

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Е.И. Шишадкая

« 14 » июня 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Оценка окислительной модификации липидов и белков сыворотки крови у
больных аденомой и раком простаты

Руководитель _____ 14.06.2018 доцент, канд. биол. наук Н. М. Титова

Выпускник _____ 14.06.2018 В. В. Борисова

Красноярск 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 Обзор литературы.....	5
1.1 Активные формы кислорода – источники, свойства, биологические функции.....	5
1.2 Антиоксидантная защита тканей.....	10
1.3 Свободно-радикальное окисление белков.....	14
1.4 Перекисное окисление липидов.....	19
1.5 Продукты перекисного окисления липидов.....	21
1.6 Заболевания предстательной железы.....	22
2 Материалы и методы.....	27
2.1 Объект исследования.....	27
2.2 Определение содержания диеновых конъюгатов.....	27
2.3 Определение содержания малонового диальдегида.....	28
2.4 Определения содержания карбонильных производных белков.....	30
2.4 Статистическая обработка результатов.....	31
3 Результаты и их обсуждения.....	32
3.1 Содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в сыворотке крови больных аденомой и раком предстательной железы..	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Содержание карбонильных производных в сыворотке крови условно здоровых мужчин и больных аденомой и раком предстательной железы.....	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	Ошибка! Закладка не определена.
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	33

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день установлено, что свободные радикалы и другие активные формы кислорода (АФК) играют огромную роль в регуляции основных функций клетки, как в обычных условиях, так и при воздействии на клетку различных патогенных факторов. Важно заметить, что активные формы кислорода в зависимости от силы воздействующего патогенного фактора могут выступать либо индукторами процессов адаптации, либо индукторами апоптоза. Кроме того, активные формы кислорода могут оказывать прямое воздействие на клеточные структуры, а также инициировать свободнорадикальное окисление липидов, белков, нуклеиновых кислот, что лежит в основе патогенеза многих заболеваний [1,2].

Фармакологическая регуляция активности процессов свободнорадикального окисления (СРО) занимает важное место в медико-биологических исследованиях, т.к. позволяет проводить эффективную патогенетическую терапию заболеваний, связанных с гипоксией и ишемией, дегенеративных поражениях нервной системы и других. Знания о регуляторной роли активных форм кислорода в процессах клеточного метаболизма, функционирования антиокислительной системы клетки необходимы для реализации фармакологической регуляции СРО путем таргетного воздействия на отдельные компоненты и этапы этого процесса, что предполагает разработку новых лекарственных средств направленного действия [3].

Цель исследования – изучить содержание диеновых конъюгатов, малонового диальдегида и карбонильных производных белков в сыворотке крови больных аденомой и раком предстательной железы.

Исходя из цели, были сформулированы следующие задачи:

- 1) Исследовать содержание диеновых конъюгатов в сыворотке крови больных аденомой и раком предстательной железы;

- 2) Оценить уровень малонового диальдегида в сыворотке крови мужчин с патологией предстательной железы;
- 3) Определить содержание карбонильных производных белков в сыворотке крови больных аденомой и раком предстательной железы.

Работа выполнена на кафедре медицинской биологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета и является частью комплексного исследования по изучению процессов свободно-радикального окисления липидов и белков в норме и при различных патологиях.

1 Обзор литературы

1.1 Активные формы кислорода – источники, свойства, биологические функции

Причинами окислительного стресса, которым подвержены аэробные организмы, являются активные формы кислорода (АФК), образующиеся в процессе неполного восстановления кислорода. С физико-химической точки зрения активные формы кислорода — это свободные радикалы, которые имеют на внешней электронной оболочке неспаренный электрон. Донорами электронов являются металлы с переменной валентностью (Fe^{2+} , Cu^{2+} и другие), входящие в состав многих ферментов [4].

Кроме 4-х электронного восстановления O_2 до H_2O в дыхательной цепи митохондрий, происходит и 1-,2-,3-электронное восстановление с образованием АФК в соответствии со схемой 1:

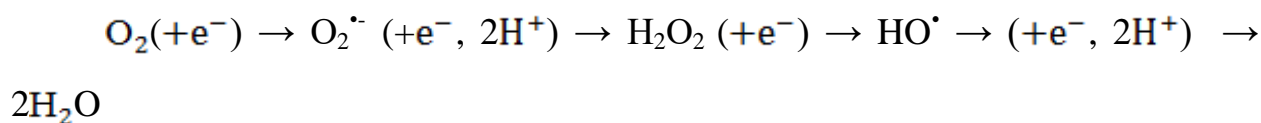


Схема 1 - Этапы одноэлектронного восстановления кислорода

Одними их важнейших активных форм кислорода являются супероксид ($\text{O}_2^{\cdot-}$), и гидроперекисный радикал (HO_2^{\cdot}) которые оказывают токсическое и мутагенное действие на все виды клеток вследствие повреждения мембранных компонентов, ДНК [1]. Наибольшую опасность представляет супероксид, т.к. он является источником других форм активных форм кислорода, таких как: перекись водорода H_2O_2 , гидроксильный радикал (HO^{\cdot}), озон (O_3), синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), нитрил-радикал, или оксид азота (NO^{\cdot}), пероксинитрит (ONOO^{\cdot}), гипохлорит (HOCl) [2,3,5].

Основными источниками АФК в клетках являются:

1. Митохондриальная и микросомальная цепь переноса электронов. Происходит «утечка» электронов с восстановленных элементов дыхательной цепи на молекулярный кислород.

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

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

4. Плазмалемма макрофагов и эндотелиоцитов.

5. Окисление гемоглобина и миоглобина, а также склонных к аутоокислению биомолекул [6].

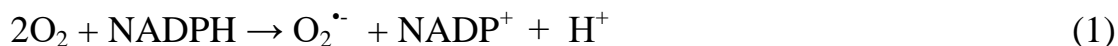
Известно, что молекулярный кислород активно участвует в реакциях, катализируемых оксидазами, оксигеназами. Первые катализируют реакции окисления различных субстратов, в результате которых происходит прямое восстановление кислорода за счет присоединения одного, двух или четырех электронов с последующим образованием $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , и H_2O .

Оксигеназы участвуют в активации молекулярного кислорода с дальнейшим внедрением одного или двух атомов кислорода в субстрат. Они участвуют в метаболизме стероидов, некоторых витаминов, простагландинов, в обезвреживании ксенобиотиков и т.д. Оксигеназы подразделяются на диоксигеназы и монооксигеназы. Диоксигеназы катализируют реакцию включения всей молекулы кислорода в субстрат, монооксигеназы – включение одного атома, а второй переходит в состав образующейся воды [7].

