

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинская биология

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

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

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в крови
больных колоректальным раком

Руководитель _____ 30.06.2020 Доцент, канд. биол. наук Н.М. Титова

Выпускник _____ 30.06.2020 А. Е. Курченко

Красноярск 2020

Реферат

Выпускная квалификационная работа выполнена по теме «Содержание продуктов перекисного окисления липидов в крови больных колоректальным раком» содержит 41 страницу текстового документа, 4 иллюстрации, 2 графика, 6 расчётных формул, 6 таблиц и 34 источника литературы.

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ, ПЕРВИЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ (ДК), ВТОРИЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ (МДА), РАК ПРЯМОЙ КИШКИ, ЭРИТРОЦИТ, ПЛАЗМА КРОВИ.

Объект – плазма крови, эритроциты: 30 условно здоровых доноров, без диагностированного опухолевого процесса и выраженной соматической патологии и 50 пациентов больных раком прямой кишки

Цель – оценка содержания продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в крови больных колоректальным раком.

Задачи: 1. Определить содержание диеновых конъюгатов в крови больных раком прямой кишки в до и после лечения

2. Исследовать содержание малонового диальдегида у больных колоректальным раком до и после лечения.

3. Определить уровень ДК и МДА в плазме крови и эритроцитах больных раком прямой кишки в зависимости от стадий заболевания.

В ходе исследования получены результаты, которые свидетельствуют о том, что у больных колоректальным раком как до, так и после лечения активно протекает перекисное окисление липидов. Повышенная концентрация вторичных продуктов ПОЛ в плазме крови и эритроцитах более значима у больных раком прямой кишки до оперативного лечения. Уровень МДА выше в плазме крови и эритроцитах на ранних стадиях заболевания до и после операции относительно показателей контроля и второй группы больных колоректальным раком (III и IV стадии).

Содержание

Введение.....	4
1 Обзор литературы	5
1.1 Активные формы кислорода – источники, свойства, биологическая роль.....	5
1.2 Перекисное окисление липидов.....	11
1.3 Окислительные модификации белков	18
1.4 Антиоксидантная система организма	20
1.5 Колоректальный рак	21
2 Материалы и методы	24
2.1 Объект исследования	24
2.2 Определение содержания диеновых конъюгатов.....	24
2.3 Определение содержания малонового диальдегида	25
2.4 Определение содержания белка	26
2.5 Статистическая обработка результатов.....	27
3 Результаты исследований и обсуждение.....	29
3.1 Содержание продуктов ПОЛ в плазме крови общей группы больных колоректальным раком	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Уровень продуктов ПОЛ в эритроцитах общей группы больных колоректальным раком	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Оценка уровня продуктов ПОЛ в плазме крови и эритроцитах больных КРР в зависимости от стадии заболевания ...	Ошибка! Закладка не определена.
Заключение	29
Список использованных источников	31

Введение

Окислительный стресс – это состояние, вызванное избыточным образованием активных форм кислорода (АФК) в организме. Процессы возникновения свободных радикалов и выражения организмом ответа примерно сбалансированы. Но при этом достаточно легко сдвинуть это относительное равновесие в пользу радикалов. В результате нарушается биохимия клетки и возникает окислительный стресс. Поэтому окислительный стресс является важным фактором при развитии различных патологий. Избыток АФК приводит к повреждению клеточных биомолекул, о степени выраженности негативных эффектов активных форм кислорода можно судить по повреждённым белковым молекулам и по уровню продуктов перекисного окисления: диеновых конъюгатов и малонового диальдегида.

В связи с этим целью данной работы явилось определение уровня продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в крови больных раком прямой кишки.

Исходя из цели, были поставлены следующие задачи:

- Определить содержание диеновых конъюгатов в крови больных раком прямой кишки до и после лечения.
- Исследовать содержание малонового диальдегида у больных колоректальным раком до и после лечения.
- Определить уровень ДК и МДА в плазме крови и эритроцитах больных раком прямой кишки в зависимости от стадий заболевания.

Работа выполнена на базе кафедры медицинской биологии института фундаментальной биологии СФУ и лаборатории клинической патофизиологии Красноярского научного центра СО РАН «НИИ медицинских проблем Севера».

1 Обзор литературы

1.1 Активные формы кислорода – источники, свойства, биологическая роль

Активные формы кислорода (АФК) составляют отдельную систему в организме, которая участвует не только в ряде физиологических функций, но и во многих патологических процессах.

