

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

Е.И.Шишацкая

« 13 » июля 2020г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Редокс-регуляция окислительного стресса у больных диффузным
токсическим зобом

Направление подготовки 06.04.01 - Биология

Профиль 06.04.01.05 - Реконструктивная биоинженерия

Научный
руководитель _____ 06.07.2020 доцент, канд.биол.наук Н.М. Титова

Выпускник _____ 06.07.2020 О.И. Зубок

Рецензент _____ 09.07.2020 доцент, канд.биол.наук Е.И. Елсукова

Красноярск 2020

Содержание

РЕФЕРАТ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	6
1.1 Щитовидная железа. Строение и функции.....	6
1.2 Диффузный токсический зоб	8
1.3 Свободные радикалы: характеристика, источники образования, биологические эффекты	11
1.4 Антиоксидантная система	16
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	28
2.1 Объект исследования.....	28
2.2 Определение гемоглобина.....	28
2.3 Определение содержания восстановленного глутатиона	29
2.4 Определение содержания окисленного глутатиона.....	31
2.5 Определение активности глутатионпероксидазы	32
2.6 Определение активности глутатион-S-трансферазы	34
2.7 Определение активности глутатионредуктазы	35
2.8 Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	36
2.9 Определение содержания аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислоты	37
2.10 Статистическая обработка результатов	39
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	40
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	43

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация выполнена по теме «Редокс-регуляция окислительного стресса у больных диффузным токсическим зобом» содержит 60 страницы текстового документа, 67 использованных источника и 9 иллюстраций.

ДИФфуЗНЫЙ ТОКСИЧЕСКИЙ ЗОБ, АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, ГЛУТАТИОН, АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА, РЕДОКС-СТАТУС, ГЛУТАТИОН-АКСКОРБАТНЫЙ ЦИКЛ, ГИПЕРТИРЕОЗ

Цель работы – исследование состояния глутатионовой системы у больных диффузным токсическим зобом.

В задачи входило:

1. Изучение содержания восстановленной и окисленной форм глутатиона в эритроцитах больных с диагнозом ДТЗ.
2. Исследование активности ферментов глутатионовой системы у больных диффузным токсическим зобом.
3. Исследование содержания восстановленной и окисленной форм аскорбиновой кислоты в эритроцитах людей с диффузным токсическим зобом.

В результате исследования состояния глутатионовой системы у больных диффузным токсическим зобом было определено содержание восстановленной и окисленной форм глутатиона и аскорбата, а также активность ферментов глутатионового звена: ГПО, GST, GP, ГбФДГ.

Полученные данные свидетельствуют об изменении редокс-статуса пар GSH/ GSSG и АК/ДАК в сторону восстановленных форм. Активность ферментов глутатионового звена имеет разнонаправленный характер и говорит о нарушении функционирования АОС при ЗЩЖ. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о необходимости проведения антиоксидантной коррекции лечения при диффузном токсическом зобе.

ВВЕДЕНИЕ

За последние время заболевания щитовидной железы (ЩЖ) стали наиболее распространенной эндокринной патологией. По различным данным, количество заболеваний ЩЖ выше, чем известно на сегодняшний момент. Это напрямую связано с нередким бессимптомным, или субклиническим течением многих болезней ЩЖ.

Диффузный токсический зоб (ДТЗ) — заболевание, имеющее аутоиммунный характер и развивающееся ввиду наработки антител к тиреотропному гормону (ТТГ), который стимулирует синтез гормонов ЩЖ и развитие тиреотоксикоза [1]. ДТЗ имеет широкую распространенность и поражает до 2—5% популяции, а связанные с ним многочисленные поражения всех значимых систем организма обуславливают медико-социальную значимость этого заболевания [2]. Частота встречаемости ДТЗ в России составляет около 1 %, при этом болеющих женщины в 7 раз больше, чем мужчин и средний возраст заболевших 20-40 лет [3,4].

Гормоны щитовидной железы поддерживают нормальное функциональное состояние организма, регулируют основные процессы жизнедеятельности, связанные с обменом веществ. Точной приложением гормонов ЩЖ являются митохондрии, при сбое в работе которых происходит интенсификация процесса образования АФК [5]. В связи с этим, оптимизация работы ЩЖ является необходимым условием нормальной работы всего организма и условием снижения вероятности развития различных патологических состояний [6].

Литературные данные о воздействии тиреоидных гормонов на увеличение окислительных процессов достаточно противоречивы. В ряде работ указывается на интенсификацию процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в условиях гипертиреоза и развитие окислительного

стресса, в других – отрицается накопление метаболитов свободнорадикального окисления липидов [3, 7].

В защите организма от бесконтрольного увеличения АФК и избыточного образования продуктов липопероксидации основная роль принадлежит системе глутатиона, включающей глутатион и ферменты его метаболизма и являющейся частью многокомпонентной антиоксидантной системы. Глутатионовая система определяет редокс-статус клеток и организма в целом.

Целью данной работы явилось исследование состояния глутатионовой системы у больных диффузным токсическим зобом.

В задачи входило:

1. Изучение содержания восстановленной и окисленной форм глутатиона в эритроцитах больных с диагнозом ДТЗ.
2. Исследование активности ферментов глутатионовой системы у больных диффузным токсическим зобом.
3. Исследование содержания восстановленной и окисленной форм аскорбиновой кислоты в эритроцитах людей с диффузным токсическим зобом.

Данная работа выполнена на базе кафедры медицинской биологии ИФБиТ Сибирского федерального университета и лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ Медицинских проблем Севера и является частью исследований механизмов развития процессов свободнорадикального окисления при различных заболеваниях и патологических состояниях.

1 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1.1 Щитовидная железа. Строение и функции.

Щитовидная железа — непарный орган, относится к эндокринным железам организма и состоит из 2 долей, соединенных перешейком. Щитовидная железа долями прилегает к трахее. В нормальном состоянии масса щитовидной железы составляет от 20 до 65 г. Структурными единицами ЩЖ являются фолликулы, размером от 20 до 300 мкм. Внутри фолликулов содержится вещество — коллоид, которое продуцируется эпителиальными или А-клетками. В состав коллоида входит йодированный тиреоглобулин, который является предшественником двух йодсодержащих гормонов — тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3) [8]. Парафолликулярные С-клетки расположены в стенке фолликула, основная функция С-клеток — секреция кальцитонина, который снижает концентрацию кальция в крови и способствует его отложению в костях.

Выработку гормонов щитовидной железой можно представить в следующем виде: ЩЖ поглощает йодиды и происходит органификация йода, с дальнейшей конденсацией с тирозином. Полученный комплекс освобождается в кровь. Тироцит захватывает йодиды из крови против градиента концентрации, что является энергозатратным процессом и требует наличие АТФ и стимулирования тиротропином. Йодирование тироксина происходит с участием перекиси водорода и тиропероксидазы, в результате чего йод присоединяется к аминокислоте тирозину и образуется монойодтирозин (МИТ) и дийодтирозин (ДИТ). Завершающим этапом является окислительная конденсация двух молекул дийодтирозина, с образованием тироксин.

При снижении уровня тиреоидных гормонов в крови происходит выделение тиротропина, который, взаимодействуя с тироцитными рецепторами, активирует аденилатциклазную система. В клетке происходит накопление цАМФ, который стимулирует активность протеаз. В апикальной

части тироцита образуются псевдоподии, которые захватывают тироглобулин из коллоида, после чего образуется фаголизосома и в ней под влиянием протеолиза высвобождаются МИТ, ДИТ, Т₄ и Т₃. Освобожденный йод остается внутри тироцита и снова может вовлекаться в синтез гормонов [9].

Точной приложения тиреоидных гормонов являются обменные процессы во всех органах и тканях. Они требуются для нормального развития организма, осуществляют контроль образования тепла, и скоростью потребления кислорода. Без их участия высока вероятность сбоя в функции дыхательного центра, и скорости образования эритропоэтина, они оказывают хронотропный и инотропный эффекты на сердце, способствуют увеличению количества β – адренергических рецепторов в сердечной и скелетной мышцах, жировой ткани и лимфоцитах. Являются стимуляторами моторики ЖКТ и синтеза многих структурных белков организма [10].

При недостаточном поступлении йода с продуктами питания происходит перестройка функций ЩЖ, синтезирование гормонов ЩЖ (Т₄ и Т₃), как и их дальнейшая секреция ингибируются. Исходя из принципа обратной связи, происходит увеличение секреции гормона ТТГ, под действием которого в ЩЖ наблюдается привыкание к дефициту йода. Происходит активация механизмов перехвата йода щитовидной железой для поддержания метаболизма клеток.

Эти этапы включают: ускорение реутилизации эндогенного йода, освобождающегося в процессе деградации тиреоидных гормонов, преимущественный синтез и секрецию более активного Т₃, ускорение конверсии Т₄ в Т₃ в крови и тканях, увеличение тиреоидной массы, которое объясняется как за счет гипертрофии, так и компенсаторной гиперплазии в ответ на низкое поступление йода в организм, недостаточное для нормальной секреции тиреоидных гормонов. В ответ на снижение уровня тиреоидных гормонов в крови наблюдается повышение секреции ТТГ, что в свою очередь

является причиной сначала диффузной гиперплазии железы, а затем и развитие узловых форм зоба. [11].

Диффузный зоб является компенсаторная реакция для нормализации уровня тиреоидных гормонов организма. При недостаточном восполнении йода, компенсаторные возможности ЩЖ истощаются, а стимулирование ТТГ не способствует активации синтеза T_4 , в организме формируется состояние субклинического или явного гипотиреоза, который влечет за собой огромные нарушения умственного и физического развития [12, 13].

Кроме того, недостаточность функции ЩЖ при йоддефицитных состояниях является тем метаболическим фоном, который удлиняет время жизни и деструктивного воздействия свободных радикалов [14].