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

Среди активных форм кислорода супероксидному анион-радикалу отводят особую роль, т.к. считается, что именно он является источником других активных форм кислорода. Его главной биологической ролью является антимикробная защита [5].

Супероксид анион продуцируется NADPH-оксидазной системой в ходе иммунного и воспалительного ответа. При этом фагоциты быстро поглощают большое количество O_2 (дыхательный «взрыв»), образуя супероксид $O_2^{\cdot-}$ за счет окисления цитозольного NADPH:



НАДФН-оксидаза обеспечивает быстрое избыточное образование $O_2^{\cdot-}$ в ходе стимуляции неспецифической защиты организма для разрушения бактерий [9].

Существует другой ферментативный путь генерации супероксидного радикала с участием ксантиноксидазы. Этот фермент участвует в реакциях окисления гипоксантина в ксантин, а ксантина в мочевую кислоту с образованием O_2 [10].

Дисмутация $O_2^{\cdot-}$ анион-радикалов под действием супероксиддисмутазы (СОД) в биологических образцах приводит к образованию перекиси водорода H_2O_2 , способной беспрепятственно проникать через мембраны клеток [4].

Гидропероксильный радикал (HO_2^{\cdot})

Является более сильным окислителем, чем супероксидный анион-радикал. Реагируя с линолевой, линоленовой, арахидоновой кислотами, окисляет их до гидроперекисей. При сдвигах pH в кислую сторону (закисление среды), например в фагосомах, уровень HO_2^{\cdot} увеличивается во много раз.

Образование гидроксиоксид-иона и его протонированной формы – перекиси водорода происходит в результате одноэлектронного восстановления супероксидного радикала [7]. При нейтральном значении pH реакция протекает в две стадии:



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



В силу того, что гидропероксильный радикал HO_2^{\cdot} не несет на себе никакого заряда, он может с легкостью пересекать биологические мембраны, и беспрепятственно проникать между компартментами клетки, реагируя с ненасыщенными жирными кислотами, некоторыми аминокислотами, такими как гистидин, метионин и триптофан [4].

Перекись водорода (H_2O_2)

Считается наиболее стабильной молекулой из всех активных форм кислорода; она обладает сравнительно большим периодом полураспада и может распространяться на большие расстояния в водных растворах. Причиной этого служит ее более низкая реакционная способность по сравнению с другими представителями АФК [11]. Пероксид водорода H_2O_2 участвует в регуляции сигнальных ферментов и транскрипционных факторов. Эта молекула играет важную роль в клеточной пролиферации, дифференцировке, миграции и апоптозе. Является субстратом для миелопероксидазы [12].

Образованию перекиси водорода способствует спонтанная дисмутация супероксидного анион-радикала $\text{O}_2^{\cdot-}$. Эта реакция катализируется супероксиддисмутазами (СОД) :



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



H_2O_2 наиболее стабильная молекула и наименее реакционноспособна [13].

Защита от разрушающего действия H_2O_2 реализуется ферментом каталазой. Этот фермент с высокой скоростью превращает H_2O_2 в O_2 и H_2O :



Каталаза имеет четко выраженную тканевую специфичность и в наибольших количествах обнаружена в печени и эритроцитах [14].

Гидроксильный радикал (HO^\bullet)

Это один из самых реакционноспособных и токсичных соединений из всех представителей активных форм кислорода. Если происходит взаимодействие HO^\bullet с окружающими молекулами, то это приводит к образованию вторичных радикалов. Образование HO^\bullet наблюдается в реакциях Хабера-Вейса при взаимодействии $\text{O}_2^{\bullet-}$ с H_2O_2 в присутствии ионов металла переменной валентности (обычно железа или меди):



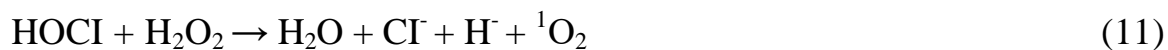
Образование HO^\bullet возможно также в реакции Фентона – взаимодействие перекиси водорода с Fe^{2+}



Следует отметить о существовании предположения о том, что нейтрофилы и моноциты человека могут генерировать гидроксильный радикал по механизмам, зависимым от миелопероксидазы [11].

Синглетный кислород ($^1\text{O}_2$)

Синглетный кислород — общее название для двух метастабильных состояний молекулярного кислорода с более высокой энергией, чем в основном, триплетном, состоянии. Предполагается, что молекулы синглетного кислорода определяют механизм запуска апоптоза. У большинства живых клеток основным источником синглетного кислорода служит спонтанная дисмутация супероксидных анионов [15]. Существует предположение, что генерация синглетного кислорода осуществляется нейтрофилами в процессе «дыхательного взрыва» [7]:



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

Нитрил-радикал (NO[•])

Является кратковременной сигнальной молекулой, которая играет важную роль в различных физиологических процессах, включая регуляцию тонуса кровеносных сосудов, воспаление, функции митохондрий и апоптоз. NO[•] также служит мощным иммунорегуляторным фактором и оказывает влияние на цитоплазматический окислительно-восстановительный баланс по генерации пероксинитрита ONOO⁻ после его реакции с супероксид (O₂^{•-}). Вероятно, именно с пероксинитритом связано повреждающее действие NO на биологические макромолекулы, в первую очередь на белки [17].

1.2 Антиоксидантная защита тканей

Защита организма от окислительного стресса осуществляется функционированием антиоксидантной системы (АОС).

АОС состоит из низкомолекулярных антиоксидантов и антиоксидантных ферментов. Содержание антиоксидантов в организме во много раз превышает содержание активных форм кислорода.

Низкомолекулярные антиоксиданты можно разделить на гидрофильные и гидрофобные. Гидрофильные антиоксиданты, к которым относятся восстановленный глутатион (GSH) и аскорбиновая кислота, защищают вещества гиалоплазмы и матрикса митохондрий, а гидрофобные – защищают мембраны. Они перехватывают свободные радикалы, восстанавливают активные формы кислорода и продукты окислительной модификации. Следует добавить, что среди низкомолекулярных антиоксидантов важную роль играют витамины (С, Е) и каротины [7].

В антиоксидантной системе отводится особая роль GSH:

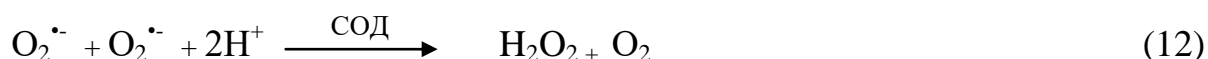
- 1) это главный восстановитель клетки, его концентрация выше, чем большинства органических веществ;
- 2) функционирует на трех линиях ферментативной защиты (восстановление перекиси водорода, гидропероксидов и обезвреживание вторичных метаболитов окислительной модификации (ОМ)) из четырех;
- 3) GSH-зависимые ферменты работают во всех частях клетки.