К наиболее распространенным активным формам кислорода относятся:

$O_2^{\cdot-}$ – супероксидный анион;

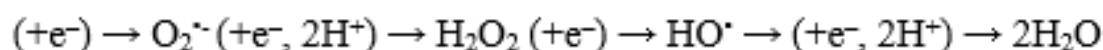
H_2O_2 – пероксид водорода;

$\cdot OH$ – гидроксильный радикал;

1O_2 – синглетный кислород;

Источники

Оксидазы и оксигеназы в организме млекопитающих являются главными ферментами метаболизма кислорода. В дыхательной цепи митохондрий происходит 4-х электронное восстановление O_2 до H_2O , также происходит и 1-, 2-, 3-электронное восстановление с образованием АФК по реакции:



В ряду ферментов в качестве доноров электронов выступают металлы с валентностью переменного характера (а именно Fe^{2+} , Cu^{2+} и др.). Свободные радикалы, которые имеют на внешней электронной оболочке неспаренный электрон и способны к генерации во всех частях клетки являются активными формами кислорода. Почти весь вдыхаемый кислород идёт на выработку энергии и окислительные процессы метаболизма белков, липидов и других субстратов, в АФК переходит примерно 5 % кислорода [1].

Основные механизмы образования активных форм кислорода связаны с нарушениями работы электронно-транспортных цепей митохондрий или микросом, а также при изменении свойств дегидрогеназ [3]. Также важно

значение и системы цитохрома Р-450, находящегося в эндоплазматическом ретикулуме. Клетки-фагоциты служат главным источником активных форм кислорода в организме человека и животных [4; 5]. В мембранах фагоцитов имеется ферментативный комплекс (НАДФН-оксидазу), этот комплекс окисляет НАДФН до НАДФ⁺ за счет восстановления кислорода до супероксидного радикала:



В данных клетках проходит ускоренное образование $\text{O}_2^{\cdot-}$ в излишних концентрациях при процессе активации неспецифической защиты организма, которая обуславливается НАДФН-оксидазой. Активные формы кислорода освобождаются клетками-фагоцитами в окружающую среду, из перекиси водорода и аниона хлора в реакции образуется гипохлорит, который ускоряется ферментом миелопероксидазой. При помощи ионов железа из гипохлорита и перекиси водорода образуется радикал $\cdot\text{OH}$. Чтобы предотвратить образование чужеродных клеток образуются АФК при помощи фагоцитов. Синглетный кислород $^1\text{O}_2$ синтезируется активными формами кислорода в реакции с другими молекулами. [6].

В ходе окислительно-восстановительных реакций образуются активные формы кислорода в живых организмах. $^1\text{O}_2$ также образуется в присутствии фотосенсибилизаторов в процессе фотоокисления [3].

O_2 супероксидный анион-радикал $\text{O}_2^{\cdot-}$ и гидроперекисный радикал HO_2^{\cdot} образуются в процессе присоединения электрона к молекуле. Вместе они порождают множество других АФК[7]. В митохондриях, которые задействуют до 99% получаемого кислорода, синтезируется наибольшая концентрация $\text{O}_2^{\cdot-}$. В дыхательной цепи и микросомах в процессе нарушения электронно-транспортной цепи образуется $\text{O}_2^{\cdot-}$ [3]. Гидроперекисный радикал – HO_2^{\cdot} имеет способность свободного проникновения через мембраны клеток, что обуславливается отсутствием заряда.

Дисмутация супероксидных анион-радикалов под действием супероксиддисмутазы (СОД) в биологических тканях ведет к образованию перекиси водорода, H_2O_2 , которая способна свободно проникать через мембраны клеток. Перекись водорода выявляется при фагоцитозе, при работе митохондрий и микросомальном окислении [3, 8]. При наличии ионов переходных металлов (например, Fe^{2+} , Cu^{2+}) H_2O_2 может выделять высокоактивный гидроксильный радикал $\cdot OH$, который обладает наибольшей цитотоксичностью среди активных форм кислорода [6].

Важную роль в образовании радикала $\cdot OH$ играет двухвалентный ион железа, входящий в состав гемоглобина, миоглобина. В крови они расположены в комплексе с трансферрином в связанной форме [4]. Отмечена генерация $\cdot OH$ радикала и под действием связанного железа – лактоферрина, также при действии гемоглобина на H_2O_2 [7].

