты. При сравнении с другими водорастворимыми антиоксидантами витамин С проявляет наиболее эффективное защитное действие против перекисного окисления липидов в плазме [49].

С другой стороны, избыточные количества витамина С ( $\approx 1$  мМ и более) могут проявлять прооксидантные свойства в присутствии металлов с переменной валентностью путем генерирования активированных кислородных радикалов во время фазы продолжения цепной реакции ПОЛ.

## 2 Материалы и методы

### 2.1 Объект исследования

Объектом исследования служила кровь 50 мужчин и женщин с почечно-клеточным раком. Кровь у больных забиралась до и после лечения. Контролем служили показатели крови 34 условно здоровых доноров, без диагностированного опухолевого процесса и выраженной соматической патологии. От каждого пациента было получено подписанное информативное согласие на участие 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».

Кровь забиралась из локтевой вены натошак в вакутейнеры с гепарином. Кровь центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. Плазму осторожно отбирали и сохраняли до проведения исследования при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2 Определение содержания малонового диальдегида

*Принцип метода.* В липидных системах в результате ПОЛ образуется малоновый диальдегид (МДА), взаимодействие которого с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) приводит к образованию хромогена с максимумом поглощения в красной области видимого спектра при длине волны 532 нм.

*Реактивы:*

1. 0,9%-ный раствор NaCl (физиологический раствор),
2. 30%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ),
3. 0,1М раствор динатриевой соли этилендиаминтетраацетата (ЭДТА),  
0,05 н раствор NaOH,
4. 1%-ный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК), приготовленный на 0,05 н растворе NaOH.

### Ход определения

Последовательность приготовления проб и план действий при подготовке проб для измерения содержания малонового диальдегида представлены в табл.2.

Таблица 2 – Порядок внесения реагентов в пробу (мл)

Реагент	Опытная проба	Контрольная проба
Физиологический раствор	0,8	0,8
Дистиллированная вода	-	0,2
Плазма крови (упакованные эритроциты)	0,2	-
ТХУ	0,5	0,5
Центрифугировали 15 мин при 1700g, отбирали супернатант		
Супернатант	1,0	1,0
ЭДТА	0,075	0,075
ТБК	0,25	0,25
Содержимое пробирок перемешивали и ставили в кипящую водяную баню на 15 мин. Затем пробирки охлаждали до комнатной температуры		

Измеряли поглощение опытной пробы против контрольной на спектрофотометре при 532 нм в кюветах с толщиной слоя 1 см.

#### Расчеты:

Расчет содержания МДА проводили с учетом коэффициента молярной экстинкции образовавшегося хромогена, равного  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  и выражали в мкмоль/л плазмы, либо в мкмоль/г Hb, если это эритроциты.

$$C = \frac{D_{532} \times V_{p.c.} \times F \times 1000}{V_{np} \cdot \varepsilon \cdot d \cdot Hb}, \text{ где}$$

$C$  – содержание МДА, мкмоль/л плазмы (г Hb);

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

$V_{p.c.}$  - объем реакционной смеси (1,325 мл);  $F$  – фактор разведения (7,5);  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции образовавшегося хромогена ( $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ );

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

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



$1000/Hb$  – коэффициент пересчета на  $g\ Hb$ , при расчёте на л плазмы не используется.

### 2.3 Определение содержания диеновых конъюгатов

*Принцип метода.* Вследствие  $\pi$ - $\pi$  переходов спектры конъюгированных гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот характеризуются интенсивным поглощением в ультрафиолетовой области спектра с максимумом при 232–234 нм.

#### Реактивы

1. Гептан-изопропанольная смесь в соотношении 1:1.
2. 0,74 %-ный водный раствора KCl.

#### Ход определения:

Оценку содержания диеновых конъюгатов проводят в экстрактах эритроцитов, гомогенатах ткани и плазме крови. Для этого липиды экстрагируют стократным избытком смеси растворителей. В гомогенизатор вносят 0,1 мл упакованных эритроцитов, добавляют 5 мл изопропилового спирта и тщательно растирают до получения гомогенной суспензии. Содержимое гомогенизатора количественно переносят в мерную центрифужную пробирку, в которую затем добавляют 5 мл гептана.

Экстракт центрифугируют в течение 10 минут при  $1700\ g$ .

Надосадочную фракцию переносят в градуированную пробирку и добавляют 1/5 объема раствора KCl для отмывки липидного экстракта от нелипидных примесей. После тщательного встряхивания образовавшаяся эмульсия расслаивается на две прозрачные фазы. В гептановом экстракте (верхняя фаза) измеряют спектрофотометрически содержание сопряженных диенов в кювете с длиной оптического пути 1,0 см против гептана. Расчет количества ДК производят с учетом молярного коэффициента экстинкции  $27000\ M^{-1} \cdot cm^{-1}$  и выражали в микромолях на 1 грамм Hb, на 1 грамм белка или на 1 л плазмы крови.

## 2.4 Определение активности супероксиддисмутазы

*Принцип метода.* Определение активности СОД основано на ингибировании реакции аутоокисления адреналина в присутствии СОД в щелочной среде вследствие дисмутации супероксидных анион-радикалов, которые являются продуктом одного из этапов.

*Реактивы:*

1. Этанол-хлороформная смесь (2:1).
2. 0,2 М бикарбонатный буфер, рН 11. Приготовление бикарбонатного буфера: 2,12 г  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,168 г  $\text{NaHCO}_3$ , 0,074 г, ЭДТА, растворить в дистиллированной воде (довести до отметки 200 мл); рН довели до нужного значения добавлением  $\text{NaOH}$  (конец).
3. 5,46 мМ раствор адреналина (0,1% аптечный раствор).

*Ход определения*

В пробирку вносят 50 мкл плазмы (эритроцитов) и 450 мкл дистиллированной воды, охлажденной до 0°C. Добавляли 250 мкл этанол-хлороформной смеси, устраняющей мешающее влияние  $\text{Hb}$ . Далее перемешивали пробы и оставляли инкубироваться при комнатной температуре 10 мин. Полученную суспензию перемешивали и центрифугировали 10 мин при 6000g. Для определения СОД использовали супернатант.