Также важную роль играют антиоксидантные ферменты. Выделяют три линии защиты:

- супероксиддисмутаза (СОД);
- глутатионпероксидаза (GPX) и каталаза;
- глутатионтрансфераза [8].

Супероксиддисмутаза

Этот фермент катализирует реакцию дисмутации супероксидного радикала в кислород и перекись водорода [18], которая в свою очередь разлагается при участии других ферментов [4] :



У млекопитающих главным цитозольным ферментом СОД является Cu, Zn-зависимая супероксиддисмутаза, состоящая из двух одинаковых субъединиц, каждая из которых содержит в области активного центра один атом меди и один атом цинка. Cu^{2+} принимает участие в дисмутации супероксидного анион-радикала, а цинк стабилизирует белковую молекулу [7].

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

Cu, Zn-содержащий белок является ферментом, катализирующим реакцию дисмутации супероксидных радикалов.

Глутатион-пероксидаза

Этот антиоксидант участвует в восстановлении H_2O_2 и органических гидропероксидов свободных жирных кислот, нуклеотидов, нуклеиновых кислот, белков, способствуя переходу восстановленного глутатиона в окисленный с участием глутатионредуктазы [19]. Активность глутатионпероксидазы зависит от содержания глутатиона клетки, что, в свою очередь, определяется активностью глутатионредуктазы и концентрацией NADPH, который образуется в пентозофосфатном пути [4].

Существует 7 изоформ глутатиона, отличающиеся внутриклеточной локализацией. Основной клеточной изоформой является глутатионпероксидаза, состоящая из 4 субъединиц, в каждой из которых содержится по атому селена. В клетках этот фермент присутствует в цитозоле и матриксе митохондрий [19].

Каталаза

По структуре - тетрамер, содержащий по одной гемовой простетической группе на субъединицу, при этом сами по себе субъединицы не обладают каталитической активностью. В организме человека и животных локализуется преимущественно в эритроцитах, в печени и почках. Так же присутствует в мозге, соединительной ткани, щитовидной и половых железах, но в очень низких концентрациях [13].

Функциональная роль каталазы - разрушение перекиси водорода и обеспечении эффективной защиты клеточных структур от разрушающего действия H_2O_2 .

Каталаза катализирует реакцию расщепления H_2O_2 :



Каталаза – фермент, способный долго сохранять высокую активность и почти не требующий энергии активации. Показано также, что каталаза может присоединять четыре молекулы NADPH, что предохраняет её от инактивации и повышает ферментативную активность. Однако считается, что

внеклеточная защитная роль каталазы незначительна, так как из-за большой молекулярной массы она плохо диффундирует в клетки, а во внеклеточных жидкостях быстро теряет свою активность в результате действия протеаз. Тем не менее, её повышенное содержание в сыворотке крови при некоторых заболеваниях, может служить для защиты от окисления определённых молекул или структур. Существует предположение, что Т-лимфоциты могут выделять во внешнюю среду каталазу для их защиты в области воспалительного очага.

Глутатион S-трансфераза

Катализирует конъюгацию глутатиона с такими соединениями как C,S, N и P, содержащих электрофильные атомы, что вносит важный вклад в защиту клетки от токсического действия этих соединений. В семействе GST выделяют три субсемейства изоформ: цитозольные, митохондриальные и микросомальные.

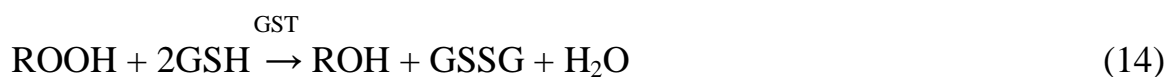
У млекопитающих GST присутствует практически во всех органах и тканях, при этом содержание фермента в печени наибольшее.

Цитозольные изоформы GST разделяют их на две субгруппы: Y-GST – изоформы, у которых для активации GSH используется тирозин, и S/C-GST – изоформы, у которых взаимодействие с GSH осуществляется через остаток серина или цистеина

Микросомальные изоформы GST – это интегральные мембранные белки, участвующие в конъюгации GSH с электрофильными соединениями.

Митохондриальной изоформой GST человека является изоформа GSTK1-1. Она обнаружена и в пероксисомах человека. Существует множество изоформ GST, что обеспечивает их широкую субстратную специфичность и разнообразие функций [20].

GST способна восстанавливать органические гидроперекиси до спиртов, используя GSH качестве косубстрата, тем самым оказывая непосредственное участие в работе антиоксидантной системы:



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

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

1.3 Свободно-радикальное окисление белков

Процессы свободно-радикального окисления (СРО), лежащие в основе метаболизма всех клеток и определяющие адаптивность организма к действию повреждающих факторов, являются необходимым звеном жизнедеятельности клетки. СРО выступает как универсальное звено развития многих патологических состояний. Пероксидное окисление (модификация) белков - один из вариантов свободнорадикального окисления. Срыв антиоксидантной защиты (АОЗ) организма ведет к неадекватному увеличению продукции активных форм кислорода, которые в свою очередь инициируют разветвление процессов СРО в тканях.

Одним из главных механизмов, ведущих к повреждению или гибели клеток является образование свободных радикалов. При этом вторичная антиоксидантная защита способствует разрушению окисленных белков [21].

В результате действия активных форм кислорода на белки происходит нарушение скелета полипептидной цепи или аминокислотных остатков, внутри-и межмолекулярные сшивки, фрагментация белковых молекул [7].

Повышение карбонильных производных белков - одно из важнейших проявлений окислительной модификации белков. Подвергшись свободнорадикальному окислению, белки плазмы имеют сравнительно

большой период полураспада. Исходя из этого, можно сделать вывод, что повышение уровня карбонильных групп окисленных белков является ранним, чувствительным маркером интенсивности свободно-радикальных процессов при многих патологиях и при воздействии неблагоприятных внешних факторов. Причиной повышения уровня продуктов окислительной модификации белков может являться не только посттрансляционная окислительная модификация самих белков, но и интенсивность их протеолитического разрушения. При определенных условиях окислительной деструкции могут подвергаться ферменты протеолиза, что может приводить к аккумуляции белков [22].

Окисление белкового скелета

Первым этапом окислительной модификации белков является участие HO^\bullet в отсоединении водорода от α -углеродного атома полипептидной цепи с последующим образованием алкильного радикала белка. (рис 1, реакция с). Источником гидроксильного радикала HO^\bullet служит радиация или металл-катализируемое расщепление (рис 1, реакции a, b)



Рисунок 1 – Окисление белкового скелета свободными радикалами

Алкильный радикал с легкостью реагирует с O_2 , в результате чего образуется алкилперокси-радикальное промежуточное соединение (реакция

d), которое может дать алкилпероксид (реакция e), затем алкокси-радикал (реакция h) . Последний, в свою очередь превращается в гидроксил-производное белка (реакция j) [7].

