

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Е.И. Шишацкая
« _____ » _____ 2019 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Оценка состояния антиоксидантной системы в эритроцитах больных раком

прямой кишки

06.04.01 – Биология

06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

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

Выпускник

М.О. Глазкова

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

Красноярск 2019

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Оценка состояния антиоксидантной системы в эритроцитах больных раком прямой кишки» содержит 64 страницы текстового документа, 7 иллюстраций, 9 таблиц, 53 использованных источника.

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, АНТИОКСИДАНТЫ, ГЛУТАТИОН, ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗА, ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗА, ДИЕНОВЫЕ КОНЬЮГАТЫ, КАТАЛАЗА, МАЛОНОВЫЙ ДИАЛЬДЕГИД, ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС, ПРООКСИДАНТЫ, РАК ПРЯМОЙ КИШКИ, СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА.

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

Цель работы – оценить состояние антиоксидантной системы эритроцитов у больных раком прямой кишки

Задачи:

1. Определить уровень диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в эритроцитах больных раком прямой кишки до и после лечения;
2. Исследовать состояние антиоксидантной системы у больных раком прямой кишки до и после лечения;
3. Оценить изменения исследованных показателей у больных по стадиям до и после лечения;
4. Рассчитать коэффициент окислительного стресса для больных раком прямой кишки.

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

В результате проведенного исследования было выявлено, что функционирование антиоксидантной системы в эритроцитах больных раком прямой кишки до и после лечения нарушено и неэффективно, действие прооксидантов превалирует над антиоксидантами.

ОГЛАВЛЕНИЕ

РЕФЕРАТ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Активные формы кислорода – продукция, характеристика, эффекты.....	7
1.2 Окислительная модификация биомакромолекул активными формами кислорода	9
1.3 Антиоксидантная система.....	11
1.3.1 Супероксиддисмутаза.....	13
1.3.2 Каталаза.....	16
1.3.3 Ферменты глутатионового звена: глутатионпероксидаза и глутатион-S-трансфераза	19
1.4 Рак прямой кишки.....	23
1.4.1 Современное состояние проблемы	23
1.4.2 Факторы риска возникновения рака прямой кишки	25
1.4.3 Стадии заболевания раком прямой кишки.....	27
1.4.4 Проблемы диагностики и лечения рака прямой кишки.....	28
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	30
2.1 Объект исследования	30
2.2 Методы оценки свободнорадикального окисления липидов	31
2.2.1 Определение содержания диеновых конъюгатов.....	31
2.2.2 Определение содержания малонового диальдегида	33
2.3 Методы оценки антиоксидантного потенциала эритроцитов	34
2.3.1 Определение активности супероксиддисмутазы.....	34
2.3.2 Определение активности каталазы	36
2.3.3 Определение содержания восстановленного глутатиона	37
2.3.4 Определение активности глутатионпероксидазы	39

2.3.5	Определение активности глутатион- S-трансферазы.....	41
2.4	Определение содержания гемоглобина	42
2.5	Статистическая обработка результатов	43
3	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	45
3.1	Состояние про- и антиоксидантных систем эритроцитов у больных раком прямой кишки до и после лечения	Error! Bookmark not defined.
3.2	Состояние про- и антиоксидантных систем эритроцитов больных раком прямой кишки до лечения в зависимости от стадии	Error! Bookmark not defined.
3.3	Состояние антиоксидантной систем эритроцитов больных раком прямой кишки после лечения в зависимости от стадии заболевания ...	Error! Bookmark not defined.
3.4	Коэффициент окислительного стресса	Error! Bookmark not defined.
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	Error! Bookmark not defined.
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	46
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	47

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших и актуальных задач современной медицины и биологии является выявление молекулярных основ различных заболеваний и патологических состояний организма человека.

В настоящее время рак прямой кишки рассматривается совместно с раком толстого кишечника (ободочной кишки), и практически всегда применяется термин «колоректальный рак». Колоректальный рак (КРР) продолжает оставаться одним из наиболее распространенных видов злокачественных новообразований человека. По имеющимся данным КРР является третьим наиболее распространенным видом рака и четвертой наиболее распространенной причиной онкологической смертности[1]. Высоким остается показатель смертности пациентов с КРР и после лечения и достигает 50% [2]. Частыми причинами смерти больных колоректальным раком являются поздняя диагностика и метастатический процесс.

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

Заболеваемость раком прямой кишки резко увеличивается с возрастом, что характерно для многих других хронических заболеваний. С возрастом также значительно интенсифицируются окислительные процессы, развивается окислительный стресс. В то же время, окислительный стресс развивается при многих заболеваниях, сопровождающихся воспалительным процессом, рак прямой кишки не исключение.

Одной из причин окислительного стресса является гиперпродукция активных форм кислорода (АФК). Мишенью АФК служат различные клетки и клеточные структуры, в том числе и эритроциты, в которых происходит

окисление высокомолекулярных веществ, таких как белки, липиды, нуклеиновые кислоты. При сильном окислительном стрессе повреждение биомакромолекул приобретает необратимый характер, приводя к гибели клеток. Поддерживает в клетках прооксидантно-антиоксидантный баланс и внутриклеточный редокс-потенциал многоуровневая антиоксидантная система (АОС) [3].

Цель работы– оценить состояние антиоксидантной системы эритроцитов у больных раком прямой кишки

Задачи:

1. Определить уровень диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в эритроцитах больных раком прямой кишки до и после лечения;
2. Исследовать состояние антиоксидантной системы у больных раком прямой кишки до и после лечения;
3. Оценить изменения исследованных показателей у больных по стадиям до и после лечения;
4. Рассчитать коэффициент окислительного стресса для больных раком прямой кишки.

Работа выполнена на базе кафедры медицинской биологии Сибирского федерального университета и лаборатории ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАН и является частью комплексных исследований по изучению состояния антиоксидантной системы в норме и при различных патологиях.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Активные формы кислорода – продукция, характеристика, эффекты

Активные формы кислорода (АФК) вырабатываются во всех клетках организма и разных их частях. Наряду с дыхательной цепью митохондрий, которая вносит наибольший вклад в генерацию АФК, «важна роль системы цитохрома P-450, локализованной в эндоплазматической сети. Так же участвуют ядерные мембраны и другие части клеток. Нередко и ферментативное происхождение АФК (NADPH-оксидаза респираторного взрыва в плазматической мембране и ксантиноксидаза в гиалоплазме)»[4].

Рассмотрим несколько важных путей синтеза активных форм кислорода в организме человека. К примеру, нейтрофилы за счет работы NADPH-оксидазы дыхательного взрыва способны генерировать активные формы кислорода, с чем и связано главным образом их цитопатическое действие. При этом установлено, что нейтрофильные гранулоциты обладают наибольшей из всех клеток организма способностью продуцировать активные формы кислорода.

«Респираторный взрыв» является метаболическим процессом, наступающим при стимуляции нейтрофила: «увеличение потребления кислорода, усиление окисления глюкозы в пентозофосфатном цикле и как следствие этого — продукция активных форм кислорода, обладающих бактерицидным действием и обеспечивающих цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток. Катализирует «респираторный взрыв» мембраноассоциированная пиридиннуклеотидоксидаза за счет реакции окисления NADPH, образующегося при окислении глюкозы и восстановлении молекулы кислорода до супероксидного аниона. Именно супероксидный

анион-радикал является первичным метаболитом активированного кислорода, с которого берет начало весь каскад активных форм кислорода. В силу своей высокой химической активности образующиеся радикалы кислорода могут повреждать внутриклеточные структуры и быть индукторами и медиаторами апоптоза. Также отмечают значимость высокоэнергетических оксидантов для процессов опухолевой инвазии и метастазирования» [5].

Описанный путь образования активных форм кислорода при участии нейтрофилов очень важен при заболеваниях, сопровождающихся воспалительным процессом. АФК выступают своего рода киллерами, которые ликвидируют как чужеродные агенты, например, бактерии, так и собственные клетки организма, которые подверглись опухолевому перерождению, к примеру. Но в то же время регуляция данного процесса, респираторного взрыва может быть нарушена под действием особых низкомолекулярных факторов, которые выделяются опухолевыми клетками и оказывают воздействие на рецепторы нейтрофилов. Тогда может нарушиться продукция АФК и их начнет вырабатываться больше нормы, что ведет к разрушительным эффектам и в конце концов к окислительному стрессу.

Следующий очень важный путь продукции АФК осуществляется в митохондриях, а именно в их электрон-транспортной цепи. Здесь продуцируется самое большое количество АФК. «В электрон-транспортной цепи митохондрий образование АФК реализуется при неполном одно-трёхэлектронном восстановлении молекулы кислорода. К активным формам кислорода относится свободный радикал-анион супероксид O_2^- , перекись водорода H_2O_2 , радикал гидроксил HO^\cdot , синглетный кислород 1O_2 , озон O_3 и гипохлорит $HOCl$. Концентрации АФК в тканях невысоки: $H_2O_2 - 10^{-8} M$, $O_2^- - 10^{-11} M$, $HO^\cdot < 10^{-11} M$ » [4].

