

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Е.И. Шишацкая
« 28 » июня 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Анализ содержания карбонильных производных белков в крови
больных хроническим атрофическим гастритом и раком желудка

Руководитель _____ к.б.н., профессор Н.М. Титова
подпись, дата

Выпускник _____ Т.В. Глушкова
подпись, дата

Красноярск 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	Ошибка! Закладка не определена.	3
1 Обзор литературы		4
1.1 Активные формы кислорода – образование, основные характеристики		4
1.2 Окислительная модификация белков		10
1.3 Молекулы средней массы		16
2 Материалы и методы		24
2.1 Объект исследования.....		24
2.2 Метод определения карбонильных производных белков.....		24
2.3 Метод определения молекул средней молекулярной массы.....		26
2.4 Статистическая обработка результатов.....		26
3 Результаты и их обсуждение.....		28
3.1 Содержание карбонильных производных белков и молекул средней массы в плазме и эритроцитах здоровых людей	Ошибка! Закладка не определена.	28
3.2 Уровень карбонильных производных и молекул средней массы в эритроцитах у больных атрофическим гастритом и раком желудка	Ошибка! Закладка не определена.	29
3.3 Уровень карбонильных производных и молекул средней массы в плазме крови у больных атрофическим гастритом и раком желудка	Ошибка! Закладка не определена.	30
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	Ошибка! Закладка не определена.	33
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ		29
ПРИЛОЖЕНИЕ.....		39

ВВЕДЕНИЕ

Токсическое действие активных форм кислорода (АФК) проявляется при окислительном стрессе (ОС). При этом происходит снижение активности антиоксидантной защиты в тканях и резкая интенсификация свободнорадикальных процессов.

Такие патологии, как неврологические и психические поражения ЦНС, воспалительные процессы любого генеза, радиационные поражения, онкозаболевания, сердечно-сосудистые и бронхолегочные патологии возникают в условиях повышения свободнорадикальных процессов и развития состояния ОС. Старение организма также протекает на фоне ОС и, соответственно, свободнорадикальные процессы вовлекаются в патофизиологию всех сопутствующих заболеваний, в том числе, нейродегенеративных поражений.

Причины, вызывающие интенсификацию свободнорадикальных процессов, могут быть разными, но изменения на молекулярном уровне носят однотипный характер, и процессы генерации АФК тесно переплетены между собой.

Повреждающее действие свободных радикалов кислорода направлено на три основных типа мишеней: липиды, нуклеиновые кислоты и белки. Изменение структуры окисленных белковых молекул может сопровождаться их агрегацией или фрагментацией, повышением гидрофобности и чувствительности к протеолизу [1]. Окислительной модификации могут подвергаться почти все аминокислотные остатки, в результате чего страдают все уровни структурной организации как простых, так и сложных белков [2]. Продукты свободнорадикального окисления белков опосредуют окислительное повреждение ДНК, липидов и других биомолекул. Таким образом, окисленные протеины являются не только «свидетелями», но и активными участниками процесса свободнорадикального повреждения [1].

Цель исследования – изучить содержание карбонильных производных белков и молекул средней массы в плазме и эритроцитах крови больных хроническим атрофическим гастритом и раком желудка.

Исходя из цели, сформулированы следующие задачи:

- Исследовать содержание карбонильных производных белков и молекул средней массы в крови здоровых людей;
- Определить уровень карбонильных производных белков в плазме и эритроцитах крови больных атрофическим гастритом и раком желудка;
- Определить содержание молекул средней массы в плазме и эритроцитах крови больных атрофическим гастритом и раком желудка;

Работа выполнена на базе кафедры медицинской биологии Института фундаментальной биологии СФУ и лаборатории молекулярно – клинической патофизиологии Красноярского научного центра СО РА «НИИ медицинских проблем Севера».

1 Обзор литературы

1.1 Активные формы кислорода – образование, основные характеристики

АФК являются побочными продуктами нормального клеточного метаболизма. Низкое и умеренное количество АФК оказывают благотворное влияние на несколько физиологических процессов, включая убийство вторгающихся патогенов, заживление ран и процессы восстановления тканей. АФК действуют как важные сигнальные молекулы. Непропорциональная генерация АФК представляет серьезную проблему для телесного гомеостаза и вызывает повреждение окислительной ткани. Хотя естественные антиокислительные пути могут ограничивать неблагоприятные эффекты АФК, их уровни могут стимулироваться многими окислительными стрессорами и поддерживаться таким образом, что они способствуют повреждению тканей. АФК производятся в ответ на ультрафиолетовое (УФ) излучение, курение сигарет, 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, включая развитие рака. Желудочно-кишечный тракт является ключевым источником АФК. Различные патологические состояния, включая язвы, злокачественные опухоли и воспалительное заболевание кишечника частично возникают из-за окислительного стресса. Понимание событий сигнализации, инициируемых свободными радикалами, а также физиологический ответ на такие процессы является ключом к дальнейшему пониманию опосредованных АФК[3].

Большинство окислительно-восстановительных реакций в клетках аэробных организмов протекает с участием молекулярного кислорода. Молекулярный кислород (O_2) не только необходим для выживания аэробных организмов, его восстановление до H_2O через комплексы

митохондриального дыхания обеспечивает АТФ, но и способствует смерти клеток. АФК образуются во время ферментативных реакций. АФК включают радикальные соединения, такие как супероксид ($O_2^{\cdot-}$), гидроксильные радикалы (HO^{\cdot}), гидропероксиды липидов и реакционноспособные нерадикальные соединения. Эти кислородно-центрированные малые молекулы, содержащие неспаренные электроны валентной оболочки, неустойчивы и очень реакционноспособны с белками, липидами, углеводами и нуклеиновыми кислотами внутри клеток. Эти взаимодействия могут необратимо инактивировать молекулы-мишени. Редокс-состояние основных клеточных антиоксидантов, таких как глутатион и тиоредоксин, зависит от уровня внутриклеточного накопления АФК. Изменение баланса между продукцией АФК и способностью быстро детоксицировать реактивные промежуточные продукты приводят к окислительному стрессу[3].

Реакционно-радикальные соединения, такие как оксид азота (NO^{\cdot}), двуокись азота (NO_2), называются реакционноспособными видами азота. Эти свободные радикалы нестабильны из-за наличия неспаренных электронов на их внешней электронной орбите. Окислительный и нитрозативный стресс были этиологически вовлечены в широкий спектр заболеваний и состояний: старение, гипертония, атеросклероз, диабетические невропатии, почечные заболевания, неврологические заболевания, включая болезнь Альцгеймера и другие формы деменции, а также раковые заболевания.

