

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Е.И. Шишацкая  
подпись инициалы, фамилия  
« \_\_\_\_\_ » июнь 2019г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Оценка состояния антиоксидантной системы в плазме крови больных раком  
прямой кишки

06.04.01 – Биология

06.04.01.05 – магистерская программа «Реконструктивная биоинженерия»

Руководитель	_____	доцент, канд. биол. наук	Н.М. Титова
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		К.А. Кудрявцева
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	профессор, д-р мед.наук	Л.М. Куртасова
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Реферат.....</b>	<b>4</b>
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Активные формы кислорода и их характеристика.....	7
1.2 Клеточная антиоксидантная система и АОС плазмы крови.....	9
1.2.1 Белки с антиоксидантными свойствами	13
1.2.2 Характеристика неферментативных антиоксидантов	16
1.2.3 Характеристика ферментативных антиоксидантов	17
1.3 Колоректальный рак.....	21
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	23
2.1 Объект исследования.....	23
2.2 Определение содержания диеновых конъюгатов.....	23
2.3 Определение содержания малонового диальдегида.....	24
2.4 Определение активности супероксиддисмутазы.....	26
2.5 Определения содержания церулоплазмينا.....	27
2.6 Определение содержания сывороточного альбумина.....	28
2.7 Определение содержания восстановленного глутатиона.....	29
2.8 Определение активности глутатион-S-трансферазы.....	31
2.9 Определение активности глутатионпероксидазы.....	32
2.10 Определение содержания общего белка.....	34
2.11 Статистическая обработка результатов.....	35
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ.....	36
3.1 Оценка уровня диеновых конъюгат и малонового дильдегида в плазме крови общей группы больных раком прямой кишки	36

3.2 Оценка уровня белков-антиоксидантов в плазме общей группы больных раком прямой кишки	37
3.3 Оценка состояние глутатионового звена в общей группе больных раком прямой кишки	39
3.4 Оценка уровня продуктов ПОЛ в плазме крови больных раком прямой кишки в зависимости от стадии заболевания	41
3.5 Оценка уровня белков-антиоксидантов в плазме крови больных раком прямой кишки в зависимости от стадий заболевания	43
3.6 Оценка состояние глутатионового звена у больных раком прямой кишки в зависимости от стадии заболевания	45
3.7 Подсчет коэффициента окислительного стресса для больных раком прямой кишки	46
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	49

## Реферат

Магистерская диссертация выполнена по теме «Оценка состояния антиоксидантной системы в плазме крови больных раком прямой кишки» содержит 54 страниц текстового документа, 5 иллюстраций, 12 расчётных формул, 12 таблиц и 57 источников литературы.

АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА, ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ, НЕФЕРМЕНТАТИВНЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ, БЕЛКИ С АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ, РАК ПРЯМОЙ КИШКИ

Объект - плазма крови: 70 условно здоровых доноров, без диагностированного опухолевого процесса и выраженной соматической патологии и 50 пациентов больных раком прямой кишки

Цель - оценка антиоксидантного потенциала в плазме крови у больных раком прямой кишки на разных стадиях заболевания.

Задачи

- 1) Определить уровень ДК и МДА в плазме крови больных раком прямой кишки до и после лечения
- 2) Исследовать состояние АОС в плазме крови больных раком прямой кишки до и после лечения
- 3) Изучить уровень ДК и МДА в плазме крови больных раком прямой кишки в зависимости от стадий заболевания
- 4) Исследовать состояние АОС в плазме крови больных раком прямой кишки в зависимости от стадий заболевания

Результаты проведенного исследования демонстрируют, что у больных как до, так и после лечения интенсивно протекают процессы перекисного окисления липидов с одновременным угнетением в целом состояния антиоксидантной системы плазмы крови. Выраженность изменений свободнорадикальных процессов и активности АОС более значимо у больных раком прямой кишки до лечения.

## **ВВЕДЕНИЕ**

Во всех аэробных организмах в процессе их жизнедеятельности постоянно образуются активные формы кислорода (АФК), которые, 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 заболеваний.

Как известно, развитие опухолевого процесса ведет к появлению нарушений в системе гемостаза больного. Все методы лечения онкологических заболеваний (хирургический, химиотерапевтический, лучевой) способствуют углублению этих нарушений[5,53]. Следовательно, больные со злокачественными новообразованиями испытывают двойную оксидантную нагрузку, обусловленную опухолевым процессом и противоопухолевым лечением. Это приводит к повреждению большого количества клеток, вызывает структурные и метаболические нарушения и обуславливает развитие выраженных местных и системных токсических реакций. Повреждение иммунокомпетентных клеток приводит к развитию вторичного иммунодефицита, который, в свою очередь, ухудшает переносимость лечения и качество жизни больных. Поэтому онкологические больные нуждаются в особенно активном изучении окислительно-восстановительного баланса в организме.

В данном исследовании проводилась оценка состояния про- и антиоксидантной системы организма больных раком прямой кишки, оценивался уровень ферментативных, неферментативных и белковых антиоксидантов, а также был выявлен уровень малонового диальдегида (МДА), до и после лечения онкобольных.

Цель данной работы заключалась в оценке антиоксидантного потенциала в плазме крови у больных раком прямой кишки до и после лечения, а также в зависимости от стадий заболевания.

Задачи исследования

1) Определить уровень ДК и МДА в плазме крови больных раком прямой кишки до и после лечения

2) Исследовать состояние АОС в плазме крови больных раком прямой кишки до и после лечения

3) Изучить уровень ДК и МДА в плазме крови больных раком прямой кишки в зависимости от стадий заболевания

4) Исследовать состояние АОС в плазме крови больных раком прямой кишки в зависимости от стадий заболевания

Работа выполнена на базе кафедры медицинской биологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета и лаборатории ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» и является частью комплексных исследований состояний антиоксидантной системы у больных раком прямой кишки.

# 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 ферментативные реакции, а находится в виде АФК [1].

Важнейшими АФК считаются: супероксидный радикал  $O_2^{\cdot-}$ , синглетный кислород  $^1O_2$ , гидроксильный  $\cdot OH$  и пероксидный  $HO_2^{\cdot}$  радикалы, перекись водорода  $H_2O_2$ , пероксидный ион  $HO_2^-$ , гипохлорит  $HOCl$ . При снижении эффективности антиоксидантных систем организма АФК могут оказывать повреждающее воздействие на клетки и вызывать различные заболевания [2].

АФК генерируются в ходе различных процессов в организме. Синглетный кислород ( $^1O_2$ ) образуется и в реакциях фотоокисления в присутствии фотосенсибилизаторов: флавины, гематопорфирин и др., а также при дисмутации супероксидных 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 супероксидный 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  $O_2^{\cdot-}$  являются ферментные системы:

NADPH-оксидаза фагоцитирующих клеток; ксантинооксидаза, митохондриальная цитохром С-оксидаза и микросомальные моно-оксигеназы [2].

Гидроперекисный радикал  $HO_2^{\cdot}$  реагирует с линолевой, линоленовой, арахидоновой кислотами, окисляя их до гидроперекисей. Образованию  $HO_2^{\cdot}$  радикала способствует закисление среды, он также свободно проникает через биомембраны, 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 [4].