Готовили контрольную и опытные пробы по схеме, представленной в табл. 3.

Таблица 3 – Порядок внесения реагентов в пробу, (мл)

Реагент	Контроль	Опыт
Бикарбонатный буфер	3	3
Дистиллированная вода	0,05	-
Супернатант	-	0,05
Раствор адреналина	0,15	0,15
Раствор адреналина добавляли в пробу непосредственно перед измерением оптической плотности		

Изменение оптической плотности регистрировали в течение 3-х минут каждые 30 секунд при длине волны – 347 нм в кювете с толщиной слоя 1,0 см. Для расчета активности использовали показатели величины поглощения контрольной и опытной проб. Активность СОД выражают в усл. ед.\* мин/л, либо в усл. ед.\* мин/г Нб.

$$\text{Ед.активности СОД} = \left( \frac{E_x - E_0}{E_x} \right) * \frac{100\% * F * V * 1000}{50 * v * d * Hb}, \text{ где}$$

$(E_x - E_0 / E_x) * 100\% / 50$  – единица активности, 50% ингибирование реакции окисления адреналина;

$V$  – общий объем инкубационной пробы (3,2 мл);

$F$  – фактор разведения (15);  $v$  – объем супернатанта, используемого для определения активности СОД (0,05 мл);

$d$  – длина оптического пути кюветы (1,0 см).

$1000/Hb$  – коэффициент пересчета на г Нб, не используется при расчёте на л плазмы.

## 2.5 Определение активности каталазы

**Принцип метода.** Активность каталазы определяли спектрофотометрическим методом. Метод основан на способности перекиси водорода образовывать стойкий окрашенный комплекс с солями молибдена.

Ход определения: К 25 мкл гемолизата эритроцитов, плазмы крови и перикардиальной жидкости приливали 2 мл 0,03%-ной перекиси водорода и инкубировали 7 мин на водяной бане при +37 °С. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 4%-ного молибдата аммония. Смесь инкубировали 5 мин при комнатной температуре для развития окраски. Измеряли оптическую плотность проб на спектрофотометре при длине волны 410 нм против контроля, в который молибдат аммония добавляли до первой инкубации.

Расчет удельной активности фермента осуществляли по формуле:

$$A = \frac{(E_k - E_{оп}) * V_{пробы}}{\epsilon_0 * l * t * V_{sub} * C}, \text{ где}$$

$E_k$  – оптическая плотность контрольной пробы;  
 $E_{оп}$  – оптическая плотность опытной пробы;  
 $V_{пробы}$  – объем пробы;  
 $\varepsilon_0$  - коэффициент миллимолярной экстинкции комплекса перекиси водорода с молибдатом аммония ( $2,22 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ );  
 $l$  – длина оптического пути;  
 $t$  – время инкубации;  
 $V_{sub}$  – объем вносимого биосубстрата;  
 $C$  – концентрация общего белка (или гемоглобина).  
Активность каталазы в эритроцитах выражали в ммоль/мин\*г Нв.

## 2.6 Определение содержания восстановленного глутатиона

*Принцип метода.* Взаимодействие восстановленного глутатиона с 5',5'-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБК), с образованием окрашенного в желтый цвет тионитрофенильного аниона (ТНФА).

*Реактивы:*

1. Осаждающий раствор (1,67 г ледяной ортофосфорной кислоты; 0,2 г ЭДТА и 30 г хлористого натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки 100 мл);
2. Фосфатный буфер (0,3 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ );
3. 1 % раствор цитрата натрия
4. 0,02 % раствор 5',5'-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБК), приготовленный на 1 % растворе цитрата натрия.

*Ход определения*

Для определения готовили гемолизат добавлением 0,1 мл отмытых от плазмы и упакованных эритроцитов к 0,9 мл дистиллированной воды, охлажденной до 0°C. Для осаждения белков к гемолизату (плазме) добавляли 1,5 мл осаждающего раствора. Пробы тщательно перемешивали и после 20-

минутного стояния при комнатной температуре фильтровали через крупнопористый фильтр. Фильтрат должен быть прозрачным и бесцветным.

В спектрофотометрическую кювету с толщиной слоя 1,0 см помещали 0,5 мл фильтрата, добавляли 2,0 мл фосфатного буфера. Поскольку раствор ДТНБК имеет слабо-желтую окраску, параллельно с опытной пробой готовили контрольную, содержащую вместо фильтрата осаждающий раствор, разведенный дистиллированной водой в отношении 2:5. Пробы фотометрировали до и после добавления ДТНБК. Затем в контрольную и опытную пробы вносили по 0,25 мл раствора ДТНБК. Сразу же после перемешивания должна появиться желтая окраска из-за образования дисульфида глутатиона с ДТНБК. Пробы фотометрировали при длине волны 412 нм в кювете с толщиной слоя 1,0 см против воздуха [24].

Содержание восстановленного глутатиона рассчитывали по формуле:

$$C = (E_2 - E_1) / (113600 * F * 138 * 1000 N_b), \text{ где}$$

$C$  - концентрация восстановленного глутатиона в мкмоль/г  $N_b$ ;

$E_1$  - оптическая плотность опытной пробы до добавления ДТНБК;

$E_2$  - оптическая плотность опытной пробы после добавления ДТНБК;

138 - разведение эритроцитов в реакционной пробе;

1000 - коэффициент для пересчета концентрации глутатиона от молярной к миллимолярной;

$F$  - отношение оптической плотности контрольной пробы до добавления ДТНБК ( $E_1$ ) и после добавления ( $E_2$ ).

## 2.7 Методика определения активности глутатион-S-трансферазы

*Принцип метода.* Активность глутатион-S-трансферазы определяли по скорости образования глутатион-S-конъюгантов между GSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ).

