

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра медицинской биологии

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

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Анализ антиоксидантного потенциала крови при различных патологиях

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

Выпускник _____ ББ13-01Б К.А. Кудрявцева

Красноярск 2017

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
1 Обзор литературы	5
1.1 Активные формы кислорода и их характеристика.....	5
1.2 Клеточная антиоксидантная система и АОС плазмы крови.....	7
1.2.1 Характеристика биоантиоксидантов плазмы крови	11
1.2 Рак желудка	15
1.3 Дифузный токсический зоб	18
1.4 Эхинококкоз печени	19
2 Материалы и методы	20
2.1 Объект исследования	20
2.2 Определение содержания мочевой кислоты в плазме крови	21
2.3 Определение содержания мочевой кислоты в эритроцитах	23
2.4 Определение содержания аскорбиновой кислоты в эритроцитах и плазме крови.....	23
2.5 Определение содержания гемоглобина.....	25
2.6 Статистическая обработка результатов	26
3 Результаты и их обсуждения	27
3.1 Содержание низкомолекулярных антиоксидантов в крови контрольной группы людей	Error! Bookmark not defined.
3.2 Содержание низкомолекулярных антиоксидантов в крови больных диффузно токсическим зобом	Error! Bookmark not defined.
3.3 Содержание низкомолекулярных антиоксидантов в крови больных раком желудка	Error! Bookmark not defined.
3.4 Содержание низкомолекулярных антиоксидантов в крови больных эхинококкозом печени	Error! Bookmark not defined.
Заключение	Error! Bookmark not defined.
Список сокращений	28
Список используемых источников.....	29

Введение

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

Баланс между процессами образования АФК, и реакциями антиоксидантов является важной гомеостатической константой. Нарушение сбалансированности в системах генерации свободных радикалов АОС приводит к развитию окислительного стресса, являющегося типовой патологической реакцией организма. Повышение радикалообразования, главным образом, за счет гиперпродукции АФК, и снижения антиоксидантной защиты обнаружено при развитии многих заболеваниях

Антиоксиданты характеризуются способностью в малых количествах разными путями нейтрализовать свободные радикалы. Антиоксидант может быть определен как молекула, которая защищает биологическую мишень от окислительного разрушения.

В последнее время наблюдается высокий интерес к связи антиоксидантов (АО), которые отражают антиоксидантный статус организма человека, и различными типами патологий. Как правило, АО являются биомаркерами, связанные с развитием окислительного стресса. Содержание антиоксидантов в биологических материалах, включая метаболиты, позволяет оценивать течение заболевания, контролировать эффективность предложенного лечения, а также несет прогностическую функцию. В качестве маркеров антиоксидантного статуса основными АО, являются

аскорбиновая кислота или соотношение их окисленных и восстановленных форм и мочевая кислота.

Цель данной работы заключалась в оценке антиоксидантного потенциала крови у здоровых людей и при различных патологиях.

В задачи работы входило:

1) изучить содержания мочевой кислоты (МК), аскорбиновой кислоты (АК) и её окисленных форм – дегидроаскорбиновой (ДАК) и дикетогулоновой кислот (ДКГК) в эритроцитах и плазме крови контрольной группы людей.

2) исследовать содержание неферментативных антиоксидантов - МК, АК, ДАК и ДАКГК в плазме и эритроцитах больных эхинококкозом, раком желудка и диффузно токсическим зобом.

Работа выполнена на базе кафедры медицинской биологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, лаборатории клинической патофизиологии и аллергологии, лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии Красноярского научного центра СО РАН «НИИ медицинских проблем Севера» и является частью комплексных исследований состояния антиоксидантной системы при различных патологиях.

1 Обзор литературы

1.1 Активные формы кислорода и их характеристика

Активные формы кислорода (АФК) — это, с физико-химической точки зрения, прежде всего свободные радикалы, которые имеют на внешней электронной оболочке не спаренный электрон. АФК генерируются во всех частях клетки. 95–98 % вдыхаемого O_2 расходуется на выработку энергии и окислительный метаболизм субстратов, 2–5 % O_2 переходит в активные формы кислорода. В тканях организма кислород обычно не вступает в неферментативные реакции, а находится в виде АФК.

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

АФК генерируются в ходе различных процессов в организме. Синглетный кислород (1O_2) образуется и в реакциях фотоокисления в присутствии фотосенсибилизаторов: флавины, гематопорфирины и др., а также при дисмутации супeroxидных радикалов. 1O_2 агрессивен в отношении биосубстратов, в особенности молекул с двойной связью; конечным итогом таких реакций обычно является образование гидроперекисей органических молекул в процессах перекисного окисления ненасыщенных липидов в биомембранах.

В процессе присоединения электрона к молекуле O_2 образуются супeroxидный анион-радикал $O_2^{\cdot-}$ и гидроперекисный радикал HO_2^{\cdot} ; оба они порождают ряд других АФК. Основное количество $O_2^{\cdot-}$ образуется в митохондриях, которые используют 85–99 % потребляемого O_2 . Генерация $O_2^{\cdot-}$ происходит в дыхательной цепи и микросомах при случайных сбоях в цепи переноса электронов, особенно при недостатке O_2 . Эти радикалы

играют также важную роль в защитных неспецифических иммунных механизмах организма при инфекционных и других воспалительных процессах. Основными источниками O_2^- являются ферментные системы: NADPH-оксидаза фагоцитирующих клеток, ксантинооксидаза, митохондриальная цитохром c-оксидаза и микросомальные монооксигеназы.

Гидроперекисный радикал HO_2^- реагирует с линолевой, линоленовой, арахидоновой кислотами, окисляя их до гидроперекисей. Образованию HO_2^- радикала способствует закисление среды, он также свободно проникает через биомембранны, так как не несет заряда. Гидроперекиси липидов являются активными соединениями и обладают высокой биологической агрессивностью. Для протекания цепного окисления липидов в биологических мембранах необходимы переходные металлы, в частности, ионы железа.