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

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

Вторичные радикалы

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

Дисмутация –  $O_2$  анион-радикалов под действием супероксиддисмутазы (СОД) в биологических тканях ведет к образованию перекиси водорода  $H_2O_2$ , способной легко проникать через мембраны 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  $\cdot OH$  [3].

## **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.) [5].

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 [6].

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 прооксидантно-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, характеризуется наличием антиоксидантных ферментов и низкомолекулярных биоантиоксидантов и присутствует не только в плазме крови, но и в межклеточной, спинномозговой, синовиальной жидкостях и лимфе [6].

Низкомолекулярные антиоксиданты – их действие 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 в сравнении с их защитным действием. К ним относят жирорастворимые (токоферолы, каротиноиды, убихинон) и водорастворимые (аскорбиновая кислота, глутатион, тиоредоксин, билирубин, ураты). Классификация АО приведена на рис.1.

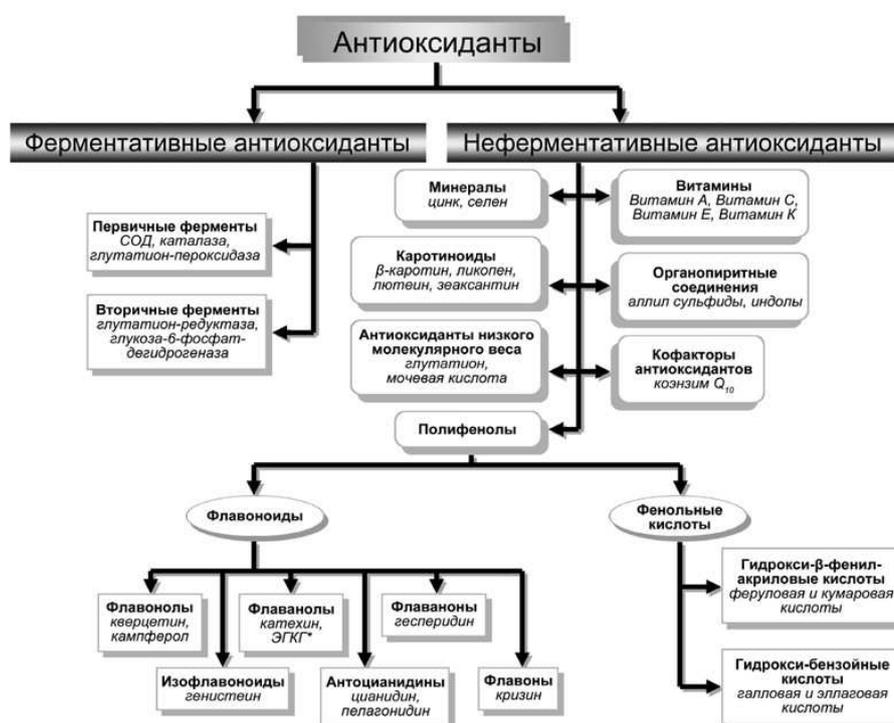


Рисунок 1 - Классификация антиоксидантов [5]

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.

В плазме крови АО представлены как ферментными, так и неферментными субстанциями. Так, в состав плазмы крови относятся

экстрацеллюлярная СОД, каталаза и ГПО, церулоплазмин, трансферрин, лактоферрин, ферритин, гаптоглобин и гемопексин (белок, связывающий) – это ферментативные антиоксиданты. 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 [5].

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

Компоненты АОС работают в комплексе: ферментативная АОС осуществляет обезвреживание  $O_2^{\cdot-}$  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, так как неспецифически связывает  $Cu^{2+}$ , 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 [6].

### *1.2.1 Белки с антиоксидантными свойствами*

Действию свободнорадикального окисления противостоит многокомпонентная антиоксидантная система организма, в которую входят белки плазмы крови, обладающие антиоксидантными свойствами. В плазме крови церулоплазмин и альбумин – два основных белка антиоксиданта. Ключевое место среди них принадлежит сывороточному альбумину человека (САЧ). Этот белок взаимодействует со свободными радикалами, претерпевая окислительную модификацию. Окислительная модификация альбумина приводит к потере или полному исчезновению его функциональной активности, но при этом приобретает новые свойства. Также окислительно-модифицированный альбумин может служить эффективным маркером.

Сывороточный альбумин синтезируется в печени и составляет большую часть среди всех сывороточных белков. Альбумин, содержащийся в крови человека, называется человеческий сывороточный альбумин, он составляет около 55 % от всех белков, содержащихся в плазме крови. Поскольку концентрация альбумина высока, а размеры его молекулы невелики, этот белок на 80 % определяет коллоидно-осмотическое давление плазмы. Нормальный уровень сывороточного альбумина у взрослых составляет от 32 до 50 г/л. Низкий уровень альбумина (гипоальбуминемия) может возникать из-за болезни печени, нефротического синдрома, ожогов, энтеропатии с потерей белка, недоедания, на поздних сроках беременности, злокачественных новообразований [10].

Развитие злокачественных новообразований вызывает специфические изменения в составе белков крови. Это характеризуется состоянием выраженной гипопроteinемии, обусловленной нарушением синтезирующей функции печени. А также расходом альбумина в качестве пластического материала опухолевой ткани, нарушением питания, потерями белков при

образовании экссудатов, ускоренном катаболизме. Поэтому определение содержания общего белка и альбумина в сыворотке крови является обязательным в динамическом наблюдении онкологических больных [3,12].

Однако нормальная концентрация альбумина далеко не всегда означает его нормальное функционирование. Белок, у которого первичная структура вполне нормальна, но нарушена вторичная и/или третичная структура, не может эффективно выполнять свою транспортную функцию [5, 10].

Церулоплазми (ЦП) — медьсодержащая оксидаза (КФ.1.16.3.1), относящаяся к альфа-2-глобулиновой фракции плазмы крови человека, — впервые описан в 1944 г. и выделен в чистом виде в 1951 г [7].

ЦП – единичная полипептидная цепь, 1046 аминокислотных остатков, высокомолекулярный белок с  $M_r = 132$  кДа. Молекула содержит 6 доменов, образующих тригональную структуру, и 6 ионов Cu. По структурному сходству домены разделяются на две группы: нечетные домены 1,3 и 5 и четные домены ,4 и 6.