АФК – молекулы, которые обладают высокой химической активностью за счёт наличия неспаренного электрона. Под действием АФК происходит перекисное окисление ДНК, белков, липидов и малых молекул во всех

клетках организма.«Оно заключается в образовании органических гидропероксидов, которые структурно напоминают H_2O_2 (R-O-O-H и H-O-O-H) и химически также активны, в процессе метаболизма $ROOH$ переходят в спирты, альдегиды и другие окисленные соединения.

Окислительная модификация (ОМ) биомакромолекул, в частности перекисное окисление, обязательные для жизнедеятельности организмов биологические процессы, которые выполняют важные физиологические функции. Например, участвуют в синтезе эйкозаноидных гормонов и доптеронинов. АФК и ОМ необходимы для иммунитета и воспаления, так как: увеличивают синтез цитокинов и иммунных рецепторов; способствуют выходу лейкоцитов в ткани; убивают фагоцитированные бактерии и др.» [4].

Но гиперпродукция АФК и избыточность ОМ приводит к необратимому повреждению клеток и может способствовать развитию многих болезней и синдромов, таких как атеросклероз, инфаркт и инсульт, тяжелые воспалительные заболевания, СПИД, злокачественные процессы.

Активные формы кислорода могут инициировать перекисное окисление липидов и повреждение ДНК, ведущие к мутагенезу, канцерогенезу и гибели клеток, если работа антиоксидантной системы нарушена [6].

1.2 Окислительная модификация биомакромолекул активными формами кислорода

Активные формы кислорода в высоких концентрациях могут вызывать повреждение биомакромолекул. Наиболее изученным процессом повреждения биомолекул является перекисное окисление липидов (ПОЛ). «ПОЛ ведет к образованию пероксидных радикалов, моно- и димерных, циклических и полимерных перекисей и гидроперекисей, в результате распада которых образуются новые радикалы» [7, 8]. Перекисное окисление

липидов ведет к образованию альдегидов, кетонов и предельных углеводов. Большинство продуктов ПОЛ оказывает негативное влияние на клетки. Например, «ненасыщенные альдегиды, являясь мутагенами и обладая выраженной цитотоксичностью, подавляют активность гликолиза и окислительного фосфорилирования, ингибируют синтез белка и нуклеиновых кислот, окисляют SH-группы, ингибируют различные цитозольные и мембраносвязанные ферменты» [8].

Наряду с липидами негативному воздействию АФК подвергаются белки и нуклеиновые кислоты (НК). «В белках происходит окисление отдельных аминокислот, например, цистеина и лизина. Такая активная форма кислорода, как гидроксильный радикал может разрывать углерод-углеродные связи белков. А это ведёт к образованию карбоксильных производных белков, которые можно использовать в качестве маркёров окислительного повреждения молекул. В ДНК модифицируются азотистые основания. Так на ДНК оказывают влияние продукты ПОЛ. В частности, малоновыйдиальдегид (МДА) встраивается в азотистые основания, что изменяет структуру молекулы ДНК и ведёт к нарушению функций ДНК. Наряду с влиянием на молекулы ДНК малоновыйдиальдегид способен образовывать аддукты с белками и углеводами, приводя к потере их биологической активности. Малоновыйдиальдегид служит маркером процессов радикального окисления, запускаемых в клетках активными формами кислорода»[9].

Таким образом, гиперпродукция АФК влечёт за собой нарушение клеточных мембран, органелл и клеток в целом. В плазме крови действию АФК подвергаются плазменные белки. В эритроцитах пагубному воздействию АФК подвергается в первую очередь мембрана (фосфолипиды и белки, в том числе мембраносвязанные ферменты), также цитозольные белки и различные ферменты, включая ферменты антиоксидантной системы. Борьба с АФК ведётся за счёт работы антиоксидантной системы организма.

1.3 Антиоксидантная система

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

Рассмотрим из чего состоит антиоксидантная система и какие ещё важные функции выполняет помимо поддержания баланса между про- и антиоксидантами.

АОС состоит из низкомолекулярных антиоксидантов и антиоксидантных ферментов. Содержание антиоксидантов в организме, безусловно, значительно выше, чем АФК. Например, концентрация восстановленного глутатиона в печени составляет 10^{-2} М, в плазме крови 10^{-5} М.

Низкомолекулярные антиоксиданты можно разделить на гидрофильные и гидрофобные. «Гидрофильные антиоксиданты, например, восстановленный глутатион (GSH) и аскорбиновая кислота, защищают вещества гиалоплазмы и матрикса митохондрий, а гидрофобные – защищают мембраны. Они способны перехватывать свободные радикалы, восстанавливать АФК и продукты ОМ. Также среди низкомолекулярных антиоксидантов важную роль играют витамины (С, Е) и каротины.

В АОС особенно важна роль GSH, который является главным восстановителем клетки и его концентрация выше, чем большинства органических веществ. Данный низкомолекулярный антиоксидант функционирует на трех линиях ферментативной защиты (восстановление перекиси водорода, гидропероксидов и обезвреживание вторичных метаболитов ОМ) из четырех; а также GSH-зависимые ферменты работают во всех частях клетки»[4].

Глутатион является трипептидом, который состоит из трёх остатков следующих аминокислот: глутамата, цистеина и глицина. Глутатион обнаружен во всех живых организмах и играет важную роль в окислительно-восстановительных реакциях за счет того, что SH—группа цистеина может вступать в обратимую реакцию. «В активном центре селен-зависимых глутатионпероксидаз (GPO) находится остаток аминокислоты селеноцистеина. Атом селена окисляется перекисями до SeOH. Затем SeOH соединяется с молекулой глутатиона, в результате образуется Se-глутатион, который реагирует с другой молекулой глутатиона. При этом регенерируется Se— и образуется окисленный глутатион» [10]. Установлено, что глутатион восстанавливает селен в GPO и эта восстановленная форма фермента катализирует распад перекиси водорода. Не исключена роль глутатиона в экспрессии генов, активации факторов транскрипции, внутриклеточной сигнализации, регуляции активности ферментов, апоптоза и других процессах. «Так, повышение внутриклеточного уровня восстановленного глутатиона подавляет экспрессию субъединиц c-Fos и Jun транскрипционного фактора AP-1, участвующего в апоптозе и клеточной пролиферации. Что может говорить о непосредственном участии глутатиона в регуляции апоптоза опухолевых клеток» [11].

Еще более важную роль играют антиоксидантные ферменты. «Обычно выделяют три линии защиты: супероксиддисмутаза (СОД); селеновая глутатионпероксидаза (GPO) и каталаза; GPO, глутатионтрансферазы и фосфолипидгидропероксид-GPO. В целом ферментативная АОС обеспечивает мощный и эффективный метаболизм как АФК, так и активных окисленных соединений» [4].

Важность АОС можно доказать, например, накоплением АФК и нарастанием ОМ при дефиците низкомолекулярных антиоксидантов: GSH, витаминов E и C;

Окислительный стресс развивается при повышенном уровне АФК и ОМ макромолекул, и также при сниженной функциональности АОС. Это означает, что окислительный стресс – это нарушение баланса между антиоксидантами и прооксидантами организма в сторону увеличения концентрации последних.

Но работа АОС заключается не только в поддержании антиоксидантно-прооксидантного баланса. «Она также выполняет ряд регуляторных функций, в частности АОС снижает или даже предупреждает большинство эффектов, вызываемых АФК и ОМ макромолекул: активацию протеинкиназы С, фактора NF-κB, экспрессии генов (в том числе протоонкогенов) и апоптоза и др.» [4].

Ткани должны быть защищены от окислительного повреждения путём экспрессии генов стресс-ответа и генов, кодирующих антиоксидантные ферменты и активации транскрипции других генов, связанных с регуляторными белками [12].

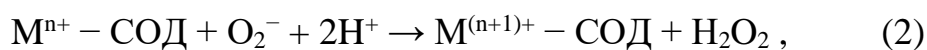
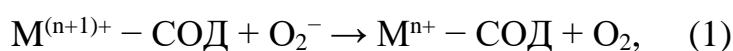
«Важную роль в общей антиоксидантной защите играет протеасома – крупная мультисубъединичная протеаза, присутствующая в клетках эукариот, архей и некоторых бактерий, осуществляющая протеолитическую деградацию ненужных и повреждённых белков до коротких пептидов (4—25 аминокислотных остатков). Это происходит за счет минимизации агрегации белков и кросс-связывание и удаление потенциально токсичных белковых фрагментов» [13].

1.3.1 Супероксиддисмутаза

Супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1, СОД, супероксид-оксидоредуктаза) - фермент АОС, играющий важнейшую роль в защите клеток аэробных организмов от окислительной модификации под действием свободных радикалов. Этот фермент катализирует реакцию дисмутации супероксидного

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

«Реакция, катализируемая супероксиддисмутазой, расписывается в два этапа и схематично выглядит так:



где М (переходный металл) = Cu (n=1); Mn (n=2); Fe (n=2); Ni (n=2)» [14].