*Реактивы:*

1. 0,1 М калий-фосфатный буфер, pH = 6,5
2. 0,015 М раствор GSH

3. Абсолютный метанол
4. 0,015 М раствор ХДНБ, приготовленный на абсолютном метаноле

#### *Ход определения*

Отмытые и упакованные эритроциты гемолизируют охлажденной до 0°C водой в соотношении 1:20. В кювету с длиной оптического пути 1 см помещают 2,5 мл калий-фосфатного буфера, pH=6,5. Добавляют 0,2 мл раствора восстановленного глутатиона и 0,1 мл гемолизата или плазмы. Реакцию инициируют внесением в кювету 0,2 мл раствора ХДНБ. Перемешивают и зануляют прибор. Регистрацию оптической плотности проводят в течение 3 минут при температуре 25 оС и длине волны 340 нм. Активность фермента рассчитывают, используя коэффициент миллимолярной экстинкции для GS-ХДНБ, равный  $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , и выражают в микромолях образующихся глутатион-S-конъюгантов в минуту на грамм Нв.

## **2.8 Методика определения активности глутатионпероксидазы**

Глутатионпероксидаза (GPO) катализирует реакцию взаимодействия глутатиона с гидроперекисью трет-бутила (ГПТБ).

*Принцип метода.* Активность фермента оценивали по изменению содержания GSH в пробах до и после инкубации с модельным субстратом в ходе цветной реакции с ДТНБК.

Реактивы:

1. 0,1 М трис-HCl буфер с 0,01%-ным содержанием ЭДТА, pH=8,5
2. Сложный буфер (78 мг азида натрия, 100 мг восстановленного глутатиона растворяют в 100 мл 0,1 М трис-HCl буфера с 0,01%-ным содержанием ЭДТА pH=8,5)
3. 0,14 %-ный раствор ГПТБ
4. 20 %-ный ТХУ
5. Абсолютный метанол
6. 0,4%-ный раствор ДТНБК, приготовленный на абсолютном метаноле

### *Ход определения*

Отмытые и упакованные эритроциты гемолизируют охлажденной до 0 оС водой в соотношении 1:200. 0,2 мл гемолизата или плазмы смешивают с 0,73 мл сложного буфера и термостатируют 10 минут при 37оС. Реакцию инициируют внесением в реакционную смесь 0,07 мл раствора ГПТБ через 5 минут инкубации реакцию останавливают добавлением 0,2 мл раствора ТХУ. В контрольные пробы раствор ГПТБ вносят после осаждения белка ТХУ. Полученные пробы центрифугируют при 1700g в течение 10 минут. Супернатант используют для определения количества восстановленного глутатиона. Для этого к 0,1 мл супернатанта добавляют 2,65 мл 0,1 М трис-НСl буфера и 0,025 мл раствора ДТНБК. После перемешивания пробы фотометрируют на спектрофотометре при длине волны 412 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против дистиллированной воды. Активность фермента в эритроцитах выражают в микромолях GSH, окисленного за 1 минут на грамм Hb, используя коэффициент молярной экстинкции ( $13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) окрашенного аниона, образующегося при взаимодействии глутатиона с ДТНБК.

## **2.9 Статистическая обработка результатов**

По результатам исследований была сформирована база данных, на основе которой производился статистический анализ. Для всех данных были рассчитаны медиана и U-критерий Манна — Уитни с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0.

### 3 Результаты и обсуждение

Онкологические заболевания являются актуальной проблемой во всем мире, а опухоли почки занимают седьмое место по распространению среди раковых заболеваний. Окислительный стресс определяется как дисбаланс между выработкой активных форм кислорода и способностью биологической системы легко детоксицировать активные промежуточные продукты. Окислительный стресс не только вызывает прямое и необратимое окислительное повреждение макромолекул, но также нарушает ключевые редокс-зависимые сигнальные процессы. Исходя из выше сказанного, очень важным является изучение состояния антиоксидантной системы организма.

#### 3.1 Перекисное окисление липидов и состояние антиоксидантной системы в эритроцитах больных раком почки

Исследования содержания продуктов перекисного окисления липидов и активности антиоксидантной системы являются довольно распространенным способом оценки окислительного стресса организма.

В эритроцитах объектом воздействия АФК служат полиеновые жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов плазматической мембраны, а также разнообразные белки, в том числе гемоглобин. У больных ПКР в эритроцитах отмечается повышенное на 82% относительно контрольной величины содержание первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (табл. 4), что указывает на высокий уровень выработки активных форм кислорода и интенсификацию окислительных процессов. Известно, что запускаются процессы липопероксидации мембранных липидов в результате их атаки супероксидным анион-радикалом,  $\text{H}_2\text{O}_2$  и особенно гидроксильным радикалом.

Содержание вторичного продукта ПОЛ – малонового диальдегида достоверно снижено на 25% относительно контрольного показателя (табл. 4).



Таблица 4 – Содержание продуктов перекисного окисления липидов в эритроцитах больных раком почки

Исследуемые показатели	Контроль (n = 34)	Больные ПКР (n = 50)
	Медиана, 25-75 %	Медиана, 25-75 %
ДК, мкмоль/г Нб	0,83 0,70 – 1,48	1,51* 0,84 – 3,05
МДА, мкмоль/г Нб	4,14 3,49 – 5,03	3,08* 2,54 – 3,76

Примечание: в этой таблице и таблицах 2, 3 \* – достоверно по сравнению с контролем (  $p < 0,05$ ).

На наш взгляд более низкий уровень МДА в эритроцитах у больных раком почки с одной стороны, может свидетельствовать в пользу важности компенсаторного повышения активности СОД и каталазы (табл. 5), а также активации глутатион-S-трансферазы, фермента, для которого малоновый диальдегид является одним из субстратов (табл 6). Нельзя исключить и того, что более низкий уровень МДА в эритроцитах у больных ПКР – следствие взаимодействия части этого продукта ПОЛ с белковыми и небелковыми компонентами клетки, содержащими свободные  $\text{NH}_2$ -группы с образованием, так называемых Шиффовых оснований (связанного МДА). Этот аддукт МДА, осаждается в результате пробоподготовки опытных проб трихлоруксусной кислотой и не определяется в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой.