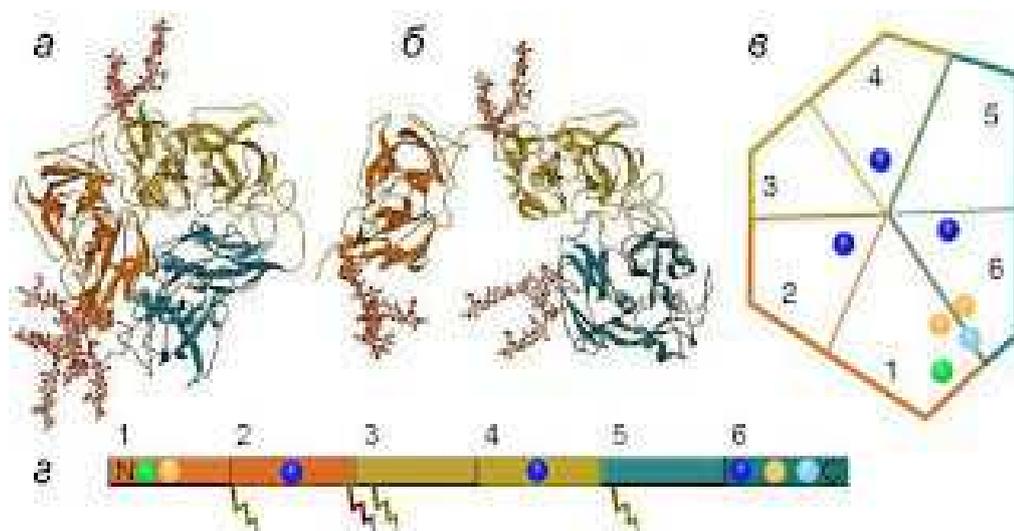


Рисунок 2 – Модели холо-ЦП (а) и апо-ЦП (б) [8]

Представлена изоформа II, в которой домены выделены цветами: 1 и 2 – оранжевым, 3 и 4 – желтым, 5 и 6 – синим. в, г. Схема распределения ионов меди I (синие), II (голубой) и III типа (желтые) и иона кальция (зеленый) между доменами в проекции на молекулу ЦП (в) и по длине полипептидной цепи (г). Углеводные цепи обозначены зигзагами, в изоформе II отсутствует

углеводная цепь в конце 2 домена. Центры T1Cu и T3Cu сближены друг с другом, образуя триядерный кластер.

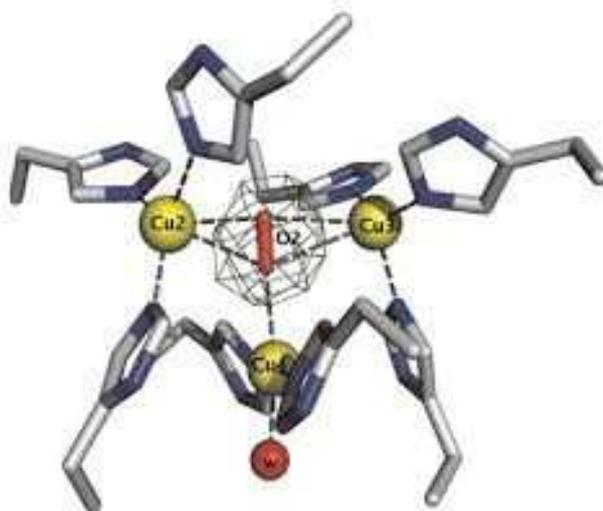


Рисунок 3 – Триядерный кластер в церулоплазмине между доменами 1 и 6 [8]

Углеводный компонент ЦП, на долю которого приходится 2–8% массы молекулы, представлен девятью олигосахаридными цепями, содержащими глюкозамин, лактозу, мальтозу, фукозу и сиаловые кислоты.

Церулоплазмин синтезируется в печени гепатоцитами на мембраносвязанных полисомах в виде простой полипептидной цепи. У взрослых ЦП еще может вырабатываться в моноцитах, синтез индуцируется гамма-интерфероном [7]. ЦП, подобно другим медьсодержащим белкам, способен участвовать в окислительно-восстановительных реакциях, причем в последние годы важнейшей физиологической функцией ЦП считается именно антиоксидантная функция.

Среди многообразных функций ЦП следует выделить ряд наиболее существенных: ЦП является медной оксидазой, обеспечивающей поддержание уровня меди в тканях; феррооксидазой, мобилизующей сывороточное железо для кроветворения; одним из гликопротеинов “острой фазы”, эндогенным модулятором воспалительного ответа; одним из наиболее значимых ферментных антиоксидантов сыворотки крови.

1. Транспорт меди - ЦП обеспечивает поддержание её уровня в тканях, особенно в печени, способствуя специфическому переносу ионов меди от печени к клеткам других тканей, тем самым поддерживая гомеостаз меди, так же способствует нормальному внутриклеточному транспорту меди.

2. Ферроксидазная функция ЦП – заключается в мобилизации сывороточного железа для кроветворения. Эта функция зависит от особенностей состояния структуры молекулы ЦП и изменяется вследствие изменения активных центров. В плазме крови человека ЦП окисляет двухвалентное железо до – трехвалентного железа. Образующееся трехвалентное железо встраивается в молекулу апотрансферрина. Таким образом Ферроксидазная активность обеспечивает насыщения железом трансферрина, который который транспортирует железо в костный мозг, где происходит синтез гема. ЦП усиливает связывание ионов железа с трансферрином, а при его избытке в сыворотке и с ферритином, принимая тем самым участие в утилизации железа, ЦП способствует кроветворению.

3. ЦП способен «перехватывать» свободные супероксидные радикалы. Он ингибирует активированные процессы перекисного окисления липидов, также предотвращает окисление липидов клеточных мембран. Церулоплазмин играет роль ингибитора, на ряде этапов образования активированных кислородных метаболитов, принимая участие в удалении токсичных свободных радикалов супероксиданиона; ингибируя образование стабильной перекиси водорода, не инактивируемой основным клеточным антиоксидантным ферментом – супероксиддисмутазой [9,11].

### *1.2.2 Характеристика неферментативных антиоксидантов*

Восстановленный глутатион (GSH) – низкомолекулярный тиол, преобладающий (90–95 %) во многих растительных, микробных и во всех животных клетках, в которых его молярная концентрация (1–10 мМ) выше, чем концентрация большинства органических веществ [27]. Его прямая

функция – разрушение свободных радикалов. Является трипептидом (L-гамма-глутамил-L-цистеинилглицин), биосинтез и катаболизм которого описываются так называемым глутамильным циклом. Глутатион в восстановленной форме, может функционировать как антиоксидант многими способами: химически взаимодействовать с синглетным кислородом, супероксидом и радикалами гидроксила или на прямую разрушать свободные радикалы; стабилизировать мембранную структуру перемещением ацилпероксидов, образующихся путем перекисного окисления липидов (ПОЛ). GSH является коферментом ряда ферментов, активность которых основана на изменении редокс-потенциала глутатиона. Активность глутатионпероксидазы (GPO) и скорость утилизации перекиси водорода напрямую зависят от концентрации восстановленного глутатиона в клетке. Конъюгирование ксенобиотиков и удаление пероксидов липидов клеточных мембран, осуществляемое глутатион S-трансферазой (GST), не происходит без GSH»[8].

Главный орган синтеза глутатиона у млекопитающих – печень, которая обеспечивает около 90 % всего циркулирующего глутатиона при физиологических условиях [14]. Уровень глутатиона в печени уменьшается приблизительно в 2 раза при голодании и быстро увеличивается после еды. Поступление глутатиона из печени в плазму крови и желчь стимулируется некоторыми гормонами, в частности глюкагоном и вазопрессином [19]. Утилизируется глутатион плазмы тканями организма путем транспорта через клеточные мембраны и ресинтеза внутри клетки посредством глутамильного цикла [14,27].