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

Агрегации молекул белков способствует образование S-S мостиков между цистеиновыми остатками 2,2' - бифенильных сшивок тирозиновых остатков белков. Между радикальными центрами аминокислотных остатков могут образовываться ковалентные связи [23].

Фрагментация полипептидных цепей

Фрагментация полипептидных цепей происходит на этапе, когда образуется алкокси-радикала. Процесс расщепления может идти двумя путями: α -амидным или диамидным путем. При расщеплении диамидным путем (рис.2, a) пептидная часть со стороны N-концевого участка белка обладает диамидной структурой при C-терминальном конце. В то же время пептидный фрагмент со стороны C-концевого участка обладает изоцианатной структурой при N- терминальном конце [24].

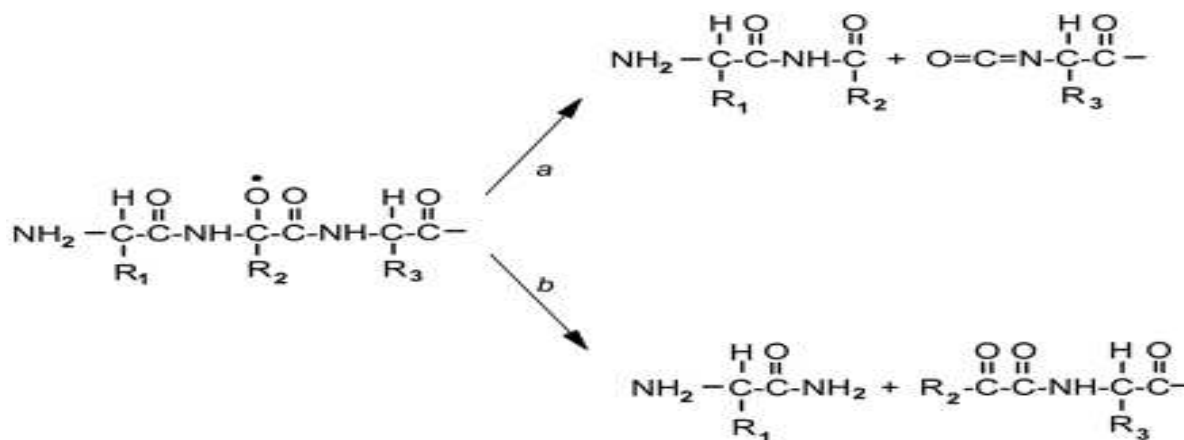


Рисунок 2 – Расщепление белковой цепи по диамидному (a) и α -амидному (b) путям [24]

При α -амидном пути пептидный фрагмент, полученный в области N – терминального конца белка, имеет амидную группу при C-концевом участке, а N-конец пептида со стороны C-терминального участка существует в виде N- α -кетоацилпроизводного. Пептидные участки, образовавшиеся диаמידным путем, подвержены кислотному гидролизу и дают CO_2 , NH_3 и свободную карбоновую кислоту, а путем α -амидации – NH_3 и свободную α -кетокислоту [7].

Расщепление пептидной связи может происходить также в результате свободно-радикальной-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 [25].

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

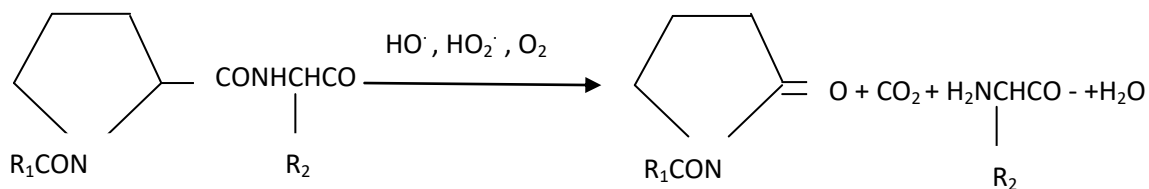


Рисунок 3 – Окисление остатков пролина с образованием 2-пирролидона и пептидного фрагмента [7]

Окислительная модификация аминокислот

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

В первую очередь подвергаться окислительной модификации будут такие аминокислоты как цистеин и метионин, т.к в своей структуре содержат –SH группы, являющиеся прекрасной мишенью для активных форм кислорода. Следует отметить, что данные аминокислоты требуют на 1-2 порядка меньших концентраций оксиданта. Тем не менее воздействию АФК, в частности гидроксильного радикала, могут подвергаться любые аминокислотные остатки. Например, аминокислотные остатки триптофана, фенилаланина, тирозина, гистедина выступают как субстрат для атаки гидроксильного радикала. В результате образуются соответствующие гидроксильные радикалы [24].

Образование карбонильных производных белков

Прямое окисление остатков лизина, аргинина, пролина и треонина может приводить к образованию карбонильных производных белков (альдегидных или кетонных производных).

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) [27]. Поэтому присутствие карбонильных групп в белках считается ранним, чувствительным и достаточно стабильным маркером свободнорадикального повреждения [5]. В связи с этим были разработаны достаточно чувствительные методы для качественного и количественного определения карбонильных групп. Принцип одного из методов основывается

на взаимодействии карбонильных групп с 2,4-дINITроферилгидрозином с образованием производных – дINITрофенилгидразонов, количество которых определяют спектрофотометрически при длине волны 360-390нм [22].

1.4 Перекисное окисление липидов

Наряду с белками, свободно-радикальному окислению так же подвержены и липиды. В результате атаки активными формами кислорода они теряют атом водорода, переходя в свободно радикальную форму (L•) и легко взаимодействуя с молекулярным кислородом, то есть переокисляются (LO•). Этот процесс назвали перекисным окислением липидов (ПОЛ).

Наиболее уязвимы при перекисном окислении полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), которые являются прекрасной мишенью для АФК благодаря наличию в их структуре от двух и более несопряженных двойных связей [29]. Поэтому, начальным этапом перекисного окисления липидов служит удаление атома водорода от этого углеродного атома полиненасыщенной жирной кислоты при взаимодействии со свободным радикалом (•ОН) [30].

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

I. Инициирование: в ходе работы дыхательной цепи в митохондриях происходит утечка электронов на молекулы кислорода, что приводит к образованию активных форм кислорода, в т. ч. супероксидный и гидроксильный радикалы.

II. Развитие цепи:

1. Гидроксильный радикал взаимодействует с находящейся в мембране полиненасыщенной жирной кислотой, отщепляя у неё атом водорода, с образованием липидного радикала.

2. К липидному радикалу присоединяется молекула кислорода с формированием липид-пероксильного радикала (LOO•).