Важно отметить, что оксид азота (NO), который обладает противовоспалительными и антикоагулирующими свойствами, а также оказывает сосудорасширяющее действие, может быть быстро инактивирован путём реакции с супероксидным анион-радикалом. Это приведёт к получению сильного окислителя пероксинитрита (ONOO⁻), а в дальнейшем к эндотелиальной и митохондриальной дисфункции, в том числе к гиперхолестеринемии, гипертензии, диабету и старению. Поэтому СОД защищает организм не только от супероксидного радикала, но и от пероксинитрита [15].

«Выявлено несколько изоформ супероксиддисмутазы, различающихся по молекулярной массе, строению, количеству субъединиц, типу переходного металла-кофактора в активном центре: Cu,Zn-СОД (медь в роли кофактора активного центра, цинк стабилизирует конформацию), Mn-СОД (кофактор марганец), а также менее распространённые Fe-СОД и Ni-СОД, встречающиеся в бактериальных клетках» [16].

В организме человека обнаружено три типа СОД: цитоплазматическая, митохондриальная и экстрацеллюлярная.

«Цитоплазматическая форма (СОД1) – гомодимер, с молекулярной массой 32 кДа, в активном центре содержит медь и цинк как структурный компонент. Субъединицы белка связаны друг с другом гидрофобными и электростатическими связями. Медь и цинк связаны с белковой частью молекулы через гистидиновые остатки.

Митохондриальная форма (СОД2) – гомотетрамер с молекулярной массой около 90 кДа, содержит марганец в активном центре.

Экстрацеллюлярная форма супероксиддисмутазы(СОД3) представляет собой гликопротеид, состоящий из двух димеров, соединенных дисульфидным мостиком. Каждая из четырёх субъединиц имеют молекулярную массу около 30 кДа, содержат ионы меди и цинка. Все субъединицы фермента имеют одинаковую аминокислотную последовательность. Субъединицы экстрацеллюлярной и цитоплазматической Cu-,Zn-СОД отличаются аминокислотным составом, антигенными свойствами, генным локусом, кодирующим аминокислотную последовательность апофермента и более низкой каталитической активностью. Если Cu-,Zn-СОД – гомодимер, каждая субъединица которого имеет четыре остатка цистеина, то экстрацеллюлярная супероксиддисмутаза – тетрамер, субъединицы которого содержат по шесть остатков цистеина. Экстрацеллюлярная СОД присутствует в основном во внеклеточных пространствах, также обнаружена в фибробластах и глиальных клетках. Является основным изоферментом плазмы, лимфы, синовиальной жидкости. Высокий уровень этого экстрацеллюлярного фермента отмечен в легких, сердце, почках и плаценте. Ингибируется цианидом, инактивируется перекисью водорода. Ионы железа блокируют секрецию фермента» [17].

Гены этих форм локализуются соответственно в хромосомах 21, 6 и 4 (21q22.1, 6q25.3 и 4p15.3-p15.1).

Существует так называемая антиоксидантная терапия. «Показано, что совместное применение СОД и каталазы значительно эффективнее защищает клетки от окислительного стресса, чем назначение ферментов по отдельности. Более того, получены ковалентно связанные с альдегиддекстраном конъюгаты каталазы и СОД, где альдегиддекстран играет роль связующего мостика, существенно не изменяя активность ферментов» [14].

Тем не менее, некоторые технические ограничения (большой размер, низкая проницаемость клеток, короткий период полураспада в кровотоке (СОД), антигенность, высокие производственные затраты) имеют ограниченное применение СОД и каталазы в качестве потенциального клинического препарата.

Альтернативой использованию антиоксидантных ферментов является проектирование и разработка синтетических соединений с низкой молекулярной массой, которые могут имитировать действие соответствующих ферментов. Некоторые биомиметики с возможностью разлагать активные формы кислорода, генерируемые в ходе окислительного стресса, уже известны; примеры включают в себя системы, которые используют порфирины, неароматические макроциклы и комплексы с металлами (Fe, Mn, Cu) [18 - 20].

1.3.2 Каталаза

Каталаза (КФ 1.11.1.6, перекись-водорода: перекись-водорода-оксидоредуктаза) – гемсодержащий фермент антиоксидантной системы. Молекулярная масса каталазы (КТ) составляет около 250 кДа. КТ является тетрамером и имеет простетические группы в виде гема на каждую субъединицу, без которых субъединицы не обладают каталитической активностью. Оптимальная величина рН для КТ находится в пределах от 6,0

до 8,0. КТобнаружена во всех живых организмах, даже в растениях и микроорганизмах, за исключением облигатных анаэробов. В организме человека и животных максимальное содержание этого фермента обнаружено в эритроцитах, печени и почках» [14; 21].

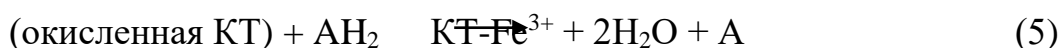
«Место локализации каталазы в клетках - преимущественно (80%) пероксисомы, где её концентрация достигает 10^{-6} М, оставшиеся 20% обнаруживаются в цитозоле. Ген, кодирующий КТ, у человека расположен на длинном плече хромосомы 11 (11p13)» [14].

Биологическая роль КТ заключается в деградации перекиси водорода, образующейся в клетках ферментативно под действием ряда оксидаз (ксантиноксидазы, глюкозооксидазы, моноаминоксидазы и др.), и тем самым обеспечении эффективной защиты клеточных структур от разрушающего действия данной АФК. Каталаза также обезвреживает перекись водорода, образованную из супероксидного радикала под действием супероксиддисмутазы.

«Разложение перекиси водорода каталазой осуществляется в двух реакциях:



В окисленном состоянии КТ может работать как пероксидаза, катализируя окисление спиртов, фенолов или альдегидов:



(донор)» [14]

Известно такое наследственное заболевание, как акаталаземия. Основная причина данной патологии состоит в генетически обусловленной недостаточности КТ. Клинически акаталаземия проявляется изъязвлением слизистой оболочки носовой и ротовой полостей, иногда выпадением зубов [22]. Особенно много людей с этим заболеванием зафиксировано в Корее и Японии.

Каталаза – фермент, наиболее длительно сохраняющий свою высокую активность и почти не требующий энергии активации, скорость реакции этого энзима лимитируется лишь скоростью диффузии субстрата к активному центру. Известно, что «КТ может присоединять четыре молекулы NADPH, что предохраняет её от инактивации и повышает ферментативную активность. Однако считается, что внеклеточная защитная роль КТ незначительна, так как из-за большой молекулярной массы КТ плохо проникает внутрь клеток, а во внеклеточных жидкостях быстро теряет свою активность в результате действия протеолитических ферментов» [14]. Происхождение сывороточной КТ при острых воспалительных процессах связано, по-видимому, с её выделением из разрушенных клеток. Низкая проницаемость мембран для КТ и её подверженность действию протеолитических ферментов ограничивают фармакологическое применение энзима.

«Наличие гема делает каталазу окрашенной, поэтому она может регистрироваться спектрофотометрически (максимум поглощения при 640 – 660 нм). Однако обычно активность КТ определяется по убыли субстрата (H_2O_2) или по увеличению содержания продукта реакции – O_2 . Разделить действие КТ и ГПО в биологической среде можно с помощью специфического ингибитора КТ – 3-амино-1,2,4-триазола, цианиды также необратимо ингибируют каталазу» [14].

Повышенная концентрация перекиси водорода, за счет уменьшения активности КТ, может способствовать окислительной деструкции β -клеток

поджелудочной железы, к снижению секреции инсулина и эффективности инсулина и началу диабета [23].

С КТсвязывают надежды на получение высокоэффективных препаратов для лечения злокачественных опухолей, так как полагают, что этот фермент играет важную роль в росте и метаболизме клеток [24]

1.3.3 Ферменты глутатионового звена: глутатионпероксидаза и глутатион-S-трансфераза

Ферменты, использующие в качестве субстрата и для выполнения своих каталитических функций глутатион, являются ферментами глутатионового звена. К ним относится глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза и фермент, восстанавливающий окисленный глутатион – глутатионредуктаза. Рассмотрим подробнее данные ферменты АОС.