Эритроциты – клетки красной крови, функционирующие в условиях высоких концентраций кислорода в силу выполняемой ими функции транспорта  $\text{O}_2$  из легких к тканям и  $\text{CO}_2$  в обратном направлении, что предполагает постоянное образование активных форм кислорода. Постоянный источник активных форм кислорода в эритроцитах – неферментативное

окисление гемоглобина в метгемоглобин, а также реакции, идущие с НАД(Р) и флавиновыми кофакторами.

Образующиеся активные формы кислорода запускают реакции СРО, которые приводят к нарушению структуры липидов, белков, углеводов и др. органических молекул и являются причиной старения и гемолиза эритроцита.

В связи с этим в эритроцитах имеется мощная многокомпонентная АОС, включающая ферменты, устраняющие АФК, продукты перекисного окисления липидов, а также низкомолекулярные антиоксиданты, выполняющие роль «перехватчиков» свободных радикалов. Супероксиддисмутаза (СОД1) и каталаза образуют тандем ферментов, обезвреживающих на начальных этапах зарождения такие активные формы кислорода, как супероксидный анион-радикал и пероксид водорода – продукт реакции, катализируемой СОД.

Активность СОД и каталазы в эритроцитах больных раком почки достоверно увеличена на 49% и 20% соответственно по сравнению с контрольными показателями (табл. 5).

Таблица 5 – Активность супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах больных ПКР

Исследуемые показатели	Контроль (n = 34)	Больные ПКР (n = 50)
	Медиана, 25-75 %	Медиана, 25-75 %
СОД, ед/мин*г Нб	1508 1248 - 1632	2250* 1910 - 2590
Каталаза, ммоль/мин г Нб	175 144 - 103	210* 190 - 234

Более высокий уровень активности СОД и каталазы может быть следствием двух механизмов: либо он является результатом ускоренного синтеза антиоксидантных ферментов в ответ на окислительный стресс у

больных ПКР, либо это изменение активности ферментов какими-то внутриклеточными факторами. Поскольку эритроциты – высоко дифференцированные клетки, утратившие ядро и внутриклеточные органеллы, синтез новых молекул ферментов в них невозможен. Остаются внутриклеточные факторы, к которым, в первую очередь, относятся субстраты –  $O_2^{\cdot -}$  и  $H_2O_2$ , повышенный уровень которых отмечается у больных ПКР.

Наряду с исследованием активности СОД и каталазы, в эритроцитах больных раком почки оценивалось состояние глутатионовой антиоксидантной системы, отвечающей за поддержание редокс-гомеостаза этих клеток крови. Результаты изучения антиоксидантной активности данной системы приведены в табл.6.

У больных ПКР в эритроцитах не найдено достоверных отличий в содержании восстановленного глутатиона и активности глутатионпероксидазы по сравнению с соответствующими показателями в группе здоровых людей. Активность глутатион-S-трансферазы достоверно повышена относительно контроля на 50%.

Таблица 6 – Содержание GSH и активность глутатионзависимых ферментов в эритроцитах больных раком почки

Исследуемые показатели	Контроль (n = 34)	Больные ПКР (n = 50)
	Медиана, 25-75 ‰	Медиана, 25-75 ‰
GSH, мкмоль /г Hb	4,32 2,22 - 6,05	5,22 3,63 - 6,51
GPO, мкмоль / мин *г Hb	73,96 53,76 - 102,08	72,54 57,49 - 119,11
GST, ммоль/мин *г Hb	4,44 3,55 - 5,68	6,65* 4,78 - 7,94

Глутатион участвует во всех трех линиях защиты эритроцитов от оксидативного стресса и, следовательно, вносит основной вклад в функционирование антиоксидантной системы этих клеток. Глутатион, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, глутатионредуктаза и NADPH образуют глутатионовую систему, в которой глутатионредуктаза и NADPH необходимы для рециклизации окисленного глутатиона в GSH.

Восстановление с помощью глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы гидропероксидов предупреждает прогрессирование пероксидации и появление ее вторичных метаболитов. В обезвреживании вторичных продуктов пероксидации и других окисленных веществ, главную роль играют глутатион-S-трансферазы. Они конъюгируют с глутатионом главные и наиболее токсичные продукты перекисного окисления липидов.

Таким образом, глутатионовая антипероксидазная система эффективно защищает клетки от оксидативного стресса, и обычно только при ее недостаточности или истощении возникают серьезные поражения. Разумеется, что с точки зрения опасности развития целого ряда хронических неинфекционных болезней, объединяемых в группу свободнорадикальной патологии, нужно стремиться избегать не только истощения глутатиона, а всего пула биоантиоксидантов, функционирующих в составе физиологической антиоксидантной системы организма.

### **3.2 Оценка свободно-радикальных процессов в эритроцитах больных раком почки до и после лечения**

Пациентам с почечно-клеточным раком после поступления в диспансер была проведена операция по удалению органа, поврежденного опухолью (нефрэктомия). В таблице 7, 8 и 9 приведены результаты анализа прооксидантной и антиоксидантной систем в эритроцитах до и после оперативного вмешательства.

Содержание продуктов перекисного окисления липидов – ДК и МДА достоверно превышает дооперационный уровень на 291% и 50% соответственно относительно контроля (табл. 7).

Таблица 7 – Сравнительный анализ содержания продуктов перекисного окисления липидов в эритроцитах больных раком почки до и после лечения

Исследуемые показатели	До операции (n = 50)	После операции, (n = 50)
	Медиана, 25-75 ‰	Медиана, 25-75 ‰
ДК, мкмоль/г Нб	1,51 0,84 – 3,05	5,91** 2,36 – 7,58
МДА, мкмоль/ г Нб	3,08 2,54 – 3,76	4,63** 4,97 – 6,01

Примечание: в этой таблице и таблицах 8, 9 \*\* – достоверно по сравнению с соответствующими показателями у больных до операции ( $p < 0,05$ ).