Активные формы кислорода могут происходить и при инактивации в организме многих ксенобиотиков [2]. В этом процессе участвует локализованная в мембранах эндоплазматической сети микросомальная система цитохрома Р-450, обеспечивающая гидрофильность ксенобиотика и снижает его активность, затем происходит выведение его из организма [3].

Свойства и биологическая роль

Активные формы кислорода принимают участие в двух направлениях разного типа, которые непрерывно осуществляются при биохимических процессах. К таким процессам относится катаболизм уже существующих молекул и образование новых путем синтезирования. Одним из свойств АФК является окисление белков и липидов в клетке, которые нуждаются в расщеплении. Так как данные молекулы имеют наибольшее сродство с окисленными субстратами, происходит процесс распада ферментов [8]. В клетке непрерывно происходят процессы катаболического типа, в которых участвуют активные формы кислорода. Также АФК оказывают влияние на непрерывный синтез новых молекул. Благодаря процессу окисления

свободными радикалами фосфолипидов, которые входят в состав биологических мембран, осуществляется синтезирование физиологически активных веществ липидного происхождения [8, 12]. Чтобы адаптация клеток в новых условиях происходила проще АФК изменяют состав фосфолипидов, находящихся на мембранах, в процессах катаболизма и синтеза молекул. При изменении строения остатков фосфолипидов происходит обновление спектра белка.

Важную роль в физиологических и метаболических реакциях играют активные формы кислорода. Регуляция процессов метаболизма соединительных тканей относится к важнейшим особенностям АФК. Метаболизм железа, образование и разрушение коллагена происходит за счет активных метаболитов кислорода. Данные молекулы участвуют в регуляции сосудистого тонуса благодаря замедлению эндогенного оксида азота. В качестве регуляторов при процессах гуморального и клеточного иммунитета используются активные формы кислорода.

АФК оказывают влияние на разрастание злокачественных тканей из клеток которые отвечают за функционал иммунной системы. Во многих работах подтверждается влияние супероксид анион-радикала на образование белков, которые называются хемотаксическими факторами. Эти факторы оказывают влияние на лейкоциты, которые мигрируют и активируются в месте воспаления [12]. За последнее время было выявлено, что большей частью процессов фагоцитоза способствует образование АФК. Возбуждение процессов окисления свободными радикалами связано с увеличением реакции хемоллюминесценции при фагоцитозе. Благодаря данному процессу можно сделать вывод о том, что в клетках присутствуют физиологические механизмы [11]. Опираясь на данные выводы можно судить о том, что АФК помимо своих реакционных способностей могут принимать участие в нормальных метаболических процессах организма, которые протекают с низкой скоростью. Это говорит нам о том, радикалы кислорода являются

важными компонентами, которые поддерживают гомеостаз, способствуют регенерации органов и тканей.

Одним из главных сигналов патологического состояния организма и образования злокачественных опухолей является избыточный синтез радикалов кислорода. АФК токсичны и оказывают губительное влияние на состояние организма в избыточных концентрациях. Свободные радикалы являются химически активными соединениями, они вступают в реакции с молекулами различной химической природы, вызывают деградацию структурных белков и липидов клеточных мембран, нуклеиновых кислот, изменение структуры и функционирования гормонов и их рецепторов [13].

Активными формами кислорода вызываются следующие процессы, которые повреждают структуры клетки и эндогенные макромолекулы. Изменение кальций-зависимых процессов и увеличение уровня свободного кальция путём индуцирования активных форм кислорода можно отнести к данным процессам [10]. Избыточная концентрация АФК способствует расщеплению большего количества компонентов антирадикальной защиты, что служит дальнейшему увеличению уровня свободно-радикальных процессов. Индукция апоптоза начинается с проникновения АФК внутрь клетки через мембрану. В этом случае генерирование активных форм кислорода происходит внутри клеток [10, 12].

Избыточная и не поддающаяся контролю активация реакции перекисного окисления липидов обуславливается чрезмерной выработкой АФК. К изменению или повреждению клеточных мембран приводит нехарактерно повышенная и излишняя активация ПОЛ. Липидная часть мембран клеток становится ригидной, потому что большая часть фосфолипидов подвергается окислительному разрушению. В связи с этим происходит ограничение структурной подвижности белковых молекул мембран и в дальнейшем понижается активность ферментов и рецепторов.