Глутатионпероксидаза (ГПО, КФ 1.11.1.9.) — фермент системы антиоксидантной защиты организма. «Впервые ГПО, как фермент АОС, была обнаружена и описана в 1957 г. Гордоном Миллсом, при изучении катаболизма гемоглобина в эритроцитах. Данный фермент содержится почти во всех клетках животных, основная доля фермента находится в цитозоле — около 70%, в митохондриях млекопитающих содержится около 30%. По структуре ГПО является гомотетрамером. Каждая субъединица имеет массу 19 кДа и содержит один атом селена, который связан с цистеиновыми остатками. Селеноцистеин добавляется в растущую полипептидную цепь во время трансляции стоп-кодона UGA. При недостатке селена активность антиоксидантной защиты снижается. Активность ГПО повышается при некоторых патологических состояниях, таких как: диабет, ангиокардиопатиях, катаракте» [10]. Тем не менее, терапевтическое использование нативной ГПО ограничено из-за ее нестабильности, ограниченной доступности и трудностей при синтезировании. Однако, создается множество искусственных ГПО, но всё же большинство из них

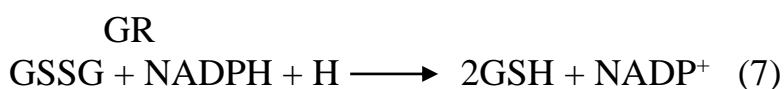
имеют низкую активность из-за отсутствия сайта субстрата. ГПО нейтрализует перекись водорода, превращая ее в воду, и переводит пероксиды липидов в соответствующие спирты, используя в качестве субстрата восстановленный глутатион. «Сульфгидрильная группа глутатиона (GSH) служит донором электронов и, окисляясь, образует дисульфидную форму глутатиона, в которой две молекулы глутатиона связаны через S-Смостик» [10].

Реакцию, катализируемую глутатионпероксидазой, схематично можно представить так:



Окисленный глутатион восстанавливается глутатионредуктазой.

Глутатионредуктаза (КФ 1.6.4.2) — цитоплазматический белок, распределенный в тканях подобно ГПО. Впервые была обнаружена в 1931 году в печени животных. Этот фермент функционально связан с ГПО. Действие глутатионредуктазы зависит от уровня НАДФН, а значит и от состояния пентозофосфатного пути. Она восстанавливает окисленный глутатион, используя НАДФН + Н⁺ по следующей реакции:



«Глутатионпероксидаза нейтрализует пероксиды липидов: гидропероксиды линолевой и линоленовой кислот, холестерин-7β-гидропероксид и некоторые синтетические вещества (кумен-, трет-бутил-гидропероксиды). Также ГПО нейтрализует пероксинитрит. Наиболее высокая активность ГПО наблюдается в печени, эритроцитах, надпочечниках, средняя активность в легких и сердце, низкая — в мышцах.

Для клетки при восстановлении H_2O_2 в печени роль каталазы и ГПО приблизительно одинакова, однако для клетки в целом активность ГПО значительно важнее. Например, КТ локализована в основном в пероксисомах, а ГПО обезвреживает H_2O_2 в цитозолеи митохондриях. Сродство ГПО к H_2O_2 выше, поэтому она защищает от низких концентраций H_2O_2 , которые возникают чаще. В некоторых тканях (сердце, мозг, легкие) ГПО играет основную роль, так как активность КТ низкая. Но в условиях окислительного стресса, при резком возрастании концентрации перекиси водорода, ключевая роль в ее расщеплении принадлежит КТ. Недостаток или ингибирование ГПО приводит к перекисному окислению липидов. Фермент устойчив к действию цианида и азиды, особенно в присутствии восстановленного глутатиона» [10].

На сегодняшний день выявлено восемь изоформ селенсодержащей ГПО, которые кодируются разными генами, различны по локализации в клетке, структуре субъединиц, первичной структуре и по субстратам. «ГПО1 — «классическая» ГПО, которая находится в цитоплазме клеток печени и кишечника. Ген кодирующий ГПО1 находится на 3 хромосоме. Для этого белка характерен полиморфизм полиаланиновой последовательности на N-терминальном конце, существуют три аллели с 5, 6 и 7 последовательностями из остатков аланина. Аллель с 5 повторами аланина связана с высоким риском возникновения рака молочной железы. Некоторые данные свидетельствуют о том, что ГПО1 защищает клетки от CD95 индуцированного апоптоза в раковых клетках молочной железы и ингибирует 5-липоксигеназу в клетках крови, а гиперэкспрессия гена ГПО1 задерживает рост эндотелиальных клеток и повышает устойчивость к токсинам. ГПО2 — ГПО кишечного эпителия. Кодирующий ее ген находится на 14 хромосоме. Состоит из 188 аминокислотных остатков. ГПО3 — внеклеточный изофермент, обнаружен в плазме крови и молоке. Ген локализован на 5й хромосоме. ГПО4 — изофермент селенсодержащей ГПО,

представлен мономером с молекулярной массой 22 кДа и с одним атомом селена. Он активно взаимодействует с гидроперекисями фосфатидилхолина, холестерина, и эфиров холестерина в мембранах и липопротеинах низкой плотности, так как является липофильным соединением. Ген белка ГПО4 локализован на 19й хромосоме. ГПО5 — эпидермальный андрогенсвязанный белок. Ген ГПО5 расположен на 6й хромосоме, специфично экспрессируется в эпидидимесе, регулируется андрогеном. В отличие от м-РНК других ГПО, м-РНК ГПО5 не содержит кодона селеноцистеина, таким образом кодируемый белок является селен-независимым ферментом. ГПО5 участвует в защите мембран сперматозоидов от перекисидации липидов. Селен-независимые ГПО сходны по механизму действия с глутатион-S-трансферазами, и более активны при взаимодействии с органическими пероксидами, чем с перекисью водорода. ГПО6 — изофермент функционирующий в зрительном анализаторе. Ген локализован на 6й хромосоме» [10].

Глутатион-S-трансфераза (GST, КФ 2.5.1.18) – фермент, применяющий восстановленный глутатион для метаболизма гидрофобных веществ. Существует целое семейство данных белковых ферментов. «Все GST являются гомо- или гетеродимерами, молекулярная масса которых 43 - 57 кДа. Каждая субъединица содержит один независимый активный центр, состоящий из двух субцентров Г и Н. Непосредственно с глутатионом взаимодействует G субцентр, который содержит SH-группу, гистидин и аргинин; с гидрофобным же субстратом взаимодействует Н субцентр, содержащий глицин» [25]. GST обнаружены практически во всех клетках живых организмов. В основном эти ферменты локализованы в цитозоле, но в незначительном количестве – и в микросомах и митохондриях, а также в ядре клетки.

«GST катализируют множество различных реакций и обезвреживают органические соединения почти всех классов, в том числе и

АФК. Эти соединения являются различными токсическими веществами, канцерогенами, мутагенами, цитостатиками, пестицидами, лаками, красками» [26, 27]. Возможность детоксикации канцерогенов данным ферментом может быть нарушена наличием полиморфизмов в гене GST, которые оказывают влияние на функционирование самого фермента [28].

Одна из реакций – с перекисью жирной кислоты, катализируемых глутатион-S-трансферазой, схематично выглядит так:



«Глутатионтрансферазы обладают высокой специфичностью к GSH, но не специфичны ко второму субстрату, и насчитывается более 3000 субстратов GST. Обязательно, чтобы субстрат был гидрофобным» [27].

«Глутатионтрансферазы играют важную роль в биосинтезе простагландинов, лейкотриенов, прогестерона и тестостерона, а также деградации тирозина» [28-30].

1.4 Рак прямой кишки

1.4.1 Современное состояние проблемы

В настоящее время рак прямой кишки (РПК) рассматривается совместно с раком толстого кишечника (ободочной кишки), и практически всегда применяется термин «колоректальный рак». Колоректальный рак (КРР) остается одним из наиболее распространенных видов злокачественных новообразований человека. По имеющимся данным КРР является третьим наиболее распространенным видом рака и четвертой наиболее распространенной причиной онкологической смертности. Заболеваемость колоректальным раком интенсивно растет, о чём

свидетельствуют статистические и эпидемиологические исследования последних десятилетий. Рост заболеваемости колоректальным раком и смертности от него побуждает к поиску путей улучшения исходов заболевания.

«Между различными географическими регионами отмечается почти десятикратная разница в частоте колоректального рака. Наибольшие показатели заболеваемости были выявлены в Европе, Северной Америке, Японии, Австралии и Новой Зеландии, наименьшие – в Африке, Южной Америке, Центральной Америке и Юго-Центральной Азии, при этом частота колоректального рака у мужчин значительно выше, чем у женщин. США являются единственной страной, где в последние годы наблюдается стабильное снижение заболеваемости колоректальным раком как у мужчин, так и у женщин, что, скорее всего, связано с внедрением широкомасштабного скрининга и, как следствие, со значительной распространенностью ранней диагностики и адекватного лечения предраковых заболеваний» [31]. Стабилизация заболеваемости отмечается также в Канаде и Новой Зеландии.

В структуре заболеваемости раком мужского населения в России колоректальный рак занимает второе место, уступая лишь раку легкого. Среди женского населения России КРР занимает третье место, уступая лишь раку молочной железы и злокачественным новообразованиям кожи [32].

Высоким остается показатель смертности пациентов с КРР после лечения. Показатель 5-летней выживаемости больных с КРР всех стадий в мире только после радикальных операций не превышает 50–60%. Частыми причинами смерти больных колоректальным раком являются поздняя диагностика и метастатический процесс [2].

«Заболеваемость КРР резко увеличивается с возрастом, что характерно для многих других хронических заболеваний. Риск возникновения КРР увеличивается в возрасте 40–59 лет у лиц обоего пола, затем удваивается с

каждой декадой жизни человека, достигая максимального значения в возрасте 70 лет и старше»[33].