Активность СОД и каталазы (табл. 8) достоверно не отличается от показателей в эритроцитах пациентов до операции, но прослеживается тенденция к повышению их активности. В послеоперационный период активность, как СОД, так и каталазы достоверно превышает контрольные показатели (табл. 5).

Таблица 8 – Сравнительный анализ активности супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах больных раком почки до и после лечения

Исследуемые показатели	До операции (n = 50)	После операции, (n = 50)
	Медиана, 25-75 ‰	Медиана, 25-75 ‰
СОД, ед/мин*г Нб	2250 1910 – 2590	2310 1770 – 2890
Каталаза, ммоль/мин г Нб	210 190 – 234	229 134 – 409

Содержание восстановленного глутатиона и активность GPO в эритроцитах после операции достоверно снижены на 47% и 27% относительно дооперационных показателей (табл.9) и на 35% и 28% по сравнению с контролем (табл. 6). Напротив, активность глутатион-S-трансферазы на 7-е сутки после оперативного вмешательства достоверно повышена на 34% по сравнению с показателем до операции (табл.9) и на 101% по сравнению с контрольным показателем (табл. 6).

Таблица 9 – Сравнительный анализ состояния глутатионовой системы в эритроцитах больных раком почки до и после лечения

Исследуемые показатели	До операции (n = 50)	После операции, (n = 50)
	Медиана, 25 – 75 ‰	Медиана, 25 – 75 ‰
GSH, мкмоль /г Hb	5,22 3,63 - 6,51	2,78** 2,01 – 4,41
GPO, мкмоль / мин *г Hb	72,54 57,49 - 119,11	53,29** 35,05 – 86,57
GST, ммоль/мин *г Hb	6,65 4,78 - 7,94	8,92** 5,68 – 10,36

### 3.3 Перекисное окисление липидов и состояние антиоксидантной системы в плазме крови больных раком почки

Результаты исследования процессов липопероксидации и активности АОС в плазме крови больных ПКР приведены в табл. 10. В ходе исследования было выяснено, что содержание первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов в плазме крови достоверно повышено по сравнению с контрольным показателем на 84%.

В гораздо большей степени происходило повышение уровня малонового диальдегида – на 202% в сравнении с контролем. Таким образом, можно говорить об интенсивно протекающем перекисном окислении липидов, а

следовательно, о наличии выраженного оксидативного стресса в плазме крови у больных ПКР.

Таблица 10 – Содержание продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови больных раком почки

Исследуемые показатели	Контроль (n = 34)	Больные ПКР (n = 50)
	Медиана, 25-75 ‰	Медиана, 25-75 ‰
ДК, мкмоль/л	0,38 0,21 – 0,53	0,70* 0,58 – 1,28
МДА, мкмоль/л	0,98 1,20 – 1,86	2,96* 2,09 – 3,79

Примечание: здесь и в таблице 11, 12 \* – достоверно по отношению к контрольным показателям (  $p < 0,05$ ).

Подтверждением усиления свободнорадикальных процессов у больных раком почки служат данные хемилюминесцентного анализа функционального состояния нейтрофильных гранулоцитов, приведенные в работе [51]. Они свидетельствуют о достоверном увеличении продукции, как первичной активной формы кислорода – супероксидного анион-радикала, так и вторичных АФК в исследовании с люцигенином и люминолом соответственно.

Главными мишенями перекисного окисления в плазме крови являются липопротеины и неэтерифицированные жирные кислоты, помимо этого пероксидации могут подвергаться многочисленные белки плазмы крови, что отрицательно сказывается на их функциях. Для защиты от АФК в плазме крови присутствует большое количество разнообразных антиоксидантов как низкомолекулярных, так и белковой природы.

Одним из антиоксидантных ферментов в плазме крови служит ЦП, синтезируемый и секретируемый печенью. Его антиоксидантные свойства обусловлены, в основном, ферроксидазной активностью. Окисляя двухвалентное железо до трехвалентного состояния, тем самым, обеспечивая

его связывание с трансферрином, ЦП предотвращает реакции Фентона и Габера-Вейса, ингибируя перекисные процессы. Повышение активности данного фермента наблюдается при любом воспалительном заболевании, онкологических процессах и является закономерным компенсаторным механизмом [52].

У больных раком почки уровень ЦП достоверно повышен на 34,8% по отношению к контрольной величине (табл. 11).

Таблица 11 – Активность антиоксидантной системы в плазме крови больных ПКР

Исследуемые показатели	Контроль (n = 34)	Больные ПКР (n = 50)
	Медиана, 25-75 ‰	Медиана, 25-75 ‰
Церулоплазмин, мг/л	204 189 – 310	275* 260 – 315
эСОД, ед/мин*л	566 540 – 726	281* 188 – 294
Каталаза, мкмоль/мин/л	198 167 – 281	610* 503 – 718

Сигналом для индукции синтеза ЦП, является повышение ИЛ-6. Доказано, что присутствие в плазме ЦП снижает содержание некоторых провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN и ИЛ-8 (кроме ИЛ-6), оказывая противовоспалительное действие [53].

Активность СОД у больных ПКР (табл. 11) наоборот снижена относительно контроля на 50%. СОД в плазме крови представлена особой экстрацеллюлярной формой (эСОД), которая синтезируется и выделяется клетками эндотелия сосудов [54]. Экстрацеллюлярная СОД представляет собой тетрамер, состоящий из двух димеров, соединенных дисульфидными мостиками. Каждая субъединица содержит по одному атому меди и цинка, необходимых для каталитической активности. Фермент представлен тремя



фракциями А, В и С, различающимися сродством к гепарину, гепарансульфату и коллагену 1 типа. Наибольшей аффинностью к экстрацеллюлярному матриксу обладает фракция С, в связи с этим в крови присутствует в основном фракция А и отчасти В [55]. Форма, не связанная с внеклеточным матриксом составляет всего 10% от общего количества фермента. Следовательно, по изменению активности данного фермента в плазме крови трудно судить о величине его синтеза. Можно предположить, что снижение активности СОД в плазме происходит как за счет снижения доли свободной формы, так и за счет усиленной окислительной модификацией фермента АФК.