3. Липид-пероксил «забирает» атом водорода у следующей полиненасыщенной жирной кислоты, с образованием нового липидного радикала и липид-пероксида (LOOH). Последний может распадаться, инициируя развитие новой цепи.

III. Происходит обрыв цепи, который осуществляется несколькими путями: образованием неактивного продукта путем взаимодействия двух радикалов, присоединением Fe^{2+} и некоторых других реагентов, а также при действии антиоксидантной системы клетки [31].

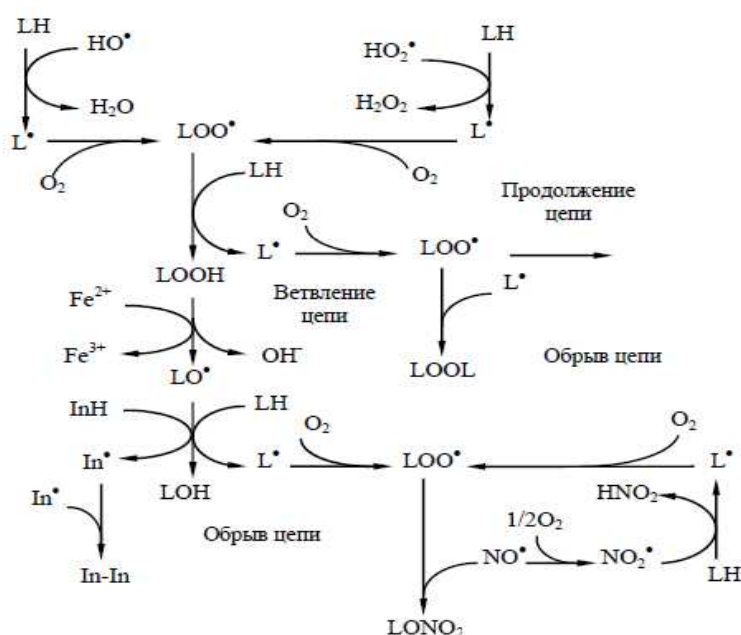


Рисунок 4 – Схема перекисного окисления липидов [31]

Продукты перекисного окисления липидов делят на : первичные (гидроперекиси, диеновые конъюгаты, эндоперекиси), вторичные (малоновый диальдегид (МДА), триеновые конъюгаты), конечные (полимерные соединения – основания Шиффа) [32].

1.5 Продукты перекисного окисления липидов

Диеновые конъюгаты (ДК)

Эти соединения относятся к первичным продуктам перекисного окисления липидов. При окислительной модификации арахидоновой кислоты происходит отрыв водорода в α -положении по отношению к двойной связи, что приводит к перемещению этой двойной связи с образованием ДК. Диеновые конъюгаты являются токсичными продуктами, которые повреждают липопротеины, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты.

Продукты ПОЛ вызывают конформационные изменения в фосфолипидном слое мембран, что приводит к нарушению функции как самой мембраны, так и различных клеточных органелл. В результате присоединения свободных радикалов жирные кислоты разрываются на фрагменты, имеющие альдегидные группы, которые обладают высокой реакционной способностью. Если разрыв произошел с двух сторон, образуется малоновый диальдегид (МДА) [33].

Малоновый диальдегид (МДА)

При перекисном окислении липидов образуется другой, вторичный продукт, так же проявляющий цитотоксичное действие - малоновый диальдегид.

Малоновый диальдегид (МДА) – это органическое соединение с трехчленной углеродной цепью и двумя альдегидными группами на концах, альдегид малоновой кислоты (рис.5).

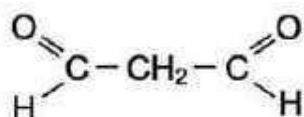


Рисунок 5- Структурная формула малонового диальдегида

Образуется в результате перекисного окисления жирных кислот, содержащих три или более двойных связей (линоленовая и

арахионовая кислоты, соответственно). Малоновый диальдегид может реагировать с ϵ -NH₂-группами лизина или N-концевыми аминокислотами белков, с NH₂-группами фосфолипидов и гликозаминов образуя внутри- и межмолекулярные сшивки типа шиффовых оснований.

Малоновый диальдегид может способствовать повреждать компоненты мембран, нарушая их важнейшие свойства и функции, такие как текучесть, ионный транспорт, ферментативная и рецепторная активности [34].

МДА образуется при пероксидации ксенобиотиков (пищевых добавок, лекарственных средств, пестицидов и т.п.) в микросомах печени в присутствии железа, а также энзиматически в присутствии эйкозаноидов. При взаимодействии аминокислотными остатками лизина, образует внутри- и межмолекулярные сшивки. Малоновый диальдегид может взаимодействовать с азотистыми основаниями ДНК, приводя к мутагенезу[35].

1.6 Заболевания предстательной железы

Предстательная железа (простата) является железистым и фиброзно-мышечным органом, охватывающим начальную часть мужского мочеиспускательного канала. Простата - орган небольших размеров, примерный объем которого 20 см³. Она наполовину состоит из железистых клеток, на одну четверть – из фиброзных и на вторую четверть – из мышечных волокон. Строма располагается между протоками железы и разделяет простату на дольки. Каждая долька предстательной железы окружена кольцевыми и продольными пучками гладкомышечной ткани. Предстательная железа является важным секреторным органом. Секрет простаты содержит фибринолизин, амилазу, простатспецифический антиген (ПСА), калликреин, фибронектин, семеногелин, фосфолипиды, холестерин, цинк, кальций и множество других соединений. Секрет простаты является первой фракцией семенной жидкости и принимает участие в его разжижении,

активизирует движение сперматозоидов, оказывает буферное, ферментативное и антибиотическое действие [36].

В предстательной железе выделяют три группы желез:

1. Слизистые железы. В составе этих желез имеются клетки, содержащие рецепторы эстрогенов, вследствие чего именно эти железы образуют аденоматозные узелки при гиперплазии простаты, что приводит к сдавливанию мочеиспускательного канала;

2. Подслизистые железы. Они окружают простатическую часть мочеиспускательного канала и открываются своими выводными протоками латеральнее семенного бугорка, отделены от главных желез прослойкой мышечной ткани;

3. Главные железы – самые крупные по размеру железы. Они открываются в 16-32 выводных протока, впадающих в уретру от семенного холмика. В просветах концевых отделов и выводных протоков главных желез имеются простатические конкреции. Они образуются в ходе конденсации продуктов секреции желез вокруг погибших и разрушенных клеток эпителия. Конкреции простаты состоят из различных белков, нуклеиновых кислот, холестерина. С возрастом количество и размеры конкреций простаты увеличиваются [37].