Таким образом, современное состояние проблемы колоректального рака плачевно: проблематична ранняя диагностика, неудовлетворительны результаты лечения больных, высока смертность, число заболевших также растет.

1.4.2 Факторы риска возникновения рака прямой кишки

К факторам риска возникновения рака прямой кишки и колоректального рака относится то, что повышает вероятность возникновения данной онкологии у человека.

«Как правило, большинство случаев колоректального рака (около 95%) считаются спорадическими. Унаследованный колоректальный рак встречается реже (около 5%)» [34]. Развитие спорадического колоректального рака может быть вызвано целым рядом различных факторов риска. Один какой-либо из этих факторов вряд ли приведет к развитию онкологического заболевания, и это происходит в совокупности нескольких факторов.

Одним из факторов риска возникновения колоректального рака является возраст. Известно, что в большинстве случаев КРР обнаруживается у людей после 50 лет. Также известно, что у мужчин КРР диагностируется несколько чаще, чем у женщин.

«Безусловно важен семейный анамнез колоректального рака. Если у человека есть семейный анамнез колоректального рака, риск развития заболевания почти удваивается.

Члены семей с некоторыми редкими наследственными заболеваниями также имеют значительно повышенный риск развития колоректального рака, а также других видов рака. Они включают: семейный аденоматозный полипоз, синдром Гарднера, синдром Линча, Синдром ювенильного полипоза, синдром Петца-Йегерса и др. Также женщины, у которых был рак яичников или рак матки, более склонны к развитию колоректального рака» [34].

Низкая физическая активность и высокий индекс массы тела считаются одним из факторов риска развития колоректального рака.

Остановимся подробнее на таком факторе, как питание. Одну из главных ролей в нарушении питания, приводящем к развитию КРР, играет прием высококалорийных пищевых продуктов с высоким содержанием жиров и повышенной энергетической ценностью. «Подобное пищевое поведение способствует повышению концентрации желчных кислот и фекальных метаболитов, являющихся канцерогенными факторами. Установлено, что диета, богатая фруктами и овощами и с низким содержанием красного мяса, может помочь снизить риск колоректального рака. Некоторые исследования также обнаружили, что люди, принимающие добавки с кальцием и витамином D, имеют меньший риск развития колоректального рака» [35].

Согласно литературным данным, существенной является роль злоупотребления алкоголем на развитие КРР. «По данным некоторых авторов, алкоголь стимулирует пролиферацию эпителиальных клеток слизистой оболочки толстой кишки, активизирует кишечные проонкогены и способствует накоплению неабсорбируемых канцерогенов в дистальных отделах толстой кишки» [36]. Что касается курения: недавние исследования показали, что курильщики чаще умирают от колоректального рака, чем некурящие.

Некоторые исследования показывают, что аспирин и другие нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) могут снижать развитие полипов у людей с колоректальным раком или полипами в анамнезе. Тем не менее, регулярное использование НПВП может вызвать серьезные побочные эффекты, включая кровотечение из слизистой желудка и сгустки крови, что приводит к инсульту или сердечному приступу. Прием аспирина или других НПВП не заменяет проведение регулярных обследований колоректального рака.

Существует такое понятие как «предраковые заболевания» - заболевания с высоким риском развития на их фоне злокачественных новообразований, и колоректальный рак не исключение в данном вопросе. «Риск возникновения неоплазии в толстом кишечнике повышен у больных воспалительными заболеваниями кишечника, при этом рак толстого кишечника может у них встречаться в 10 раз чаще, чем в общей популяции. Заболеваемость КРР, в том числе при язвенном колите и болезни Крона, выше в экономически развитых странах»[37, 38].

Таким образом, анализ литературных данных свидетельствует о том, что рациональное питание, ограниченное употреблением в рационе высококалорийных пищевых продуктов с богатым содержанием жиров, мяса, алкоголя, отказ от курения, активный образ жизни, диеты, насыщенные клетчаткой, кальцийсодержащими продуктами могут способствовать снижению риска заболеваемости колоректальным раком.

1.4.3 Стадии заболевания раком прямой кишки

Рассмотрим стадии и символы, с помощью которых обозначают стадию заболевания раком прямой кишки. «Т – символ, обозначающий глубину проникновения опухоли в стенку кишечника или за ее пределы (соответственно T1–T4). По современной классификации, все процессы от T2

до T4 относятся ко II стадии, если не выявлены метастазы в лимфатических узлах или в отдаленных зонах. В случаях, когда опухоль проросла всеслойки кишки или вышла за ее пределы (соответственно, T3 и T4), диагностика оказывается запоздалой или поздней – к этому сроку опухоль уже может дать метастазы, не имеющие клинических проявлений. Появление метастазов в параколической клетчатке в единичном или множественных регионарных лимфатических узлах при разной удаленности от опухоли соответственно обозначается символами N1–N3; это всегда III стадия заболевания. Метастазирование по лимфатическим путям и кровеносному руслу находится в безусловной зависимости от глубины проникновения опухоли в ткани и агрессивности опухоли, которая определяется ее гистологической структурой. О IV стадии болезни свидетельствуют отсев опухоли в любую отдаленную зону (символ M), «распространение по брюшине» [39].

1.4.4 Проблемы диагностики и лечения рака прямой кишки

Рак ободочной и прямой кишки (колоректальный рак) является одной из основных проблем здравоохранения. «Ранняя диагностика данного заболевания представляет собой проблему во всех системах здравоохранения по многим причинам: часто отсутствуют конкретные симптомы; симптомы в нижней части живота очень распространены и в основном связаны с неопухольевыми заболеваниями, а не с КРР; диагностика КРР в основном основана на колоноскопии, инвазивной процедуре. Растущая потребность в колоноскопии стала серьезной проблемой, поскольку эндоскопические ресурсы ограничены; эти периоды ожидания также задерживают постановку диагноза КРР» [40].

За последние три десятилетия медицину оснастили новыми очень эффективными методами объективной диагностики. «Применение всех этих

исследований, к которым относятся эндоскопия, УЗИ, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, подняло диагностику на новый уровень. Однако с появлением новых диагностических методов выявление болезни на ранних стадиях не улучшилось» [39].

Основными видами лечения колоректального рака являются хирургическая операция, лучевая терапия, химиотерапия, таргетная терапия и иммунотерапия. В зависимости от стадии рака, эти методы лечения могут сочетаться.

Хирургическая операция является наиболее эффективным методом лечения местных колоректальных опухолей. Очень маленькие опухоли могут быть удалены с помощью колоноскопа, но даже при небольших опухолях удаление части толстой кишки, содержащей опухоль, окружающую жировую ткань и близлежащие лимфатические узлы, часто является лучшим лечением. Операция может быть выполнена либо лапароскопически, либо открытым методом, в котором используются более крупные разрезы.

«Лучевая терапия - это лечение высокоэнергетическими лучами, которые разрушают раковые клетки. В случае рака прямой кишки облучение обычно проводится после операции, наряду с химиотерапией (известной как адьювантная терапия), чтобы уничтожить любые оставшиеся раковые клетки. Кроме того, его можно использовать вместе с химиотерапией перед операцией (известной как неoadьювантная терапия), чтобы уменьшить большую опухоль, облегчая операцию. При распространенном раке прямой кишки облучение можно использовать для сокращения опухолей, которые вызывают симптомы непроходимости кишечника, кровотечения или боли» [40].

Химиотерапевтические препараты используются для лечения различных стадий колоректального рака. Химиотерапия также может быть введена непосредственно в печень, если рак толстой кишки метастазировал там.

«Таргетные препараты для лечения рака толстой кишки работают совершенно по-другому. Эти лекарства работают, блокируя кровоснабжение рака или блокируя протеин, или генетические изменения, сделанные раком, чтобы увеличить его рост. Их можно использовать для лечения распространенного колоректального рака, который распространился (метастазировал) в другие части тела» [40].

Иммунотерапия включает препараты, которые стимулируют собственную иммунную систему организма распознавать и уничтожать раковые клетки.

Как только рак ободочной кишки или прямой кишки находится в стадии ремиссии, необходимы повторные осмотры для проверки рецидива.

В целом можно констатировать, что, несмотря на все нововведения и улучшения в методах лечения и в подходе к нему, общие результаты лечения в популяции улучшились. Основная причина состоит в запоздалости диагностики на уровне первого звена [39].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования служили эритроциты условно здоровых людей (контрольная группа - 70 человек) и эритроциты людей больных колоректальным раком до и после лечения (50 пациентов). Кровь у больных забиралась в день поступления в стационар и на 7-е сутки после операции. Среди условно здоровых людей 67% мужчины, 33% женщины. Средний возраст здоровых людей составил $34,5 \pm 1,1$ лет. Среди больных колоректальным раком 57% женщины, 43% мужчины. Средний возраст больных раком составил $61,7 \pm 1,1$ лет. От каждого пациента было получено подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено Локальными этическими комитетами: ФГБУ «НИИ

медицинских проблем Севера» СО РАН и КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И.Крыжановского».