В основном (невозбужденном) состоянии молекула кислорода является стабильным бирадикалом, у которого неспаренные электроны имеют параллельные спины. Такая электронная конфигурация является причиной чрезвычайно низкой реакционной способности молекулярного кислорода по отношению к стабильным органическим соединениям [3]. Помимо обычного молекулярного кислорода, находящегося в триплетном состоянии (3O_2), существуют его активные производные - так называемые АФК, которые обладают чрезвычайно высокой реакционной

способностью и могут окислять практически все классы биологических молекул – белки, липиды мембран, молекулы ДНК.

К АФК, запускающим цепи пероксидного окисления в биологических системах, относят: супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), пергидроксильный радикал (HO_2^{\cdot}), гидроксильный радикал ($\cdot OH$), пероксид водорода (H_2O_2). Кроме продуктов восстановления кислорода к АФК относятся также молекулы кислорода в синглетном состоянии (1O_2), оксид азота, или нитрил-радикал (NO^{\cdot}), пероксинитрит ($ONOO^{\cdot}$), гидрогалогениды ($HOCl$, $HOBr$, HOI) [4].

Восстановление молекулярного кислорода происходит в соответствии со схемой 1:

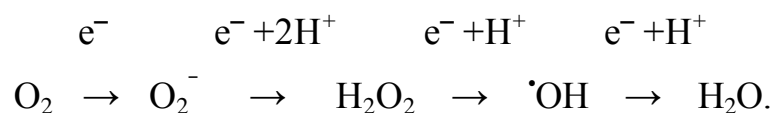


Схема 1 – Этапы одноэлектронного восстановления кислорода

Супероксидный анион-радикал

Образование супероксидного анионрадикал происходит в результате одноэлектронного восстановления молекулы кислорода. При этом донором электронов могут выступать свободные или связанные с металлопротеинами ионы металлов с переменной валентностью – в биологических системах преимущественно Fe^{2+} и Cu^+ [5]:



Считается что в результате подобных реакций, катализируемых металлопротеинами, супероксидный радикал постоянно образуется при нормальном функционировании дыхательных цепей митохондрий или мембран эндоплазматического ретикула гепатоцитов.

При этом в нормальной, здоровой клетке лишь незначительная часть электронов в митохондриальной электронтранспортной цепи идет

на образование супероксидного радикала $O_2^{\cdot-}$, который постоянно инактивируется под действием супероксиддисмутазы [5].

Супероксидному анион-радикалу ($O_2^{\cdot-}$) отводят наиболее значительную роль, так как считается, что именно он является родоначальником многих других активных форм кислорода.

В физиологических условиях $O_2^{\cdot-}$ является относительно слабым окислителем, но может выступать донором электронов, восстанавливая целый ряд соединений. Имея заряд, супероксидный радикал плохо проникает через плазматическую мембрану, данный вариант возможен при взаимодействии с анионно-обменными белками, являющимися трансмембранными переносчиками, регулируя рН и объем клетки [5].

Образование супероксида в организме происходит, в основном:

- 1) В митохондриальной и микросомальной цепях переноса электронов в результате «утечки» электронов с восстановленных элементов этих цепей на молекулярный кислород;
- 2) При активации фагоцитирующих клеток и тканевых макрофагов;
- 3) В ходе энзиматических реакций при действии так называемых «перекись продуцирующих ферментов»;
- 4) При окислении гемоглобина (Hb) и миоглобина, а также склонных к аутоокислению биомолекул (аскорбиновая кислота, биогенные амины и т.д.).

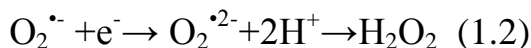
Полупериод существования $O_2^{\cdot-}$ при $37^{\circ}C$ составляет 10^{-6} с [6].

Перекись водорода

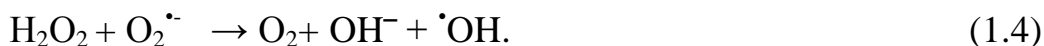
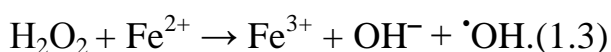
Пероксид водорода является окислителем средней силы, однако в норме, при отсутствии ионов металлов переменной валентности, ферментов, относительно стабилен, легко проходит через мембрану клетки и не выступает в качестве окислителя. Считается, что при низких (микромольных) уровнях H_2O_2 является относительно слабореактивной. Однако с ростом концентрации агрессивность перекиси водорода увеличивается и при достаточно высоком уровне H_2O_2 может атаковать

различные биомолекулы. Полупериод существования H_2O_2 при 37°C составляет 10-100 с.

Взаимодействие диоксида со вторым электроном и протонирование продукта приводит к образованию перекиси водорода:

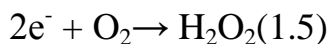


Повреждающее действие перекиси водорода в отношении биомолекул связано с тем, что H_2O_2 может являться источником образования свободных радикалов гидроксила, что происходит в результате реакции Фентона(1.3) или Хабера – Вейсса(1.4):

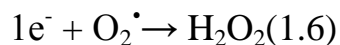


Вследствие высокой химической активности время жизни $\cdot\text{OH}$ -радикалов в клетке составляет около 10^{-9} с. Обладая наиболее высоким в живой природе редокс-потенциалом ($E_0 = +2,7$ В), он оказывает действие практически на любую биологическую молекулу [7].

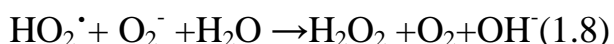
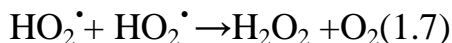
Образование перекисного аниона или пероксида водорода происходит при переносе двух электронов на O_2 :



Пероксид водорода образуется также путем одноэлектронного восстановления кислорода с последующей дисмутацией $\text{O}_2^{\cdot-}$ в реакции, протекающей спонтанно или катализируемой супероксиддисмутазой:

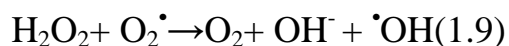


А так же при спонтанных превращениях $\text{O}_2^{\cdot-}$ и HO_2^{\cdot} :



Пергидроксильный радикал

HO_2 – гидропероксильный радикал более сильный окислитель, чем $\text{O}_2^{\cdot-}$. Он возникает при протонировании $\text{O}_2^{\cdot-}$ в кислой среде, при взаимодействии H_2O_2 с органическими радикалами или $\text{O}_2^{\cdot-}$, при радиолизе воды:



Пергидрооксильный радикал способен пересекать биологические мембраны и свободно диффундировать между компартментами клетки и реагировать с ненасыщенными жирными кислотами, некоторыми аминокислотами, такими как гистидин, метионин и триптофан.