Поэтому происходит нарушение выведения ионов кальция из саркоплазмы клетки, что приводит к повреждению клеточных органелл.

Активные формы кислорода и продукты перекисного окисления липидов способствуют избыточной выработке и высвобождению ряда провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухолей, интерлейкина-1, интерлейкина-6) и медиаторов воспаления (гистамина, брадикинина, серотонина), производных арахидоновой кислоты (лейкотриенов, простагландинов и тромбоксанов) [12, 14].

Свободно-радикальный механизм повреждения плазматических, митохондриальных и ядерных мембран, ядерного и митохондриального генома, липопротеинов крови приводит к повреждению сосудов и гистогематических барьеров, что играет важную роль в патогенезе наиболее распространенных заболеваний воспалительной, токсической и аутоиммунной природы. Патогенетическая роль АФК выявлена к настоящему времени приблизительно для более, чем сотни заболеваний человека [12]. Это имеет место при сердечно-сосудистой патологии — ишемической болезни сердца, инфаркте миокарда, ишемических поражениях головного мозга и почек, атеросклерозе. АФК играет важную роль при бронхолегочной патологии — эмфиземе, бронхиальной астме, хроническом бронхите, респираторном дистресс-синдроме и др.

Многочисленные исследования свидетельствуют, что процессы свободно-радикального окисления лежат в основе патогенеза многих хронических заболеваний печени, причем избыточное образование АФК и продуктов ПОЛ наблюдается на самых ранних стадиях процесса. Радикалы кислорода повреждают мембранный аппарат гепатоцита, разрушают липидный бислой его мембран, а также повреждают белки-ферменты монооксигеназной системы.

Избыточное образование АФК и активация ПОЛ являются причиной возникновения и прогрессирования гипертонической болезни [12]. Под их

влиянием происходит накопление в клетке ионизированного кальция, повышается тонус артериальных сосудов, развивается артериокапиллярный фиброз.

Избыточное образование свободных радикалов кислорода является одним из ведущих механизмов в патогенезе гриппа. Генерирование АФК определяет мутагенез и протеолитическую активность вируса гриппа, цитолитический эффект вирусной инфекции, деструкцию капиллярной сети и стенок капилляров, развитие отека легких.

Токсическое повреждение нейронов АФК и продуктами ПОЛ рассматривается в качестве основного механизма при нейродегенеративных заболеваниях мозга (рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, хорей Геттингтона, болезнь Альцгеймера и др.). АФК и продукты ПОЛ оказывают прямое деструктивное действие на внутренние органы и могут приводить к развитию полиорганной недостаточности после тяжелых травм и обширных ожогов [12, 14, 15].

Таким образом, АФК имеют фундаментальное значение, как для физиологических процессов, так и для патогенеза различных заболеваний. В связи с этим патогенетически обоснованным является предупреждение выработки, нейтрализация и элиминация избытка радикалов кислорода и продуктов свободно-радикального окисления.

1.2 Перекисное окисление липидов

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) протекает в норме с малой скоростью в мембранах митохондрий, лизосом, в мембране эритроцитов там, где имеются ненасыщенные липиды, прежде всего фосфолипиды.

При ПОЛ происходит влияние на проницаемость мембран, скорость роста живого организма. Кроме этого от процесса перекисного окисления липидов зависит частота и скорость обновления клеточных мембран [19].

Все процессы ПОЛ относятся к свободно-радикальными и регулярно осуществляются в организме человека. Под действием свободных радикалов большое число молекул организма претерпевают структурные нарушения. В молекулах белков окисляются аминокислоты, в следствии чего конформация белков изменяется, образуются ковалентные "сшивки".

При взаимодействии двух валентного иона железа с молекулой ДНК, образуются АФК, а именно гидроксильные радикалы. Гидроксильные радикалы – это высокореакционные соединения, которые могут разрушать структуру азотистых оснований. Отсюда следует, что гидроксильные радикалы могут повлиять на структуру ДНК.

Но наиболее подвержены действию активных форм кислорода жирные кислоты, содержащие двойные связи, расположенные через CH_2 -группу. Именно от этой CH_2 -группы свободный радикал – инициатор окисления, легко отнимает электрон, превращая липид, содержащий эту кислоту, в свободный радикал [4, 20].

К образованию свободных радикалов и ускорению ПОЛ приводят:

- облучение ионизирующей радиацией;
- металлы с переменной валентностью (Fe^{2+} , Cu^{2+});
- некоторые диазосоединения.