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

Название	Структура	Образуется	Биологическая роль
Первичные радикалы			
Супероксид	OO^-	НАДФН-оксидаза	Анти микробная защита
Нитроксид	NO	NO-синтаза	Фактор расслабления сосудов
Убихинол	Q	Дыхательная цепь митохондрий	Переносчик электронов
Молекулы, образующие свободные радикалы			
Перекись водорода	HOON	Супероксиддисмутаза, оксидазы	Субстрат миелопероксидазы
Гидроперекиси липидов	LOOH	Циклооксигеназа	Фактор расслабления сосудов
Вторичные радикалы			
Название	Структура	Образуется в реакции	
Радикал гидроксила	$\cdot OH$	$Fe^{2+} + HOON \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + OH$ $Fe^{2+} + ClO^- \rightarrow Fe^{3+} + Cl^- + OH$	
Липидные радикалы	$LO\cdot$ $L\cdot$ $LOO\cdot$	$Fe^{2+} + LOOH \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + LO\cdot$ $LO\cdot + LH \rightarrow LH + L\cdot$ $L\cdot + O_2 \rightarrow LOO\cdot$	

Дисмутация – O_2^- анион-радикалов под действием супероксиддисмутазы (СОД) в биологических тканях ведет к образованию перекиси водорода H_2O_2 , способной легко проникать через мембранные клеток. H_2O_2 обнаруживается при фагоцитозе, при работе митохондрий и микросом. В присутствии ионов переходных металлов (Fe^{2+}) перекись водорода образует высоко активный гидроксильный радикал ($\cdot OH$), обладающий наибольшей цитотоксичностью среди АФК. Это определяет его преимущественно местное действие. При этом главными видами повреждений биомолекул являются: отрыв атома водорода (таким образом повреждается фосфатидилхолин — компонент биологических мембран, а также сахара в составе нуклеозидов ДНК); присоединение к молекулам по двойным связям (взаимодействие с пуринами и пиримидинами ДНК и РНК), перенос электронов также является важным в повреждающем действии $\cdot OH$.[10]

1.2 Клеточная антиоксидантная система и АОС плазмы крови

При действии разных эндогенных и экзогенных факторов, которые являются причиной окислительного стресса, баланс между антиоксидантной системой и активными формами кислорода в клетках может нарушаться либо в результате снижения уровня антиоксидантов, либо вследствие гиперпродукции активных форм кислорода. Такое состояние нарушенного окислительно-восстановительного статуса клеток, когда активные формы кислорода не могут быть нейтрализованы антиоксидантной системой, называется окислительным стрессом.

Продукция активных форм кислорода в клетках может увеличиваться в результате действия на них физиологических (гормонов, цитокинов, др.) и нефизиологических стимулов (ионизирующего излучения, ксенобиотиков и т.д.) [2].

Клеточная антиоксидантная система включает широкий класс соединений, снижающих активность радикальных окислительных процессов.

Её физиологический компонент обеспечивает равновесие между транспортом кислорода к клеткам и процессами по его безопасной утилизации.

АОС можно условно разделить на специфическую и неспецифическую. Специфическая антиоксидантная система направлена на разрушение АФК и продуктов их дальнейших превращений. Действие неспецифической АОС связано с предотвращением условий и возможностей утечки электронов и генерации АФК в ходе окислительно-восстановительных реакций.

Для обеспечения максимальной защиты от окислительного стресса клетки имеют хорошо развитую антиоксидантную систему, которая содержит разные низко- и высокомолекулярные соединения, способные “перехватывать” свободные радикалы или нейтрализовать источник их возникновения. Важную роль в реализации АОА *in vivo* принадлежит печени; в гепатоцитах и клетках рыхлой соединительной ткани (макрофагах Купфера) происходят процессы метаболизма, при которых образуются и поступают в кровь эндогенные инактиваторы АФК, включая мочевую кислоту, билирубин, биливердин и альбумин.

За стабильность прооксиданто-антиоксидантного равновесия жидкостных сред организма ответственны специализированные АО-системы, активность которых вполне приемлемо оценивать по АОА плазмы крови.

Защита ферментов и белков, в частности липопротеинов, присутствующих в плазме крови, осуществляется внеклеточной АОС. Эта антиоксидантная система, как и клеточная, включает антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные биоантиоксиданты. Внеклеточная АОС присутствует не только в плазме крови, но и в межклеточной, спинномозговой, синовиальной жидкостях и лимфе.

Действие низкомолекулярных антиоксидантов направлено на защиту белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов, а также биомембран от окислительного разрушения при свободнорадикальных процессах. Важное значение низкомолекулярные АО приобретают в условиях окислительного

стресса, когда ферментативная АОС оказывается менее эффективной по сравнению с их защитным действием. К ним относят жирорастворимые (токоферолы, каротиноиды, убихиноны) и водорастворимые (аскорбиновая кислота, глутатион, тиоредоксин, билирубин, ураты). Классификация АО приведена на рис.1.



Рисунок 1 - Классификация антиоксидантов [11]

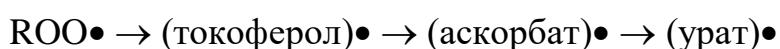
Вещество может считаться полезным антиоксидантом, если выполнены следующие условия: возможно взаимодействие этого вещества с биологически значимыми оксидантами и радикалами, продукт этого взаимодействия безвредный, данное вещество присутствует в достаточно высоких концентрациях, обеспечивающих количественно высокую скорость реакции.

Состав белковых антиоксидантов в плазме крови разнообразен. Так, к АОС плазмы крови относятся экстрацеллюлярная СОД, каталаза и ГПО, альбумины, церулоплазмин, трансферрин, лактоферрин, ферритин, гаптоглобин и гемопексин (белок, связывающий гемоглобин), часть из них

проявляют катализитические свойства. Антиоксидантная активность плазмы крови зависит состояния здоровья, стресса, питания, возраста, климатических условий проживания и других факторов. Доказано, что в условиях острого стресса наблюдается увеличение АО в плазме крови, в то время как при длительном стрессе АОА организма снижается.

К внеклеточной неферментативной АОС в настоящее время относят ураты и билирубин – метаболиты, образующиеся при расщеплении пуриновых нуклеотидов и гема, а также витамины С, Е и А, поступающие в организм с пищей.

Компоненты АОС работают в комплексе: ферментативная АОС осуществляет обезвреживание O_2^- и H_2O_2 ингибиторы органических радикалов также участвуют в цепочке взаимопревращений, в результате которых образуется менее активная форма радикала.



Считают, что главными защитными системами в плазме крови являются антиоксидантные белки. Они связывают ионы металлов переменной валентности в формы, которые не могут стимулировать свободнорадикальные реакции. Например, церулоплазмин ингибирует Fe^{2+} -зависимое ПОЛ и образование $\cdot OH$ из H_2O_2 . Церулоплазмин – основной антиоксидант плазмы крови, поскольку неспецифически связывая Cu^{2+} , он тормозит также Cu^{2+} -стимулируемое образование АФК.

Белки плазмы крови могут инактивировать активные формы кислорода, а также связывать ионы переменной валентности, инициирующие образование активных форм кислорода, осуществляя, таким образом, защиту на уровне эритроцитов, предотвращая их гемолиз в результате активации перекисного окисления липидов.

1.2.1 Характеристика биоантиоксидантов плазмы крови

Аскорбиновая и мочевая кислоты – это два важных антиоксиданта, содержащиеся в организме в высоких концентрациях.

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

Мочевая кислота может действовать как антиоксидант за счет связывания переходных металлов, таких как железо и, несомненно, является лучшим антиоксидантом и в меньшей степени прооксидантом.