### *1.2.3 Характеристика ферментативных антиоксидантов*

Супероксиддисмутаза – один из основных ферментов антиоксидантной системы. Представляет собой группу металлоферментов, катализирующих реакцию дисмутации супероксидных анион-радикалов, поддерживая их

концентрацию в клетке на низком уровне, и уменьшают вероятность образования еще более активного синглетного кислорода. В зависимости от иона металла в активном центре фермента различают несколько изоферментов СОД, среди которых наибольшей активностью обладает Cu-, Zn- СОД. В организме человека существует три типа СОД. СОД1 находится в цитоплазме, СОД2 — в митохондриях, а СОД3 — это внеклеточная (экстраклеточная) форма. Первая форма — димерная, тогда как вторая и третья формы — тетрамерные (состоящие из 4 равных субъединиц). СОД1 и СОД3 содержат медь в активном центре и цинк как структурный компонент, а СОД2 содержит марганец в активном центре. Гены этих форм локализованы соответственно в хромосомах 21, 6 и 4 (21q22.1, 6q25.3 и 4p15.3-p15.1). Цитозольная СОД1 является небольшим белком с молекулярной массой 32,5 кДа, молекулярная масса митохондриальной СОД2 — около 86-88 кДа. Экстраклеточная СОД3 представляет собой самую крупную супероксиддисмутазу, молекулярная масса — 135 кДа [37].

Супероксиддисмутазы обладают узкой субстратной специфичностью, действие их направлено только на полувосстановленную молекулу кислорода. СОД может взаимодействовать также с пероксидом водорода и выступать в качестве прооксиданта, инициируя образование радикалов - супероксида и гидроксила:



Неорганические перекиси ингибируют СОД, необратимо восстанавливая медь в составе её активного центра. В отличие от неорганических липидные перекиси обратимо ингибируют СОД. Эффективным ингибитором фермента является гидроперекись линоленовой кислоты, снижающая её активность в 3,5 раза.

Глутатионпероксидаза (ГПО) – важнейший фермент, обеспечивающий инактивацию активных форм кислорода, так как разрушает и пероксид

водорода и гидропероксида липидов. Он катализирует восстановление пероксидов с помощью трипептида глутатиона ( $\gamma$ -глутамилцистеинилглицин). ГПО – гомотетрамерный селенопротеин, имеет молекулярную массу около 74 кДа, состоит из 4 идентичных субъединиц, в состав активного центра входит селен, который содержится в виде Se-цистеина. Селен необходим для синтеза глутатионпероксидазы [38].

Глутатионпероксидаза обезвреживает не только перекись водорода, но и разные органические липидные пероксиды, которые образуются в организме при активации ПОЛ. Такие как гидропероксиды линолевой и линоленовой кислот, холестерин-7 $\beta$ -гидропероксид и некоторые синтетические вещества (кумен-, трет-бутил-гидропероксиды). Глутатионпероксидаза защищает от окислительной атаки белки, липиды, никотинамидные коферменты, восстанавливает липидные перекиси.

Помимо способности восстанавливать пероксид водорода и гидропероксиды жирных кислот, ГПО обеспечивает защиту аэробных организмов и от чрезвычайно токсичного пероксинитрита путем восстановления его до нитрит-аниона (рис.5).

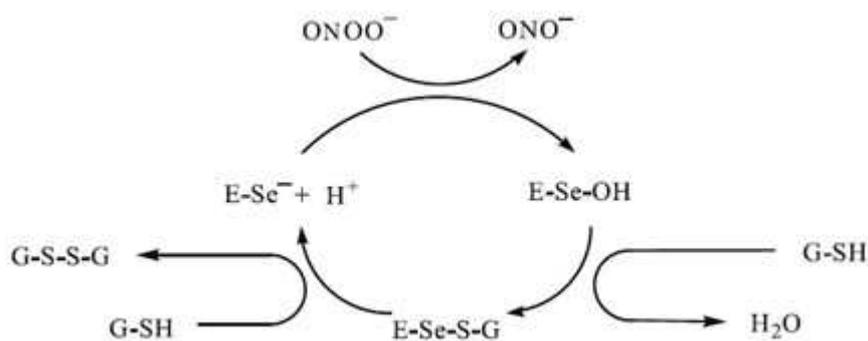


Рисунок 4 – Предполагаемый каталитический механизм восстановления пероксинитрита глутатионпероксидазой [39].

Фермент глутатионпероксидаза локализован в цитозоле в небольших количествах, а также в митохондриях. В тканях млекопитающих максимальная активность глутатионпероксидазы в печени, эритроцитах,

надпочечниках. Активность фермента зависит от количества образованных пероксидов. Функционирует сопряженно с глутатионредуктазой [40,41].

Глутатион-S-трансферазы представлены суперсемейством мультифункциональных изоферментов, которые способствуют процессам детоксикации, используя различные механизмы, включая:

- 1) каталитическую инактивацию широкого спектра ксенобиотиков через конъюгацию с GSH;
- 2) некаталитическое связывание определенных ксенобиотиков;
- 3) восстановление липид- и ДНК-гидропероксидов через экспрессию активности GSH-пероксидазы. Кроме того, глутатион-S-трансферазы изомеризуют некоторые стероиды и простагландины, участвуют в метаболизме других эндогенных веществ. В частности, GST могут вовлекаться в синтез лейкотриенов, поддерживая процесс воспаления.

В отличие от ГПО GST не способна восстанавливать перекись водорода, но подобно мономерной ГПО весьма эффективно восстанавливает гидропероксиацилы мембранных фосфолипидов, а также подобно тетрамерной ГПО восстанавливает свободные гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот, образовавшиеся в результате гидролиза окисленных фосфолипидов фосфолипазой A2. Восстановление гидроперекисей полиеновых жирных кислот как свободных, так и находящихся в структуре мембранных фосфолипидов протекает по схеме:

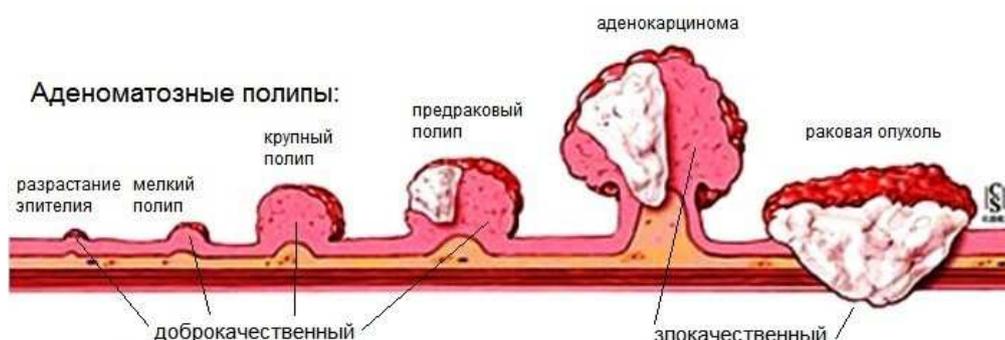


Нестойкое сульфеновое производное глутатиона (G-SOH) способно взаимодействовать еще с одной молекулой глутатиона с образованием дисульфида окисленного глутатиона:



### 1.3 Колоректальный рак

Большинство колоректальных опухолей развиваются длительно, на протяжении многих лет. Все начинается с доброкачественного полипа на слизистой оболочке толстой или прямой кишки. Но не каждый полип впоследствии преобразуется в злокачественную опухоль, все здесь зависит от его типа: аденоматозный полип (аденома) — это как раз те «неблагонадежные» с онкологической точки зрения полипы. Именно поэтому аденому называют предраковым состоянием; гиперпластические и воспалительные полипы — в целом, не имеют тенденции к



озлокачествлению (рис.6)[51].