Степень интенсификации свободно-радикальных процессов является одним из ведущих патогенетических факторов в развитии многих болезней. Активные формы кислорода повреждают структуру ДНК, белков и различные мембранные структуры клеток. В результате появления в гидрофобном слое мембран гидрофильных зон за счёт образования гидропероксидов жирных кислот в клетки могут проникать вода, ионы натрия, кальция, что приводит к набуханию клеток, органелл и их разрушению. Активация перекисного окисления характерна для многих заболеваний: дистрофии мышц (болезнь Дюшенна), болезни Паркинсона, при которых ПОЛ разрушает нервные клетки в стволовой части мозга, при

атеросклерозе, развитии опухолей. Перекисное окисление активируется также в тканях, подвергшихся сначала ишемии, а затем реоксигенации, что происходит, например, при спазме коронарных артерий и последующем их расширении [7, 19].

Стадии перекисного окисления липидов

Основным субстратом для свободно-радикальных реакций служат полиненасыщенные жирные кислоты в составе фосфолипидов и гликолипидов клеточных мембран. Большое количество фосфолипидов с полиненасыщенными жирными кислотами локализуется в оболочке липопротеинов высокой, низкой и очень низкой плотности [15].

В результате свободно-радикального окисления жирных кислот образуются гидроперексиды и диеновые конъюгаты, нестабильны молекулы, которые классифицируют как первичные продукты ПОЛ. При участии металлов переменной валентности они быстро метаболизируются, превращаясь во вторичные (альдегиды, диальдегиды) и третичные (шиффовы основания) продукты перекисного окисления липидов [15, 19].

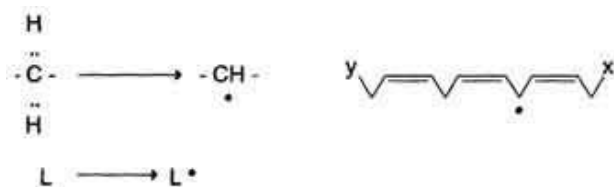
Перекисное окисление липидов включает в себя несколько стадий: инициацию, развитие, разветвление и обрыв цепи. Во время инициации гидроксильный радикал атакует метиленовую группу, которая расположена между двойными связями, и выбивает электрон, восстанавливающий $\cdot\text{OH}$ до воды. Далее двойные связи переставляются, смещается радикальная группа и взаимодействует с кислородом. В результате образуется липопероксильный радикал.

Дальнейшее взаимодействие липопероксильного радикала с соседними жирными кислотами приводит к нейтрализации и появлению новых липоперекисных радикалов, т.е. к развитию линейной цепной реакции с появлением новых окисленных жирных кислот [17].

Кроме линейного развития, может происходить разветвление реакции за счет получения гидроперекисью электронов от каких-либо металлов или при воздействии излучения.

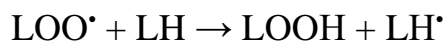
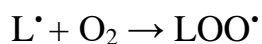
Обрыв цепной реакции происходит при взаимодействии радикалов друг с другом, либо в реакции с различными антиоксидантами.

1) Инициация: образование свободного радикала (L[•])



Иницирует реакцию чаще всего гидроксильный радикал, отнимающий водород от CH₂-групп полиеновой кислоты, что приводит к образованию липидного радикала [6].

2) Развитие цепи:



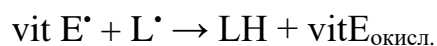
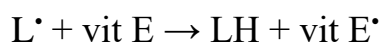
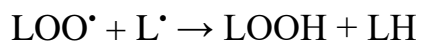
Развитие цепи происходит при присоединении O₂, в результате чего образуется липопероксирадикал LOO[•] или пероксид липида LOOH. ПОЛ представляет собой свободнорадикальные цепные реакции, каждый образовавшийся радикал иницирует образование нескольких других.

3) Разрушение структуры липидов



Продуктами перекисного окисления полиеновых кислот служат малоновый диальдегид и гидропероксид кислоты [6].

4) Обрыв цепи – взаимодействие радикалов между собой:



Развитие цепи может останавливаться при взаимодействии свободных радикалов между собой или при взаимодействии с различными антиоксидантами, например, витамином Е, который отдаёт электроны, превращаясь при этом в стабильную окисленную форму [6].