Биосинтез мочевой кислоты представлен на рисунке 4. Пурины образуются в процессе метаболизма пищевых и эндогенных нуклеиновых кислот и, в конце концов, деградируют под действием фермента ксантиноксидазы до мочевой кислоты.

Она является слабо кислотой ($pK_a_1=5.4$ и $pK_a_2=9,8$) и при физиологических значениях pH существует в качестве аниона – дигидроурата натрия, распределенного во внеклеточной жидкости. Мочевая кислота растворима в воде. У людей нет ферментов, способных к дальнейшему окислению мочевой кислоты, и она удаляется из плазмы за счет клубочковой фильтрации.

Концентрация мочевой кислоты определяется сочетанием скорости метаболизма пуринов (как эндогенных, так и экзогенных) и эффективностью почечного очищения.

При физиологических значениях pH мочевая кислота присутствует в форме моновалентного урат-аниона. Именно в такой форме существования мочевой кислоты важно ее антиоксидантное действие. Вклад мочевой кислоты в антиоксидантную плазматическую способность в отношении перекисей составляет 30-65%, а гидроперекисей 10-15% [9].

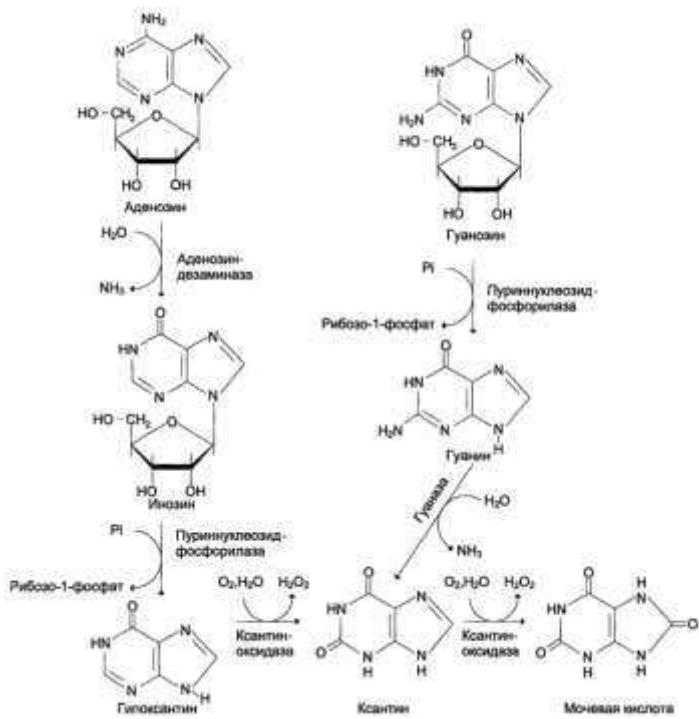


Рисунок 2 – Метаболический путь образования мочевой кислоты [9]

Аскорбиновая кислота относится к основным водорастворимым антиоксидантам. Она является производным моносахарида L-ряда. Это строение подтверждено синтезами, в которых исходными веществами являются L-сорбоза (наиболее доступна) или L-гулоза, превращающиеся в 2-кето- β -гидро-новую кислоту—ключевой полупродукт в синтезе аскорбиновой кислоты. Она имеет два асимметрических атома углерода в положениях 4 и 5 и образует четыре оптических изомера и два рацемата:

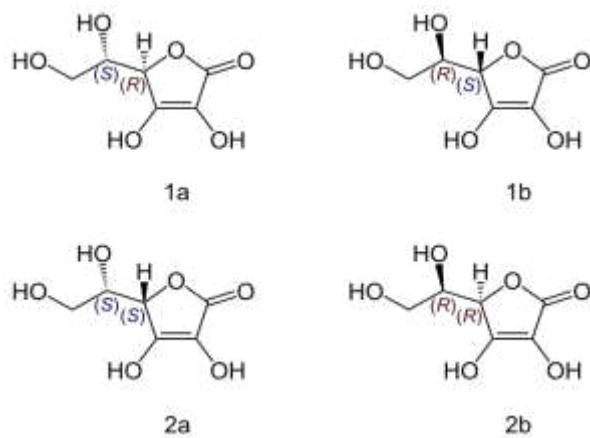


Рисунок 3 – Оптические изомеры аскорбиновой кислоты [24]

1a — L-аскорбиновая кислота; 2a — L-изоаскорбиновая кислота; 1b — D-изоаскорбиновая кислота; 2b — D-аскорбиновая кислота

Биологически активной является L-(+)-форма. D-(-)-форма является антивитамином и не существует в природе. Принятое строение аскорбиновой кислоты подтверждается рентгеноструктурным анализом. Молекулярная модель, установленная этим методом, показывает, что все атомы углерода и кислорода цикла лежат в одной плоскости, кроме C4, лежащего вне её.

Аскорбиновая кислота очень легко окисляется и обладает сильной восстановительной способностью. Процесс окисления аскорбиновой кислоты протекает сложно, начальной стадией его является образование т.н. дегидроаскорбиновой кислоты (ДАК) под влиянием кислорода или других окислителей. Наличие в аскорбиновой кислоте двух сопряжённых двойных связей обуславливает ее способность к обратимому окислению. В процессе окислительного и гидролитического расщепления дегидроаскорбиновая кислота, превращается в 2,3-дикето-L-гулоновую кислоту (ДКГК). С помощью сульфгидрильной группы глутатиона дегидроаскорбиновая кислота легко регенерируется обратно в аскорбиновую кислоту (рис. 6).

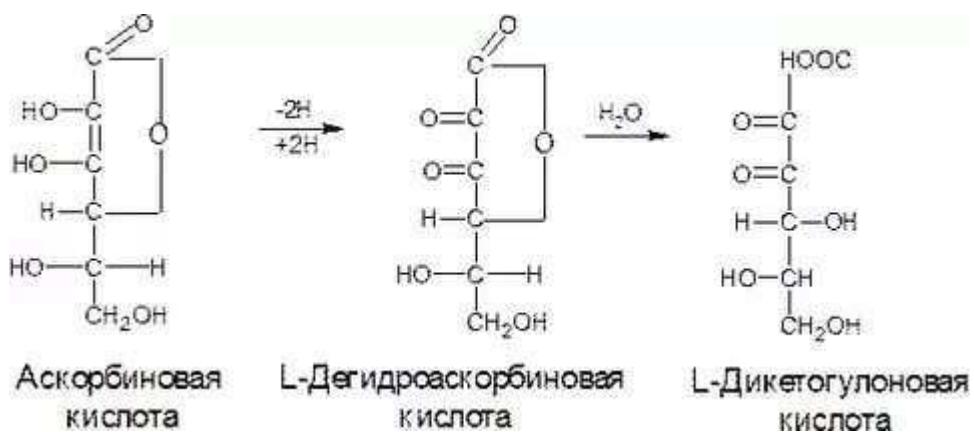


Рисунок 4 - Окисление аскорбиновой кислоты с образованием ДАК И ДКГК [24]

Обе формы, ДАК и АК обладают биологической активностью. Концентрация аскорбиновой кислоты в крови в диапазоне от 4,87 – 11,75 мг/л обеспечивает нормальное протекание многих биохимических реакций в организме. Она участвует в реакциях гидроксилирования пролина и лизина

при синтезе коллагена, также аскорбиновая кислота является переносчиком водорода в процессе дыхания. В окислительно-востановительных процессах таких как в системе метгемоглобин – гемоглобин, играет ведущую роль. Присутствие аскорбиновой кислоты в эритроцитах оказывает защитное действие на гемоглобин, препятствуя его окислению. Аскорбиновая кислота способна восстанавливать метгемоглобин, сама окисляясь в ДАК. Обратное превращение происходит за счет глутатиона [24].