В отличие от СОД, активность каталазы существенно повышена у больных ПКР на 208% относительно контрольной величины (табл. 11). Поскольку каталаза собственной внеклеточной формы не имеет, повышенная активность данного фермента в плазме крови, по-видимому, обусловлена вышедшей из клеток в результате их повреждения или разрушения каталазой. Сохраняя свою активность, каталаза может в известной степени способствовать компенсации окислительного стресса в плазме крови.

Таким образом, в плазме крови у больных ПКР до проведения операции интенсивно протекают процессы перекисного окисления липидов, не смотря на повышенную активность церулоплазмينا и каталазы. По-видимому, основной вклад в развитие процессов ПОЛ, особенно увеличение содержания вторичных продуктов (МДА) вносит гидроксильный радикал, избыточное образование которого можно предполагать в реакциях неферментативного взаимодействия супероксидного анион-радикала и пероксида водорода с ионами железа в двух- и трехвалентном состояниях.

### **3.4 Оценка свободно-радикальных процессов в плазме крови больных раком почки до и после лечения**

Результаты сравнительного анализа прооксидантной и антиоксидантной систем в эритроцитах больных почечно-клеточным раком до и после оперативного вмешательства представлены в табл. 12 и 13.

Согласно данным, приведенным в табл.12, в плазме крови пациентов с ПКР после проведения операции уровень продуктов перекисного окисления липидов достоверно повышен относительно показателей до оперативного вмешательства. Содержание ДК повышено на 78%, МДА – на 49%.

Таблица 12 – Содержание продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови больных раком почки до и после лечения

Исследуемые показатели	До операции (n = 50)	После операции, (n = 50)
	Медиана, 25-75 ‰	Медиана, 25-75 ‰
ДК, мкмоль/л	0,70 0,58 – 1,28	1,25*/** 0,83 – 2,05
МДА, мкмоль/л	2,96 2,09 – 3,79	4.42*/** 3,88 – 5,45

Примечание: в этой таблице и таблице 13 \*\* – достоверно по сравнению с соответствующими показателями у больных до проведенной операции ( $p < 0,05$ ).

Ферроксидазная активность церулоплазмينا после проведенной операции увеличена на 74% относительно дооперационной величины. Активность внеклеточной СОД и каталазы снижена на 27% и 34% соответственно по сравнению с величинами до операции (табл. 13).

Таблица 13 – Активность антиоксидантной системы плазмы крови больных раком почки до операции и после нефрэктомии

Исследуемые показатели	До операции (n = 50)	После операции, (n = 50)
	Медиана, 25-75 ‰	Медиана, 25-75 ‰
Церулоплазмин, мг/л	275* 260 – 315	480*/** 364 – 507
эСОД, ед/мин*л	281*	206*/**

	188 – 294	164 – 280
Каталаза, мкмоль/мин/л	610* 503 – 718	404*/** 394 – 477

В целом, можно отметить, что динамика показателей ДК в эритроцитах и плазме практически одинакова – повышенный уровень диеновых конъюгатов отмечается у больных ПКР, как до, так и после проведения нефрэктомии по сравнению с контролем. Напротив, изменения показателей МДА в эритроцитах и плазме крови имеют противоположный характер – в эритроцитах уровень МДА снижен до и незначительно увеличен после операции, в плазме крови как до, так и после оперативного вмешательства отмечается высокий уровень МДА относительно контроля. Такая разница между эритроцитами и плазмой крови в уровне малонового диальдегида может быть следствием его поступления в плазму крови из поврежденных и разрушенных вследствие окислительного стресса эритроцитов, а также из других тканей, поскольку известно, что МДА способен проходить через плазматические мембраны [51].

Нами был рассчитан коэффициент окислительного стресса (КОС) – отношение всех прооксидантов к антиоксидантам. КОС рассчитывается по формуле (для эритроцитов и плазмы соответственно):

$$\text{КОС} = \frac{\left(\frac{\text{ДК}_o}{\text{ДК}_k}\right) \cdot \left(\frac{\text{МДА}_k}{\text{МДА}_o}\right)}{\left(\frac{\text{СОД}_o}{\text{СОД}_k}\right) \cdot \left(\frac{\text{КАТ}_o}{\text{КАТ}_k}\right) \cdot \left(\frac{\text{GHS}_o}{\text{GHS}_k}\right) \cdot \left(\frac{\text{GPO}_o}{\text{GPO}_k}\right) \cdot \left(\frac{\text{GST}_o}{\text{GST}_k}\right)}$$

$$\text{КОС} = \frac{\left(\frac{\text{ДК}_o}{\text{ДК}_k}\right) \cdot \left(\frac{\text{МДА}_k}{\text{МДА}_o}\right)}{\left(\frac{\text{СОД}_o}{\text{СОД}_k}\right) \cdot \left(\frac{\text{КАТ}_o}{\text{КАТ}_k}\right) \cdot \left(\frac{\text{ЦПО}_o}{\text{ЦПК}_k}\right)}$$

где,

$o$  – обозначается соответствующий показатель про- и антиоксидантной системы у обследуемых пациентов,  $k$  – соответственно у контрольной группы; КОС = 1 – баланс между про- и антиоксидантами; КОС >1 – развитие окислительного стресса, дисбаланс из-за превалирования прооксидантных процессов; КОС <1 – превалирование антиоксидантов над прооксидантами.

В ходе проделанной работы установлено, что у больных раком почки коэффициент окислительного стресса в плазме и эритроцитах крови до лечения имеют противоположный характер. Если в плазме мы наблюдаем смещение коэффициента в 2,7 раз в сторону прооксидантов, то в эритроцитах этот показатель смещается до 0,4 в сторону антиоксидантов. Исходя из полученных данных, мы видим, что в эритроцитах больных до лечения наблюдается значительное превалирование антиоксидантов за счет увеличения активности СОД, ГСТ и каталазы. В тоже время в плазме активность прооксидантов гораздо выше, а уровень оксидантов (в частности СОД) значительно падает.