«Кровь забиралась из локтевой вены обследуемых. В качестве антикоагулянта использовался гепарин. Цельную гепаринизированную кровь центрифугировали 15мин при 1700g, затем осторожно отбирали плазму и сохраняли для дальнейшего исследования. Плазму хранили в небольших порциях (аликвотами) при температуре не выше -20°C . Размораживали аликвоты один раз, используя в опытах по мере необходимости, так как при повторной заморозке-разморозке активность ферментов плазмы резко падает.

Для приготовления упакованных эритроцитов клеточную массу, оставшуюся после отбора плазмы, трижды отмывали физиологическим раствором (0,9 %-ным NaCl), каждый раз центрифугируя по 15 минут при 1700g. Супернатант отбрасывали, клетки крови хранили в виде аликвот при температуре -20°C до использования»[41, с. 6].

2.2 Методы оценки свободнорадикального окисления липидов

2.2.1 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.

Реактивы:

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

Ход работы:

Оценку содержания диеновых конъюгатов проводили в экстрактах эритроцитов. Для этого липиды экстрагировали стократным избытком смеси

растворителей. В гомогенизатор вносили 0,1 мл упакованных эритроцитов, добавляли 5 мл изопропилового спирта и тщательно растирали до получения гомогенной суспензии. Содержимое гомогенизатора количественно переносили в мерную центрифужную пробирку, в которую затем добавляли 5 мл гептана. Экстракт центрифугировали в течение 10 минут при 1700g. Надосадочную фракцию переносили в градуированную пробирку и добавляли 1/5 объема раствора КС₁ для отмычки липидного экстракта от нелипидных примесей. После тщательного встряхивания образовавшаяся эмульсия расслаивается на две прозрачные фазы.

Измерение:

В гептановом экстракте (верхняя фаза) измеряют спектрофотометрически содержание сопряженных диенов в кювете с длиной оптического пути 1,0 см против гептана при 232-234 нм.

Расчет:

Расчет количества ДК производят с учетом молярного коэффициента экстинкции $27000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ и выражают в миллимолях на 1 грамм Нв» [41, с. 11-12].

$$C = (D_{232} / \epsilon_{232}) * F * \frac{1000}{[Hb]}$$

где:

C – содержание ДК, ммоль/г Нв;

D_{232} – оптическая плотность при длине волны 232 нм;

ϵ_{232} – коэффициент молярной экстинкции при 232 нм ($27000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);

F – фактор разведения (101);

$1000/[Hb]$ – коэффициент пересчета на г Нв.

2.2.2 Определение содержания малонового диальдегида

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

Реактивы:

- 1) 0,9%-ный раствор NaCl (физиологический раствор),
- 2) 30%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ),
- 3) 0,1М раствор динатриевой соли этилендиаминтетраацетата (ЭДТА),
- 4) 0,05 н раствор NaOH,
- 5) 1%-ный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК), приготовленный на 0,05 н растворе NaOH» [41, с. 12].

Ход работы.

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

Таблица 2.1 – Порядок внесения реагентов в пробу, мл

Реагент	Опытная проба	Контрольная проба
Физиологический раствор	0,8	0,8
Дистиллированная вода	-	0,2
Упакованные эритроциты	0,2	-
ТХУ	0,5	0,5
Центрифугировали 15 мин при 1700g, отбиралисупернатант		
Супернатант	1,0	1,0
ЭДТА	0,075	0,075
ТБК	0,25	0,25
Содержимое пробирок перемешивали и ставили в кипящую водяную баню на 15 мин.		

Затем пробирки охлаждали до комнатной температуры

Измерение:

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

Расчеты:

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

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

где:

C – содержание МДА, мкмоль/г Hb;

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

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

F – фактор разведения (7,5);

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

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

d – длина оптического пути кюветы (1 см);

1000/Hb – коэффициент пересчета на г Hb.

2.3 Методы оценки антиоксидантного потенциала эритроцитов

2.3.1 Определение активности супероксиддисмутазы

«Принцип метода: Определение активности СОД основано на ингибировании реакции аутоокисления адреналина в присутствии СОД в

щелочной среде вследствие дисмутации супероксидных анион-радикалов, которые являются продуктом одного из этапов.

Реактивы:

- 1) этанол-хлороформная смесь (2:1).
- 2) 0,2 М бикарбонатный буфер, pH 11.
- 3) 5,46 мМ раствор адреналина (0,1% аптечный раствор).

Приготовление бикарбонатного буфера: 2,12 г Na_2CO_3 , 0,168 г NaHCO_3 , 0,074 г ЭДТА, растворить в дистиллированной воде (довести до отметки 200 мл); pH довели до нужного значения добавлением NaOH (конец).

Ход работы:

В пробирку вносили 50 мкл эритроцитов и 450 мкл дистиллированной воды, охлажденной до 0°C. Добавляли 250 мкл этанол-хлороформной смеси, устраняющей мешающее влияние Hb. Далее перемешивали пробы и оставляли инкубироваться при комнатной температуре 10 мин. Полученную суспензию перемешивали и центрифугировали 10 мин при 6000g. Для определения СОД использовали супернатант. Готовили контрольную и опытные пробы по схеме, представленной в табл. 3.

Таблица 2.2 – Порядок внесения реагентов в пробу, мл

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

Измерение:

Изменение оптической плотности регистрировали в течение 3-х минут каждые 30 секунд при длине волны 347 нм в кювете с толщиной слоя 1,0 см.

Расчет:

Для расчета активности использовали показатели величины поглощения контрольной и опытной проб. Активность СОД выражают в усл. ед./мин/г Нб» [41, с. 16-17].

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

где:

$\frac{E_x - E_0}{E_x} * \frac{100\%}{50}$ — единица активности, 50% ингибирование реакции

окисления адреналина;

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

F — фактор разведения (15);

v — объем супернатанта, используемого для определения активности СОД (0,05 мл);

d — длина оптического пути кюветы (1,0 см);

1000/Нб — коэффициент пересчета на г Нб.

2.3.2 Определение активности каталазы

«Принцип метода: Принцип метода определения активности каталазы основан на образовании окрашенного в жёлтый цвет комплекса неразрушенной в ходе каталазной реакции перекиси водорода с молибдатом аммония.

Реактивы:

1. 0,03 %-ный раствор перекиси водорода;
2. 4 %-ный раствор молибдата аммония.

Ход работы:

Для определения активности фермента готовили контрольную и опытную пробы. В обе пробирки наливали по 2 мл раствора перекиси водорода. Затем в опытную пробу вносили 0,01 мл гемолизата, приготовленного в соотношении 1:49 (эритроциты: дистиллированная вода, охлажденная до 0°C), а в контрольную – 0,01 мл дистиллированной воды. Пробы перемешивали и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте. После инкубации реакцию останавливали добавлением 1 мл раствора молибдата аммония.

Измерение:

Измеряли экстинкцию опытной и контрольной проб на спектрофотометре при длине волны 400 нм против дистиллированной воды в кювете с толщиной слоя 1,0 см.

Расчёт:

Активность каталазы рассчитывали, используя коэффициент экстинкции перекиси водорода, равный $22,2 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ и выражали в нмоль неразрушенной H_2O_2 за мин на г Hb» [41, с. 18]. Расчет активности каталазы осуществляли по формуле:

$$A = \frac{(E_x - E_0) \cdot V \cdot F \cdot 1000}{t \cdot v \cdot \varepsilon \cdot d \cdot \text{Hb}},$$

где:

E_x – оптическая плотность контрольной пробы;

E_0 – оптическая плотность опытной пробы;

V – общий объём инкубационной смеси (3,01 мл);

F – фактор разведения (50);

v – количество гемолизата (0,01 мл);

t – время (10 мин);

ε – коэффициент экстинкции перекиси водорода ($22,2 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

d – длина оптического пути (1,0 см)

1000/Нб – коэффициент пересчета на г Нб.

2.3.3 Определение содержания восстановленного глутатиона

«Принцип метода: определение основано на взаимодействии восстановленного глутатиона с ДТНБК с образованием окрашенного в желтый цвет аниона 2-нитро-5-тиобензоата.

Реактивы:

1. Осаждающий раствор (1,67 г ледяной ортофосфорной кислоты, 0,2 г ЭДТА и 30 г хлористого натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки 100 мл);
2. Фосфатный буфер (0,3 М Na_2HPO_4);
3. 1 % раствор цитрата натрия;
4. 0,02 %-ный раствор дитионитро(бис)бензойной кислоты, приготовленный на 1 %-ном растворе цитрата натрия.

Ход работы:

Готовят гемолизат добавлением 0,1 мл отмытых от плазмы и упакованных эритроцитов к 0,9 мл дистиллированной воды, охлажденной до 0°C. Для осаждения белков к гемолизату добавляют 1,5 мл осаждающего раствора. Пробы тщательно перемешивают и после 20-минутного стояния при комнатной температуре фильтруют через крупнопористый фильтр. Фильтрат должен быть прозрачным и бесцветным.