В состав секрета простаты входят:

- 1) ряд протеаз (фибринолизин), разжижающих семенную жидкость;
- 2) трансклутаминаза – фермент, участвующий в предотвращении иммунного ответа в женских половых путях при попадании в них семенной жидкости;
- 3) простатический андрогенсвязывающий белок - его синтез и секреция стимулируется мужскими половыми гормонами (андрогенами);
- 4) кислая фосфатаза - фермент, являющийся одним из онкомаркеров предстательной железы;
- 5) белки аннексины - белки, участвующие в связывании ионов Ca^{2+} и фосфолипидов;
- 6) фосфолипиды – предохраняют сперматозоиды от перепадов температур;

- 7) лимонная кислота;
- 8) цинк (может играть роль антибиотического фактора) и магний;
- 9) простагландины - влияют на сократительную активность гладкомышечной ткани женских половых путей при попадании туда эякулята;
- 10) спермин – предохраняет урогенитальный тракт от инфицирования;
- 11) холестерин [38].

Аденома предстательной железы

Аденома предстательной железы (доброкачественная гиперплазия предстательной железы, ДГПЖ) является одним из наиболее распространенных заболеваний мочеполовой системы мужчин пожилого возраста. Заболевание характеризуется разрастанием ткани предстательной железы и возникновением доброкачественных новообразований (аденоматозных «узлов»). При разрастании опухоли происходит сдавливание части уретры, и как следствие затрудненное мочеиспускания [39].

Основную роль в пролиферации ткани простаты играет метаболизм тестостерона. Существуют множество факторов, оказывающих влияние тестостерона на простату, но в настоящее время основным фактором считается увеличение активности фермента 5- α -редуктазы (5-AR), приводящей к избыточному превращению тестостерона в более активный дигидротестостерон (ДГТ). Выявление повышенной активности 5-AR при доброкачественной гиперплазии предстательной железы дало основание полагать, что развитие аденомы простаты связано с избыточным преобразованием тестостерона в дигидротестостерон.

Предположительно, что повышение активности 5- α -редуктазы является компенсаторной реакцией простаты поддержать нормальный уровень ДГТ при снижении уровня тестостерона. Вследствие этого, образование 5- α -ДГТ и эстрадиола из него оказывается значительно превосходящим нормальные показатели. Это способствует развитию гиперплазии простаты [40].

Синтез и клиническое внедрение специфических ингибиторов 5-АР (финастерид, дутастерид и др.) позволили добиться существенных положительных результатов в лечении больных ДГПЖ. Однако, конкретно молекулярные механизмы регуляции активности фермента 5-АР в простате стареющего организма, пока не установлены [41].

Рак предстательной железы

На сегодняшний день все большее значение приобретает проблема ранней диагностики рака предстательной железы (РПЖ) в связи с тем, что он является одним из наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований у лиц мужского пола [42].

Одним из генов предрасположенности к раку простаты является ген андрогенового рецептора (АР). Этот ген характеризуется выраженным полиморфизмом, благодаря присутствию в кодирующем экзоне одного участка повторов триплетной САG-последовательности. Данный участок сильно варьирует по длине. Вероятно, что у мужчин с меньшим числом САG-повторов в гене рецептора андрогена риск заболеваемости раком простаты значительно повышен [43].

На сегодняшний день основным методом ранней диагностики РПЖ является оценка уровня простат-специфического антигена (ПСА). ПСА – это гликопротеид, секретируемый эпителиальной тканью простаты. Ценностью данного метода является его простота и объективность. Большая клиническая значимость этого онкомаркера достигается при анализе уровня общего ПСА и соотношения его фракций (свободной, связанной).

Основной биологической ролью простат-специфического антигена является обеспечение разжижения семенной жидкости. В кровь ПСА попадает лишь небольшими порциями. Основная часть ПСА в крови связывается с различными белками, подавляющими его протеазную активность. Для клеток злокачественных опухолей простаты характерно образование ПСА, связанного с белками сыворотки крови. От 55 до 95%

ПСА, обнаруживаемого в сыворотке крови иммунохимически, находится в комплексе с α 1-антихимотрипсином. Часть простат-специфического антигена сохраняет свободное состояние [44].

К основным средствам диагностики РПЖ относятся: пальцевое ректальное исследование (ПРИ), концентрация ПСА в сыворотке крови и трансректальное ультразвуковое исследование (ТРУЗИ). Окончательный диагноз ставится при обнаружении аденомы простаты в биопсийном или послеоперационном материале предстательной железы. Патоморфологические исследования также позволяют выявить стадию и распространенность рака в организме.

Лечение РПЖ:

При локализованном РПЖ проводится хирургическая операция или лучевая терапия. В зависимости от свойств раковых клеток возможно проведение множества разных видов лучевой терапии. При агрессивных формах рака наиболее вероятный лучший результат достигается с помощью комбинации высокодозной HDR-брахитерапии (внутриканальное облучение) и наружной лучевой терапии. Для снижения риска рецидива возможно в дополнении к лучевому лечению провести лечение гормональными препаратами [45].

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Объектом исследования служили сыворотка условно здоровых людей (12 человек), больных аденомой (48 человек) и раком предстательной железы (33 человека). Диагноз у больных устанавливался на основании клинико-лабораторных данных и результатов ультразвукового исследования врачами больницы КНЦ СО РАН. Забор крови производили из локтевой вены натощак, без антикоагулянта, затем кровь центрифугировали при 1700g, сыворотка отбиралась для определения методик.

В сыворотке больных аденомой и раком простаты определяли уровень карбонильных производных белков, малоновый диальдегид.

2.2 Определение содержания диеновых конъюгатов

Принцип метода: вследствие π - π переходов спектры конъюгированных гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот характеризуются интенсивным поглощением в ультрафиолетовой области спектра с максимумом при 232-234 нм. Количество диеновых конъюгатов экстрагируются в гептан-изопропанольных фракциях. Так как в гептане экстрагируются в основном нейтральные липиды, а в изопропаноле – фосфолипиды, т.о. гептановая фракция свидетельствует об активности ПОЛ в нейтральных липидах, а изопропанольная – в фосфолипидах.

Реактивы:

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

Ход определения:

Оценку содержания диеновых конъюгатов проводили в сыворотке крови. Для этого липиды экстрагируют стократным избытком смеси растворителей. В гомогенизатор вносили 0,1 мл сыворотки, добавляли 5 мл изопропилового спирта и тщательно растирали до получения гомогенной

суспензии. Содержимое гомогенизатора переносили в мерную пробирку, в которую затем добавляли 5 мл гептана.