Гидроксильный радикал

Гидроксильный радикал не несет на себе заряд и способен легко проникать через клеточную мембрану [5].

При физиологических значениях pH $\text{O}^{\cdot-}$ существует в виде $\cdot\text{OH}$, который является наиболее реакционноспособной формой АФК. Главный путь образования:



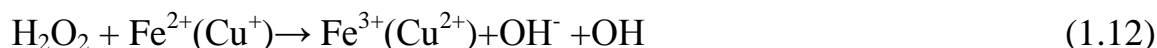
Он разрушает практически любую встретившуюся ему молекулу. Действуя на SH-группы, гистидиновые и другие аминокислотные остатки белков, $\cdot\text{OH}$ вызывает денатурацию последних и инактивирует ферменты. В нуклеиновых кислотах $\cdot\text{OH}$ разрушает углеводные мостики между нуклеотидами и, таким образом, разрывает цепи ДНК и РНК.

Появление $\cdot\text{OH}$ в биологических системах связывают с двумя основными реакциями:

1. Реакция Хабера-Вейсса (при физиологических условиях реакция Хабера-Вейсса в растениях протекает медленно):



2. Реакция Фентона – цикл реакций, включающий окисление ионов металлов переменной валентности, таких как железо и медь:



1.2 Окислительная модификация белков

Окислительной модификации могут подвергаться почти все аминокислотные остатки белков, в результате чего страдают все уровни структурной организации различных белков [8], включая гликопротеины, ферменты, металлопротеины. ОМБ проходит в условиях окислительного стресса (ОС). Свободные радикалы атакуют белки по всей длине полипептидной цепи, нарушая не только первичную, но и вторичную, и третичную структуру белков, что приводит к агрегации или фрагментации белковой молекулы. Многие ферменты, содержащие SH-группы, такие как АТФазы или дегидрогеназы, легко окисляются в результате свободнорадикальной атаки.

ОМБ играет важную роль в обороте белков в организме. Накопление окисленных белков рассматривается как один из факторов регуляции синтеза и распада протеинов, избирательно разрушающих окислительные белки. Фактически разрушение окислительных белков рассматривается как проявление вторичной антиоксидантной защиты в организме.

В качестве основных индукторов ОМБ, рассматриваются АФК, увеличение свободного железа, продукты перекисного окисления липидов при снижении антиоксидантной защиты. Например, гидроксильный радикал чаще всего вызывает агрегацию белков, а в комбинации с супероксиданионом - фрагментацию с образованием низкомолекулярных фрагментов. Радикалы липидов могут также вызывать фрагментацию белковых молекул [9].

Карбонильные производные белков (КПБ) - это стабильные продукты, которые образуются при участии аминокислотных остатков пролина, аргинина, лизина, треонина с образованием аддуктов Михаэля. Также КПБ могут образовываться при участии аминокислотных остатков лизина, цистеина и гистидина с продуктами перекисного окисления липидов. Причем карбонилирование аргинина и лизина сопровождается потерей одного или

более атомов азота. Кроме этого, они могут образовываться в процессе гликирования/гликооксидации аминокрупп лизина. Разные организмы, а также различные ткани сильно различаются по интенсивности метаболизма, а, следовательно, и по интенсивности продукции свободных радикалов. Скорость производства свободных радикалов в клетке зависит, прежде всего, от интенсивности дыхания. Для того, чтобы при усилении дыхания степень повреждения белков поддерживалась на постоянном уровне, необходимо, чтобы при этом происходило увеличение скорости обновления поврежденных белков. То есть скорости дыхания и обновления белков в различных тканях и организмах должны быть коррелированы [10].

Накопление окисленного дисфункционального белка с реактивными карбонильными группами может привести к межмолекулярным и внутримолекулярным поперечным связям с протеиновыми аминокруппами и вызвать потерю биохимической и физиологической функции субклеточных структур - рецепторной, механизмов передачи сигналов, транспортных системы и др. Если это касается митохондрий, то накопление продуктов окисления белков может привести к недостатку образования энергии и еще большему образованию АФК [10].

Окисление белкового скелета

Как показано на Рис.1, окисление белкового скелета инициируется воздействием $\cdot\text{OH}$ – радикала на α -водородный атом аминокислотного остатка с образованием углеродсодержащего радикала (Рис.1, реакция с). Необходимый для этой реакции $\cdot\text{OH}$ может быть получен путем радиолиза воды или катализируемого металлом расщепления H_2O_2 (Рис.1, реакции а и б). Полученный таким образом алкильный радикал быстро реагирует с O_2 , образуя алкилпероксильный радикал (Рис. 1, реакция d), который может приводить к образованию алкилпероксида (Рис.1, реакция f) с последующим образованием алкоксильного радикала (Рис.1, реакция h), который в свою очередь может быть превращен в гидроксильную группу производного белка (Рис.1, реакция j). Примечательно, что многие из этапов этого пути, которые

опосредованы взаимодействием с HO· 2, могут быть катализированы также Fe²⁺ (Рис.1, реакции e, g и j) и Cu⁺.



Рисунок 1 – Окисление белкового скелета свободными радикалами [3]

Промежуточные соединения алкила, алкилпероксила и алкоксила в этом пути могут подвергаться побочным реакциям с другими аминокислотными остатками в той же самой или другой молекуле белка, чтобы образовать новый алкильный радикал (Рис.2).

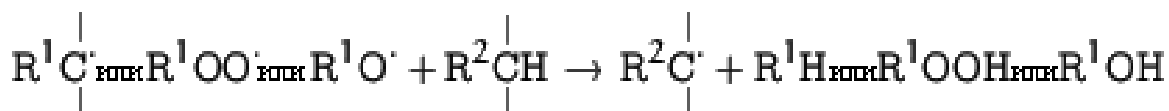


Рисунок 2 – Взаимодействие алкильного, алкилпероксильного и алкоксильного радикала с аминокислотными остатками [11]

Кроме того, в отсутствии кислорода, когда реакция d на рис. 1 не может идти, алкильный радикал может вступать в реакцию с другим углеродсодержащим радикалом, образуя сшивки между белками (Рис. 3).