Нарушения функции ЩЖ и корреляции в секреции тиреоидных гормонов могут происходить на разных этапах: в результате нарушения синтеза тиреоидных гормонов, попадания из крови йодидов и их окисление в элементарный йод, конденсацию йода и тирозина с образованием МИТ и ДИТ, объединение молекул йодтирозина с образованием T_4 и T_3 [13, 15].

1.2 Диффузный токсический зоб

Диффузный токсический зоб – заболевание, вызываемое чрезмерным синтезом тиреоидных гормонов и диффузно увеличенной ЩЖ. К основным клиническим проявления можно отнести увеличенный размер щитовидной железы, резкое похудение, экзофтальм, потливость, повышенную возбудимость и раздражительность.

ДТЗ – аутоиммунное заболевание, характеризующееся наследственной предрасположенностью, встречается у женщин на много чаще, чем у мужчин. ДТЗ по мнению одних ученых наследуется аутосомно-рецессивным типом наследования, а по мнению других – аутосомно-доминантным путем. Скорее всего, наблюдается многофакторный тип наследования [16].

Благодаря изучению заболеваний щитовидной железы впервые были

обнаружены аутоиммунные механизмы развития заболеваний.

Антигенами в ЩЖ выступают белки и ферменты тироцита: тиреоглобулин (белок, состоящий из 5496 аминокислот, имеет молекулярную массу 660 кДа и является базовым компонентом коллоида фолликула), тиропероксидаза (молекулярная масса 102 кДа, состоит из 926 аминокислот, напрямую связана с мембранами апикальной части тироцита), рецептор к тиреотропному гормону (молекулярная масса 100 кДа, молекула включает 744 аминокислотных остатка).

При ДТЗ в 20-30% случаев обнаруживаются антитела к тиреоглобулину, в 85 % случаев антитела к тиропероксидазе (что указывает на аутоиммунный характер), в 50 % случаев обнаруживаются антитела ко второму коллоидному антигену. Тиреоидстимулирующие антитела – это антитела, которые связывают и многократно стимулируют рецепторы к ТТГ или другим белковым структурам, на поверхности фолликулярных клеток. При связывании антител с рецепторами происходит стимулирование синтеза и выход тиреоидных гормонов в кровяное русло, аналогичный механизм можно наблюдать при взаимодействии с ТТГ. Однако не во всех случаях тиреоидстимулирующие антитела усиливают продукцию гормонов ЩЖ, т.к. один из классов этих антител конкурентно связывается с рецептором к ТТГ, угнетает секрецию тиреоидных гормонов, что наблюдается в случае гипотериоза.

Присутствие тиреоидстимулирующих иммуноглобулинов в сыворотке крови больных не полностью объясняет патогенез ДТЗ. Можно предположить, что помимо гуморального иммунитета в механизме развития заболевания важное место занимают изменения и повреждения клеточно-опосредованного иммунитета [17].

При гипертиреоидных состояниях наблюдается стимуляция окислительных процессов внутри клетки и усиление катаболизма. Больной ДТЗ резко теряет в весе, так как происходит увеличение расхода энергии,

снижается концентрация жира и гликогена в печени. Развивается резкая мышечная слабость, вызванная усилением катаболизма белков [18].

Повышение окислительных процессов на периферии (окисление жиров, углеводов и в последнюю очередь белков), с одной стороны, требует постоянного достаточного количества кислорода, а с другой – образуется избыточное количество тепловой энергии (вследствие разобщения окисления и фосфорилирования), которая вызывает гипертермию, иногда до 40°С. Для удовлетворения высокой необходимости периферических отделов организма в кислороде и распределения избыточной тепловой энергии, в организме начинают развиваться компенсаторные реакции: повышается систолический объем крови и систолическая артериальная гипертензия, появляется тахипноэ и тахикардия. Помимо всего прочего, тиреоидные гормоны могут оказывать токсическое действие на сердечную мышцу [19,20,21].

Чрезмерная активация процессов ПОЛ при сниженной мощности систем антиоксидантной защиты лежит в основе развития многих патологических процессов в организме [22], в полной мере это можно отнести и к патологиям ЩЖ .

Продукты ПОЛ всегда присутствуют в клетке, но накопление продуктов ПОЛ, опасных для организма происходит лишь в случае снижения мощности антиоксидантной защиты. Основную нагрузку по защите биомембран от продуктов пероксидации и поддержанию стационарного уровня восстановленных SH-групп белков, ферментов, гормонов и рецепторов несет регуляторная система глутатиона. Полагают, что уровень восстановленных тиолов в биологических объектах в существенной мере определяет радиочувствительность тканей. Связывая гидроперекиси, тиолы тормозят ПОЛ, стимулированное облучением, и снижают возросший в результате облучения уровень малонового диальдегида. Выявленное уменьшение содержания GSH и падение активности ГПО свидетельствует о

снижении способности мембран эритроцитов крови с патологией ЩЖ противостоять пероксидной деструкции.

Сведения по поводу нарушения АОС при заболеваниях щитовидной железы (ЗЩЖ), противоречивы и неоднозначны, но многие исследователи сходятся в том, что при прогрессирующем течении ЗЩЖ компенсаторные возможности АОС истощаются, о чем свидетельствует снижение активности ферментативного звена и снижение содержание низкомолекулярных компонентов АОС [23].

1.3 Свободные радикалы: характеристика, источники образования, биологические эффекты

Свободнорадикальное окисление (СРО) на сегодняшний день является одним из основных патогенетических механизмов многих патологических состояний и заболеваний, но не менее важными являются и физиологические эффекты самих свободных радикалов [24].

Вся жизнь человека непосредственно связана с кислородом. Он является той незаменимой частью, без которой наше существование невозможно. Молекулярный кислород участвует почти во всех процесса организма как в свободном состоянии, так и в составе сложных молекул: липидах, белках, углевода. В основном состоянии молекула кислорода спонтанно не реагирует с другими молекулами, однако многие процессы с участие кислорода сопровождаются образование высокорекреакционных форм кислорода – АФК [5,6].

Активные формы кислорода (АФК, реактивные формы кислорода) – свободные радикалы, ионы кислорода, и перекиси как органического, так и неорганического происхождения, которые имеют на внешней оболочке неспаренный электрон [5].

АФК выполняют важную регуляторную роль в организме, так, в зависимости от силы воздействующего на клетку патогенна они могут

выполнять роль индуктора апоптоза или адаптации. АФК могут действовать напрямую на органеллы и компоненты клеток, нарушая их работу, а также быть причиной свободнорадикального окисления главных компонентов клеток – нуклеиновых кислот, белков, липидов, что лежит в основе патогенеза многих заболеваний [25].

К активным формам кислорода относят: супероксид-анион радикал, пероксид водорода, гидроксильный радикал, синглетный кислород, оксид азота, гипохлориды и многие другие соединения. Супероксид-анион радикал и оксид азота относят к первичным АФК, и они помимо деструктивного действия обладают регуляторным и антимикробным действием. Оксид азота участвует в регуляции тонуса сосудов, является нейромедиатором и обладает антиагрегатными и антиадгезионными свойствами. При взаимодействии первичных АФК с ионами переменной валентности образуются вторичные АФК (гидроксильный радикал, радикалы липидов, пероксинитрит). Вторичные АФК способны повреждать липиды мембран клеток, белки и ДНК, а также являются причиной развития патологических состояний, атеросклероза и канцерогенеза [7]. Вследствие взаимодействия вторичных радикалов с молекулами антиоксидантов образуются третичные АФК, они обладают различными функциями, от регуляторных до канцерогенных [8].

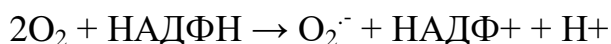
Основным поставщиком активных форм кислорода в клетках является митохондриальная цепь переноса электронов, по-другому называемая дыхательной цепью. Около 97% всего O_2 , поступающего в клетки, тратится на получение АТФ и тепла в ходе реакций окисления субстратов, а на образование АФК отводится только 3% потребляемого кислорода [9]. Однако при чрезмерном потреблении кислорода клетками или сбоях в работе дыхательной цепи образование активных форм кислорода увеличивается. Утечка электронов в электрон-транспортной цепи митохондрий наблюдается с I по III митохондриальный ферментный комплекс (МФК), за счет этого

часть O_2 переходит в активную форму и участвует в свободнорадикальном окислении макромолекул.

Главным местом высвобождения электронов из электрон-транспортной цепи митохондрий и образования супероксиданион радикала является убихинол-цитохром С оксидоредуктаза, где генерация АФК происходит за счет одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода от убисемихинона. В НАДН-убихинон-редуктазе источником супероксиданион радикала является семихиноновая форма флавина. При снижении активности дыхательной цепи и изменении степени восстановленности её компонентов, снижается количество утечек электронов [25].

Пероксисомы участвуют в метаболизме пероксида водорода и имеют в своем составе большое количество ферментов, необходимых для данных процессов. Благодаря активному метаболизму пероксида водорода, пероксисомы являются одним из главных генераторов АФК в клетке.

Супероксид анион радикал может продуцироваться цитохром-зависимыми оксигеназами в гладком ЭПР. В ходе иммунного и воспалительного ответа в НАД(Ф)Н-оксидазной системе плазмалеммы макрофагов и эндотелиоцитов продуцируется супероксид анион. В фагоциты поступает большое количество O_2 и происходит «дыхательный взрыв», в результате которого за счет окисления цитозольного НАД(Ф)Н на внешней стороне мембраны фагоцита образуется супероксиданион радикал [25].



АФК образуются и в результате окисления ряда низкомолекулярных веществ, например катехоламинов, при переходе оксигемоглобина в неактивный метгемоглобин, при метаболизме арахидоновой кислоты.