Рисунок 5 – виды полипов и опухолей [51]

Однако в некоторых источниках гиперпластические полипы также относят к, скажем так, рискованным новообразованиям. Другим предраковым состоянием является дисплазия. Так обозначают область эпителия толстого или прямого кишечника, где клетки под микроскопом выглядят подозрительно: не так, как раковые, но уже и не как нормальные добропорядочные клетки. Дисплазия характерна для лиц, хронически страдающих от язвенного колита или болезни Крона. Со временем хронический воспалительный процесс, в стенке кишечника, вызываемый этими заболеваниями, может привести к необратимым изменениям структуры клетки и вызвать зарождение раковой опухоли [52].

Виды колоректального рака:

Толстая и прямая кишка могут стать местом развития нескольких видов рака. В подавляющем (95%) числе случаев это аденокарцинома. Этот рак начинается в железистых клетках, продуцирующих слизь для смазывания внутренней поверхности кишечника. Когда онкологи говорят о колоректальном раке, то практически всегда речь идет об аденокарциноме. Карциноидная опухоль (формируется из особых гормонпродуцирующих клеток кишечника). Гастроинтестинальная стромальная опухоль (развивается из специальных клеток стенки толстого кишечника, называемых интерстициальными клетками Кахаля). Лимфома (это рак иммунной системы, который обычно начинается в лимфоузлах, но иногда может развиваться также и в прямой и толстой кишке). Саркома (может развиваться в кровеносных сосудах и мышечной стенке толстого и прямого кишечника).

Выделяют четыре стадии рака прямой кишки:

0 стадия — не распространяется дальше слизистой оболочки прямой или толстой кишки. Эта стадия носит название внутриэпителиальный или преинвазивный рак.

I стадия — опухоль прорастает мышечный слой слизистой оболочки и достигает подслизистого слоя, а далее — собственно, мышечного корсета кишки. Лимфоузлы пока остаются незатронутыми.

II стадия — опухоль достигает наружного слоя кишки, а затем и прорастает сквозь него. На финише данной стадии она прорастает в близлежащие органы и ткани (но не регионарные лимфоузлы).

III стадия — в зависимости от направления роста опухоли поражаются регионарные лимфоузлы (до 7) или жировая клетчатка в районе их расположения.

IV стадия — рак распространяется в дистанционно удаленные органы (печень, легкие) и лимфоузлы, а также в дальние участки брюшины [53].

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Объект исследования

Объектом исследования служила плазма крови мужчин и женщин раком прямой кишки, возраст пациентов находился в среднем диапазоне от 40 до 60 лет. Кровь у больных забиралась в день поступления в стационар и на 7-е сутки после операции. Контролем служили показатели крови 70 условно здоровых доноров, без диагностированного опухолевого процесса и выраженной соматической патологии. От каждого пациента было получено подписанное информативное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено Локальными этическими комитетами: ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАН и КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского».

Кровь забиралась из локтевой вены натощак в вакутейнеры с гепарином. Кровь центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин (4°C). Плазму осторожно отбирали и сохраняли до проведения исследования при температуре -20°C.

### 2.2 Определение содержания диеновых конъюгатов

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

*Реактивы:*

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

*Ход определения*

Оценку содержания диеновых конъюгатов проводят в экстрактах эритроцитов, гомогенатах ткани и плазме крови. Для этого липиды экстрагируют стократным избытком смеси растворителей. В гомогенизатор

вносят 0,1 мл упакованных эритроцитов, добавляют 5 мл изопропилового спирта и тщательно растирают до получения гомогенной суспензии. Содержимое гомогенизатора количественно переносят в мерную центрифужную пробирку, в которую затем добавляют 5 мл гептана.

Экстракт центрифугируют в течение 10 минут при 1700 г. Надосадочную фракцию переносят в градуированную пробирку и добавляют 1/5 объема раствора KCl для отмывки липидного экстракта от нелипидных примесей. После тщательного встряхивания образовавшаяся эмульсия расслаивается на две прозрачные фазы. В гептановом экстракте (верхняя фаза) измеряют спектрофотометрически содержание сопряженных диенов в кювете с длиной оптического пути 1,0 см против гептана.

Расчет количества ДК производят с учетом молярного коэффициента экстинкции:

$$C = \left( \frac{OD_{232}}{\epsilon_{232}} \right) * X, \text{ где} \quad (1)$$

*C – концентрация карбонильных групп в плазме,  $OD_{232}$  – оптическая плотность образца при длине волны = 232 нм,  $\epsilon_{232}$  – коэффициент молярной экстинкции при длине волны = 232 нм, равный  $27000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  и выражали в микромолях на 1 грамм белка или на 1 л плазмы крови, X – фактор разведения, равный 101.*

### **2.3 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.

*Ход определения*

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

Таблица 2 - Порядок внесения реагентов в пробу (мл)

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

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

*Расчеты:*

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

$$C = \frac{D_{532} \times V_{p.c.} \times F \times 1000}{V_{np} * \epsilon * d * Hb} \quad (2)$$

$C$  – содержание МДА, мкмоль/л плазмы ( $g\ Hb$ );  $D_{532}$  – оптическая плотность при длине волны 532 нм;  $V_{p.c.}$  – объем реакционной смеси (1,325 мл);  $F$  – фактор разведения (7,5);  $\epsilon$  – коэффициент молярной экстинкции образовавшегося хромогена ( $1,56 \cdot 10^5\ M^{-1} \cdot cm^{-1}$ );  $V_{np}$  – объем супернатанта, используемый для определения содержания МДА (1 мл);  $d$  – длина оптического пути кюветы (1 см).  $1000/Hb$  – коэффициент пересчета на  $gHb$ , при расчёте на л плазмы не используется.

## 2.4 Определение активности супероксиддисмутазы

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

*Реактивы:*

- 1) этанол-хлороформная смесь (2:1).
- 2) 0,2 М бикарбонатный буфер, рН 11.
- 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); рН довели до нужного значения добавлением NaOH (конц).

*Ход определения*

В пробирку вносят 50 мкл плазмы (эритроцитов) и 450 мкл дистиллированной воды, охлажденной до 0°C. Добавляли 250 мкл этанол-хлороформной смеси, устраняющей мешающее влияние Hb. Далее перемешивали пробы и оставляли инкубироваться при комнатной температуре 10 мин. Полученную суспензию перемешивали и

центрифугировали 10 мин при 6000g. Для определения СОД использовали супернатант.

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

Таблица 3 – Порядок внесения реагентов в пробу, мл

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

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

$$\text{Ед. активности } \frac{\text{СОД}}{\text{г}} = \left( \frac{E_x - E_0}{E_x} \right) * \frac{100\% * F * V * 1000}{50 * v * d * \text{Нв}}, \text{ где} \quad (3)$$

$\frac{E_x - E_0}{E_x} * \frac{100\%}{50}$  – 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).  $1000/\text{Нв}$  – коэффициент пересчета на г Нв, не используется при расчёте на л плазмы.