При этом после нефрэктомии что в эритроцитах, что в плазме наблюдается сильное смещение КОС в сторону прооксидантов (4,88 и 8,4 соответственно). Это говорит о том, что в организме в послеоперационный период усиливается выработка прооксидантов и происходит снижение активности ферментов и уровня антиоксидантов как в плазме крови так и в эритроцитах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В эритроцитах и плазме крови больных почечно-клеточным раком как до операции, так и после нефрэктомии интенсивно протекают процессы перекисного окисления липидов.

2. В эритроцитах превалирующим продуктом ПОЛ служат диеновые конъюгаты, в плазме крови – малоновый диальдегид.

3. Дисбаланс прооксидантной и антиоксидантной системы у больных почечно-клеточным раком обусловлен, как гиперпродукцией активных форм кислорода, так и недостаточно эффективным функционированием антиоксидантной системы.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ковылина, М.В. Патоморфологическая диагностика рака предстательной железы, рака мочевого пузыря и рака почки. / М.В. Ковылина, Е.А. Прилепская, Д.Ю. Пушкарь. – Москва. – АБВ-пресс, 2017. – 48с.
2. Chaan, S. Renal Cell Carcinoma: Diagnosis, Staging, and Surveillance. / S. Chaan [et. al]// American Journal of Roentgenology. – 2008. – №191. – P/1220–1232.
3. Ljungberg, B. Guidelines on Renal Cell Carcinoma. / B. Ljungberg [et. al]// European Association of Urology. – 2014. – 70P.
4. Алексеев, Б. Я. Особенности диагностики и лечения рака почки в России: предварительные результаты многоцентрового кооперированного исследования. / Алексеев Б.Я., Анжиганова Ю.В., Лыков А.В. и соавт. // Онкоурология. – 2012. - № 3. – С.24–30.
5. Есаян, А. М. Почечно-клеточный рак и хроническая болезнь почек: внимание к отдаленным неонкологическим исходам. / Есаян А.М., АльШукри С.Х., Мосоян М.С. // Нефрология. – 2012. – № 16(4). – С.94–99.
6. Farber, N.J. Tumor enucleation of renal cell carcinoma in a solitary kidney. / N. J. Farber, I. Faiena [et al]. // Austin J. Surg. – 2015. – Vol. 2(3). – 1059P.
7. Rajer, M. Kidney cancer. / M. Rajer. // Radiol Oncol. – 2007. – №41(2). – P. 64–73.
8. Подколзин, А.А. Система антиоксидантной защиты и старения / А.А. Подколзин и [др.] // профилактика старения. – 2000. – Т. 61, №2. – вып. 3. – С.14–23.
9. Фридович, И. В. Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода / И. В. Фридович // Свободные радикалы в биологии. – 1979. – Т. 1. – С. 7-21.
10. Зуйков, С. А. Исследование соотношения прооксидантной и

антиоксидантной систем при опухолях кишечника / С. А. Зуйков, Б. Г. Борзенко, О. В Зуйкова // Сибирский онкологический журнал. Томск, – 2014. – №2. – С. 1-4.

11. Карбышев, М. С. Биохимия оксидативного стресса : Учебно-методическое пособие / М. С. Карбышев, Ш. П. Абдуллаев ; под общ. ред. А. В. Шеспопалова. – Москва : Издательство ХХ, 2018. – 60с.

12. Hatem, E. Glutathione is essential to preserve nuclear function and cell survival under oxidative stress. / E. Hatem, [et. al] // Free Radical Biology and Medicine. – 2014. - Vol. 75. – P.25-26.

13. Burton, G. J. Oxidative stress. / G. J. Burton, E. Jauniaux // Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology. – 2011. - № 25. – P.287-299.

14. Кулинский, В. И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред, защита. / В. И. Кулинский // Соровский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 2-7.

15. Bhattacharyya, A. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. / A. Bhattacharyya, [et. al] // Physiological Reviews. – 2014. - №94. – P.329-354.

16. Isoda, R. The role of protein oxidative modification in periodontal diseases. / R. Isoda, K. Matsushita. – New York- springer, 2014.- P. 15-32.

17. Меньщикова, Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. / Е.Б. Меньщикова [и др.] – Москва. - Слово, 2006. — 556 с.

18. Мартусевич, А. К. Оксидативный стресс и его роль в формировании дизадаптации и патологии. / А. К. Мартусевич, К. А. Карузин // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2015. – Т. 2., № 2. – с. 5-14.

19. Муравлева, Л.Е. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования. / Л. Е. Муравлева [и др.] //Фундаментальные исследования. – 2010. – № 1. – С. 74-78.

20. Губский, Ю.И. Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз: монография. / Ю. И. Губский. - Винница. - Нова книга, 2015. - 360с.

21. Узбеков, М.Г. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные

системы при психических заболеваниях. / М. Г. Узбеков // Социальная и клиническая психиатрия. – 2014. – Т. 24., № 4. – С. 97-103.

22. Södergren, E. Lipid peroxidation in vivo: Evaluation and application of methods for measurement./ E. Södergren. – Uppsala. - Acta Universitatis Upsaliensis, 2000. - P. 78.

23. Birben, E. Oxidative stress and antioxidant defense. / E. Birben [et. al] // The World Allergy Organization journal. – 2012. - № 5. – P. 9-19.

24. Pizzino, G. Oxidative stress: harms and benefits for human health. / G. Pizzino [et. al] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2017. – Vol. 2017. – 13p.

25. Ayala, A. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. / A. Ayala, M. F. Muñoz, S. Argüelles // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2014. –Vol. 2014. – 31p.

26. Янковский, О.Ю. Токсичность кислорода и биологические системы. / О.Ю.Янковский. Спб. – Игра, 2000. – 294с.