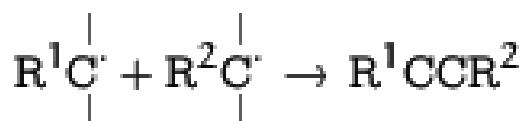


Рисунок 3 – Взаимодействие алкильных радикалов с образованием сшивки между белками [9]

Фрагментация белков

Образование алкоксильного радикала (Рис. 1, реакция h и g) устанавливает стадию расщепления пептидной связи белковой цепи либо путем диамида, либо путем α -амида. После расщепления диамидным путем (Рис. 4, путь a) пептидный фрагмент, полученный из N-концевой части белка, обладает диамидной структурой на C-конце, тогда как пептид, полученный из C-концевой части белка обладает изоцианатной структурой на N-конце

Напротив, при расщеплении по α -амидному пути (Рис.4, путь b), пептидный фрагмент, полученный из N-концевой части белка, обладает амидной группой на C-конце, тогда как N-концевой аминокислотный остаток фрагмента, полученного из C-концевой части белка, существует как производное N- α -кетоацила. При кислотном гидролизе пептидные фрагменты, полученные диамидным путем, получают CO_2 , NH_3 и свободную карбоновую кислоту, тогда как гидролиз фрагмента, полученного по пути α -амидному, дает и NH_3 свободную α -кетокрбоновую кислоту.

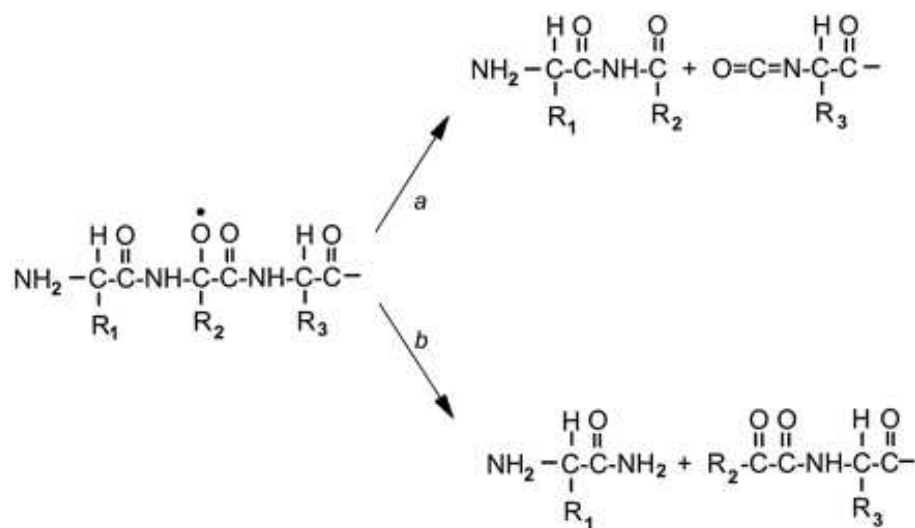


Рисунок 4 – Расщепление белковой цепи по диамидному (a) и α -амидному (b) путям [3]

Расщепление пептидной связи может происходить также в результате свободнорадикальной-атаки глутамиловых, аспартильных и пролильных боковых цепей. $\cdot\text{OH}$ -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 C-концевой части белка, будет существовать в виде N-пировильного производного (Рис.5).

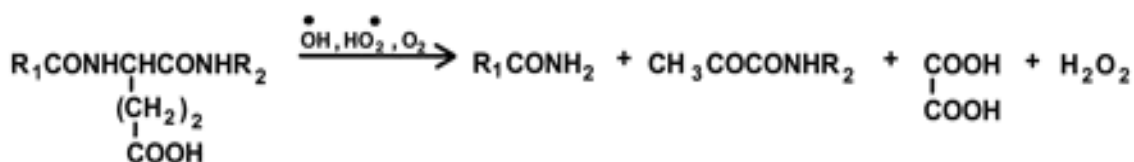


Рисунок 5 – Образованием щавелевой кислоты и N-пировил-производного [3]

Исходя из того, что количество пептидов, образующихся при радиолитическом расщеплении белков, приблизительно равно количеству остатков пролина, (4) предположили, что окисление пролильных остатков приведет к расщеплению пептидной связи. Было показано, что окисление остатков пролина приводит к образованию 2-пирролидона и сопутствующего расщепления пептидной связи (Рис.6) [12]. Поскольку кислотный гидролиз 2-пирролидона дает 4-аминомасляную кислоту, присутствие 4-аминомасляной кислоты в белковых гидролизатах может служить доказательством того, что расщепление белковой цепи в данном случае происходит через окисление пролина.



Рисунок 6 – Окисление остатков пролина с образованием 2-пирролидона и пептидного фрагмента [3]

Образование карбонильных производных белков

Как уже отмечалось, окислительная фрагментация белков либо путем α-амидирования (Рис.4), либо путем окисления боковых цепей глутамила (Рис.5)

приводит к образованию пептида, в котором N-концевая аминокислота блокируется α -кетоацильного производного. Однако как показано в таблице 1, прямое окисление остатков лизина, аргинина, пролина и треонина также может приводить к образованию карбонильных производных [13].

Также карбонильные группы могут образовываться в белках при реакциях с альдегидами (4-гидрокси-2-ноненаль, малоновыйдиальдегид), образующимися в результате перекисного окисления липидов (Рис.5 В, С), или с активными карбонильными производными (кетоамины, кетоальдегиды), образующимися в результате реакций расщепления сахаров или продуктов их окисления с остатками лизина (реакции гликирования и гликооксидации) (Рис. 5 А). Поэтому присутствие карбонильных групп в белках считается ранним, чувствительным и достаточно стабильным маркером свободнорадикального повреждения [14,15]. В связи с этим были разработаны достаточно чувствительные методы для качественного и количественного определения карбонильных групп. Большинство этих методов основывается на взаимодействии карбонильных групп с 2,4-ДНФГ с образованием производных – динитрофенилгидразонов, количество которых определяют спектрофотометрически при длине волны 360-390нм [16].

Судя по наличию карбонильных групп, было установлено, что окисление белка связано со старением, окислительным стрессом и рядом заболеваний [17].