Продуктами перекисного окисления ненасыщенных липидов являются:

- свободные радикалы – R;
- перекисные радикалы – ROO;
- гидроперекиси – ROOH;
- альдегиды (малоновый диальдегид);
- кетоны;
- эпоксиды.

На рисунке 1 приведены стадии развития перекисного окисления γ -линоленовой кислоты, содержащей три двойные связи в положении Δ^6 , Δ^9 и Δ^{12} .

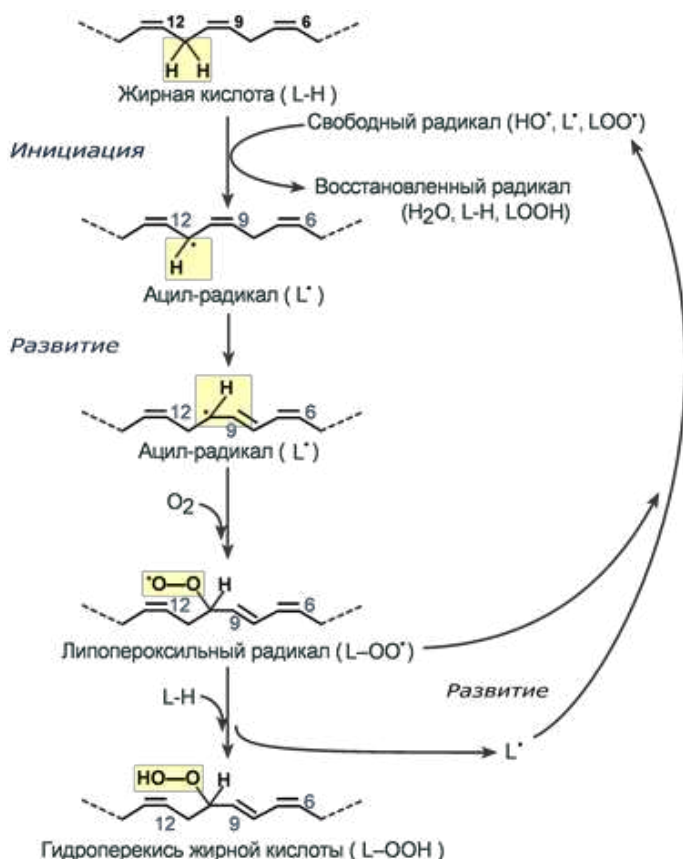


Рисунок 1 – Разветвление и обрыв реакций перекисного окисления липидов [20]

Диеновые конъюгаты (ДК) – первичные продукты процесса перекисного окисления липидов. Полиеновая кислота окисляется свободными радикалами, после чего водород отрывается в α -положении по отношению к двойной связи. Эта двойная связь образует диеновые конъюгаты из-за своего смещения. Липопротейны, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты способны повреждаться под действием ДК, так как они являются высокотоксическими метаболитами [6].

В результате последующей окислительной модификации нестабильные первичные продукты трансформируются во вторичные продукты окисления, наиболее важными из которых являются ненасыщенные альдегиды, в частности, малоновый диальдегид.

Малоновый диальдегид (МДА) – метаболит, образующийся по окислительной деградации эндопероксидов жирных кислот (рис. 2).

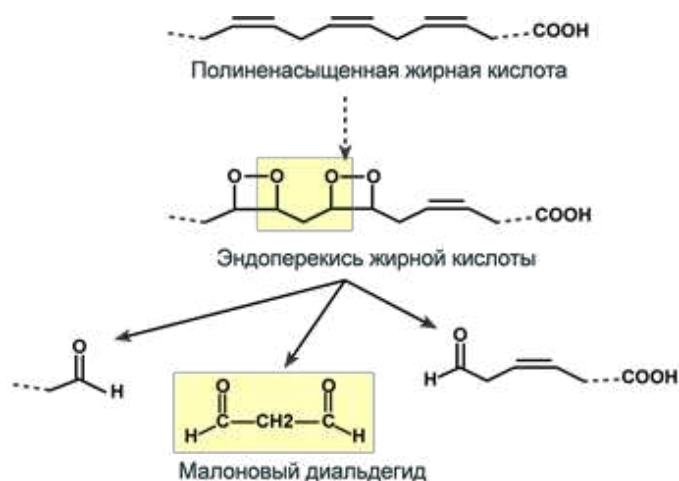


Рисунок 2 – Схема реакций образования малонового диальдегида [20]

МДА – наиболее реакционноспособный из вторичных продуктов ПОЛ, может образовывать ковалентные связи с ϵ - NH_2 -группами лизина или NH_2 -

группами концевых аминокислотных остатков в белках, NH₂-группами в фосфолипидах и гликозаминнах (рис. 3).