АФК могут напрямую повреждать молекулы ДНК, так например гидроксид-радикал может взаимодействовать с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, дезоксирибозой и рибозой. При взаимодействии супероксид-анион радикала с гуанином, образуются

различные окси-производные. Образовавшиеся при перекисном окислении липидов радикалы способны напрямую повреждать молекулы ДНК. Недавно было установлено, что ядерная ДНК в меньшей степени подвергается окислительному действию АФК, благодаря наличию белков – гистонов. Митохондриальная ДНК (мтДНК) имеет близость к источникам генерации АФК и не связана с гистонами, что в свою очередь ведет к высокой степени окисления её АФК. В ходе дыхательной цепи образуется пероксид водорода, который может взаимодействовать с ионами железа и меди, которые входят в состав окислительно-восстановительных комплексов электрон-транспортной цепи внутренней митохондриальной мембраны. В результате данного взаимодействия образуется гидроксид-радикал, который способен повреждать мтДНК. После повреждения мтДНК накапливаются ошибки в синтезе компонентов дыхательной цепи, следствием этого является усиление утечки супероксиданион радикалов и нарушение функционирования дыхательной цепи. При повреждении ядерной ДНК активными формами кислорода происходит индукция процесса хромосомных аббераций, что ведет к изменениям структуры хромосом [26].

При развитии окислительного стресса, свободные радикалы, помимо ДНК, способны повреждать белки, изменяя как первичную, вторичную, так и третичную структуру. Это ведет к агрегации и фрагментации белковых молекул, нарушая их функциональное состояние и активность. Так, в ходе свободнорадикальной атаки АТФазы, дегидрогеназы и другие ферменты, содержащие SH-группы окисляются и не способны выполнять свои функции. Если в составе белка содержится металл с переменной валентностью, то при присутствии перекиси водорода могут образовываться гидроксид-радикалы, которые окисляют в активном центре белка аминокислоты. Под влиянием АФК трансформируются карбоксильные группы белков, при этом образуются карбонильные группы, которые при взаимодействии с аминокислотами образуют Шиффовы основания. В результате таких

взаимодействий между белковыми молекулами образуются поперечные сшивки [26].

АФК играют не малую роль в сигнальных путях клеток, они способны влиять на различные транскрипционные белки и принимать участие в передаче сигналов от факторов роста. Так, например, есть данные, что АФК участвуют в качестве сигнальных молекул при активации транскрипционных ядерных факторов AP-1 (активирующий протеин-1) и NF-κB (nuclear factor κB – ядерный фактор каппа-би) и индукции экспрессии генов при иммунном ответе. Помимо того, что АФК могут выступать в качестве ингибиторов цитотоксического действия лекарственных препаратов на раковые клетки, они способны индуцировать апоптоз клетки [27]. В литературе есть данные, что АФК могут в низких концентрациях способствовать делению клеток некоторых тканей, выступая в роли митотических стимуляторов.

АФК оказывают цитотоксическое действие на мембраны клеток, участвуя в перекисном окислении липидов. Мишенью активных форм кислорода служат полиненасыщенные жирные кислоты, входящие фосфолипиды клеточных мембран. ПОЛ протекает в билипидном слое мембран клеток и состоит из нескольких этапов:

1. Инициация окисления цепей.
2. Развитие цепных реакций
3. Разрушение структуры липидов
4. Обрыв цепи.

В результате ПОЛ изменяется проницаемость и текучесть мембраны, молекулы фосфолипидов способны переходить из одного монослоя мембраны в другой, изменяется активность и функциональное состояние мембранных рецепторов, энзимов, белков и ионных каналов. Конечные продукты ПОЛ – альдегиды, кетоны и предельные углеводороды [22]. Практически все продукты ПОЛ могут вызывать негативное воздействие на клетки. Так, ненасыщенные альдегиды являются мутагенами и обладают

выраженной цитотоксичностью: ингибируют активность гликолиза и окислительного фосфорилирования, подавляют синтез белка и нуклеиновых кислот, окисляют SH-группы, ингибируют различные цитозольные и мембраносвязанные ферменты.

Повреждение свободными радикалами липидных, белковых структур и молекул ДНК делает возможным развитие многих патологических состояний [28].

1.4 Антиоксидантная система

Антиоксидантная система – это структура, включающая в себя различные классы соединений, необходимая для обезвреживания АФК и защиты клеток от окислительного повреждения, вызванного кислородными радикалами. Антиоксидантная система включает в себя антиоксидантные ферменты (каталаза, супероксиддисумутазы, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза), витамины, церулоплазмин, альбумины, свободные жирные кислоты и комплексы ионов металлов, а также низкомолекулярные соединения (глутатион, аскорбат, урат, тиолы), образующие редокс-буфер,

Антиоксиданты по своей химической структуре относятся к различным классам соединений: белкам, флавоноидам, стероидным гормонам, полифенолам и фенолам (токоферолы, пирокатехин), а также к иным классам соединений. Антиоксиданты имеют различную растворимость, так встречаются водорастворимые и жирорастворимые. По молекулярной массе антиоксиданты разделяют на низкомолекулярные (глутатион, аскорбат, мочевиная кислота, α -токоферолы) и высокомолекулярные антиоксиданты (белки с металлами переменной валентности), не способные проникать через биологические барьеры [29].

К неферментативной антиоксидантной системе относят следующие антиоксиданты: токоферолы, флавоноиды, β -каротин, убихиноны, билирубин, [31,32] аскорбат, рутин, глутатион, урат, тиолы [31, 32, 33, 34].

Антиоксидантные ферменты в организме человека необходимы для поддержания постоянной концентрации кислородсодержащих радикалов [30]. Низкомолекулярные антиоксиданты, в отличие от ферментов АОС, могут напрямую снижать интенсивность СРО, а также они выполняют многие другие метаболические функции. В основном это относится к группе низкомолекулярных водорастворимых антиоксидантов. Так, глутатион и аскорбат участвуют во многих биохимических процессах, не связанных с антиоксидантной защитой клеток. Уровень низкомолекулярных антиоксидантов тканей определяется соотношением активности ферментных систем их образования и метаболических превращений, транспорта и выведения из организма (мочевина, урат) [36].

В большинстве своем, степень ингибирования свободнорадикальных процессов напрямую зависит от концентрации низкомолекулярных антиоксидантов. Ведущую роль низкомолекулярные антиоксиданты выполняют в тех случаях, когда компоненты ферментативной системы слабо эффективны и не могут быстро вступать в реакции ввиду их инактивации СР. Так низкомолекулярные антиоксиданты в условиях окислительного стресса способствуют быстрой инактивации свободных радикалов, когда ферментативная система АОС не способна сражаться с АФК. При многократном увеличении концентрации АО и активной борьбе с окислительным стрессом, в организме могут образовываться токсичные метаболиты АО, прооксиданты и даже свободные радикалы [36].

1.4.1 Глутатион

Глутатион (L-γ-глутамил-L-цистеинил-глицин) – одно из ведущих внутриклеточных низкомолекулярных тиолсодержащих соединений, которое образуются почти во всех эукариотических клетках.

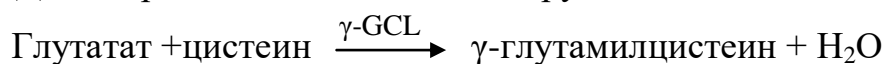
Глутатион – это низкомолекулярный внутриклеточный антиоксидант, который инактивирует свободные радикалы, перехватывая их и является

косубстратом для антиоксидантных ферментов – глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы, а также участвует в восстановлении окисленного глутатионредоксина и дисульфидов. Важное значение ГSH в редокс-зависимых процессах определяется его участием в регуляции клеточного редокс-зависимого сигналинга и активности транскрипционных факторов, в работе системы детоксикации, синтезе эйкозаноидов [37].

В клетке глутатион присутствует в двух формах: восстановленной (ГSH) и окисленной (ГSSG). В большом количестве в клетке можно обнаружить восстановленную форму, а окисленной формы глутатиона в клетках присутствует всего в районе 1% от общего внутриклеточного содержания. Восстановленная форма глутатиона находится как в цитозоле (85-90% общего содержания ГSH), так и в ядре, эндомлазматическом ретикулуме, митохондриях и пероксисомах, но уже в следовых количествах [38].

Синтез глутатиона в большинстве своем протекает в печени (80%), откуда потом образовавшийся ГSH транспортируется в другие ткани и органы. Биосинтез ГSH включает 2 этапа:

1. Между глутаминовой кислотой и цистеином образуется пептидная связь, катализатором является фермент γ -глутамилцистеинлигаза (γ -GCL). Данная реакция является лимитирующей.



2. В ходе второй реакции, катализируемой глутатионсинтетазой (GS), происходит связывание γ -глутамилцистеина и глицина.



Обе реакции протекают в присутствии АТФ и ионов магния [39,40].

Образовавшийся глутатион может затем расщепляться ферментом γ -глутамилтрансферазой (γ -GT), которая способна гидролизовать связь между остатками глутаминовой кислотой и цистеина. В результате гидролиза образуется 5-оксопролин и цистеинилглицин. Образовавшийся 5-оксопролин гидролизуется 5-оксопролиназой с образованием глутамата, в то время как

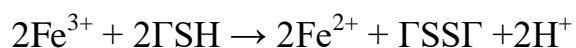
цистеинилглицин расщепляется специфическими дипептидазами с образованием цистеина и глицина [37, 41].

GSH в клетке может восполняться несколькими путями: за счет синтеза в γ -глутамильном цикле и в восстановлении окисленного глутатиона ферментом глутатионредуктазой (ГР) в присутствии НАДФН(H⁺) [42]. GSSG может подобно GS-конъюгатам удаляться из клеток с помощью одностороннего активного транспорта, осуществляемого специальным мембранным гликопротеином MRP (multidrug resistance protein), относящимся к семейству АТФ-зависимых транспортных насосов [43, 44].

Антиоксидантные свойства GSH проявляются в ходе прямого контакта с активными формами кислорода и обменными реакциями с дисульфидными связями, так и функционированием ряда ферментов глутатионового цикла, в которых GSH является косубстратом для ферментов: глутатионпероксидазы (ГПО), глутатион-S-трансферазы (GST) и др.