## 2.5 Определения содержания церулоплазмينا

Методоснован на окислении р-фенилендиамина при участии церулоплазмينا (ЦП).

*Реактивы:*

1. 0,4 М ацетатный буфер (рН 5,5), приготовленный путем смешивания растворов 1 и 2 (в соотношении 9:1). 1-й раствор – 55,44 ацетата натрия помещали в мерную колбу на 1 л и доводили до метки. 2-й раствор – 22,6 мл ледяной уксусной кислоты растворяли и доводили до метки 1 л дистиллированной водой.

2. 1,3%-ный раствор фтористого натрия.

3. 0,5%-ный раствор солянокислого р-фенилендиамина.

*Ход определения*

В контрольную и опытную пробы вносим по 0,1 мл плазмы и 8 мл ацетатного буфера. В контрольную пробирку добавляем 2 мл раствора фтористого натрия (для инактивации ферментативной активности церулоплазмينا). Затем в пробирки вносят по 1 мл раствора солянокислого п-фенилендиамина. Пробирки встряхивают, и помещаем в термостат и инкубируют в течении часа. После инкубации во все пробирки, (кроме контрольной), добавляют по 2 мл раствора фтористого натрия. Содержимое пробирок перемешивают, переносят в холодильник на 30 минут. Пробы колориметрируют против контроля в кюветах с толщенной 1,0 см при длине волны 530 нм.

*Расчеты:*

$$C = D \cdot 875 \text{ мг / л, где} \quad (4)$$

*D* – значение оптической плотности; 875 – коэффициент пересчета;  
*C* – концентрация церулоплазмينا в мг/л

## **2.6 Определение содержания сывороточного альбумина**

*Принцип метода.* В слабокислой среде молекулы альбумина вступают в реакцию с красителем бромкрезоловым зеленым. Интенсивность окраски образующегося комплекса сине-зеленого цвета прямо пропорциональна концентрации альбумина в образце и измеряется фотометрически при 628 (600-650) нм. Фотометрическое измерение основано на наличии пика

поглощения с максимумом при длине волны 628 нм молекулами окрашенного комплекса. Все остальные компоненты реакционной смеси слабо поглощают свет при этой длине волны. Таким образом, увеличение оптической плотности реакционной смеси прямо пропорционально содержанию альбумина в анализируемом образце.

Альбумин определяли с помощью специального набора реагентов для определения концентрации сывороточного альбумина в биологических жидкостях энзиматическим колориметрическим методом (набор «витал»).

#### *Состав набора*

1. Реагент (сукцинатный буфер pH 4,2, 75 ммоль/л; бромкрезоловый зеленый 0,12 ммоль/л; ПАВ 2 г/л)
2. Калибратор (водный раствор бычьего сывороточного альбумина 60 г/л)

#### *Ход определения*

В пробирки добавляем по 2,0 мл реагента. Затем в опытные пробы вносим по 0,010 мл исследуемого образца (плазма). В калибровочную пробу добавляем к 2,0 мл реагента 0,010 мл калибратора и готовим холостую пробу. Пробы перемешать и инкубировать в течение 10 минут при 15 – 25<sup>o</sup>C или при 5 минут при +37<sup>o</sup> C. Измерить оптическую плотность калибровочной ( $E_k$ ) и анализируемой опытной пробы ( $E_{оп}$ ) при длине волны 628 (600-650) нм против холостой пробы. Окраска стабильна в течение 1 часа.

#### *Расчеты*

$$C = \frac{E_{оп}}{E_k} \cdot 30 \text{ мкмоль / л, где} \quad (5)$$

$E_{оп}$  – оптическая плотность опытной пробы;  $E_k$  – оптическая плотность калибратора;  $C$  – концентрация сывороточного альбумина в г/л

## **2.7 Определение содержания восстановленного глутатиона**

*Принцип метода.* Взаимодействие восстановленного глутатиона с 5',5'-

дитио-бис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБК), с образованием окрашенного в желтый цвет тионитрофенильного аниона (ТНФА).

*Реактивы:*

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

*Ход определения*

Для определения готовили гемолизат добавлением 0,1 мл отмытых от плазмы и упакованных эритроцитов к 0,9 мл дистиллированной воды, охлажденной до 0°C. Для осаждения белков к гемолизату (плазме) добавляли 1,5 мл осаждающего раствора. Пробы тщательно перемешивали и после 20-минутного стояния при комнатной температуре фильтровали через крупнопористый фильтр. Фильтрат должен быть прозрачным и бесцветным.

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

Содержание восстановленного глутатиона рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{E_2 - E_1}{13600} * F * 138 * \frac{1000}{Hb}, \text{ где} \quad (6)$$

$C$  - концентрация восстановленного глутатиона в мкмоль/г Hb;  $E_1$  - оптическая плотность опытной пробы до добавления ДТНБК;  $E_2$  - оптическая плотность опытной пробы после добавления ДТНБК; 138 - разведение эритроцитов в реакционной пробе; 1000 - коэффициент для пересчета концентрации глутатиона от молярной к миллимолярной;  $F$  - отношение оптической плотности контрольной пробы до добавления ДТНБК ( $E_1$ ) и после добавления ( $E_2$ ).

## 2.8 Определение активности глутатион-S-трансферазы

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

*Реактивы:*

1. 0,1 М калий-фосфатный буфер, pH = 6,5
2. 0,015 М раствор GSH
3. Абсолютный метанол
4. 0,015 М раствор ХДНБ, приготовленный на абсолютном метаноле

*Ход определения*

Отмытые и упакованные эритроциты гемолизируют охлажденной до 0°C водой в соотношении 1:20. В кювету с длиной оптического пути 1 см помещают 2,5 мл калий-фосфатного буфера, pH=6,5. Добавляют 0,2 мл раствора восстановленного глутатиона и 0,1 мл гемолизата или плазмы. Реакцию инициируют внесением в кювету 0,2 мл раствора ХДНБ. Перемешивают и зануляют прибор. Регистрацию оптической плотности проводят в течение 3 минут при температуре 25 оС и длине волны 340 нм. Активность фермента рассчитывают, используя коэффициент миллимолярной экстинкции для GS-ХДНБ, равный 9,6 мМ-1 \* см-1, и

выражают в микромолях образующихся глутатион-S-конъюгатов в минуту на грамм Hb; или в минуту на грамм белка.

Активность фермента рассчитывали, используя коэффициент экстинкции для GS-ХДНБ при длине волны 340 нм, равный  $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ , и выражали в ммолях образующихся глутатион S-конъюгатов в минуту на грамм белка.