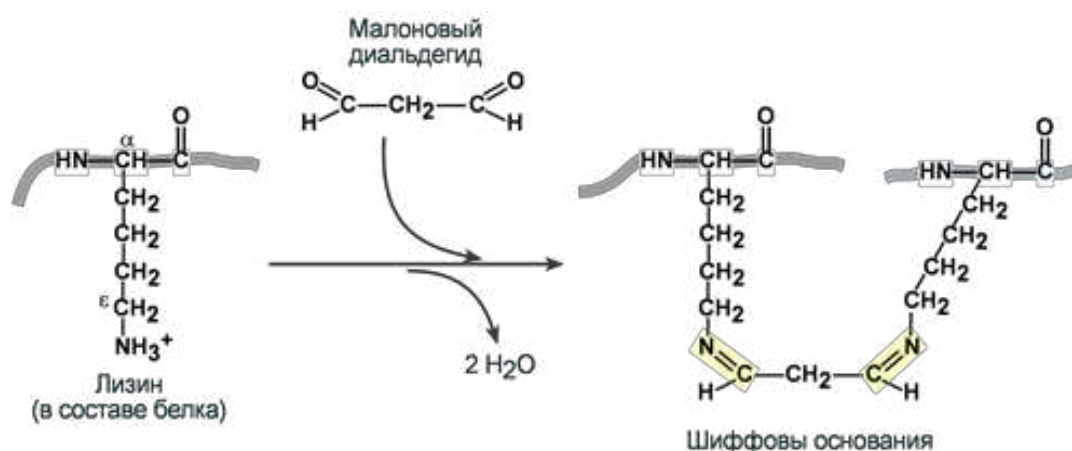


Рисунок 3 – Роль малонового диальдегида в образовании сшивок между белками [20]

МДА формирует мостики внутри молекул и между ними с образованием шиффовых оснований [7, 20]. В конечном результате после окислительной атаки в белках появляются поперечные сшивки внутри одной молекулы, между разными белками, между белками и фосфолипидами (рис. 4).

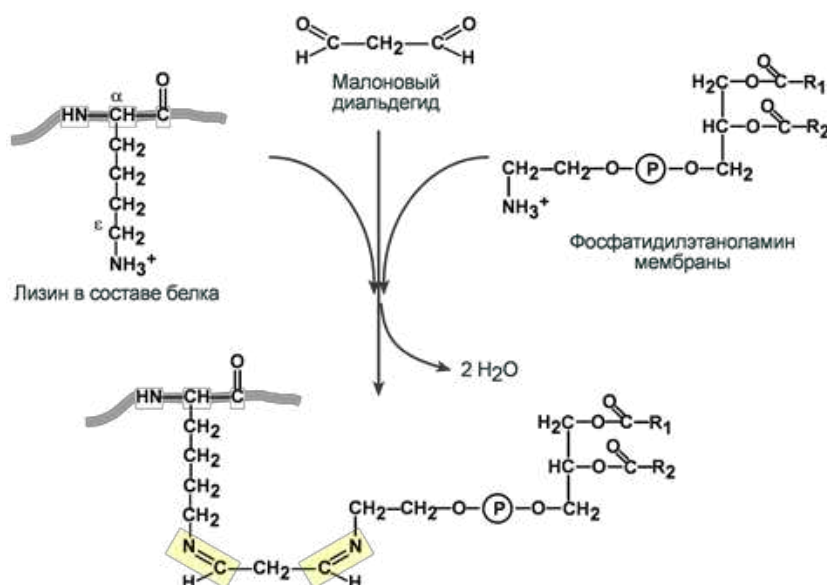


Рисунок 4 – Роль малонового диальдегида в образовании сшивок между белками и фосфолипидами [20]

Из-за этого активность ферментативных белков изменяется, возможности структурных и сократительных белков падают, каналобразующие белки мембраны деформируются, и проницаемость мембран возрастает, жизнеспособность и функционирование клетки уменьшаются [17].