Проявление анти- и прооксидантных свойств АК зависит также от концентрации субстрата и условий протекания реакций; такая ее функциональная пластичность важна для поддержания в биологических системах окислительно-востановительного гомеостаза. В качестве стабилизатора АК выступает мочевая кислота, которая ингибитирует радикалы аскорбата и предотвращает его окисление Fe [25].

Этот важный растворимый антиоксидант в организме человека не синтезируется, а поступает с пищей. Отмечено, что для поступления витамина С в клетки организма важен переход АК в ДАК [26]. Постоянное пополнение эритроцитов аскорбиновой кислотой происходит за счет поступления ДАК из плазмы, с помощью специального переносчика Glut1, осуществляющий транспорт глюкозы [26, 27]. Поглощение аскорбиновой кислоты эритроцитами происходит очень медленно (рис. 7) [30]. Напротив, у большинства ядерных клеток имеется зависимый от натрия и энергии транспортер с высоким сродством к аскорбату (SVCT2), который поддерживает низкие миллимолярные внутриклеточные концентрации витамина [28, 29, 41].

Аскорбиновая кислота используется организмом для биохимических окислительно-востановительных процессов, вступает во взаимодействие с супероксид-анионом, синглетным кислородом, гидроксильным и перекисным радикалами [24].

RBC Ascorbate Recycling

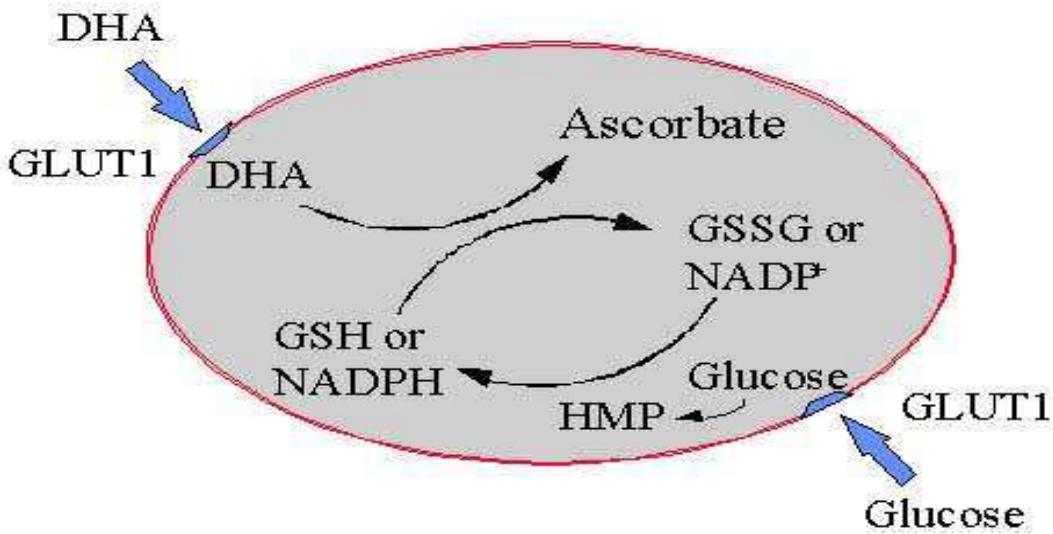


Рисунок 5 - Восстановление эритроцитами ДАК в АК. ГМФ = гексозомонофосфатный путь [30]

Важнейшая роль АК заключается в поддержании и стабилизации антиоксидантной защиты эритроцитов. Защита от повреждения окислителем в мембране плазмы эритроцитов включает в себя профилактику и отмену перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот в липидном бислое. Аскорбат не влияет непосредственно на перекисное окисление липидов мембран, но он может выполнять эту функцию косвенно, снижая токофероксильный свободный радикал в липидном бислое [25].

1.2 Рак желудка

Рак желудка — злокачественная опухоль, происходящая из эпителия слизистой оболочки желудка. Является одним из наиболее распространённых онкологических заболеваний. Может развиваться в любом отделе желудка и распространяться на другие органы, особенно пищевод, лёгкие и печень [15].

Лечение рака химиотерапевтическими средствами и лучевой терапией в значительной степени зависит от генерации АФК, которые необходимы для уничтожения злокачественных клеток путем индукции апоптоза. Но

непропорциональное генерирование АФК представляет серьезную проблему для гомеостаза и вызывает повреждение тканей. В то время как природные антиоксидантные пути могут ограничивать неблагоприятные эффекты АФК.

АФК производится в ответ на ультрафиолетовое (УФ) излучение, курение сигарет, потребление алкоголя, прием нестероидных противовоспалительных препаратов и многие другие экзогенные вещества. Инфекции, ишемия-реперфузия и различные воспалительные процессы также приводят к повышенным уровням АФК. Нарушение нормального клеточного гомеостаза с помощью окислительно-восстановительной сигнализации способствует развитию заболевания практически в каждом органе, включая развитие рака (рис.8).

Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) является ключевым источником АФК. Несмотря на защитный барьер, обеспечиваемый эпителиальным слоем, попадающие в организм вещества и патогенные микроорганизмы могут вызывать воспаление, активируя эпителий, полиморфоядерные нейтрофилы и макрофаги, которые в дальнейшем способствуют окислительному стрессу. Различные патологические состояния желудочно-кишечного тракта, включая гастродуodenальные язвы, злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта и воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), частично возникают в результате окислительного стресса.

Внутриклеточные компартменты, включая митохондрии, эндоплазматический ретикулум, пероксисомы, ядра, цитозоль, плазматические мембранные и даже внеклеточные пространства, способны генерировать АФК. Митохондриальная цепь переноса электронов является основным источником АФК в большинстве клеток млекопитающих. Ферментами, которые катализируют АФК-генерирующие химические реакции, являются пероксидазы, NADPH-оксидаза, NADPH-оксидазные изоформы, ксантинооксидаза, липоксигеназы, глюкозооксидаза, миелопероксидаза, NO- синтаза и циклооксигеназы.