Активность рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{\Delta E / \text{мин} \times V_{\text{реакц. смеси}} \times 1000}{\varepsilon \times V_{\text{пробы}} \times \text{Hb}}, \text{ где} \quad (9)$$

$A$  – активность фермента, моль\мин на г белка,  $\Delta E$  – изменение оптической плотности в мин,  $d$  – толщина кюветы (1 см),  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции при  $\lambda=340 \text{ нм}$  ( $9600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ),  $V_{\text{пр.}}$  – объем пробы, используемый для определения активности GST,  $V_{\text{р.с.}}$  – объем реакционной смеси;

## 2.9 Определение активности глутатионпероксидазы

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

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

*Реактивы:*

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

### *Ход определения*

Отмытые и упакованные эритроциты гемолизируют охлажденной до 0 °С водой в соотношении 1:200. 0,2 мл гемолизата или плазмы 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 через 5 минут инкубации реакцию останавливают добавлением 0,2 мл раствора ТХУ. В контрольные пробы раствор ГПТБ вносят после осаждения белка ТХУ. Полученные пробы центрифугируют при 1700g в течение 10 минут. Супернатант используют для определения количества восстановленного глутатиона. Для этого к 0,1 мл супернатанта добавляют 2,65 мл 0,1 М трис-НСl буфера и 0,025 мл раствора ДТНБК. После перемешивания пробы фотометрируют на спектрофотометре при длине волны 412 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против дистиллированной воды. Активность фермента в эритроцитах выражают в мкмольях GSH, окисленного за 1 минут на грамм Hb, используя коэффициент молярной экстинкции (13600 М<sup>-1</sup> \* см<sup>-1</sup>) окрашенного аниона, образующегося при взаимодействии восстановленного глутатиона с ДТНБК.

Активность фермента в плазме выражали в мкмольях GSH, окисленного за 1 минуту на грамм белка, используя коэффициент молярной экстинкции (13600 М<sup>-1</sup> \* см<sup>-1</sup>) окрашенного аниона, образующегося при взаимодействии GSH с ДТНБК.

Активность рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{\Delta C \times V_{p.c.} * 1000}{V_{np} * \epsilon * Hb * t}, \quad \text{где} \quad (10)$$

*A* - активность фермента, мкмоль/мин на 1 г белка;  $\Delta C$  – разность концентраций GSH в опытной и контрольной пробах;  $V_{np}$  – объем супернатанта, используемый для определения концентрации GPO (0,1 мл)  $t$  – время инкубации (5 минут);  $V_{p.c.}$  - объем реакционной смеси (2,775 мл);  $1000/Hb$  – коэффициент пересчета на г/Hb.

## 2.10 Определение содержания общего белка

*Принцип метода.* Белок образует окрашенный комплекс с ионами меди в щелочной среде. Интенсивность окраски при длине волны 540 нм прямо пропорциональна концентрации общего белка в пробе.

Определяем содержание общего белка в плазме крови с помощью набора «Витал». В который входит:

1. №1 Биуретовый реагент- 2×100 мл

Натрия гидроокись - 0,5 моль/л

Калий-натри виннокислый – 80ммоль/л

Калий йодистый - 75ммоль/л

Сульфат меди – 30 ммоль/л

2. Калибратор 1×2,0 мл

Альбумин сывороточный – 70г/л

Натрий хлористый – 154 ммоль/л

Приготовление рабочего реагента – разводим необходимое количество реагента №1 бидистиллированной или деионизированной водой в 5 раз (1 часть реагента + 4части воды).

Стабильность рабочего реагента составляет не менее 6 месяцев при температуре 18-25°C, в темном месте, в плотно закрытой посуде. Не использовать рабочий реагент, если его оптическая плотность против воды более 0,2 (кювета -1см, длина волны 540 нм).

*Ход определения*

В пробирки вносим рабочий реагент по 5,0 мл (в опытную, калибровочную и холостую). В опытные пробирки добавляем плазму крови по 0,1 мл (100мкл). Затем в калибровочную пробу вносим калибратор 0,1 мл (100мкл) и в холостую добавляем 0,1 мл (100 мкл) воды.

Пробы тщательно перемешиваем, инкубировать 30 мин при 18-25°C и измерить оптическую плотность опытной ( $E_{оп}$ ) и калибровочной ( $E_k$ ) проб против холостой пробы.

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

Далее делаем соответствующие расчеты.

Нормы: 65-85 г/л (Эти значения являются ориентировочными).

$$C = \frac{E_{оп}}{E_k} \cdot 70 \text{ г/л, где} \quad (11)$$

$E_{оп}$  – оптическая плотность опытной пробы;  $E_k$  – оптическая плотность калибратора;  $C$  – концентрация общего белка в г/л

## 2.11 Статистическая обработка результатов

По результатам исследований была сформирована база данных, на основе которой производился статистический анализ. Полученные данные представляли в виде медианы ( $Me$ ),  $C_{25}$  и  $C_{75}$  перцентиля. Так как распределение показателей отклонялось от нормальных, для оценки значимости различий между группами использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия между группами и значимость взаимосвязей показателей считались достоверными при значении для  $p < 0,05$ .

### **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 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. Фридович, И. В. Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода / И. В. Фридович // Свободные радикалы в биологии. – 1979. – Т. 1. – С. 7-21.
3. Зуйков, С. А. Исследование соотношения прооксидантной и антиоксидантной систем при опухолях кишечника / С. А. Зуйков, Б. Г. Борзенко, О. В Зуйкова // Сибирский онкологический журнал. Томск, – 2014. – №2. – С. 1-4.
4. Кит, О. И. Состояние свободнорадикальных процессов в ткани злокачественной опухоли толстой кишки / О. И. Кит, Е.М. Франциянц [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2014. – №1. – С.1-5.
5. Ходус, С.В. Предоперационная коррекция симптомов эндогенной интоксикации и нарушений кислородного статуса у больных колоректальным раком / С. В. Ходус [ и др.]// Бюл. физ. и пат. дых. – 2018. – №69. – С. 1-5.
6. 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.
7. Вавилова, Т.П. Роль церулоплазмينا при развитии неопластических процессов / Т.П. Вавилова и [др.] // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, вып. 3. – С. 263-275.
8. Мошков, К.А. Церулоплазмин: внутримолекулярный перенос электронов и ферроксидазная активность / К.А. Мошков и [др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – №3 (1). – С.104 – 107.
9. Артамошенина, Н.Е. Активность антиоксидантной системы церулоплазмينا / Н.Е. Артамошенина, О.В. Белая // Наука и современность – 2008. – Т.7.–№ 6-S1. – С. 5-7.

10. Пашина, Е.В. Альбумин в оценке эндогенной интоксикации / Е.В. Пашина, М.Л. Золотавина // Наука и современность. – 2014. – №33. – С. 23-28.
11. 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.
12. Латюшин, Я. В. Влияние церулоплазмينا 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.
13. Галунска, Б. Двухликий янус биохимии: мочева кислота – оксидант или антиоксидант? / Б. Галунска, Д. Паскалев // Нефрология. – 2004. – Т.8.– №4. –С.25-30.
14. Донцов, В.И. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / В.И. Донцов, В.Н. Крутько // – 2006. – Т.19. – С.50-65.
15. 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.
16. Parkin, D. M. Global cancer statistics / D. M Parkin, F. Bray, J. Ferlay, P. Pisani // Cancer Science – 2002. - № 2.– P.74-108.
17. Давыдов, М. И. Хирургическое лечение рака проксимального отдела желудка: эволюция стандартов / М. И.Давыдов, М. Д. Тер-Ованесов [и др] // Успехи современной биологии.-2012.-№1.-С.23-25.
18. Сельчук, В.Ю. Рак желудка / В. Ю Сельчук, М.П. Никулин // "РМЖ". – 2003. – №26. – С.1441.