Измерение:

В спектрофотометрическую кювету с толщиной слоя 1,0 см помещают 0,5 мл фильтрата, добавляют 2,0 мл фосфатного буфера. Поскольку раствор ДТНБК имеет слабозелтую окраску, параллельно с опытной пробой готовят контрольную, содержащую вместо фильтрата осаждающий раствор, разведенный дистиллированной водой в отношении 2:5. Затем в контрольную и опытную пробы вносят по 0,25 мл раствора ДТНБК. Сразу же

после перемешивания должна появиться желтая окраска из-за образования дисульфида глутатиона с ДТНБК. Измеряли экстинкцию проб до и после добавления ДТНБК при длине волны 412 нм в кювете с толщиной слоя 1,0 см против воздуха» [41, с. 23-24].

Расчёт:

Содержание восстановленного глутатиона рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{E_2 - E_1}{\varepsilon} * F * K * \frac{1000}{[Hb]},$$

где:

C - концентрация восстановленного глутатиона в мкмоль/г Hb;

E1 - оптическая плотность опытной пробы до добавления ДТНБК;

E2 - оптическая плотность опытной пробы после добавления ДТНБК;

ε – коэффициент молярной экстинкции образовавшегося окрашенного аниона ($13600 \text{ M}^{-1} * \text{см}^{-1}$);

F – фактор разведения;

K - отношение оптической плотности контрольной пробы до добавления ДТНБК и после добавления;

$1000/[Hb]$ – коэффициент пересчета на г Hb.

2.3.4 Определение активности глутатионпероксидазы

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

«Принцип метода: активность фермента оценивается по изменению содержания GSH в пробах до и после инкубации с модельным субстратом в ходе цветной реакции с ДТНБК.

Реактивы:

1. 0,1 М трис-HCl буфер с 0,01%-ным содержанием ЭДТА, pH=8,5;

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

Ход работы:

Отмытые и упакованные эритроциты гемолизируют охлажденной до 0°С водой в соотношении 1:200. 0,2 мл гемолизата смешивают с 0,73 мл сложного буфера и термостатируют 10 минут при 37 °С. Реакцию инициируют внесением в реакционную смесь 0,07 мл раствора ГПТБ. Строго по секундомеру через 5 минут инкубации при 37 °С реакцию останавливают добавлением 0,2 мл раствора ТХУ. В контрольные пробы раствор ГПТБ вносят после осаждения белка ТХУ. Полученные пробы центрифугируют при 1700g в течение 10 минут. Супернатант используют для определения количества восстановленного глутатиона. Для этого к 0,1 мл супернатанта добавляют 2,65 мл 0,1 М трис-НСl буфера и 0,025 мл раствора ДТНБК.

Измерение:

После перемешивания пробы фотометрируют на спектрофотометре при длине волны 412 нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см против дистиллированной воды.

Расчёт:

Активность фермента в эритроцитах выражают в микромолях GSH, окисленного за 1 минуту на грамм Hb, используя коэффициент молярной экстинкции ($13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) окрашенного аниона, образующегося при взаимодействии GSH с ДТНБК» [41, с. 18-19].

Активность рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{(E_x - E_0) * V * 1000}{\varepsilon * \nu * Hb},$$

где:

A – активность ГПО в мкмоль/мин/гНв;

E_x – оптическая плотность контрольной пробы;

E_0 – оптическая плотность опытной пробы;

V – общий объем реакционной смеси (2,775 мл);

ν – количество супернатанта (0,1 мл);

1000/Hb – коэффициент пересчета на г Нв.

2.3.5 Определение активности глутатион-S-трансферазы

«Принцип метода: активность глутатион-S-трансферазы определяют по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между GSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ).

Реактивы:

1. 0,1 М калий-фосфатный буфер, рН = 6,5;
2. 0,015 М раствор восстановленного глутатиона;
3. Абсолютный метанол;
4. 0,015 М раствор ХДНБ (готовится на абсолютном метаноле).

Ход работы:

Отмытые и упакованные эритроциты гемолизируют охлажденной до 0°С водой в соотношении 1:20. В кювету с длиной оптического пути 1,0 см помещают 2,5 мл калий-фосфатного буфера (рН=6,5), добавляют 0,2 мл раствора восстановленного глутатиона и 0,1 мл гемолизата. Реакцию инициируют внесением в кювету 0,2 мл раствора ХДНБ. Сразу же после этого перемешивают пробу и зануляют прибор.

Измерение:

Регистрацию оптической плотности проводят в течение 3 минут при температуре 25°C и длине волны 340 нм.

Расчёт:

Активность фермента рассчитывают, используя коэффициент миллимолярной экстинкции для GS-ХДНБ при длине волны 340 нм, равный $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, и выражают в микромолях образующихся глутатион-S-конъюгатов в минуту на грамм Hb» [41, с. 19-20].

Активность рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{\Delta E * V * 1000}{\nu * \varepsilon * Hb},$$

где:

A – активность GST в мкмоль/мин/гНВ;

ΔE – изменение оптической плотности в минуту;

V – общий объём реакционной смеси;

ν – объём пробы, используемый для определения активности GST;

ε – коэффициент молярной экстинкции при $\lambda=340\text{нм}$ ($9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$)

$1000/Hb$ – коэффициент пересчета на г Hb.

2.4 Определение содержания гемоглобина

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

Реактивы:

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

2. Ацетонциангидрин;

3. Калибровочный раствор гемоглобина с концентрацией 120 г/л

Ход работы:

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

Измерение:

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

Расчёт:

Содержание гемоглобина рассчитывают по формуле:

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

Где:

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

D_o– оптическая плотность опытной пробы;

D_x – оптическая плотность калибровочной пробы;

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

F – фактор разведения»[41, с. 10-11].

2.5 Статистическая обработка результатов

По результатам исследований была сформирована база данных, на основе которой производился статистический анализ с помощью пакета прикладных программ Statistica 13 и Microsoft Office Excel 2016. Обработку

данных проводили с помощью методов описательной статистики: подсчета медианы и интервального разброса (С25-С75 процентиля). Достоверность различия двух независимых выборок оценивалась по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни (при $p < 0,05$).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АОС – Антиоксидантная система
АДФ – Аденозиндифосфат
АФК – Активные формы кислорода
ДК – Диеновые конъюгаты
КОС – Коэффициент окислительного стресса
КРР – Колоректальный рак
КТ – Каталаза
МДА – Малоновыйдиальдегид
ОМ – Окислительная модификация
ПОЛ – Перекисное окисление липидов
РПК – Рак прямой кишки
СОД – Супероксиддисмутаза
ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота
ТХУ – Трихлоруксусная кислота
ЭДТА - Этилендиаминтетраацитат
NADPH - Кофермент
GPO (ГПО) - Глутатионпероксидаза
GSH – Восстановленныйглутатион
GST (ГСТ) – Глутатион-S-трансфераза

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Опенко, Т. Г. Колоректальный рак: тенденции за четверть века в Новосибирске, возможности раннего выявления и профилактика/ Т. Г. Опенко, О. В. Решетников, С. А. Курилович [и др.] // Вопросы онкологии. – 2014. – Том 60, № 6. – с. 687-694.
2. Животовский, А. С. Колоректальный рак: динамика заболеваемости и смертности в Кемеровской области/ А. С. Животовский, А. Г. Кутихин, Ю. А. Магарилл [и др.]// Медицинский альманах. – 2012. – № 2 (21). – С. 58-61.
3. Таганович А. Д. Патологическая биохимия/ А. Д. Таганович, Э. И. Олецкий, И. Л. Котович// М.: Издательский дом БИНОМ. – 2019. – 448с.
4. 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.
5. Куртасова, Л.М. Изменения функционально-метаболической активности нейтрофилов периферической крови у больных почечно-клеточным раком в динамике заболевания/ Л.М. Куртасова, Е.А. Шкапова, Р.А. Зуков// Вестник РАМН. – 2014. – Т. 11–12. – с. 104–109.
6. Mates, J.M. Antioxidant Enzymes and Human Diseases/ J.M. Mates// Clinical Biochemistry. – 1999. – V. 32, № 8. – p. 595 – 603.
7. Барабой, В. А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / В. А. Барабой // Успехи современной биологии. – 1991. – Т.111, №6. – с.21-28.
8. Перепечай, Я. И. Содержание малонового диальдегида и активность антиоксидантных ферментов в плазме крови больных механической желтухой [Электронный ресурс]/ Я. И. Перепечай, Е.Ю. Меркулова//

- Научное сообщество студентов XXI столетия. Естественные науки: сб. ст. по мат. VII междунар. студ. науч.-практ. конф. – 2013. - № 7. – Режим доступа: <https://sibac.info/studconf/natur/vii/31406>.
9. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологиях: учебное пособие для врачей / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков. – Москва: Наука. – 2001. – с. 14-39.
 10. Матейкович, П. А. Глутатионпероксидаза как фермент системы антиоксидантной защиты клеток/П. А. Матейкович// Международный научный журнал. – 2016. – Т. 3, № 6. – с. 21-24.
 11. Рязанцева, Н.В. Система глутатиона участвует в регуляции апоптоза опухолевых клеток/ Н.В. Рязанцева//Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13, № 5. – с. 73 -78.
 12. Sonali, P. Madhusnata De Changes in Anti-Oxidant Enzyme Profile during Haematological Malignancy/ P. Sonali// Int J Hum Genet. – 2010. – № 10. — p. 247—250
 13. Grune, T. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. / T. Grune, T. Reinheckel, and K. J. Davies// The FASEB J. – 1997. — V. 11. — p. 526—534.
 14. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты/ Е.Б. Меньщикова [и др.]. – М.: Фирма «Слово», 2006. – с.223-227.
 15. Fukui, T. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases [Electronic resource]/ T. Fukui, M. Ushio-Fukai// Antioxidants and redox signaling. – 2011. - № 15(6). – Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3151424/>
 16. Goodsell, D. Superoxide Dismutase [Electronic resource]/ D. Goodsell// Molecular explorations through biology and medicine. – 2007. – Access mode: <https://pdb101.rcsb.org/motm/94>.