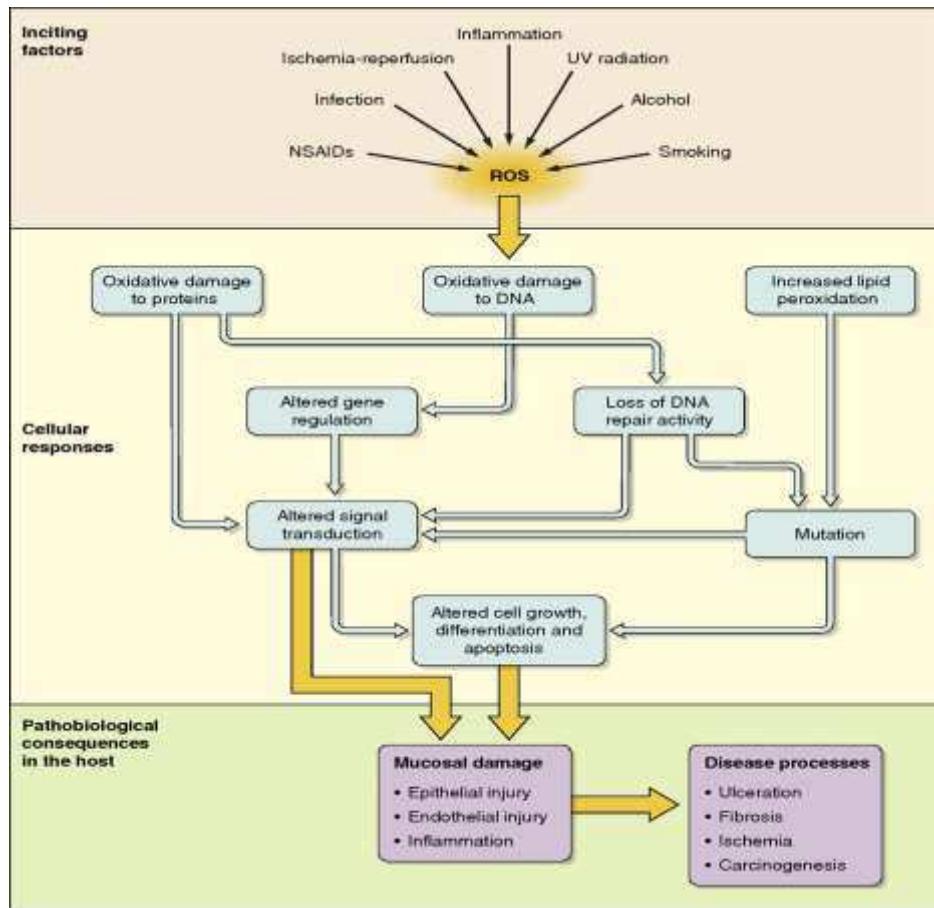


Рисунок 6 - Схематический график, показывающий индукцию окислительного стресса и его патологических эффектов. Окислительный стресс повреждает внутренние органы, вызывая повреждение слизистой оболочки [26].

Helicobacter pylori — наиболее постоянный фактор риска рака желудка. Доказано, что инфекция *Helicobacter pylori* является самым распространенным фактором риска рака некардиального отдела желудка у человека [18]. В то же время, кардиальной (проксимальный) рак желудка с инфекцией *H. pylori* не связан [19].

Риск рака желудка зависит от факторов вирулентности бактерий и от генетических факторов пациента, однако рекомендации в отношении конкретных маркеров вирулентности или маркеров для генетических исследований для применения в клинической практике в настоящее время отсутствуют [18].

1.3 Диффузный токсический зоб

В настоящее время диффузный токсический зоб рассматривается как наследственное аутоиммунное заболевание, которое передаётся многофакторным путём. Факторы, провоцирующие развитие заболевания: психические травмы, инфекционно-воспалительные заболевания, черепно-мозговые травмы, заболевания носоглотки. Данное заболевание обусловлено избыточной секрецией тиреоидных гормонов диффузной тканью щитовидной железы, которое приводит к отравлению этими гормонами – тиреотоксикозу.

Заболевание распространено среди женщин, чаще всего оно развивается в среднем возрасте между 30 и 50 годами, но не редко встречается и у подростков. Существует семейная предрасположенность, что привело исследователей к предположению, что в развитии болезни может играть генетический компонент. На данный момент не найдено никакого единого для всех больных диффузным токсическим зобом генетического дефекта, который бы указывал на моногенетическую природу болезни. Предположительно в развитии болезни играет роль сложный комплекс нескольких генов в сочетании с ещё не выявленными факторами внешней среды [22].

Выяснение роли иммунной системы и в частности лимфоцитов в развитии ДТЗ позволило объяснить характерную для этого заболевания лимфопролиферацию в виде лимфоцитоза, лимфаденопатии, увеличения селезенки, а в некоторых случаях и тимуса, а также наличие ассоциированной аутоиммунной патологии.

Как было сказано выше, избыточное количество тиреоидных гормонов вызывает развитие синдрома тиреотоксикоза. Ключевое значение в патогенезе этого синдрома имеет способность тиреоидных гормонов потенцировать активность симпатической нервной системы, что обусловлено повышением плотности адренорецепторов в клетках и возрастанием их чувствительности к катехоламинам – медиаторам симпатаoadреналовой системы.

Симпатомиметический эффект тиреоидных гормонов повышает функциональную активность всех органов и систем организма: активизируются процессы нервной возбудимости и проводимости, учащается частота дыхания, сердечных сокращений, возрастает артериальное давление, увеличивается почечная фильтрации и т.д. Катехоламины имеют короткий период полувыведения, долговременное симпатомиметическое действие тиреоидных гормонов связывают с их эффектами на генном уровне. Гормоны щитовидной железы индуцируют экспрессию генов, регулирующих активность катехоламинобразующих ферментов, а также связываются с ядерными рецепторами в клетке, стимулируя метаболические процессы в митохондриях [23].

1.4 Эхинококкоз печени

Эхинококкоз — гельминтоз из группы цестодозов, характеризующийся образованием в печени паразитарных кист. Возбудителем является личиночная стадия эхинококка *Echinococcus granulosus*. Половозрелая форма имеет длину 2—7 мм. Имеет головку с 4 присосками и двойную корону из 35—40 крючьев, шейку и 2—6 членников. Личиночная стадия, растущая, развивающаяся и живущая в организме человека десятки лет, представлена кистой круглой или овальной формы, заполненной жидкостью. Животные (такие как овцы или коровы) заражаются, поедая траву, в которой могут оказаться яйца эхинококка. Затем, если собака съедает мясо заражённого животного, внутри неё развивается цепень, яйца которого попадают в последствии на траву или же остаются на шерсти.