GSH улавливает свободные радикалы и образует комплекс GS-радикал, после чего происходит димеризация в дисульфид (GSSG). GSH хорошо перехватывает HO[•], ¹O₂. В качестве косубстрата GSH способен восстанавливать H₂O₂ до воды в ходе реакции с участием глутатионпероксидазы [33]. GSH вместе с аскорбиновой кислотой (АК) способствует восстановлению метгемоглобина [33]. В физиологических условиях этот процесс является незначительным, так как только 13% метгемоглобина восстанавливается, но в условиях окислительного стресса, концентрация метгемоглобина в эритроцитах может достигать 15-20%, что приводит к незаменимости данного процесса. [14, 39].

Обнаружено, что SH-содержащие соединения вовлекаются в окисление в первую очередь. Вместе с тем в условиях окислительного стресса окисление SH-групп приводит к тому, что глутатион преобладает в форме цитотоксических радикалов GS[•] и GSO₂[•]. Наличие легкоокисляющегося GSH способствует восстановлению металлов переменной валентности:



Многие белки имеют в своем составе функционально значимые остатки цистеина, которые могут подвергаться посттрансляционной модификации, в том числе и окислению. К такой посттрансляционной модификации можно отнести образование между остатками цистеина белка и GSH дисульфидной связи с образованием комплекса белок-SSG, данный процесс носит название S-глутатионилирования. Такая посттрансляционная модификация способствует защите белков от свободнорадикального окисления и выполняет огромную роль в регуляцию активности белков и редокс-сигналинге. Наличие в клетке большого количества глутатионилированных белков может являться признаком развития окислительного стресса, ведущего к апоптозу [45].

Снижение таких показателей, как суммарное содержание GSH и GSSG и отношение их концентраций положительно коррелирует с интенсификацией ПОЛ. Накопление GSSG в тканях рассматривается как индикатор окислительного стресса, напротив, повышение содержания GSH свидетельствует о развитии адаптивного ответа ткани на ОС [35].

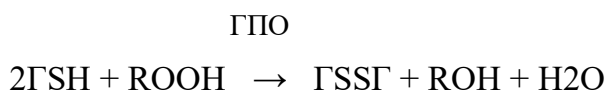
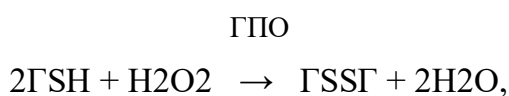
Эффективное противостояние развитию ОС в тканях наблюдается при высокой индуцируемости в них процессов освобождения от GSSG через связывание с белками, восстановление в глутатионредуктазной реакции, либо активного экспорта дисульфида из клеток [46].

1.4.2 Глутатионпероксидаза

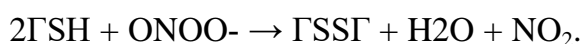
Глутатионпероксидаза (ГПО) присутствует почти во всех клетках человека, в цитозоле находится большая его часть — около 70%, а содержание в митохондриях составляет около 20-30%. ГПО по химической структуре является гомотетрамером, молекулярная масса субъединицы

составляет 19 кДа. В состав ГПО входит один атом селена, связанный с цистеиновыми остатками.

ГПО нейтрализует H_2O_2 , превращая в воду, и переводит пероксиды липидов (гидропероксиды линолевой и линоленовой кислот, холестерин-7 β -гидропероксид и некоторые синтетические вещества в соответствующие спирты, используя в качестве субстрата GSH. Сульфгидрильная группа глутатиона служит донором электронов и, окисляясь, образует дисульфидную форму глутатиона:



Также ГПО нейтрализует пероксинитрит, токсическое производное оксида азота:



Наибольшей активностью ГПО обладает в печени, эритроцитах, надпочечниках, средней активностью в легких и сердце, низкой – в мышцах. В настоящее время описано 8 белков с глутатионпероксидазной активностью, но наиболее изученными являются ГПО₁ – ГПО₄. Все изоформы ГПО кодируются разными генами, различаются по локализации в клетке, структуре субъединиц, первичной структуре и ферментативному действию (по субстратам) [47].

Вклад ГПО в процесс нейтрализации пероксида водорода является большим, чем у каталазы. ГПО участвует в ингибировании этапа инициации ПОЛ за счет нейтрализации H_2O_2 . ГПО имеет более высокое сродство к H_2O_2 , чем каталаза и защищает от пероксида водорода даже при низких его концентрациях, что свидетельствует в пользу превалирующей роли ГПО.

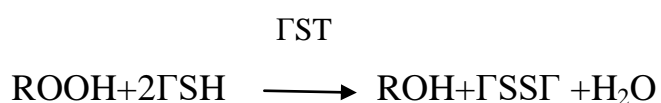
1.4.3 Глутатион-S-трансфераза

Глутатион-S-трансфераза – фермент, который можно обнаружить почти во всех тканях организма млекопитающих, но наибольшее его количество находится в печени. Так, в цитозоле находится около 90% всех

изоформ GST клетки. Всего имеется 3 основных семейства GST: митохондриальные, цитозольные и микросомальные. Цитозольные и митохондриальные формы представлены растворимыми соединениями и являются гомо и гетеродимерами. Исходя из аминокислотного состава цитозольные формы GST можно разделить на 7 классов: α , μ , π , θ , ζ , ω , σ , при объединении которых получается 17 изоформ. Микросомальное семейство включает в себя моно-, ди-, три- и мультимерные комплексы.

Субъединицы GST представлены 2 доменами и имеют соединительный участок. N-концевой домен (G-сайт) – место связывания GSH – обладает топологией, подобной тиоредоксину, и включает в себя четыре β -складчатых слоя ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ и $\beta 4$), три из которых расположены антипараллельно, и трех α -спиралей. Эти элементы вторичной структуры скомбинированы в последовательности $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$. С-концевой домен (H-сайт) – место связывания косубстрата.

GST участвует во многих физиологически важных процессах организма. При конъюгации с GSH способствует каталитической инактивации разнообразных ксенобиотиков. Может участвовать в восстановлении гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот, фосфолипидов и холестерина, благодаря Se-независимой глутатионпероксидазной активности [48].



Помимо того, что GST является частью АОС организма, он выполняет регуляторную функцию: участвует в клеточном сигналинге за счет белок-белковых взаимодействий с киназами, активация которых происходит при развитии окислительного стресса.

Так как GST способен напрямую восстанавливать фосфолипиды мембран, то при физиологических условиях и низкой активности

фосфолипазы A2 именно GST контролирует уровень липопероксидов. При развитии патологических процессов внутри организма и повышении концентрации внутриклеточного кальция происходит активация фосфолипазы A2, это ведет к высвобождению несвязанных гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот. Совокупность этих процессов способствует вступлению ГПО в борьбу с образовавшимися гидроперекисями жирных кислот [26].

Научно доказано, что GST участвует в процессе S-глутатионилирования. Так, при интенсификации образования АФК, увеличивается S-глутатионилирование, способствующее защите остатков цистеина белков от необратимого окисления. Позже выяснилось, что S-глутатионилирование выполняет важную роль в клеточном сигналинге за счет чувствительности остатков цистеина к редокс-модификации.

1.4.4 Глутатионредуктаза

Глутатионредуктаза (ГР) играет основную роль в поддержании отношения восстановленного глутатиона (GSH) к окисленному глутатиону. ГР катализирует обратимое НАДФН-зависимое восстановление GSSG с образованием двух молекул GSH, последний в свою очередь помогает устранить АФК, либо напрямую инактивируя их, либо действуя в качестве донора электронов для АФК-акцепторов.

ГР состоит из двух одинаковых субъединиц, каждая с ФАД-связывающим доменом, НАДФН-связывающим доменом и доменом димеризации. ФАД – и НАДФН-связывающие домены сходятся у активного сайта фермента и восстановление протекает с участием аминокислотных остатков обеих субъединиц. Каталитический цикл ГР разделен на две полуреакции с альтернативными субстратами. В восстановительной полуреакции с НАДФН сначала два электрона переходят из НАДФН в ФАД и из ФАД – в окислительно-восстановительный дисульфид Cys58-Cys63,

образуя восстановленный фермент. Затем НАДФ⁺ диссоциирует и заменяется другой молекулой НАДФН. Во время окислительной полуреакции с ГSSG, Cys58 полученного дитиола атакует ГSSG с образованием глутатионилированного фермента, в то время как высвобождается первая молекула GSH. Затем Cys63 атакует смешанный дисульфид, высвобождается вторая молекула GSH и восстанавливается окислительно-восстановительный центр [49].

У эукариот ГР обнаружена в цитоплазме и в органеллах, включая ядро и митохондрии. Оксидоредуктазная активность была также обнаружена в эндоплазматической сети и в лизосомах. Глутатионредуктаза может существовать в просвете эндоплазматического ретикулума. Недавно было описано, что в лизосомах тиолредуктаза осуществляет превращение окисленного глутатиона в его восстановленную форму [50].

1.4.5 Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ) является ферментом, экспрессируемым во всех клетках организма и участвующим в пентозофосфатном пути. Г6ФДГ катализирует окисление глюкозо-6-фосфата (Г6Ф) до 6-фосфоглюконо-d-лактона, который затем гидролизуется до 6-фосфоглюконо-v-лактон. Последний, в свою очередь, под действием фермента фосфоглюконатдегидрогеназы (6ФГД) окисляется и декарбоксилируется до пентозы, рибулозо-5-фосфата. Оба фермента Г6ФДГ и 6ФГД имеют НАДФ⁺ в качестве кофермента, и, следовательно, образуются 2 молекулы НАДФН [51].

Следует отметить, что, в отличие от других типов клеток, эритроциты не содержат митохондрий, и поэтому пентозофосфатный путь является единственным источником НАДФН, который играет ключевую роль в защите клеток от окислительного повреждения активными формами кислорода.

Фермент Г6ФДГ активен в эритроцитах в виде тетрамерной или димерной формы. Димерные структуры состоят из двух субъединиц симметрично расположены через сложную структуру β -листов. Каждая субъединица связывается с молекулой NADP^+ для своей структурной стабильности и состоит из 479 аминокислотных остатков.