Экстракт центрифугировали в течение 10 минут при 1700G g. Супернатант переносили в градуированную пробирку и добавляли 1/5 объема КСІ для отмывки липидного экстракта от нелипидных примесей. После тщательного встряхивания образовавшаяся эмульсия расслаивается на две прозрачные фазы. В гептановом экстракте (верхняя фаза) измеряли спектрофотометрически содержание сопряженных диенов в кювете длиной оптического пути 1 см против гептана. Расчет количества ДК производили с учетом молярного коэффициента экстинкции $27000 \text{ M}^{-1} * \text{см}^{-1}$ и выражали в нмолях на 1 г белка.

$$C = D * F / K * \text{ОБ}, \text{ где}$$

C - содержание ДК, нмоль/ г белка;

D – оптическая плотность гептанового экстракта;

F – фактор разведения, равный 121,2;

K – коэффициент молярной экстинкции для ДК при длине волны 233 нм, равный $27000 \text{ M}^{-1} * \text{см}^{-1}$;

ОБ – содержание общего белка в сыворотке крови.

2.3 Определение содержания малонового диальдегида

Принцип метода: В липидных системах в результате процессов перекисного окисления липидов образуется малоновый диальдегид (МДА), взаимодействие которого с 2-тиобарбитуровой кислотой 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. 0,1 М раствор динатриевой соли этилендиаминтетраацетата (ЭДТА)
4. 1%-ный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК)

5. 0,05 н раствор NaOH

Ход определения:

К 0,2 мл упакованных эритроцитов добавляли 0,8 мл физиологического раствора и 0,5 мл раствора ТХУ, перемешивали. Затем центрифугировали 15 минут при 1700g. Аналогичным способом готовили контрольную пробу, в которой эритроциты заменяли равным объемом дистиллированной воды. В другую пробирку переносили 1 мл супернатанта, добавляли 0,075 мл ЭДТА и 0,25 мл раствора ТБК, приготовленного на 0,05 н растворе NaOH. Содержимое перемешивали и ставили пробирки в кипящую водяную баню на 15 минут. Затем пробирки охлаждали до комнатной температуры. Поглощение опытной пробы измеряли против контрольной при 532 нм в кюветах с толщиной слоя 1,0 см на спектрофотометре.

Расчет содержания МДА производили с учетом коэффициента молярной экстинкции образовавшегося хромогена, равного $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ и выражают в мкмоль/г белка.

$$C = \frac{D_{532} \cdot V_{p.c} \cdot 1000}{V_{np} \cdot \epsilon \cdot d \cdot \text{ОБ}}, \text{ где}$$

C – содержание МДА, мкмоль/ г белка;

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

$V_{p.c.}$ – объем реакционной смеси (1,325 мл);

ϵ – коэффициент молярной экстинкции образовавшегося хромогена ($1,56 \cdot 10^5 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$);

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

d – толщина слоя кюветы (1 см);

1000 – коэффициент пересчета на г/белка.

ОБ – содержание общего белка в сыворотке крови.

2.4 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 [24].

Реактивы:

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

Ход определения:

Отмытые и упакованные эритроциты гемолизировались дистиллированной водой (1:50), плазма разводилась 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-ДНФГ, а в контрольную только 2Н HCl. 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-ДНФГ, который не прореагировал с карбонильными группами окисленных белков.

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 мкмоль на грамм белка [27], применяя следующую формулу:

$$C = \frac{\text{ОП} \cdot K \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot \text{ОБ}}, \text{ где}$$

C – содержание КПБ, мкмоль/ на 1 г белка

ОП – оптическая плотность

K – коэффициент пересчета (1000 мкмоль)

V – объём опытной пробы (мл)

ε – коэффициент экстинкции ($22 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

d – толщина кюветы (1 см)

ОБ – содержание общего белка (г/л).

2.4 Статистическая обработка результатов

Для обработки полученных результатов использовались программы Statistica 8 и Microsoft Office Excel 2007 в Windows HP. Обработку данных проводили с помощью подсчета медианы, интерквартильного разброса (С25-С75 процентели). Достоверность различий между больными аденомой и раком предстательной железы оценивалась по критерию Манна-Уитни. Различия считались значимыми при $p \leq 0,05$.

3 Результаты и их обсуждения

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

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Толпыгина, О. А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты / О. А. Толпыгина. //Бюллетень ВСЦН со РАМН. - 2012. - №2 (84), Часть 2. – С. 178.
2. Кулинский, В. И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул:польза, вред и защита / В. И. Кулинский //Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 2–7.
3. Мерзляк, М. Н. Активированный кислород и жизнедеятельность растений / М. Н. Мерзляк // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 9. – С. 20–26.
4. Донцов, В. И. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / В. И. Донцов и [др.] //Труды ИСА РАН. – 2006. – Т. 19. – С.51.
5. Коган, А. Х. Модулирующая роль CO_2 в действии активных форм кислорода / А. Х. Коган и [др.] // ГЭОТАР-Медиа. – М, 2006. –224 с.
6. Новиков, В. Е. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция / В. Е. Новиков, О. С. Левченкова, Е. В. Пожилова // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. –Т. 12. - С. 13– 34.
7. Ribeiro, T. P. Iron, copper, and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress/ T. P. Ribeiro [et al.]// Free Radical Biology and Medicine. – 2015. – V. 80. – p. 67-76.
8. Lapinski, R. Oxidants and antioxidants of erythrocytes / R. Lapinski, M. Siergiejuk , A. Worowska// Prog Health Sciences. – 2014. - Vol 4, No 1. - P. 212
9. Маянский, А. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге / А.Н. Маянский, Д.Н. Маянский // Наука. – Новосибирск, 1983. – 264 с.
10. Weiss, S. J. Oxygen, ischemia and inflammation / S. J. Weiss // Acta Fhysiol. Scund. – 1986. – Vol.548. – P. 9-37.

11. Пасечник, И. Н. Механизмы повреждающего действия активированных форм кислорода на биологические структуры у больных в критических состояниях / И. Н. Пасечник // Вестник интенсивной терапии. - 2001. – №4. – С. 3-7.
12. Rhee, S. G. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation / S. G. Rhee, Y. S. Bae, S. R Lee // Science's STKE. – 2000. – Vol.2000. – P. 53.
13. Al-Naama L. M. Association of erythrocytes antioxidant enzymes and their cofactors with markers of oxidative stress in patients with sickle cell anemia/ L. M. Al-Naama// Qatar Med. J. – 2015. – №2. – p. 14.
14. Haber, F. The catalytic Decomposition of hydrogen Peroxide by Iron Salts / [Электронный ресурс] / F. Haber. - Режим доступа: <http://rspa.royalsocietypublishing.org>.
15. Briviba, K. Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems /K. Briviba, I-O. Klorz, H.Sics // Biol. Chem. –1997 . –Vol. 378. – P. 1259-1265.
16. Щепин, А. С. Время жизни синглетного кислорода в столкновительных комплексах O₂-CO₂ / А. С. Щепин, С. А Пешков, Т. В . Пешкова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2016. – № 3 (191). – С. 92-97.
17. Aida, A. Serum Protein Carbonyl Content, Total Thiol and Nitric Oxide in Patients with Rheumatoid Arthritis / A. Aida // Journal of American Science. – 2011. – N. 7(5). – P. 683.
18. Ткачук, В. А. Пероксид водорода как новый вторичный посредник / В. А. Ткачук и [др.] // Биологические мембраны. – 2012. – Т. 29. –№ 1–2. – С. 21–37.
19. Chu, F. F. Expression, characterization and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase: GSHPx- GI / F. F. Chu, J. H. Doroshov, R. S. Elsworthy // Journal of Biological Chemistry. – 1993. – P. 2571-2576.