Эхинококкоз чаще выявляется у лиц среднего возраста. Болезнь в неосложненных случаях протекает годами и может быть выявлена случайно. Это заболевание распространено во многих регионах мира: Австралии, Америке, так же регистрируется на Кавказе, в Крыму, Казахстане и в Западной Сибири [31].

В крови обычно обнаруживается эозинофилия. В цереброспинальной жидкости обнаруживается небольшой плеоцитоз с наличием эозинофилов, небольшое повышение уровня белка, иногда — отдельные части пузыря, янтарная кислота, плеоцитоз в этой жидкости может и отсутствовать.

Эхинококкоз печени встречается часто (50—70 % случаях эхиноккоза). Онкосферы из кишечной стенки с кровотоком портальной системы заносятся в печень, где большинство оседает в мелких капиллярах. Эхинококковые кисты медленно прогрессивно растут и прорываются в паренхиму печени, жёлчные протоки или свободную брюшную полость. Кисты располагаются в правой доле. Наиболее ранний симптом: чувство тяжести и боли в эпигастрии и области правого подреберья. Нагноение пузыря приводит к развитию клинической картины абсцесса печени. При вскрытии абсцесса возможны гнойный плеврит или перитонит. Прорыв абсцесса в жёлчные протоки — причина гноиного холангита. Разрыв неинфицированного пузыря сопровождает комплекс аллергических реакций, вплоть до развития анафилактического шока [32].

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Объектом исследования служили эритроциты и плазма крови 22 пациентов с диффузным токсическим зобом (ДТЗ), до лекарственной терапии. 19 – с патологией рак желудка до операции и 30 пациентов с эхинококкозом (противопаразитарная терапия не проводилась). Контрольная группа включала 48 условно здоровых человек.

Кровь забиралась из локтевой вены натощак в вакутейнеры с гепарином в лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, лаборатории клинической пактофизиологии и аллергологии ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера», клинической лаборатории Краевой больницы №1.

Кровь центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. Плазму осторожно отбирали и сохраняли до проведения исследования при температуре -20⁰С. Эритроциты трижды отмывали от следов плазмы крови, суспендируя с 0,9%-ным раствором NaCl и центрифугируя при 3000 об/мин (температура 4⁰С) в течение 10 мин. Последнее центрифугирование осуществляли в течение 20 мин для более плотной упаковки эритроцитов.

Таблица 2 – Возрастные категории контрольной группы людей

	20-44 лет	44-60 лет	60-75 лет	75-90 лет
обследуемые	31	9	5	3

Классификация возраста согласно ВОЗ от 2015 г: 25-44 лет – молодой возраст, 44-60 лет - средний возраст, 60-75 лет – пожилой возраст, 75-90 лет – старческий возраст.

2.2 Определение содержания мочевой кислоты в плазме крови

Мочевую кислоту определяли с помощью специального набора реагентов «ВИТАЛ» для определения концентрации мочевой кислоты в биологических жидкостях энзиматическим колориметрическим методом.

Принцип метода. Содержащаяся в пробе мочевая кислота окисляется под действием фермента уриказы с образованием перекиси водорода. В присутствии пероксидазы перекись водорода окисляет хромогены с образование окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации мочевой кислоты в пробе.

Реактивы:

1. Реагент №1- фосфат (150 ммоль/л); 3,5-дихлоро-2-фенолсульфонат (2,5ммоль/л).
2. Реагент №2- 4-аминоантипирин (0,25ммоль/л); уриказа (300 ед/л); аскорбатоксидаза (250ед/л); пероксидаза (250 ед/л).
3. Рабочий реагент. Содержимое флакона с Реагентом №2 аккуратно перемешивали и растворяли в буферном растворе Реагента №1. Для получения оптимальных результатов рабочий реагент выдерживали при комнатной температуре 5-10 мин.
4. Калибратор – мочевая кислота (357 мкмоль/л).

Ход определения.

В опытную, калибровочную и холостую пробы наливали по 2,0 мл рабочего реагента. Далее, в опытную пробу вносили 0,05 мл плазмы крови. В калибровочную – 0,05 мл стандартного раствора мочевой кислоты (калибратор), в холостую – 0,05 мл дистиллированной воды.

Пробы тщательно перемешивали и инкубировали 5 минут в термостате, либо 7 минут при 25°C. Оптическую плотность опытной и калибровочной пробы измеряли против холостой пробы в кюветах 1,0 см при длине волны 520 нм.

Расчетная формула:

$$C = \frac{E_{on}}{E_{\kappa}} \cdot 357 \text{ мкмоль / л}, \text{ где} \quad (1)$$

C – концентрация мочевой кислоты в мкмоль/л; E_{on} – оптическая плотность опытной пробы; E_{κ} – оптическая плотность калибратора; 357 мкмоль/л – концентрация мочевой кислоты в калибраторе.

2.3 Определение содержания мочевой кислоты в эритроцитах

Для определения мочевой кислоты в эритроцитах в пробирку вносили 0,1 мл упакованных эритроцитов, 0,4 мл 0,9%-ного раствора NaCl и 0,5 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты. Пробу аккуратно перемешивали, затем центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Супернатант осторожно отбирали и использовали для определения содержания мочевой кислоты, далее следуя методике, представленной в разделе 2.2

Расчетная формула:

$$C = \frac{E_{on} \cdot C_{\kappa} \cdot f}{E_{\kappa} \cdot Hb}, \text{ где} \quad (2)$$

C – концентрация мочевой кислоты в мкмоль /г Hb; E_{on} – оптическая плотность опытной пробы; C_{κ} – концентрация калибратора; f – фактор разведения пробы; E_{κ} – оптическая плотность калибратора; Hb – гемоглобин (г/л).

2.4 Определение содержания аскорбиновой кислоты в эритроцитах и плазме крови

Для количественных определений аскорбиновой (АК), дегидроаскорбиновой (ДАК) и дикетогулоновой кислот (ДКГК) использовали метод J.H. Roe., C.A. Kuether (1943) в модификации В.В. Соколовского с соавторстве [33].

Принцип метода: определение основано на образовании окрашенных в красный цвет азазонов при взаимодействии ДАК и ДКГК с 2,4-динитрофенилгидразином в серной кислоте, используемое для фотометрического определения. Для вычисления суммы всех кислот их окисляют 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия. Содержание АК определяют по разности между суммой всех окисленных форм аскорбиновой кислоты и содержанием ДАК и ДКГК.

Реактивы:

1. 5% - ный раствор ТХУ.
2. 85%- ный раствор H_2SO_4 .
3. 0,9% - ный раствор $NaCl$.
4. 9 н H_2SO_4
5. 2%-ный раствор 2,4-динитрофенилгидразина (2,4-ДФГ) – в который входит 0,5 г 2,4-ДФГ, 0,0625 г тиомочивины, навески растворить в 25 мл 9 н H_2SO_4 .
6. 0,001 н раствора 2,6-ДХФФН (2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия или краска Тильманса).
7. Стандартный раствор аскорбиновой кислоты. Навеску аскорбиновой кислоты 200 мг растворяют в 10 мл 5%-ной ТХУ (основной стандартный раствор). Для приготовления рабочего стандартного раствора аскорбиновой кислоты (2 мг%-ный) к 0,005 мл основного раствора приливают 4,995 мл 5%-ной ТХУ.