- 17.Волыхина, В. Е. Супероксиддисмутазы: структура и свойства/ В. Е. Волыхина, Е. В. Шафрановская// ВестникВГМУ. – 2009. – Т.8, №4. – с. 6-12.
- 18.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.]// *FreeRadicalBiologyandMedicine*. – 2015. – V. 80. – p. 67-76.
- 19.Kiefer, D. Superoxide Dismutase Boosting the Body's Primary Antioxidant Defense [Electronic resource]/ D. Kiefer// *Life extension magazine*. – 2006. – Access mode: http://www.lifeextension.com/magazine/2006/6/report_sod/page-01.
- 20.Che, M. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer/ M. Che [et al.]// *Drug discov today*. – 2016. – № 21(1). – p. 143-149.
- 21.Goodsell, D. Catalase [Electronic resource]/ D. Goodsell// *Molecular explorations through biology and medicine*. – 2004. – Access mode: <https://pdb101.rcsb.org/motm/57>
- 22.Патологическая анатомия: Учебник. — 4-е изд., стереотипное/ А. И. Струков, В. В. Серов. — М.: Медицина, 1995. — с. 688.
- 23.Безручко, Н.В. Каталаза биологических сред организма человека и её клинико-биохимическое значение в оценке эндотоксикоза / Н.В. Безручко [и др.] // *Вестник ТГПУ*. – 2012. – №7. – с.94 – 99.
- 24.Goth, L. Blood Catalase Deficiency and Diabetes in Hungary / Laszlo Goth, AgotaLenkey, William N. Bigler // *Diabetes Care*. – 2001. - № 24. – p. 10.
- 25.Кичеева, А. Г. СодержаниеGSHиактивностьGSH-зависимыхферментовубольныхсопухолямипростаты: бакалаврская работа: 06.03.01 – Биология / А.Г. Кичеева – Красноярск, 2018. – 39 с.

26. Nissar, S. Glutathione S Transferases: Biochemistry, Polymorphism and Role in Colorectal Carcinogenesis/ S.Nissar[et al.]// J Carcinog Mutagen. – 2017. – Vol. 8. – p. 1-9.
27. Chikezie, P. C. Glutathione S-Transferase Activity in Diagnostic Pathology/ P.C. Chikezie// Metabolomics. – 2015. – Vol.5. – p. 1-8.
28. Klusek, J. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and colorectal cancer risk in Polish nonsmokers/ Justyna Klusek [et al.]// Oncotarget. – 2018. – Vol. 9, №30. – p. 21224-21230.
29. Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzyme/ M. Deponte// Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects. – 2013. – Vol.1830. – P.3217-3266.
30. Смирнова, Е. Ю. Использование глутатион-S-трансферазы как маркера окислительного стресса в токсикологических исследованиях [Электронный ресурс]/ Е. Ю. Смирнова, А.О. Шевцова// Молодёжь и наука. — Красноярск: Сибирский федеральный ун-т, 2011. — Режим доступа: <http://elib.sfu-kras.ru/handle/2311/6141>
31. Rebecca, L. Colorectal cancer statistics, 2017 [Electronic resource]/ Rebecca L. [et al.] //CA: A Cancer Journal for Clinicians. – 2017. – Access mode: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21395>
32. Алиев, В.А. Колоректальный рак с синхронными отдаленными метастазами: обоснование циторедуктивных операций и перспективы – взгляд хирурга/ В.А. Алиев [и др.]// Онкологическая колопроктология. – 2012.- Т. 4. – с. 15-20.
33. Weinberg, B.A. The Growing Challenge of Young Adults With Colorectal Cancer/ B. A. Weinberg// Oncology. – 2017. – V.31, №5. – p. 381-389.
34. Underwood, M. J. Familial colorectal cancer: discussion paper/ M. J. Underwood, V. W. Johnson// J R Soc Med. – 1992. – V. 85, №6. – p. 339–341.

- 35.Алиев, С.А.Колоректальный рак: заболеваемость, смертность, инвалидность, некоторые факторы риска/ С.А.Алиев, Э.С.Алиев// «Вестник хирургии». – 2007.– Том 166, № 4. - с.118-122.
- 36.Haggar, F. A. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors/ Fatima A. Haggar, Robin P. Boushey// Clin Colon Rectal Surg. – 2009. - V. 22, №4. – p. 191–197.
- 37.Никитина, Н.В.Рак толстой кишки при воспалительных заболеваниях кишечника/ Н.В. Никитина, Е.А. Белоусова, Е.В. Великанов [и др.]// Гастроэнтерология. –№4. – 2011. – с. 18-22.
- 38.Nordqvist, C. Colorectal cancer: What you need to know[Electronic resource]/ / Christian Nordqvist// Medical News Today.– 2018. – Access mode: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/155598.php>
- 39.Александров, В. Колоректальный рак (некоторые вопросы диагностики и лечения)/ В. Александров, О. Рахимова// «Врач». –2009. - №11. – с.8-10.
- 40.Vega, P. Colorectal cancer diagnosis: Pitfalls and opportunities/ Pablo Vega, FatimaValentin, and Joaquin Cubiella// World J GastrointestOncol. – 2015. –V. 7, № 12. –p. 422–433.
- 41.Титова, Н.М. Оценка структурно-функционального состояния клетки: метод. указания к практическим занятиям/ Н.М. Титова [и др.]. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. – 60 с.
- 42.Vece, M.M. DietaryTotalAntioxidantCapacityandColorectalCancerintheItalianEPICCohort [Electronicresource]/Marilena Monica Vece [et al.]//PLoS One. – 2015. – V. 10, №11. – Access mode:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4643904/>
- 43.Wu, R. Significance of Serum Total Oxidant/Antioxidant Status in Patients with Colorectal Cancer[Electronic resource]/Rong Wu [et al.]//PLoS One. –

2017. – V. 12, №1. –Access mode:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5245835/>
44. Skrzydlewska, E. Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer/ Elzbieta Skrzydlewska [et al.]// Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A. – 2001. – V.64, №3. – p. 213-222.
45. Perse, M. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Colorectal Cancer: Cause or Consequence [Electronic resource]/ Martina Perse// BioMed Research International. – 2013. – 9 p. – Access mode: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/725710/>
46. 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.
47. Abiaka, C. Activities of erythrocyte antioxidant enzymes in cancer patients/ C. Abiaka [et al.]// J of clinical laboratory analysis. – 2002. – V. 16, № 4. – p.167 – 171.
48. 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.
49. Зуйков, С. А. Исследование соотношения прооксидантной и антиоксидантной систем при опухолях кишечника/ С.А. Зуйков, Б.Г. Борзенко, О.В. Зуйкова// Сибирский онкологический журнал. – 2014. – № 2 (62). – с. 24 – 27.
50. Chang, D. Evaluation of Oxidative Stress in Colorectal Cancer Patients/Dong Chang [et al.]// Biomedical and environmental sciences. – 2008. – №21. – p. 286-289.
51. Pandey, K. B. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans/Kanti Bhooshan Pandey, Syed Ibrahim Rizvi// Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2010. – V. 3, I. 1. – p. 2-12.

52. Kuhn, V. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia/Viktoria Kuhn[et al.]// ANTIOXIDANTS&REDOXSIGNALING. – 2017. – V. 26, № 13. – p. 718-742.
53. СТО 4.2-07-2014. Система менеджмента качества. Общие требования к построению, изложению и оформлению документов учебной деятельности. – Введ. 30.12.2013. – Красноярск: СФУ, 2014. – 60 с.

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
Е.И. Шишацкая
« 5 » июня 2019 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Оценка состояния антиоксидантной системы в эритроцитах больных раком
прямой кишки
06.04.01 – Биология
06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель Титова доцент, канд. биол. наук, Н.М. Титова
Выпускник Глазкова М.О. Глазкова
Рецензент Куртасова профессор, д-р мед. наук, Л. М. Куртасова