20. Муравлева, Л. Е. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования/ Л. Е. Муравлева и [др.] // *Фундаментальные исследования*. – 2010. – № 1 – С. 74-78.
21. Stadtman, E. R. Protein oxidation / E.R. Stadtman, R.L. Levine // *Annals of N.Y. Academy of Sciences*. – 2000 . – Vol. 899. – P. 191-208.
22. Дубинина, Е. Е. Свободнорадикальные процессы при старении, нейродегенеративных заболеваниях и других патологических состояниях / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина // *Биомедицинская химия*. – 2007. – Т.53. – Вып. 4. – С . 351-372.
23. Bhattacharyya, A. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases/ A. Bhattacharyya// *Physiol. Rev.* – 2014. – V. 94, № 2. – P. 329-354.
24. Путилина, Ф.Е. Свободнорадикальное окисление / Ф. Е. Путилина и [др.]. – СПб., 2008. – 161 с.
25. Berlett, B. S. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress / B. S. Berlett, E. R. Stadtman // *Biol. Chem.* – 1997. – V.272, N33. – P.20313-20316.
26. Uchida, K. A novel mechanism for oxidative cleavage of prolyl peptides induced by the hydroxyl radical / K. Uchida, Y. Kato, S. Kawakishi// *BiochemBiophys Res Commun.* - 1990. - Vol.169, N.1. – P.265-271.
27. Титова, Н. М. Оценка структурно-функционального состояния клетки: методические указания к практическим занятиям / Н. М. Титова и [др.]. – Красноярск, 2009. – 60 с.
28. Dalle-Donne I. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress./ I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini // *Clinica Chimica Acta* – 2003. - Vol. 329, No.1-2. - P. 23-38.

29. Копытова, Т. В. Молекулы средней массы как субстрат эндогенной интоксикации при тяжелых дерматозах / Т. В. Копытова // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 9 – С. 7-10.
30. Чебышев, Н. В. Инфекционные и паразитарные болезни развивающихся стран / Н. В. Чебышев, С.Г Пак // ГЭОТАР-Медиа. – М, 2007. – 496 с.
- 31 . Меньщикова, Е. Б. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков // Фирма «Слова». – М, 2006. – 556 с.
32. Узбекиков, М. Г. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психиатрических заболеваниях Сообщение II / М. Г. Узбекиков // Социальная и клиническая психиатрия. – 2014. – Т. 24, - № 4. – С. 97–103.
33. Жуков, В. И. Система перекисного окисления липидов и активность апоптоза при экспериментальном хроническом гастроэнтероколите / В. И. Жуков, А. С. Ткаченко // Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. – 2013. - № 18 (161). – Вып. 23. – С. 138- 141.
34. Kelly, S. A. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems/ S. A. Kelly, C. M. Havrilla, T. C . Brady., // Environ Health Perspect. – 1998. – Vol. 106. – P. 375–384.
35. Ланкин, В. З. Итоги изучения патофизиологических последствий нарушения регуляции свободнорадикальных процессов: тупик или новый импульс?/ В. З. Ланкин, А. К. Тихазе // Медицина и здравоохранение. – 2016. – Т.1. – №3(109). С. – 160 –165.
36. Eileen, Tan. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery / Tan Eileen // Journal ListActa Pharmacol Sin. – 2015. V.36(1). – P. 3–23.
37. Карпов, Е. И. Новые перспективы в профилактике рака предстательной железы / Е. И. Карпов// РМЖ. – 2015. – №26. – С. 1576–1578 .

38. Назаренко, Г. И. Ультразвуковая диагностика предстательной железы в современной урологической практике / Г. И. Назаренко, А.Н. Хитрова// Издательский дом Видар. – М, 2012. – 288 с.
39. Ещиганов, А. Ж. Что такое аденома простаты / А. Ж. Ещиганов// Кордайская центральная районная больница. МЕДИЦИНА. – 2012. – №4. – С. 53- 55.
40. Тюзиков, И. А. Взаимосвязь компонентов метаболического синдрома и гормональных нарушений в патогенезе заболеваний предстательной железы / И. А. Тюзиков, А. Г. Мартов, Е. А. Греков// экспериментальная и клиническая урология. – 2012. – №3. – С. 39-46
41. Кирпатовский, В. И. Роль гормональных факторов и нарушения кровоснабжения предстательной железы в патогенезе ДППЖ / В. И. Кирпатовский и [др] //Экспериментальная и клиническая урология. – 2013. – №2. – С. 38-43.
42. Heidenreich, A. EAU guidelines on prostate cancer / A. Heidenreich, G. Aus, M. Bolla // Eur Urol . – 2008. – Vol. 53. – P. 68-80.
43. Северин, С. Е. Роль молекулярно-генетических маркеров в скрининге рака предстательной железы: обзор литературы / С. Е. Северин и [др].// Экспериментальная и клиническая урология. – 2012. – №3. – С. 63-67.
44. Зайцев, В. Г. Простатический специфический антиген (ПСА) в диагностике рака предстательной железы /В. Г. Зайцев, В. В. Скворцов// Спецвыпуск «Лаборатория». – 2003. – С. 55- 58.
45. Heidenreich, A. / Prostate cancer// A. Heidenreich M. Bolla, S. Joniau // European association of urology. – 2010. – №1. – P.15-18.
46. Копытова, Т. В. Значение окислительной модификации липопротеинов для диагностики нарушений обменных процессов при хронических распространенных дерматозах / Т. В. Копытова и [др]. // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 8 (1). – С. 82-85.

47. Кичеева, А. Г. Содержание GSH и активность GSH-зависимых ферментов у больных с опухолями простаты : выпускная квалификационная работа: 06.03.01 Биология / А.Г. Кичеева. – Красноярск, 2018.

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
 Е.И. Шишацкая

« 14 » июня 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Оценка окислительной модификации липидов и белков сыворотки крови у
больных аденомой и раком простаты

Руководитель  14.06.2018 доцент, канд. биол. наук Н. М. Титова

Выпускник  14.06.2018 В. В. Борисова

Красноярск 2018