Карбонильные производные белков при окислительном стрессе

Окислительная модификация белков в живых организмах может привести не только к потере каталитической активности и последующей протеолитической деградации белков, но также используется для сигнализации, межклеточной коммуникации и получения информации из внешней среды [18]. Внутриклеточный уровень белков, подвергнутых окислительной деструкции, фактически отражает соотношение между прооксидантной и антиоксидантной системами: скоростью окисления белков

и скоростью деградации окисленных белков [19]. Одними из основных ловушек АФК, продуцируемых как в процессе нормальной клеточной жизнедеятельности, так и при воздействии на организм ионизирующего излучения, вредных химических веществ в силу своего строения являются белки. Выяснено, что белки могут улавливать от 50% до 75% свободных радикалов [20]. Под действием АФК происходит нарушение нативной конформации белков с образованием крупных белковых агрегатов или фрагментация белковой молекулы. Влияние гидроксильного радикала наиболее часто вызывает агрегацию белков, а в сочетании с супероксидным радикалом происходит фрагментация молекулы с образованием низкомолекулярных фрагментов [21].

Одним из проявлений окислительной деструкции белков является повышение карбонильных производных белков. Увеличение содержания карбонильных производных является одним из ранних и значимых маркеров окислительного повреждения. Наиболее распространенный метод определения продуктов окисления белков основан на образовании дополнительных карбонильных групп в результате окислительной модификации белков с применением динитрофенилгидрозина [22].

1.3 Молекулы средней массы

Молекулы средней массы (МСМ) изменяются в зависимости от метаболического состояния организма, и служит прогностическим критерием нарушения обменных процессов. При различных патологических состояниях содержание МСМ в крови повышается, уровень данного показателя варьирует. МСМ играют важную роль в развитии интоксикации организма, а также отрицательно влияют на его метаболизм и функции, т.к. способны присоединяться и блокировать рецепторы любой клетки. Также МСМ участвуют в биорегуляторных механизмах, поскольку пул

данных соединений довольно разнообразен и широк по химическому составу [23].

Биологическое действие молекул средней массы

Особенность МСМ заключается в их выраженной высокой биологической активности. Накопление МСМ является не только маркером эндоинтоксикации, но и усугубляют течение патологического процесса, приобретая роль вторичных токсинов, оказывая влияние на жизнедеятельность всех систем и органов. Основным биохимическим маркером считают показатель уровня МСМ, отражающим уровень патологического белкового метаболизма.

МСМ – имеют молекулярную массу 300-500Д. В организме они присутствуют в разных соотношениях, как в физиологических условиях, так и при патологии [1, 2]. В состав МСМ входят продукты катаболизма белков, олигосахара, производные глюкуроновых кислот, нуклеотиды и т.д. [3]. В здоровом организме как концентрация, так и распределение МСМ между плазмой и эритроцитами поддерживается на постоянном и индивидуальном уровне, зависящем от наследуемых признаков, характера метаболизма, питания и т.д.

МСМ подразделяются на две большие группы – вещества средней молекулярной массы (ВМСММ) и олигопептиды (ОП). ВМСММ или катаболический пул МСМ представляют собой небелковые производные различной природы: мочевины, креатинина, мочевая кислота, глюкоза, молочные и др. органические кислоты, аминокислоты, жирные кислоты, холестерин, фосфолипиды, продукты свободнорадикального окисления, промежуточного метаболизма, нуклеопротеидного обмена и др., накапливающиеся в организме в превышающие нормальные концентрации. Основная часть МСМ – олигопептиды, представлена веществами пептидной природы, выполняющими различные функции, в том числе и регуляторные [1]. Многие из них обладают нейротоксической активностью, угнетают процессы биосинтеза белка, способны подавлять активность ряда ферментов,

разобщают процессы окисления и фосфорилирования, нарушают механизмы регуляции синтеза адениловых нуклеотидов, изменяют транспорт ионов через мембраны, эритропоз, фагоцитоз, микроциркуляцию, лимфодинамику, вызывают состояние вторичной иммунодепрессии. Известно, что МСМ способны соединяться и блокировать рецепторы любой клетки, неадекватно влияя на её метаболизм и функции. Показана возможность влияния МСМ на тонус гладкомышечных клеток, на трансваскулярный транспорт. Эти вещества могут взаимодействовать с компонентами систем гемостаза. Считается, что МСМ могут проникать через плацентарный барьер, оказывая непосредственное токсическое влияние на плод, вызывая полиорганные нарушения разного характера. Токсическое влияние могут оказывать накапливающиеся в нефизиологических концентрациях промежуточные и конечные продукты нормального и нарушенного обмена. В результате многочисленных исследований было установлено, что повышение уровня МСМ в крови наблюдается при различных патологических состояниях различной этиологии и степени тяжести: при шоковых состояниях, сепсисе, злокачественных новообразованиях, ожоговой болезни, травмах, остром панкреатите и панкреонекрозе, диабете и при диабетических поражениях сосудов, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, ишемии органов и тканей, менингите, ряде хирургических заболеваний (перитоните, панкреатите), заболеваниях сердечно–сосудистой и респираторной систем, у больных с разными формами инсульта, нарушении процессов свертываемости крови, при развитии аритмии, поражениях суставов, ревматоидном артрите, вибрационной болезни, ожогах и др. Накопление в крови недоокисленных продуктов метаболизма, патогенов отмечается при инфекционных заболеваниях, при этом нарушается целостность клеток хозяина, в кровь выходят функционально «закрытые» антигены и в организме начинается наработка против них аутоантител, которые являются факторами формирования эндогенных патогенов, аутоиммунных комплексов [23].

Роль окислительной модификации белков при патологических состояниях организма

Накопление окисленных белков также связано с рядом заболеваний [24], таких как лучевая болезнь, некоторые виды рака, мышечная дистрофия, катарактогенез, ревматоидный артрит, прогерия, синдром Вернера, при некоторых психических расстройствах, заболеваниях головного мозга [25].

Имеется ряд исследований, подтверждающих, что при ряде патологических состояний именно белки, а не липиды и нуклеиновые кислоты являются эффективными ловушками генерируемых АФК, и их окислительная модификация рассматривается как один из ранних и надежных маркеров ОС [26].

Проникновение активных форм кислорода в слизистую оболочку желудка, приводит к прямому и опосредованному через цитокины повреждению эпителия слизистой и служит фактором риска образования язв и эрозий. С другой стороны, длительное воздействие активных форм кислорода приводит к необратимым повреждениям ДНК, которые накапливаются с течением времени и создают «стартовую площадку» для развития рака желудка [27,28].