Ген Г6ФДГ, расположен вблизи теломерной области дистального плеча X-хромосомы в позиции – Xq28 и отличается высоким полиморфизмом. На сегодняшний день найдено около 400 вариантов Г6ФДГ. Они различаются по электрофоретической подвижности и уровню активности, кинетическим константам и оптимуму pH [51].

1.4.6 Аскорбиновая кислота

Аскорбиновая кислота (витамин С) представляет собой лактон гулоновой кислоты и по структуре схожа с α -глюкозой. Синтез аскорбиновой кислоты (АК) в организме человека не происходит, так как в процессе эволюции был утрачен ген, ответственный за синтез оксидазы L-гулонолактата микросом. Этот фермент необходим в финальной стадии биосинтеза АК [52, 53, 54].

Продуктом окисления АК в тканях человека является дегидроаскорбиновая кислота (ДАК), которая самопроизвольно превращается в дикетогулоновую кислоту (ДКГК). Дикетогулоновая кислота распадается на трионовую и этандиовую кислоты [39].

Аскорбиновая кислота используется в окислительно-восстановительных процессах и обладает чрезвычайно широким спектром антиоксидантных свойств. АК вступает во взаимодействие с супероксид-анионом, синглетным кислородом, гидроксильным и перекисным радикалами [55]. АК участвует в реакции восстановления, так при взаимодействии с α -токоферильным радикалом она восстанавливая α -токоферол возвращает его антиоксидантные свойства, также тиильный (GS^{\cdot}) и тиопероксильный (GSO_2^{\cdot}) радикалы. При

восстановлении пероксида водорода АК может принимать прямое участие, либо в совокупности с аскорбатпероксидазой.

Присутствие аскорбиновой кислоты в эритроцитах оказывает защитное действие на гемоглобин, препятствуя его окислению. Аскорбиновая кислота способна восстанавливать метгемоглобин, окисляясь в ДАК. Обратное превращение осуществляется за счет глутатиона [55]. Аскорбиновая кислота также препятствует перекисному окислению ненасыщенных жирных кислот в липидном бислое мембраны эритроцитов. Аскорбат не влияет непосредственно на перекисное окисление липидов мембран, но он может выполнять эту функцию косвенно, снижая токофероксильный свободный радикал в липидном бислое [56].

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. Постоянное пополнение эритроцитов аскорбиновой кислотой происходит за счет поступления ДАК из плазмы крови [57]. Поглощение аскорбиновой кислоты эритроцитами происходит при участии глюкозного транспортного белка (рис. 1) GLUT1 [58].

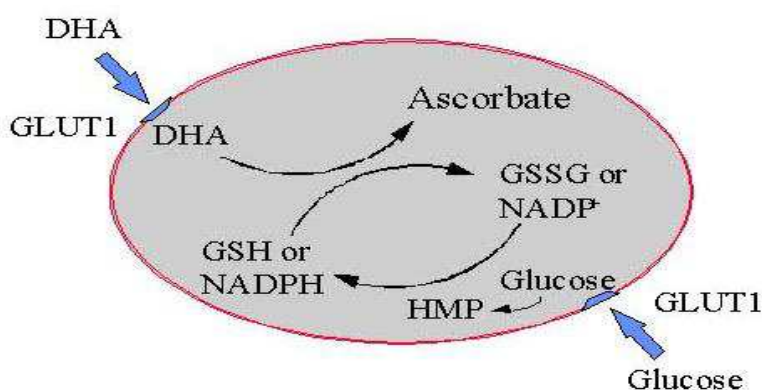


Рисунок 1 – Рециклизация аскорбата из ДАК в эритроцитах (Восстановление эритроцитами ДАК в АК): DHA – дегидроаскорбиновая кислота; GLUT1 – глюкозный транспортер, ГЛЮТ1; HMP – гексозомонофосфатный путь [58]

Напротив, у большинства ядерных клеток имеется зависимый от натрия и энергии транспортер с высоким сродством к аскорбату, который поддерживает низкие микромолярные внутриклеточные концентрации витамина [59]. Поскольку эритроциты испытывают недостаток в активном транспортере аскорбата, они имеют внутриклеточные концентрации витамина, которые сходны с таковыми в плазме, от 20 до 60 микромолей у людей, не принимающих добавки аскорбиновой кислоты [58].

В качестве стабилизатора АК выступает мочевая кислота, которая ингибирует радикалы аскорбата и предотвращает его окисление Fe [25].

ДАК имеет большую способность к диффузии через мембраны эритроцитов, чем АК. ДАК – транспортная форма аскорбата – проникает в эритроциты в ходе простой или облегченной диффузии, где восстанавливается до АК, при этом процесс перехода через мембрану не энергозатратный [25].

АК стимулирует Na^+ -зависимый транспорт аминокислот, чувствительное к Ca^{2+} выделение ацетилхолина из синаптических пузырьков в присутствии АТФ и Mg^{2+} , снижает связывание соответствующих лигандов опиатными, дофаминовыми, α -адрено- и мускариновыми рецепторами, препятствует окислению гемоглобина, неферментативно восстанавливает метгемоглобин.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

В работе для исследования компонентов антиоксидантной системы использовалась кровь 42-ти условно здоровых и 43-ми больных с диагнозом диффузный токсический зоб до лекарственной терапии. Все пациенты были женщины, а средний возраст составлял 43 ± 5 года. Исследования проводились с согласия пациентов.

Объектом исследования служили упакованные эритроциты. Для этого кровь забиралась утром натощак из локтевой вены обследуемого в вакутейнеры с гепарином в качестве антикоагулянта. Для отделения эритроцитов от плазмы кровь центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. Затем трехкратно отмывали 0,9%-ным раствором NaCl, центрифугируя после каждой отмывки 15 мин при 3000 об/мин [60].

2.2 Определение гемоглобина

Определение содержания гемоглобина (Hb) осуществляли с использованием набора реагентов для определения гемоглобина фирмы «Агат-Мед».

Принцип метода: при взаимодействии гемоглобин крови с железосинеродистым калием происходит окисление гемоглобина в метгемоглобин, а после реакции с ацетонциангидрином образуется гемиглобинцианид (цианметгемоглобин). Величина оптической плотности гемиглобинцианида при длине волны 540 нм пропорциональна концентрации гемоглобина в образце. Измерение проводили спектрофотометрически и содержание гемоглобина в испытуемых образцах выражали в граммах на литр (г/л) упакованных эритроцитов.

Реагенты:

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

2. Ацетонциангидрин.

3. Калибровочный раствор гемоглобина с концентрацией 120 г/л.

Ход определения: кровь разводили трансформирующим раствором в 251 раз, для этого к 5 мл трансформирующего раствора и 0,02 мл крови, после чего пробу перемешали. Через 10 мин проводили фотометрирование при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы (трансформирующего раствора). Окраска проб стабильна в течение более 1 час.

Содержание гемоглобина находили по формуле 1:

$$: A = \frac{D}{B} \times 120; \quad (1)$$

где:

A – концентрация гемоглобина в мг/мл;

B – оптическая плотность контрольной пробы;

D – оптическая плотность опытной пробы;

120 – коэффициент пересчета.

2.3 Определение содержания восстановленного глутатиона

Для определения количества ГSH использовалась стандартная методика, описанная E. Beutler 1990 [61].

Принцип метода: при взаимодействии восстановленного глутатиона с ДТНБК появляется окрашивание желтого цвета, обусловленное образованием аниона 2-нитро-5-тиобензоата. Окрашивание желтого цвета, пропорциональное количеству аниона, регистрируют спектрофотометрически при длине волны 412 нм.

Реагенты:

1. Осаждающий раствор (1,67 г ледяной ортофосфорной кислоты, 0,2 г ЭДТА и 30 г хлористого натрия растворили в дистиллированной воде и довели до метки 100 мл).

2. Фосфатный буфер (0,3 М Na₂HPO₄).
3. 1 %-ный раствор цитрата натрия.
4. 0,02%-ный раствор дитионитро(бис)бензойной кислоты, приготовленный на 1 %-ном растворе цитрата натрия.

Ход определения: для приготовления гемолизата смешали 0,9 мл дистиллированной воды (температура 0 °С) с 0,1 мл отмытых эритроцитов. Для осаждения белков добавили к гемолизату 1,5 мл осаждающего раствора и перемешали. Пробы инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре, после чего отфильтровали через фильтр типа «красная лента». В кювету с толщиной слоя 1,0 см поместили 0,5 мл фильтрата и 2,0 мл фосфатного буфера. В параллель с опытной пробой готовили контрольную, в состав которой входит осаждающий раствор, разведенный в отношении 2:5 дистиллированной водой. Фотометрирование проб проводили до и после добавления ДТНБК. Объем вносимого в пробы ДТНБК составлял 0,25 мл, а измерение проводили на спектрофотометре при длине волны 412 нм в кювете с толщиной слоя 1,0 см против воздуха.

Содержание глутатиона определяли по формуле 2:

$$C = \frac{(E_2 - E_1)}{13600} \times F \times 138 \times \frac{1000}{Hb}; \quad (2)$$

где:

C – концентрация восстановленного глутатиона в мкмоль/гHb;

E₁ – оптическая плотность опытной пробы до добавления ДТНБК;

E₂ – оптическая плотность опытной пробы после добавления ДТНБК;

138 – разведение эритроцитов в реакционной пробе;

Hb – гемоглобин в г/л;

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);

13600 – коэффициент молярной экстинкции окрашенного аниона, образующегося при взаимодействии GSH с ДТНБК.

2.4 Определение содержания окисленного глутатиона

За основу количественного определения GSSG в эритроцитах был взят метод, описанный в монографии В.С. Асатиани [62].