27. Rahal, A. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. / A. Rahal. BioMed Research International. – 2014.- Vol. 2014. – 19p.

28. Толпыгина, О.А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты. / О. А. Толпыгина // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2012. № 2. С. 178-180.

29. Толпыгина, О.А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты. / О. А. Толпыгина // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2012. № 2. С. 178-180.

30. Kurutas, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. / E. B. Kurutas // Nutrition Journal. – 2016. №15. – 22p.

31. Aitken, J. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. / J. Aitken, S. Roman. // Oxidative medicine and cellular longevity. - 2008. - №1. - P. 15-24.



32. Чанчаева, Е. А. Современное представление об антиоксидантной системе организма человека. / Е. А. Чанчаева // экология человека. – 2013. - № 7. – с. 50-58
33. Костюк, В. А. Биорадикалы и биоантиоксиданты / В. А. Костюк, А. И. Потапович. – Минск: БГУ, 2004. – 179 с.
34. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer / A. Chatterjee [et al.] // Cancer Letters. – 2018. – Vol. 433. – P. 33-42.
35. Redox control of cancer cell destruction / C. Hegedus [et al.] // Redox Biology. – 2018. – Vol. 16. – P. 59-70.
36. Вавилова, Т.П. Роль церулоплазмينا при развитии неопластических процессов / Т.П. Вавилова и [др.] // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, вып. 3. – С. 263-275.
37. Мошков, К.А. Церулоплазмин: внутримолекулярный перенос электронов и ферроксидазная активность / К.А. Мошков и [др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – №3. – вып.1. – С.104 – 107.
38. Артамошена, Н.Е. Активность антиоксидантной системы церулоплазмينا / Н.Е. Артамошена, О.В. Белая // Трансферин в плазме крови больных ишемической болезнью сердца: постинфарктным кардиосклерозом с дислипидемией, материалы конференции. – 2008. – Т.7. –№ 6-S1. – С. 5-7.
39. Белова, С.В. Церулоплазмин – структура, физико-химические и функциональные свойства / С.В. Белова, Е.В. Крякина // Успехи современной биологии. –2010. – Т.130 , № 2. – С.180-189.
40. Gaware, V. Ceruloplasmin its role and significance: a review / V. Gaware [et.al] // International Journal of Biomedical Research. – 2010. – № 1. – P. 153-162.
41. Hellman, N. E. Ceruloplasmin metabolism and function / N. E. Hellman, J. D. Gitlin // Annu. Rev. Nutr. – 2002. – № 22. – P. 439–458.
42. Lopez-Avila, V. Ceruloplasmin levels in human sera from various diseases and their correlation with patient's age and gender / V. Lopez-Avila, W. H. Robinson, K. Lokits // Health. – 2009. – V. 1, № 2. – P. 104–110.

43. Pham-huy, L. A. Free radicals, antioxidants in disease and health. / L. A. Pham-huy, H. He, C. Pham-huy // *Int j biomed sci.* – 2008. - № 4.- P. 89-96.
44. Birben, E. Oxidative stress and antioxidant defense. / E. Birben [et. al] // *World allergy organ j.*- 2012. - № 5. –P. 9-19.
45. Irshad, M. Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. / M. Irshad, P. Chaudhuri // *Indian journal of experimental biology.* – 2002. – Vol. 40., № 11. – P. 1233-1239.
46. Rossi, R. Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? / R. Rossi [et. al] // *Clinical chemistry.* – 2002. – № 5. P. 742–753.
47. Singh, M. Significance of the glutathione-s-transferase activity. / M. Singh // *Journal of clinical and diagnostic research.* – 2012. – Vol. 6, №1. – P. 31-33.
48. Hakuna, L. A simple assay for glutathione in whole blood. / L. Hakuna [et. al] // *The royal society of chemistry.* – 2015. - P.1
49. Sautin, Y. Y. Uric acid: the oxidant–antioxidant paradox. / Y. Y. Sautin, R. J. Johnson. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* – 2008. - №27. – P. 608–619.
50. Галунская, Б. Двухликий Янус биохимии: мочевая кислота – оксидант или антиоксидант? / Б. Галунская [и др.] // *Нефрология.* – 2004. - Т.8, №4. – С. 25-31.
51. Шкапова, Е.А. Показатели люцигенин- и люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у больных раком почки / Е.А. Шкапова, Л.М. Куртасова, А.А. Савченко // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2010. – Т. 149, № 2. – С. 201 — 203.
52. Ващенко, В. И. Церулоплазмин от метаболита до лекарственного средства / В. И. Ващенко, Т. Н. Ващенко // *Психофармакология и биологическая наркология.* – 2006. – Т.6, №3. – С. 1254-1266.
53. Кляритская, И. Л. Роль различных цитокинов в фиброгенезе печени при хронических вирусных гепатитах В и С / И. Л. Кляритская, Е. И. Стилиди // *Крымский терапевтический журнал.* – 2010. – №1. – С. 41-45.

54. Ookawara, T. Effects of oxidative stress on the nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase / T. Ookawara [et. al] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2003. – Vol.303, №3. – P. 914-919.

55. Nozik-Grayck, E. Superoxide Dismutase 3 R213G Single-Nucleotide Polymorphism Blocks Murine Bleomycin-Induced Fibrosis and Promotes Resolution of Inflammation / E. Nozik-Grayck [et. al] // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2017. – Vol.56, №3. – P. 362-371.

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**

06.04.01 – Биология

06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Дисбаланс прооксидантной и антиоксидантной систем крови  
у больных раком почки

Руководитель	 подпись, дата	<u>доцент, канд. биол. наук</u> должность, ученая степень	<u>Н.М. Титова</u> инициалы, фамилия
Выпускник	 подпись, дата		<u>А.Н. Путятина</u> инициалы, фамилия
Рецензент	 подпись, дата	<u>профессор, д-р мед. наук</u> должность, ученая степень	<u>Л.М. Куртасова</u> инициалы, фамилия

Красноярск 2020