Главная проблема в том, что желудок является начальным звеном пищеварительного конвейера, и нарушение его функции незамедлительно сказывается на состоянии других органов пищеварения, вызывая сбой в работе тонкой и толстой кишки, поджелудочной железы, печени и приводя к увеличению содержания патогенных бактерий в кишечнике. Хронический атрофический гастрит относят к предраковым состояниям желудка, на фоне данного заболевания часто развиваются такие предраковые изменения, как кишечная метаплазия и дисплазия эпителия слизистой желудка, а также гиперпролиферация эпителия слизистой желудка, способствующая развитию опухолей [29,30].

Хронический гастрит (ХГ) занимает центральное место среди заболеваний желудка. И не только потому, что он является наиболее распространенным заболеванием пищеварительной системы. Более существенно то, что ХГ, почти как правило, предшествует или сопутствует таким серьезным по течению и прогнозу болезням, как язва и рак желудка. В основе ХГ лежат воспалительные, дисрегенераторные, дистрофические и атрофические процессы в слизистой оболочке желудка, приводящие, в конечном счете, к ее функциональной недостаточности [31].

Рак желудка - это заболевание, характеризующееся злокачественной опухолью, находящейся в покровных тканях желудка. Как правило, раковые клетки там делятся и занимают все большее и большее пространство. Клетки организма превращаются в раковые, если в связи с внешними факторами происходит какая-либо мутация клеток ДНК. Обычно причиной этому служит радиация, токсические вещества, попавшие в организм и бактерии. Помимо этого существует еще множество причин, которые до сих пор неизвестны ученым. Можно назвать лишь список факторов, которые при определенном ряде обстоятельств могут привести к возникновению болезни[32,33].

Факторы возникновения.

- Основной фактор возникновения - бактерия *Helicobacter pylori*. Она способна существовать даже в кислой среде кишечника и желудка. Сама она приводит к гастриту и другим язвенным болезням, которые влекут за собой опухоль, то есть рак желудка.

- Злоупотребление алкоголем. Употребление алкоголя приводит к раку какого-либо органа. Чаще всего к онкологии желудка.

- Злоупотребление жирными продуктами.

- Радиация. Радиация вызывает мутацию в клетках организма и влечет за собой рак желудка и других органов.

- Употребление пищи, содержащей нитраты и нитриты. Существует мнение, что нитраты и нитриты разлагают нормальную клетку,

сбивая ее жизненный цикл. Мутируя, клетка превращается в раковую со всеми вытекающими последствиями[34,35].

Белки плазмы, подвергшиеся окислительной деструкции, имеют довольно большой период полураспада. Исходя из этого, повышение карбонильных групп окисленных белков является наиболее перспективным маркером интенсивности свободнорадикальных процессов при ряде патологических состояний, при воздействии неблагоприятных внешних факторов. Причиной повышения уровня продуктов ОМБ при состояниях ОС может являться не только посттрансляционная ОМБ, но и интенсивность их протеолитической деструкции [35,36].

Таким образом, окислительная модификация белков является одним из ранних показателей поражения тканей при свободнорадикальной патологии [37].

Количество окисленных белков в клетках обусловлено генетически и является их фенотипической характеристикой. Повышение уровня окисленных белков с возрастом и при различных патологических состояниях может быть обусловлено окислительным повреждением отдельных фрагментов ДНК, что ведёт к нарушению процесса регуляции окисления белков и их деградации, образованию мутантных белков[38].

Биологическая роль окислительной деструкции белков

На начальных стадиях свободнорадикальной модификации происходит увеличение гидрофобности и денатурации белковых молекул. Далее происходит увеличение гидрофобности и денатурации с параллельным возрастанием протеолитической чувствительности окисленных белков.

При средней степени окислительной деструкции белков усиление их деградации является нормальной функцией внутриклеточной протеолитической системы. В то же время, наоборот, неспособность к деградации продуктов свободнорадикальной модификации при их

интенсивной деструкции связана с различными патологическими состояниями. В анаэробных условиях при глубокой степени окисления может снижаться протеолитическая чувствительность окисленных белков, что происходит по причине образования дополнительных сшивок и выраженной их агрегации. В присутствии высоких концентраций кислорода фрагментация происходит быстрее, чем образование ковалентных сшивок [39].

Существует другая точка зрения, по которой изменение вторичной структуры белка приводит к повышению протеолитической чувствительности. Определена корреляционная зависимость между конформационными изменениями, вызванными окислением очищенной РНК-азы А, ковалентными модификациями аминокислотных остатков и протеолитической чувствительностью за счет 20S протеасомы [40].

Протеасомная система является главной внутриклеточной системой, деградирующей окисленные белки. Мультикаталитический протеасомный комплекс, представленный АТФ-независимой 19-20S и АТФ-стимулируемой-26S формами в клетках млекопитающих, при состоянии ОС узнает и селективно деградирует окисленные поврежденные субстраты. Таким образом, селективный протеолиз может предотвратить накопление в клетке белков, подвергшихся свободнорадикальной модификации.

Нарушение сбалансированности окислительной деструкции белков и их протеолиза может привести к образованию агрегатов при увеличении гидрофобных взаимодействий и дополнительных ковалентных сшивок между молекулами и являться одним из маркеров повреждения в тканях. Определение окислительной деструкции белков стало новым направлением для оценки интенсивности окислительного стресса. Выявление именно их окислительной модификации может служить надежным маркером интенсивности протекания окислительных процессов. На основании того, что белки выполняют специфические биологические функции, можно регистрировать не только образование продуктов свободнорадикальной модификации, но и изменение функций белков. Анализ продуктов

окислительной деструкции белков может дать информацию о типе оксидантов, участвующих в процессе их окисления [41].

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования

В качестве объектов исследования в данной работе была использована кровь людей больных раком желудка и атрофическим гастритом. Общее количество обследованных составило 46 человека, из них больных раком желудка 26 человек и атрофическим гастритом 20 человек. Контрольная группа составила 27 человек.

Кровь забиралась на следующий день после поступления больного в стационар. Забор крови производили из локтевой вены в вакутейнеры с гепарином в качестве антикоагулянта.