Принцип метода: определение содержания окисленного глутатиона основано на его количественном восстановлении в GSH под действием фермента глутатионредуктазы и восстановленного НАДФ. Убыль восстановленного НАДФ регистрировалась спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

Ход определения: источником GSSG служил хлорный экстракт эритроцитов. Для приготовления экстракта 500 мкл упакованных эритроцитов разводили в двукратном объеме 0,9% раствора NaCl, охлажденного до 0°C. К полученной смеси добавляли равный объем, охлажденной до 0° С хлорной кислоты. Смесь тщательно перемешивали и центрифугировали для осаждения белков. Из пробы отбирали 1 мл супернатанта, добавляли 200 мкл 1М раствора K_2CO_3 и оставляли на 15 минут в ледяной бане для осаждения перхлората калия. Затем осадок отфильтровывали и доводили pH фильтрата до 7,0 добавлением 0,1 М соляной кислоты.

Инкубационная проба готовилась последовательным внесением следующих компонентов:

1,6 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора pH 7,0;

0,1 мл восстановленного НАДФ;

7,5 мкл глутатионредуктазы;

0,5 мл хлорного экстракта эритроцитов.

Вычисление содержания GSSG в пробе проводили по формуле 3:

$$C = \frac{\Delta E / 10 * 2,2 * 1000}{6,22 * d * Hb} * 4,25; \quad (3)$$

где:

$\Delta E/10$ – изменение оптической плотности инкубационной пробы за минуту;

d – ширина кюветы (1 см);

4,25 – коэффициент для пересчета ГССГ на 1 мл эритроцитов, учитывающий содержание эритроцитов в пробе;

6,22 – коэффициент экстинкции для НАДФН, $\text{мкМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ при $\lambda = 340$ нм;

1000 – коэффициент пересчета гемоглобина;

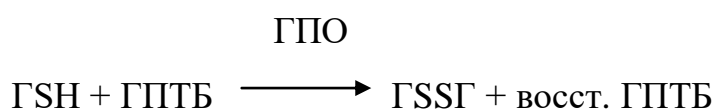
Hb – гемоглобин, г/л;

2,2 – объем инкубационной пробы (мл);

C – количество ГССГ, мкмоль/г Hb

2.5 Определение активности глутатионпероксидазы

Принцип метода: глутатионпероксидаза катализирует реакцию взаимодействия глутатиона с гидроперекисью трет-бутила (ГПТБ):



Активность фермента оценивали по изменению содержания GSH в пробах до, и после инкубации с модельным субстратом в ходе цветной реакции с ДТНБК [63].

Реагенты:

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) готовится новый реактив перед каждым определением.

3. 0,14%-ный раствор ГПТБ (коммерческий препарат). Готовится новый реактив перед каждым определением.

4. 20%-ный раствор ТХУ.

5. 0,4%-ный раствор ДТНБК, приготовленный на метаноле.

Ход определения: гемолизат отмытых и упакованных эритроцитов готовили в соотношении 1:200 (эритроциты: дист. вода, охлажденная до 0°C). Смешали 0,2 мл полученного гемолизата и 0,73 мл сложного буфера, пробы инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Для запуска реакции в пробы вносили 0,07 мл раствора ГПТБ и инкубировали при 37°C в течение ровно 5 мин, после реакцию останавливали добавлением 0,2 мл ТХУ. В контрольную пробу раствор ГПТБ добавляли после осаждения белка ТХУ. После инкубации супернатант отделяли центрифугированием при 1700 g в течение 10 мин.

К 0,1 мл полученного супернатанта добавляли 2,65 мл 0,1 М трис-НСI буфера и 0,025 мл раствора ДТНБК, пробы перемешивали. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре при длине волны 412 нм, в кювете с толщиной слоя 1,0 см против дистиллированной воды.

Расчет активности фермента ГПО проводили по формуле 4:

$$A = \frac{\Delta D * V_{p.c.} * 1000}{V_{np} * \varepsilon * Hb * d} \quad (4)$$

где ΔD – разность оптических плотностей в опытной и контрольной пробах;

V_{np} – объем супернатанта, используемый для определения концентрации ГПО (0,1 мл);

d – длина оптического пути кюветы (1 см);

$V_{p.c.}$ – объем реакционной смеси (2,775 мл);

1000/белка – коэффициент пересчета на г/белка

ε – коэффициент молярной экстинкции (13600 M⁻¹ x см⁻¹)

Hb – гемоглобин, г/л.

2.6 Определение активности глутатион-S-трансферазы

Принцип метода: активность глутатион-S-трансферазы определяли по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между GSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ) [64].



Увеличение количества конъюгатов в ходе испытания регистрировали спектрофотометрически при длине волны 340 нм (максимум поглощения глутатион-S-ХДНБ).

Реагенты:

1. 0,1 М калий-фосфатный буфер, pH=6,5.
2. 0,015 М раствор восстановленного глутатиона.
3. Метанол.
4. 0,015М раствор ХДНБ (готовится на метаноле).

Ход определения: гемолизат отмытых и упакованных эритроцитов готовили в соотношении 1:20 (эритроциты: дист. вода, охлажденная до 0°C). В кювету с толщиной слоя 1,0 см внесли 2,5 мл калий-фосфатного буфера, 0,2 мл раствора восстановленного глутатиона и 0,1 мл гемолизата. Реакцию запускали внесением в кювету 0,2 мл ХДНБ и перемешивали пробу. Проводили кинетическое измерение оптической плотности длине волны 340 нм сразу после перемешивания в течение трех минут. Измерение проводили при температуре 25 °С

Расчет активности фермента GST проводили по формуле 5:

$$A = \frac{\Delta E / \text{мин} * V_{p.c.} * 1000}{\varepsilon * V_n * Hb * d} \quad (5)$$

Где:

ΔE – изменение оптической плотности в мин;

d – длина оптического пути кюветы (1см);

ε – коэффициент молярной экстинкции при $\lambda = 340\text{нм}$ ($9600\text{М}^{-1} * \text{см}^{-1}$);

Hb – гемоглобин, г/л;

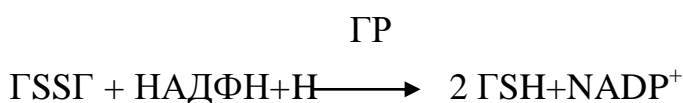
1000 – коэффициент для пересчета активности GST от молярной к миллимолярной;

Vп. – объем пробы, используемый для определения активности GST (мл);

Vр.с. – объем реакционной смеси (мл).

2.7 Определение активности глутатионредуктазы

Принцип метода: глутатионредуктаза катализирует восстановление окисленного глутатиона, GSSG в GSH за счет НАДФН [65].



Реагенты:

1. 50 mM калий-фосфатный буфер, pH 7,0, содержащий 1mM ЭДТА.
2. 0,1 mM НАДФН (хранят в замороженном виде).
3. 0,5 mM GSSG (хранят в замороженном виде).

Ход определения: гемолизат отмытых и упакованных эритроцитов готовили в соотношении 1:9 (эритроциты: дист. вода, охлажденная до 0°C). В кювету спектрофотометра с толщиной слоя 1,0 см поочередно добавляли 2,7 мл 50 mM калий-фосфатного буфера, 0,1 мл 0,1 mM раствора НАДФН, 0,1 мл гемолизата. Реакция инициировали внесением в реакционную смесь 0,1 мл 0,5mM раствора окисленного глутатиона, пробы перемешивали. Оптическую плотность считывали через 1 мин в течение 3 минут против пробы, содержащей все компоненты, кроме окисленного глутатиона.

Активность фермента ГР рассчитывали по формуле 6:

$$A = \frac{\Delta E / \text{мин} \times K}{6,22 \times d \times \text{Hb}} \times 1000 \quad (6)$$

Где:

A – активность ГР, мкмоль/мин*г Hb;

ΔE/мин – изменение оптической плотности в мин;

К – коэффициент, учитывающий разведение эритроцитов в реакционной пробе;

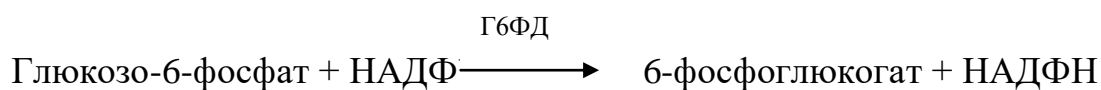
6,22 – коэффициент микромолярной экстинкции для НАДФН при 340 нм;

d – длина оптического пути кюветы (см);

Hв – гемоглобин в г/л.

2.8 Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

Принцип метода: активность фермента определяли по скорости восстановления НАДФ⁺ при взаимодействии с глюкозо-6-фосфатом. Увеличение концентрации НАДФН в ходе реакции регистрировали спектрофотометрически при 340 нм [61].



Реагенты:

1. 1М трис-НСl буфер, содержащий 5мМ ЭДТА.
2. 2мМ НАДФ⁺.
3. 6мМ глюкозо-6-фосфат.
4. 0,1М MgCl₂.

Ход определения: гемолизат отмытых и упакованных эритроцитов готовили в соотношении 1:20 (эритроциты: дист. вода, охлажденная до 0°С). В кювету спектрофотометра с толщиной слоя 1,0 см поочередно добавляли 0,3 мл 1 М трисНСl буфера, рН 8,0, содержащего ЭДТА в концентрации 5мМ, 0,3 мл 0,1 М раствора MgCl₂, 0,3 мл 2мМ НАДФ⁺, 0,06 мл гемолизата и 1,74 мл дистиллированной воды. Инкубировали пробы при температуре 37°С в течение 10 мин. Реакцию запускали внесением в реакционную смесь 0,3 мл 6 мМ глюкозо-6-фосфата. Измерение оптической плотности проводили при температуре 25 °С и длине волны 340 нм сразу после перемешивания в течение 3 мин. Раствор сравнения – дистиллированная вода. Полученные

значения используются для вычисления активности Г6ФДГ, которую выражают в мкмолях НАДФН, образованного за 1 мин на 1 г гемоглобина.