Ход определения.

В две пробирки вносили по 0,25 мл упакованных и отмытых от плазмы эритроцитов / (0,25 мл плазмы), 0,75 мл 0,9%-ного $NaCl$ и 1 мл 5%-ной ТХУ. Содержимое пробирок перемешивали, затем центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Далее, в две чистые пробирки вносили по 1 мл супернатанта. В одну из пробирок с супернатантом по каплям добавляли 0,001 н раствор 2,6-ДХФФН до появления слабо-розового окрашивания, устойчивого в течение 30 с. Затем в каждую пробирку вносили по 0,25 мл

2%-ного раствора 2,4-ДФГ. Пробы инкубировали в течение 10 мин при температуре 100°C. Затем помещали пробирки в ледяную баню и добавляли по 1,25 мл 85%-ного раствора H₂SO₄.

Параллельно опытным пробам готовили холостую пробу: в пробирку добавляли 1 мл дистиллированной воды, затем вносили 0,25 мл раствора 2,4-ДФГ и 1,25 мл 85% серной кислоты.

Пробы тщательно перемешивали, инкубировали 60 мин при 18-25°C и измеряли оптическую плотность опытных проб против холостой пробы при длине волны 540 нм.

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

Концентрацию кислот рассчитывали по формулам (3) и (4). Сначала находли концентрацию всех кислот, выраженную в мг%, затем – концентрацию окисленных форм аскорбата в мг% и далее определяли концентрацию АК.

$$C = \frac{E_1 \cdot 2}{E_2}, \text{ где} \quad (3)$$

C – концентрация кислот, мг%; 2 – концентрация стандартного раствора аскорбиновой кислоты, мг%; E₁ – оптическая плотность опытной пробы; E₂ – оптическая плотность стандартного раствора аскорбата.

$$C_{\text{ммоль/л}} = \frac{C_{\text{мг%}} \cdot 10000}{176}, \text{ где} \quad (4)$$

C_{ммоль/л} – концентрации кислот, ммоль/л; C_{мг%} – концентрация кислот, мг%; 10000 – коэффициент, учитывающий перевод мг% в граммы и объем исследуемого образца; 176 – молекулярная масса аскорбата (г/моль); Hb – концентрация гемоглобина (г/л).

2.5 Определение содержания гемоглобина

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

Реагенты:

1. Трансформирующий реагент – сухая смесь (натрий углекислый, 1,0 г; калий железосинеродистый, 200 мг).
2. Ацетонциангидрин
3. Калибровочный раствор гемоглобина с концентрацией 120 г/л.

Ход работы

Готовят гемолизат (упакованные эритроциты разводят охлажденной дистиллированной водой в отношении 1:2). Затем к 5 мл трансформирующего раствора добавляют 0,02 мл гемолизата, хорошо перемешать. Определение проводят при 540 нм в кювете с толщиной слоя 1 см через 10 минут против трансформирующего раствора.

Расчетная формула:

$$Hb(\text{г/л}) = \frac{D_o}{D_k} \cdot 120, \text{ где} \quad (5)$$

Hb – содержание гемоглобина в опытной пробе, г/л; D_o – оптическая плотность опытной пробы; D_k – оптическая плотность калибровочной пробы; 120 – содержание гемоглобина в калибровочном растворе, г/л. [34]

2.6 Статистическая обработка результатов

По результатам исследований была сформирована база данных, на основе которой производился статистический анализ. Для всех данных были рассчитаны среднее арифметическое, квадратичное отклонение и отклонение от среднего с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0. Проверку гипотезы о статистической достоверности двух выборок проводили с помощью критерия Стьюдента.

3 Результаты и их обсуждения

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

Список сокращений

АК – аскорбиновая кислота

АО – антиоксиданты

АОА – антиоксидантная активность

АОЗ – антиоксидантная защита

АОС – антиоксидантная система

АФК – активные формы кислорода

ГПО – глутатионпероксидаза

ДАК – дегидроаскорбиновая кислота

ДКГК – дикетогулоновая кислота

ДТЗ – диффузный токсический зоб

МК – мочевая кислота

НО[•] – гидроксильный радикал

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СОД – супероксидный радикал

¹O₂[•] – синглетный кислород

H₂O₂ – перекись водорода

Список используемых источников

1. Подколзин, А.А. Система антиоксидантной защиты и старения / А.А. Подколзин и [др.] // профилактика старения. – 2000. – Т. 61, №2. –вып. 3. – С.14–23.
2. Чанчаева, Е.А. Современное представление об антиоксидантной системе организма человека / Е.А. Чанчаева , Р.И. Айзман, А.Д. Герасев // Экология человека. – 2013. – №7. – С. 50-54.
3. Вавилова, Т.П. Роль церулоплазмина при развитии неопластических процессов / Т.П. Вавилова и [др.] // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, вып. 3. – С. 263-275.
4. Мошков, К.А. Церулоплазмин: внутримолекулярный перенос электронов и ферроксидазная активность / К.А. Мошков и [др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – №3. – вып.1. – С.104 – 107.
5. Артамошена, Н.Е. Активность антиоксидантной системы церулоплазмина / Н.Е. Артамошена, О.В. Белая // Трансферин в плазме крови больных ишемической болезнью сердца: постинфарктным кардиосклерозом с дислипидемией, материалы конференции. – 2008. – Т.7, № 6-S1
6. Пашина, Е.В. Альбумин в оценке эндогенной интоксикации / Е.В. Пашина, М.Л. Золотавина // наука и современность. – 2014. – №33. – С. 23-28.
7. Белова, С.В. Церулоплазмин – структура, физико-химические и функциональные свойства / С.В. Белова, Е.В. Крякина // Успехи современной биологии. –2010. – Т.130, № 2. – С.180-189.
8. Латюшин, Я. В. Влияние церулоплазмина на динамику перекисного окисления липидов и активность антиоксидантной системы в ткани тимуса при гипокинетическом стрессе / Я. В Латюшин и [др.] //Вестник Южно-Уральского государственного университета. – 2014. – Т.14, №1. – С.30-33.
9. Галунска, Б. Двуликий янус биохимии: мочевая кислота- оксидант или антиоксидант? / Б. Галунска, Д. Паскалев // Нефрология. – 2004. – Т.8, №4. – С.25-30.