19. Stomach cancer symptoms [Электронный ресурс] : Cancer Research UK : Cancer Help UK . – Режим доступа: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/stomach-cancer/symptoms>.
20. Hatakeyama, M. Helicobacter pylori CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis / M. Hatakeyama, H. Higashi // Cancer Science. – 2005.-№ 5.- P. 835 - 843.
21. 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.
22. Циммерман, Я.С. Проблема растущей резистентности микроорганизмов к антибактериальной терапии перспективы эрадикации Helicobacter pylori-инфекции / Я.С. Циммерман //Нерешенные и спорные проблемы современной гастроэнтерологии. – 2013.- № 4. – С.147-166.
23. Malfertheiner, P. Диагностика и лечение инфекции Helicobacter pylori / P. Malfertheiner // Вестник практического врача. – 2012. – Вып.1. – С. 6-22.
24. Старкова Н. Т. Клиническая эндокринологии: Руководство «Спутник Врача» / Н. Т. Старкова. — Санкт-Петербург . – 2002. – №3.— С.576.
25. Диффузный токсический зоб: современные представления и анализ клинического случая: учебное пособие / Л.М. Фархутдинова [и др.]. – Уфа: ГБУ ВПО БГМУ Минздрава России. – 2015. – С. 92.
26. Тимирханова, Г. А. 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
27. Меньщикова, Е. Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов / Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков // Успехи современной биологии. – 1993. – Т.113, № 4. – С. 442-445.

28. Bhattacharyya, A. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases / A. Bhattacharyya, R. Chattopadhyay and etc // *Physiol Rev.*–2014. – Vol. 94. – P. 329 – 334.
29. Bhattacharya, S. 15-Lipoxygenase-1 in colorectal cancer: a review./ G. Mathew, D.G. Jayne // *Tumour Biol* 30. – 2009.– №.30 – P.85–199.
30. Rose, R. C. Transport of ascorbic acid and other watersoluble vitamins. *Biochim Biophys Acta* - 2014. №30 – P. 66 – 75.
31. Hughes, R. E. The passage of vitamin C across the erythrocyte membrane / S. C. Maton// *Biochim Biophys Acta* .–2012.-№2 – P.247-53.
32. James, M. M. Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte / M. M. James // *Frontiers in Bioscience*. – 1998. – №2. – P.1-5
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. Бочкарева, Н. В. 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. – С.56.
36. Волыхина, В.Е. Супероксиддисмутазы: структура и свойства /В.Е. Волыхина, Е.В. Шафрановская // *Биомедицинская химия*. – Москва, 2009.- №4,– С. 15-18.
37. Никитина, Н.В. Рак толстой кишки при воспалительных заболеваниях кишечника /Н.В. Никитина, Е.В. Великанов// *Сибирский онкологический институт* .- Томск,-2011.- №2,-С.18-20.
38. Wheeler M. D. Comparison of the effect of adenoviral delivery of three superoxide dismutase genes against hepatic ischemia-reperfusion injury / M. D. Wheeler [et al.] // *Hum.Gene Ther*. – 2001. –N 18. – P. 2167-2177.
39. Костюк, В. А. Биорадикалы и биоантиоксиданты / В. А. Костюк, А. И. Потапович. – Минск: БГУ, 2004. – 179 с.

40. Chatterjee A. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer / A. Chatterjee // *Cancer Letters*. – 2018. – Vol. 433. – P. 33-42.
41. Hegedus C. Redox control of cancer cell destruction / C. Hegedus // *Redox Biology*. – 2018. – Vol. 16. – P. 59-70.
42. Jiang H. Targeting antioxidant enzymes as a radiosensitizing strategy / H. Jiang // *Cancer Letters*. – 2018. – № 438. – P. 154-164.
43. Chikara S. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment/ S. Chikara // *Cancer Letters*. – 2018. – № 413. – P. 122-134.
44. Rizvi, A. Physiological serum copper concentrations found in malignancies cause unfolding induced aggregation of human serum albumin in vitro / A. Rizvi // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2017. – Vol. 636. – P. 71-78.
45. Ribeiro, D. Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products / D. Ribeiro // *Food and Chemical Toxicology*. – 2018. – Vol. 120. – P. 681-699.
46. Moloney, J.N. ROS signalling in the biology of cancer/ J.N. Moloney [et al.] // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. – 2018. – Vol. 80. – P. 50-64.
47. Yamazaki, Y. Metalation states versus enzyme activities of Cu, Zn-superoxide dismutase probed by electrospray ionization mass spectrometry / Y. Yamazaki, T. Takao // *Anal. Chem*. – 2008. – Vol. 80. – №21. – P. 8246-8252.
48. Domellof, M. Iron supplementation does not affect copper and zinc absorption in breast fed infants / M. Domellof [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2009. – Vol. 89. – №1. – P. 185 - 190.
49. Marklund, S. L. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines / S. L. Marklund // *Biochem. J.* – 1990. – Vol. 266. – № 1. – P. 213-219.
50. Ryu K. Increased yield of high-purity and active tetrameric recombinant human ECSOD by solid phase refolding / K. Ryu [et al.] // *Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – №10. – P. 1648-1654.

51. Набатова, О. С. Влияние лимфотропной полихимиоиммунотерапии колоректального рака на некоторые биохимические показатели крови/ О. И.Кит, И. А. Горошинская и др. // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2013. – №4 (147). – С. 30-35.

52. Животовский, А.С. Колоректальный рак: динамика заболеваемости и смертности в Кемеровской области / А.С. Животовский, А.Г. Кутихин, Ю.А.//Медицинский альманах.- 2012.- №2(21).- С. 1-4.

53.Александров,В. Колоректальный рак (некоторые вопросы диагностики и лечения) / В. Александров, О. Рахимова //Медицинский альманах.-2009.-№11.-С.1-3.

54. Пушкина Т. А., Супероксиддисмутаза в составе антиоксидантной терапии: состояние вопроса и перспективы /Т. А Пушкина, .Э.С. Токаев [и др.]// НМП. - 2016. -№4. С.- 42-44.

55. Толпыгина О. А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты (обзор)/ О. А.Толпыгина // Acta Biomedica Scientifica.- 2012. - №2(84).-С.178-180.

56. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты/ Е.Б. Меньщикова, В.З.Ланкин, [и др.]. – Москва,2006.- 556 с.

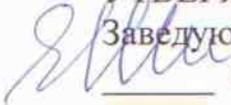
57. Зуйков, С.А. Исследование соотношения прооксидантной и антиоксидантной систем при опухолях кишечника /С.А. Зуйков, Б.Г. Борозенко [и др.] // Сибирский онкологический журнал.-2014.-№2(62).-С.-24-27.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

 Заведующий кафедрой

Е.И. Шишацкая

подпись инициалы, фамилия

« 5 » июня 2019г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Оценка состояния антиоксидантной системы в плазме крови больных раком  
прямой кишки

06.04.01 – Биология

06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный  
руководитель



доцент, канд. биол. наук

Н.М. Титова

Выпускник



К.А. Кудрявцева

Рецензент



профессор, д-р мед. наук

Л.М. Куртасова

Красноярск 2019