Кровь подвергалась центрифугированию при 3000 об/мин для разделения на плазму и эритроциты. Плазму отбирали и сохраняли при температуре -20°C до проведения исследования. Затем осуществлялось отмывание эритроцитов от плазмы. Для этого эритроциты каждой фракции суспендировали в десятикратном объеме 0,9%-ного раствора NaCl и центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. Супернатант отбрасывали, процедура отмывания повторяли три раза. Заключительное центрифугирование проводили в течение 20 мин (3000 об/мин) для более плотной упаковки эритроцитов.

В плазме и эритроцитах крови здоровых людей, больных атрофическим гастритом и раком желудка определяли уровень карбонильных производных белков и содержание молекул средней массы.

2.2 Метод определения карбонильных производных белков

Метод основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием производных 2,4-динитрофенилгидразонов (ДНФГ-

производные), интенсивность окраски которых регистрировали на спектрофотометре при длине волны 370 нм [42,43].

Реактивы:

1. 20%-ный раствор ТХУ.
2. 2н раствор HCl.
3. 0,2%-ный раствор 2,4-ДНФГ, приготовленный на 2нHCl.
4. Этанол.
5. Этилацетат.
6. 8М раствор мочевины.

Ход определения:

Отмытые и упакованные эритроциты гемолизировали дистиллированной водой (1:50), плазму разводили дистиллированной водой (1:10).

Для анализа готовили две пробы – контрольную и опытную, в которые вносили 0,1 мл гемолизата (содержащего 0,7-1,0 мг белка) и 0,9 мл 20%-ого раствора ТХУ для осаждения белков. К денатурированным белкам приливали: в опытную пробу 1 мл 0,2%-ого 2,4-ДФГ, а в контрольную только 2нHCl. После инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре образцы центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин. Супернатант удаляли, осадок трижды промывали смесью растворителей (этанол-этилацетат в соотношении 1:1) для экстракции липидов и 2,4-ДФГ, который не прореагировал с карбонильными группами окисленных белков. Предварительно подсушив, промытый осадок растворяли в 2,5 мл 8М раствора мочевины, выдерживая в кипящей бане в течение 5 минут до полного его растворения. Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов регистрировали спектрофотометрически при длине волны 370 нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см против контроля. Уровень карбонильных групп окисленных белков рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции, равный $21,0 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ для ДНФГ-

производных и выражали в нмоль на миллиграмм гемоглобина в эритроцитах и в нмоль на литр в плазме крови [44,45].

2.3 Метод определения молекул средней молекулярной массы

Принцип метода

О содержании среднемолекулярных пептидов можно судить на основании прямой спектрометрии депротеинизированного супернатанта, полученного после осаждения белков раствором ТХУ при длине волны 254 нм.

Реактивы

1. 10%-ный раствор ТХУ.

Ход работы

В центрифужные пробирки вносили 1 мл сыворотки крови и 0,5 мл раствора 10%-ной ТХУ. Через 10 минут пробы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин. К 0,5 мл надосадочной жидкости прибавляли 4,5 мл дистиллированной воды и измеряли содержание среднемолекулярных пептидов на спектрофотометре в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм. Уровень МСМ выражали в единицах экстинкции (показатель умножают на 100). За норму принята величина 24-28 единиц.

2.4 Статистическая обработка результатов

Для обработки полученных результатов использовалась программа MicrosoftOfficeExcel 2007. Обработка данных проводилась с помощью методов вариационной статистики: вычисление средней арифметической показателей и ошибки средней величины. Достоверность различия средних величин оценивалась по t-критерию Стьюдента.

Чтобы рассчитать погрешность, использовали следующие формулы:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}},$$

$$m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}},$$

где:

σ - среднеквадратичное отклонение;

\bar{x} - среднее значение;

x_i - индивидуальное значение;

n - количество проб;

m - погрешность определения

3 Результаты и их обсуждение

Из текста ВКР изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Данилевский, Н. Ф. Заболевания пародонта / Н. Ф. Данилевский, А. В. Борисенко. – К.: Здоровья, 2000. – 160 с.
2. Меньщикова, Е.Б. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков с соат. –М.: Фирма «Слова», 2006. – 556с.
- 3.Сторожок, С. А. Молекулярные дефекты белков мембраны эритроцита / С. А. Сторожок, А. Г. Санников //Вопр.мед.хим. – 1996. – Т.42, вып.2. – С. 103 – 110.
- 4.Кулинский, В. И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В. И. Кулинский // Сорос. обще-образоват. журн. – 1999. – №1. – С. 2–7.
5. Губский, Ю.И. Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз: монография / Ю.И.Губский. - Винница: Нова Книга, 2015. – С41-42.
6. Коган, А.Х. Модулирующая роль CO₂ в действии активных форм кислорода / А.Х. Коган, С.В. Грачев, С.В. Елисеева.– 2006. –224с..
7. Зенков Н.К. Окислительный стресс. / Н.К. Зенков. – М.: Наука, 2001. – С. 343.
- 8.Suksrichavalit T. Copper complexes of pyridine derivatives with superoxide scavenging and antimicrobial activities./ T. Suksrichavalit, S. Prachayasittikul, C. Nantasenamat, C. Isarankura-Na-Ayudhya, V. Prachayasittikul// European Journal of Medicinal Chemistry – 2009. – Vol. 44, No.8. - P. 3259-3265.
- 9.Муравлева, Л.Е. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования/ Л.Е. Муравлева. – 2010. – С. 57
- 10.Stadtman E.R. Protein oxidation / E.R. Stadtman, R.L. Levine // Annals of N.Y. Academy of Sciences. — 2000. — Vol. 899. — P. 191-208.

11.Хавинсон, В.Х. Свободно-радикальное окисление и старение /В.Х. Хавинсон, В.А.Баринов, А.В. Арутюнян, В.В. Малинин. – СПб: Наука, 2003 – С. 14-327.

12.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, No.1. - P.265-271.

13. Morse, L.R.A short report: PAMM, a novel antioxidant protein, induced by oxidative stress. Morse L.R, da Silva R.A, Wang D, BattagliniR.A. // *Redox Biol.* - 2015 – Vol. 6. – P. 446-453.

14. Бондарь, И.А., Климонтов В.В., Поршенников И.А. Окислительная модификация белков при диабетических микроангиопатиях [Электрон.ресурс].- Режимдоступа: <http://www.diabet.ru/Sdiabet/2000-03/2000-03-02.htm>

15.Carr, A. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? /A. Carr, B. Frei // *The FASEB Journal* - 1999. - Vol.13. - P.1007-1024.