10. Донцов, В.И. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / В.И. Донцов, В.Н. Крутько // Труды ИСЫ РАН. – 2006. – Т.19. – С.50-65.
11. Никитина, А.Ф. Антиоксидантная система зрительного анализатора и антиоксиданты, применяемые в офтальмологии / А.Ф. Никитина, Д.К. Абсаликова, Н.А. Никитин // ГУ «Уфимский НИИ глазных болезней» АН РБ. – 2011. – С. 536.
- 12 Cancer. World Health Organization (February 2011). .
13. Parkin DM. Global cancer statistics / DM Parkin, Bray F, Ferlay J, Pisani P // CA Cancer J Clin. – 2002. – Р.74-108.
14. Давыдов, М. И. Хирургическое лечение рака проксимального отдела желудка: эволюция стандартов / М. И.Давыдов, М. Д. Тер-Ованесов, И. С. Стилиди // Онкология .
15. Сельчук, В.Ю. Рак желудка / В.Ю Сельчук, М.П. Никулин // "РМЖ". – 2003. – №26. – С.1441.
16. Stomach cancer symptoms [Электронный ресурс] : Cancer Research UK : CancerHelp UK . – Режим доступа: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/stomach-cancer/symptoms>.
17. Hatakeyama M. Higashi H. Helicobacter pylori CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis/ М. Hatakeyama, H. Higashi // Cancer Science. – 2005. — Р. 835—843.
18. Исаков В. А. Диагностика и лечение инфекции, вызванной *Helicobacter pylori*: IV Маастрихтское соглашение / В. А. Исаков. // Best Clinical Practice. – 2012. – вып.2. – С.4-23.
19. Циммерман Я.С. Проблема растущей резистентности микроорганизмов к антибактериальной терапии и перспективы эрадикации *Helicobacter pylori*-инфекции / В кн.: Нерешенные и спорные проблемы современной гастроэнтерологии / Я.С. Циммерман. – 2013. – С.147-166.
20. Malfertheiner P. Диагностика и лечение инфекции *Helicobacter pylori* / P. Malfertheiner // Вестник практического врача. – 2012. –вып.1. – С. 6-22.
22. Старкова Н. Т. Клиническая эндокринологи: Руководство «Спутник Врача» / Н. Т. Старкова. — Санкт-Петербург . – 2002. – издание 3.— С.576.

23. Дифузный токсический зоб: современные представления и анализ клинического случая: учебное пособие / Л.М. Фархутдинова [и др.]. – Уфа: ГБУ ВПО БГМУ Минздрава России. – 2015. – С. 92.
24. Тимирханова Г. А., Абдуллина Г. М., Кулагина И. Г. Витамин с: классические представления и новые факты о механизмах биологического действия/ Г. А. Тимирханова, Г. М. Абдуллина и др. // Вятский медицинский вестник. - 2007. – №4. – С. 158-160
25. Меньщикова, Е. Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислильных процессов / Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков // Ин-т общ. пат. и экол. чел-ка СО РАМН. Успехи современной биологии. – 1993. – Т.113. – № 4. – С. 442-445.
26. Bhattacharyya A., Chattopadhyay R. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases / A. Bhattacharyya, R. Chattopadhyay and etc // Physiol Rev 94.- 2014. – P. 329 – 334.
27. Bhattacharya S, Mathew G, Jayne DG, Pelengaris S, Khan M. 15-Lipoxygenase-1 in colorectal cancer: a review. Tumour Biol 30. – 2009. – P.85–199.
28. Rose, R. C.: Transport of ascorbic acid and other watersoluble vitamins. Biochim Biophys Acta 947 - 1988. – P. 66 – 75.
29. Hughes, R. E. & S. C. Maton: The passage of vitamin C across the erythrocyte membrane. Brit J Haematol 14. –1968. – P.247-53.
30. James M. May ASCORBATE FUNCTION AND METABOLISM IN THE HUMAN ERYTHROCYTE / M. May James // Frontiers in Bioscience. – 1998. – №2. – P.1-5
31. Сороченко Е.В. Пути распространения эхинококкоза среди конкретного населения / Е.В. Сороченко // Вопросы медицинской географии Севера Европейско части СССР : тез. док. науч. конф. – Апатиты, 1972. – С. 49-52.
32. Быков В. П., Голованов Е. С. Эхинококкоз как природно-очаговая патология / В. П. Быков, Е. С. Голованов// Экология человека. –2006. – №4. – С.3-4.
33. Диагностика и лечение окислительного стресса при остром панкреатите / Д. В. Черданцев, Ю. С. Винник, Э. В. Каспаров, Н. М. Титова. – Красноярск :

АРТЭ, 2002. – 148 с.

34. Оценка структурно-функционального состояния клетки : метод. Указания к практическим занятиям / сост.: Н.М. Титова, Т.Н. Замай, Т.Н. Субботина, А.А. Савченко. – Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – 11 с.
35. Медицинские лабораторные технологии медицинская диагностика: Справочник. Медицинские лабораторные технологии / Под ред. проф. А.И. Карпищенко. – Санкт-Петербург: Интермедика, 1999 – 656 с.
36. Kandar r., stramova x., drabkova p. A monitoring of allantoin, uric acid, and malondialdehyde levels in plasma and erythrocytes after ten minutes of running activity / r. Kandar, x. Stramova, p. Drabkova // Physiological research. – 2013. - №63. - 753-762p.
37. Jamaati H. R., Pajouh P., Nayeb M. Ascorbic Acid Concentration in Plasma and White Blood Cells of Patients with Bronchial Asthma / H. R. Jamaati, P. Pajouh, M. Nayeb // National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease. – 2006.- 31-35p.
38. Бочкарева Н. В., Коломиец Л. А. Клинико-диагностическое значение определения антиоксидантных характеристик биологических жидкостей при диспластических изменениях слизистой оболочки и раке желудка/ Н. В. Бочкарева, Л. А. Коломиец // Сибирский онкологический журнал. - 2002. - №2.
39. Фархутдинова Л. М., Аллабердина Д. У Диффузный токсический зоб: современные представления и анализ клинического случая / Л. М. Фархутдинова, Д. Аллабердина // Медицинский вестник Башкортостана.- 2011. - №5. – С. 130-136
40. Montel-Hagen A., Kine S., Manel N. Erythrocyte Glut1 Triggers Dehydroascorbic Acid Uptake in Mammals Unable to Synthesize Vitamin C / A. Montel-Hagen, S. Kine, N. Manel // Journal CELL.: 2008.- № 132.- 1032 p.
41. Wohlrab K., Phillip E. Vitamin C Transporters in Cancer: Current Understanding and Gaps in Knowledge / K. Wohlrab, E.Phillip // Journal Frontiers in Oncology.: 2017. - №7. – 1-5p.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ


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

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Анализ антиоксидантного потенциала крови при различных патологиях

Руководитель  профессор, к.б.н Н.М. Титова

Выпускник  ББ13-01Б К.А. Кудрявцева

Красноярск 2017