Расчет активности Г6ФДГ производили по формуле 7:

$$A = \frac{\Delta E / \text{мин} \times K}{6,22 \times d \times Hb} \times 1000 \quad (7)$$

где;

A – активность Г6ФДГ;

$\Delta E/\text{мин}$ – изменение оптической плотности;

K – коэффициент, учитывающий разведение эритроцитов в реакционной пробе, равный 1000;

6,22 – коэффициент микромолярной экстинкции для НАДФН при 340 нм;

d – расстояние между рабочими гранями кюветы (см);

Hb – гемоглобин в г/л.

2.9 Определение содержания аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислоты

Принцип метода: при взаимодействии ДАК с 2,4-динитрофенилгидразином образуются окрашенные в красный цвет азаны в серной кислоте, окраску которых используют для спектрофотометрического определения. Для вычисления суммы всех кислот их окисляют 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия. Содержание АК определяют по разности между суммой всех окисленных форм аскорбиновой кислоты (АК, ДАК) и содержанием ДАК [66].

Реагенты:

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. 200 мг аскорбиновой кислоты растворяли в 10 мл 5%-ной ТХУ (основной стандартный раствор). Для приготовления рабочего стандартного раствора аскорбиновой кислоты к 0,005 мл основного раствора приливают 4,995 мл 5%-ной ТХУ.

Ход определения: в пробирки внесли по 0,25 мл упакованных и отмытых эритроцитов, 0,75 мл 0,9%-ного NaCl и 1 мл 5%-ной ТХУ. Испытание проводили в 2-х повторностях. Содержимое пробирок перемешали и центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. В новые пробирки переносили по 1 мл супернатанта, в одну из пробирок с супернатантом по каплям внесли 0,001 н раствор 2,6-ДХФФН до появления слабо-розового окрашивания, устойчивого в течение 30 с. После чего, в каждую пробирку вносили по 0,25 мл 2% раствора 2,4-ДФГ. Пробу инкубировали в течение 10 мин при температуре 100°C, после чего поместили в ледяную баню и добавили по 1,25 мл 85%-ного раствора H_2SO_4 . Параллельно с опытными пробами готовили холостую пробу: в пробирку вносили 1 мл дистиллированной воды, затем добавляли 0,25 мл раствора 2,4-ДФГ и 1,25 мл 85%-ной серной кислоты.

После тщательного перемешивания пробы инкубировали 60 мин при температуре 18-25°C в темноте. Измерение оптической плотности опытных проб против холостой пробы проводили при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 1 см. Окраска стабильна не менее 30 мин после окончания инкубации при хранении проб в темноте.

Концентрацию кислот рассчитывали по формулам (8) и (9). Сначала находили концентрацию всех кислот, выраженную в мг%, затем – концентрацию окисленных форм аскорбата в мг% и далее определяли концентрацию АК.

$$C = \frac{E_1 \cdot 2}{E_2}, \text{ где} \quad (8)$$

C – концентрация кислот, мг%;

2 – концентрация стандартного раствора аскорбиновой кислоты, мг%;

E1- оптическая плотность опытной пробы;

E2 – оптическая плотность стандартного раствора аскорбата.

$$C_{\text{мкмоль/л}} = \frac{C_{\text{мг\%}} \cdot 10000}{176}, \text{ где} \quad (9)$$

C_{мкмоль/л} – концентрации кислот, мкмоль/л;

C_{мг%} - концентрация кислот, мг%;

10000 – коэффициент, учитывающий перевод мг% в граммы, объем исследуемого образца, разведение эритроцитов;

176 – молекулярная масса аскорбата (г/моль).

2.10 Статистическая обработка результатов

Обработка экспериментальных данных проводилась с использованием пакета программ статистической обработки данных EXCEL 2007

Достоверность различий между выборками оценивали по критерию Манна-Уитни с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0.. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты с 41 по 50 страницы, результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

$^1\text{O}_2^\bullet$ – синглетный кислород

GS - глутатионсинтетаза

H_2O_2 – перекись водорода

Hb – гемоглобин

MRP (multidrug resistance protein)

NaCl – натрия хлорид

O_2^\bullet – супероксидный радикал

γ -GT – глутамилтрансфераза

γ -GCL – γ -глутамилцистеинлигаза

АЗЩЖ – аутоиммунные заболевания щитовидной железы

АК – аскорбиновая кислота

АО – антиоксиданты

АОЗ – антиоксидантная защита

АОС – антиоксидантная система

АТФ-аза – аденозинтрифосфотаза

АФК – активные формы кислорода

Г6Ф – глюкозо-6-фосфат

Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа

GR – глутатион редоксин

GSH, GSSG – восстановленный и окисленный глутатион

GST – глутатион-S-трансфераза

ГПО – глутатионпероксидаза

ГПТБ – гидроперекись тетра-бутил

ГР – глутатионредуктаза

ДАК – дегидроаскорбиновая кислота

ДИТ – диiodтирозин

ДКГК – дикетогулоновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТЗ – диффузный токсический зоб
ДТНБК - 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойная кислота
ЗЩЖ – заболевания щитовидной железы
ИФБиБТ – Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
МИТ – монойодтирозин
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
МФК – митохондриальный ферментный комплекс
НАД(Ф)Н– восстановленный никотинамидадениндинуклеатид(фосфат)
НО• – гидроксильный радикал
ОС – окислительный стресс
ПОЛ – перекисное окисление липидов
РНК – рибонуклеиновая кислота
СРО – свободно радикальное окисление
СФУ – Сибирский федеральный университет
Т₄ – тироксин
Т₃ – трийодтиронин
ТТГ – тиреотропный гормон
ФАД – флавинадениндинуклеотид
ХДНБ – 1-хлор, 2,4 – диниробензол
Цис – цистеиновая аминокислота
ЩЖ – щитовидная железа
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Якубовский, С.В. Использование сукцинатсодержащих препаратов в комплексном лечении пациентов с диффузным токсическим зобом / С.В. Якубовский, Г.Г. Кондратенко, И.И. Попова // УО Белорус. гос. мед. ун-та. Клиническая медицина. – 2014. – № 8. – С. 50-53.
2. Тепперман, Дж. Физиология обмена веществ и эндокринной системы : учеб. пособие для вузов / Дж. Тепперман, Х. Тепперман ; под ред. Я. И. Ажипы ; Вводный курс : пер. с англ. – Москва : Мир, 1989. – 656 с.
3. Манюк, Е.С. Коррекция морфофункциональных изменений щитовидной железы при гипо- и гипертиреозе аконитом байкальским (экспериментальное исследование) : дис. ... канд. мед. наук : 14.00.16 / Манюк Елена Степановна. – Иркутск, 2008. – 130 с.
4. Venditti, P. Thyroid hormone-induced oxidative stress / P. Venditti, Di Meo // Cellular and Molecular Life Science. – 2006. – P. 414-434.
5. Halliwell, B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, M.C.Guttridge ; – 4th. ed. – Oxford : Oxford University Press, 2007. – 851 p.
6. Попов, С.С. Влияние мелатонина на свободнорадикальный гомеостаз в тканях крыс при тиреотоксикозе / С.С Попов, А.Н. Пашков, Т.Н. Попов, В.И. Золоедов, А.В. Семенихина, Т.И. Рахманова // Воронеж. гос. ун-т. Биомедицинская химия. – 2008. – Т. 54. – № 1. – С. 114-121.
7. Барабой, В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / В. А. Барабой // Успехи современной биологии. – 1991. –Т. 111. – № 6. – С. 21-28.
8. Ланкин, В. З. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях : пособие для врачей / В. З. Ланкин, А. К. Тихазе, Ю. Н. Беленков. – М. : Наука, 2001. – 78 с.
9. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю. А. Владимиров // Вестн. РАМН.– 1998.– № 7.– С. 43-51.
10. Эскин, И.А. Основы физиологии эндокринных желез : учеб.

пособие для биол. специальностей ун-тов / И. А. Эскин. – М.: Высшая школа, 1996. – 356 с.

11. Тепперман, Дж. Физиология обмена веществ и эндокринной системы : учеб. пособие для вузов / Дж. Тепперман, Х. Тепперман ; под ред. Я. И. Ажицы ; Вводный курс : пер. с англ. – М.: Мир, 1989. – 656 с.

12. Скулачев, В.П. Феноптоз: запрограммированная смерть организма/ В.П. Скулачев //Биохимия, - 1999. - Т. 64, № 12. - С. 1679-1688.

13. Dröge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function / W. Dröge // *Physiol. Rev.*, - 2002.- № 82. – P. 47-95.

14. Дедов, И. И. Йоддефицитные заболевания в Российской Федерации / И. И. Дедов, Н. Ю. Свириденко // Вестник РАМН. – 2001. – № 6. – С.3-12.

15. Wu, D. Interaction of 1-Hydroxyethyl Radical With Glutathione, Ascorbic Acid and α -Tocopherol /D. Wu, D.A. Stoyanovsky, A.I. Cederbaum // *Free Radic. Biology & Med.*, - 1998. - № 1. - P. 132 – 138.

16. Благосклонная, Я. В. Заболевания щитовидной железы: современное лечение и профилактика : науч. изд. / Я. В Благосклонная, А. Ю. Бабенко, Е. И. Красильникова. –СПб. : Невский проспект, 2005. – 124 с.

17. Валидипа, Е.А. Заболевания щитовидной железы: науч. изд / Е.А. Благосклонная. – СПб.: Спутник врача, 2006. – 355с.

18. Diana, T Stimulatory TSH-Receptor Antibodies and Oxidative Stress in Graves Disease /T. Diana, A. Daiber, M.Oelze, et al.// *Clin Endocrinol Metab.* – 2018. – № 103. – P. 3668-3677.

19. Козаченко, А.И. Влияние аскорбата и α -токоферола на устойчивость β -каротина к окислению / А.И. Козаченко, С.М. Гуревич, Л.Г. Наглер // Бюлл. эксперим биологии и медицины, - 2005. - №7. -С. 59-63.

20. Никинченко, Ю.В. Ферментативная регуляция свободно-радикального окисления липидов при действии факторов, влияющих на скорость старения / Ю.В. Никинченко // Свобод.- радикал. процессы: экол.,

фармокол. и клин. аспекты, 1999.