16.Levine, L.R. Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins/ L.R. Levine, J.A. Williams, E.R.Stadtman, E. Shacter// *Methods in enzymology.* – 1994. – Vol.233. - P.346 – 357.

17.Leeuwenburgh C., Hansen P.A., Holloszy J.O., Heinecke J.W. Oxidized amino acids in the urine of aging rats: potential markers for assessing oxidative stress in vivo [Electronic resource].-Mode of access:<http://ajpregu.physiology.org/cgi/content/full/276/1/R128>

18. Луцак, В. И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма : (обзор) / В. И. Луцак // *Биохимия.* – 2007. – Т. 72, вып. 8. – С. 995–1017.

19. Скулачев, В. П. Кислород в живой клетке: добро и зло / В. П. Скулачев // *Сорос.общееобразоват. журн.* – 1996. – №3. – С.1–8.

20. Gebicki J. M. Protein hydroperoxides as new reactive oxygen species / J. M. Gebicki // *Redox Rep.* – 1997. – V.3, N2. – P. 99–110.

21. Davies K. J. Protein damage and degradation by oxygen radicals : III. Modification of secondary and tertiary structure / K. J. Davies, M. E. Delsignore // J Biol Chem. – 1987. – V.15, №20 (262). – P.9908–9913.
22. Дубинина, Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты / Е. Е. Дубинина. – СПб. : Мед.пресса, 2006. – 397с.
23. Городецкая И.В. Тиреоидные гормоны и антистресс-система // Тез. докл. X съезда Белорусского общества физиологов.- Минск, 2001. С. 39 - 40.
24. Меньшикова, Е.Б. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньшикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, И.А. Бондарь, В.А. Труфакин. – Новосибирск: АРТА, – 2008. – 284 с.
25. Morgan P.E. Protective Mechanisms Against Peptide and Protein Peroxides Generated by Singlet Oxygen / P.E. Morgan, R.T. Dean, M.J. Davies//Free Radical Biology & Medicine - 2004. - Vol.36, № 4. - P.484 – 496.
26. Идельсон, Л. И. Справочник по функциональной диагностике. / под ред. И. А. Кассирского. – М.: Медицина, 1970. – 401 с.
27. Кравец, Е.Б. Клинические лекции по детской эндокринологии. – Томск, 2004. – 364 с.
28. Петунина, Н.А. Клиника, диагностика и лечение аутоиммунного тиреоидита // Проблемы эндокринологии. – 2002. – Т. 48, № 6. – С.16-21.
29. Тишенина, Р.С. Перекисное окисление липидов и атокоферол у больных диффузным токсическим зобом // Проблемы эндокринологии/ Р.С.Тишенина, Т.А. Филоненко, А.В. Древаль. – 2000. – Т. 46, № 6. – С.26-28.
30. Bozhko A.P. The role of thyroid hormones in prevention of disorders of myocardial contractile function and antioxidant activity during heat stress // Ross. Fiziol.Zh. Im I.M. Sechenova. – 1998. – Vol. 84, № 3. – P.226-232.

31. Ляхович, В.В. Активная защита при окислительном стрессе. Антиоксидант-респонзивный элемент / В.В. Ляхович, В.А. Вавилин, Н.К. Зенков, Е.Б. Меньшикова // Биохимия – 2006. – Т. 71, № 9. – С. 1183-1197
32. Василенко, И.В. Предрак и рак желудка: этиология, патогенез, морфология, лечебный патоморфоз. / И.В. Василенко, В.Д. Садчиков, К.А. Галахины др // К.: Книга плюс, 2001. – с. 9–54.
33. Лактионов, П.П. Биомедицинская химия // Иммунохимические и молекулярно-генетические маркеры в диагностике рака желудка. - 2009. - С. 15-31.
34. Сельчук, В.Ю. Рак желудка // Рубрика: Онкология. -2003. – С. 14-41.
35. Казеннов, А. М. Роль белков мембранного скелета безъядерных эритроцитов в функционировании мембранных скелетов. / А. М. Казеннов, М. Н. Маслова, А. Д. Шагабодов // Докл. АН СССР. – 1990. – Т. 312, №1. – С. 223 – 226.
36. Меньшикова, Е.Б. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньшикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, И.А. Бондарь, В.А. Труфакин. – Новосибирск: АРТА, – 2008. – 284 с.
37. Рябов, С. И. Молекулярно-генетические аспекты эритропоэза. / С. И. Рябов, Г. Д. Шостка – М.: Ленинград, 1973. – 280 с.
38. Северин, С.Е. Внутриклеточный обмен углеводов и биологическое окисление. Ч. 1. Гликолиз. / С.Е. Северин // Химические основы процессов жизнедеятельности. - М., 1962. – 156 с.
39. Protein oxidation and proteolysis in RAW 264.7 macrophages: effects of PMA activation / J. Gieche [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2001. – Vol.1538, №2-3. – P. 321–328
40. Hydrogen peroxide-induced structural alterations of RNase A. / P. Lasch [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol.276, №12. – P. 9492–9502.
41. Chemistry, physiology and pathology of free radicals / L. Bergendi [et al.] // Life Sci. – 1999. – Vol.65, №18/19. – P. 1865–1874.

42. Биохимические маркеры воспаления тканей ротовой полости: метод. рекомендации // А. П. Левицкий, О. В. Деньга, О. А. Макаренко [и др.] – Одесса: КП ОГТ, 2010 – 16 с.

43. Dalle-Donne I. Protein carbonylation: 2,4-dinitrophenylhydrazine reacts with both aldehydes/ketones and sulfenic acids./ I. Dalle-Donne, M. Carini, M. Orioli, G. Vistoli, L. Regazzoni, G. Colombo, R. Rossi, A. Milzani, G. Aldini// Free Radical Biology and Medicine – 2009. - Vol. 46, №10. – P. 1411-1419.

44. Хавинсон, В.Х. Свободно-радикальное окисление и старение /В.Х. Хавинсон, В.А.Баринов, А.В. Арутюнян, В.В. Малинин. – СПб: Наука, 2003 – С. 14-327.

45. Чеснокова, Н.П. Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 7. – С. 37-41.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Е.И. Шишачкая
« 28 » июня 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Анализ содержания карбонильных производных белков в крови
больных хроническим атрофическим гастритом и раком желудка

Руководитель _____ к.б.н., профессор Н.М. Титова
подпись, дата

Выпускник _____ Т.В. Глушкова
подпись, дата

Красноярск 2017