21. Campos, C Oxidative stress, thyroid dysfunction & Down syndrome / C. Campos, A. Casado // Indian J Med Res –2015. – №142 – P. 113-119.

22. Зайцев, В. Г. Методологические аспекты исследований свободно-радикального окисления и антиоксидантной системы организма / В. Г. Зайцев // Вестн. Волгоград. мед. акад. – 1984. – № 4. –С. 49-53.

23. Mancini, A Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation / A. Mancini // Mediators of inflammation vol. – 2016. – P. 1-12.

24. Фархутдинова, Л.М. Окислительный стресс. История вопроса / Л.М. Фархутдинова // Вестник академии наук РБ. – 2016. – Т.20, №1. – С. 42-48.

25. Пожилова, Е.В. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клетки / Е.В. Пожилова, В.Е. Новиков, О.С. Левченкова // Вестник Смоленской государственной медицинской академии– 2015. – Т.14, №2. – С. 13-22.

26. Карбышев, М.С. Биохимия оксидативного стресса / М.С. Карбышев, Ш.П. Абдуллаев //Учебное методическое пособие, М., 2018. – С. 160

27. Fluery, C. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling / C. Fluery, B. Mignotte, J.L.Vayssiere // Biochimie. – 2002. – V.84, I.2. – P. 131-141.

28. Меньщикова, Е. Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных 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.

29. He, L, Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species / L. He, T. He // Cell Physiol Biochem.– 2017. – V.44, I.2. – P. 532-553.

30. Valko, M Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease / M. Valko, K. Jomova, CJ Rhodes, et al // Arch Toxicol. – 2016. – V.90. – P. 1-37.

31. 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.

32. Meister, A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection / A. Meister // Cancer research (suppl.). – 1994. – № 6. – P.1969-1975.

33. Кения, М. В. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе / М. В. Кения, А. И. Лукаш, Е. П. Гуськов // Успехи современной биологии. – 1993. – № 4. – С.456-470.

34. Sato, Y. Novel assay for glutathione reductase activity by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection / Y. Sato, M. Naoi, T. Ohkuwa // J. Chromatography B : Biomedical science. Appl. – 1998. – № 705. – P. 23-28.

35. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты : учеб. пособие для специалистов в области изучения радикальных окислительных процессов в биологических системах / Е. Б. Менщикова, В. З. Ланкин, Н. К, Зенков, И. А. Бондар, Н. Ф. Круговых, В. А. Труфакин. – М.: Слово, 2006. – 556 с.

36. Lemaitre, D. Effects of Fatty Acids on Human Platelet Glutathione Peroxidase: Possible Role of Oxidative Stress / D. Lemaitre, E. Vericel, A. Polette // Biochem. Pharmacology. – 1997. – № 53. – P. 479-486.

37. Калинина, Е.В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутатионредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов // Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, М.Д. Новичкова // Успехи биологической химии – 2014. – Т.54. – С. 299-348.

38. Calabrese, G. Mitochondrial Glutathione: Regulation and Functions / G. Calabrese, B. Morgan, J. Riemer // *Antioxid Redox Signal.* – 2017. – V.27, I.15. – P.1162-1177.
39. Селочник, Л.И. Определение содержания аскорбиновой кислоты в надпочечнике крысы / Л. И. Селочник, К. Ф. Кацер // *Лаб. дело.* – 1967. – № 5. – С.179-180.
40. May, J.M. Interaction of ascorbate and α -tocopherol in resealed human erythrocyte ghosts-Transmembrane electron transfer and protection from lipid peroxidation / J. M. May, Z.-C. Qu, J. D. Morrow // *Biological chemistry.* – 1996. – № 271. – P. 10577-10582.
41. Bachhawat, A.K. The Glutathione Cycle: Glutathione Metabolism Beyond the γ -glutamyl Cycle/ A.K. Bachhawat, S. Yadav// *IUBMB Life.*– 2018. – V.70, I.7. – P.585-592.
42. Lu, S.C. Glutathione synthesis /S.C. Lu // *Biochimica et Biophysica Acta,* – 2018. – V.1830. – P. 3143–3153.
43. Шохина А.Г. Генетически кодируемый индикатор для регистрации редокс-статуса пула глутатиона на основе красного флуоресцентного белка mCHERRY: дис. ... кандю биолу наук : 03.01.03 / Шохина Арина Геннадьевнаю – Москва, 2019. – 120 с.
44. Booty L.M. The mitochondrial dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers do not transport glutathione / L.M. Booty et al. // *FEBS Lett.* – 2015. – V. 589, № 5. – P. 621–628.
45. Jacob, C. Control of oxidative posttranslational cysteine modifications: from intricate chemistry to widespread biological and medical. Applications / C. Jacob et al // *Chemical Research in Toxicology,* – 2012. –V.25. – P. 588–604.
46. Черданцев, Д.В. 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.

47. Матейкович, П.А. Глутатионпероксидаза как фермент системы антиоксидантной защиты клеток / П.А. Матейкович // Международный научный журнал. – 2016. – Т. 3, № 6. – С. 21-24.
48. Dong, SC Glutathione S-transferase π : a potential role in antitumor therapy / S.C. Dong, H.H. Sha, X.Y. Xu, et al. // Drug Des Devel Ther. – 2018. – V.12. – P. 3535-3547.
49. Dalmizrak, O. The Relevance of Glutathione Reductase Inhibition by Fluoxetine to Human Health and Disease: Insights Derived from a Combined Kinetic and Docking Study/, K. Terali, E. et al. // The Protein Journal, – 2019. – V. 38. – P. 515-524.
50. Couto, N. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network/ N. Couto, J. Wood, J. Barber // Free Radical Biology and Medicine. – 2016. – С. 1-48. Luz
51. zatto, L. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency / L. Luzzatto, C. Nannelli, R. Notaro Hematology // Oncology Clinics of North America, – 2016. – V.30, I.2. – P. 373–393.
52. Кулинский, В. И. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатиона / В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко // Успехи современной биологии. – 1993. – Вып.3. – С. 187-195.
53. Gokturk, D The Effect of Ascorbic Acid over the Etoposide- and Temozolomide-Mediated Cytotoxicity in Glioblastoma Cell Culture / D. Gokturk, H. Kelebek, S. Ceylan, D.M. Yilmaz // A Molecular Study. Turk Neurosurg.– 2018. – V.28, I.1. – P. 13-18.
54. Beutler, E. Red cell metabolism. A Manual of Bio- chemical Method / E. Beutler. // Orlando: Grune and Stratton, 1990. – 188 p.
55. Тимирханова, Г. А. Витамин С: классические представления и новые факты о механизмах биологического действия / Г.А. Тимирханова, Г.М. Абдуллина, И.Г. Кулагина // Вятский медицинский вестник. – 2007. – №4. – С. 158 – 160.

56. Эскин, И.А. Основы физиологии эндокринных желез : учеб. пособие для биол. специальностей ун-тов / И. А. Эскин. – М.: Высшая школа, 1996. – 356 с.
57. Bhattacharyya, A. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases / A. Bhattacharyya [et al.] // *Physiol Rev.* – 2014. – V.94.– P. 329 – 334.
58. May, James M. Ascorbate Function and Metabolism in the Human Erythrocyte / James M. May // *Frontiers in Bioscience.* – 1998. – №2. – P.1 – 5.
59. Rose, R. C. Transport of ascorbic acid and other watersoluble vitamins /R.C. Rose // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1988. – Vol. 947. – P. 66 – 75.
60. Титова, Н.М. Оценка структурно-функционального состояния клетки: методические указания к практическим занятиям / Н.М. Титова, Т.Н. Замай, Т.Н. Субботина, А.А. Савченко. – Красноярск: ИПК СФУ. - 2009. - 18-22 с.
61. Beutler, E. Red cell metabolism. A Manual of Bio- chemical Method / E. Beutler. // Orlando: Grune and Stratton, 1990. – 188 p.
62. Асатиани, В.С. Биохимический анализ: науч. изд / В.С. Асатиани. – Тбилиси: Грузмедгиз, 1953 – 943с.
63. Карпищенко, А.И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: справочник / А. И. Карпищенко,. – СПб. : Интермедика, 1999
64. Habig, W. H. Glutathione-S-transfe rases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jacoby // *J. Biol. Chem.* – 1974. – V. 249, № 22. – P. 7130–7139
65. Carlberg, I. Glutathione reductase / I. Carlberg, B. Mannervik // *Mol. Enzymol.* – 1985. – V.113. – P. 484–490
66. Соколовский, В.В. Количественное определение фракций аскорбиновой кислоты / В.В. Соколовский, Л.В. Лебедева, Т.Е. Лиелуп // *Лабораторное дело* – 1974. – № 3. – С. 160-162.

67. Szarka, A. The Ascorbate-glutathione- α -tocopherol Triad in Abiotic Stress Response / A. Szarka, B. Tomasskovics, G. Banhegui //Int. J. Mol. Sci. – 2012. – V. 13, I. 4. – P. 4458-4483.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ Е.И.Шишацкая
« 13 » июля 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Редокс-регуляция окислительного стресса у больных диффузным
токсическим зобом

06.04.01 - Биология

06.04.01.05 - Реконструктивная биоинженерия

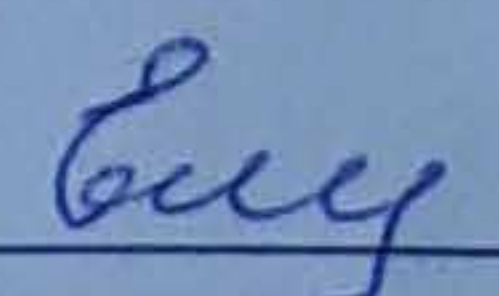
Научный

руководитель  06.07.2020

доцент, к.б.н. Н.М. Титова

Выпускник  06.07.2020

О.И. Зубок

Рецензент  09.07.2020

доцент, к.б.н Е.И. Елсукова

Красноярск 2020