1.3 Окислительные модификации белков

Свободные радикалы повреждают не только липиды мембран, но и другие макромолекулы: нуклеиновые кислоты и белки. Причем окислительному повреждению белков уделяется в последнее время все большее внимание. Если липиды мембран защищены от радикальной атаки жирорастворимыми антиоксидантами (витамины Е, А), то белки, находящиеся в водном окружении, такой защитой не обладают. Имеются данные, что липиды разрушаются под действием свободных радикалов в водной среде гораздо быстрее, чем в гидрофобной среде [15].

Белки признаны главными мишенями для активных форм кислорода из-за своей высокой чувствительности к свободным радикалам [29] и распространенности в биологических системах. Поскольку белки необходимы для большинства функциональных процессов в клетках, изучение механизмов их окислительных повреждений имеет как научную, так и практическую значимость [25].

Окислительная модификация белков представляет собой процесс их ковалентного преобразования, вызванный непосредственным воздействием АФК, а также косвенным взаимодействием со вторичными побочными продуктами окислительного стресса [31, 32].

Белки в силу особенностей своего строения являются одной из основных ловушек активных форм кислорода, которые образуются в процессе ионизирующей радиации, фотохимических воздействий, металл-зависимом окислении или как продукты ряда окислительно-

восстановительных реакций ферментативной и неферментативной природы [33]. В качестве индукторов образования окислительно-модифицированных белков (ОМБ) могут выступать не только активные формы кислорода ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $^1\text{O}_2$), но и продукты перекисного окисления липидов [24, 33].

Важно отметить, что формирование ОМБ происходит не только при возрастании концентрации индуцирующих агентов, но и при смещении баланса антиоксидантов и прооксидантов в пользу вторых в условиях истощения антиоксидантной системы. Влияние прооксидантов на простые белки приводит к модификация полипептидной цепи, а при атаке сложных белков выделяют модификацию полипептидного компонента и небелковой части [3, 7]. Модификация протетической группы, представленной, например, негемовым железом, заключается в диссоциации ионов железа от белка [7]. Изменение структуры полипептидной цепи может происходить в результате модификации в пептидной связи, а также и в боковых радикалах аминокислотных остатков [24, 34]. Окислительная атака полипептидной цепи приводит к образованию углеродного радикального центра за счет реакции с $\cdot\text{OH}$ α -водородного атома аминокислотного остатка, что в конечном итоге приводит к разрыву пептидных связей [3, 7].

В настоящее время наиболее изученным является формирование карбонильных производных в результате окисления боковых аминокислотных остатков полипептидной цепи [29]. При этом окисление остатков лизина, аргинина, гистидина, пролина приводит к формированию альдегидных или кетонных производных, а окисление остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот приводит к разрыву полипептидной цепи с образованием пирувильной группы из N-концевой аминокислоты [3, 29, 30]. Наличие СО-группы является характерным признаком карбонильных производных окисленных белков [29, 32]. По данным литературы, альдегидные производные принято считать ранними маркерами окислительной деструкции белка, а кетонные производные – поздними

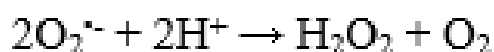
маркерами [15], характеризующими степень окислительной модификации белковой молекулы. Накопление в клетке активных карбонильных соединений приводит к развитию карбонильного стресса [18, 4].

1.4 Антиоксидантная система организма

В организме токсическое действие активных форм кислорода предотвращается за счет функционирования систем антиоксидантной защиты. В норме сохраняется равновесие между окислительными (прооксидантными) и антиоксидантными системами. Антиоксидантная система защиты представлена ферментными и неферментативными компонентами [22, 34].

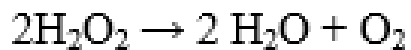
Ферментативная антиоксидантная система (АОС) включает: супероксиддисмутазу, каталазу, пероксидазу (глутатионпероксидазу), глутатионредуктазу. Энзимы АОС характеризуются высокой избирательностью действия, направленного против определенных радикалов. Такие ферменты практически всегда выполняют свою функцию внутри клеток, большая молекулярная масса ферментов препятствует их выходу из клеток.

Супероксиддисмутаза превращает супероксидные анион-радикалы в пероксид водорода:



Супероксиддисмутаза является мощным ингибитором свободнорадикального окисления в организме, защищающим биополимеры (белки, нуклеиновые кислоты и др.) от окислительной деструкции. Супероксиддисмутаза – индуцируемый фермент, т.е. его синтез увеличивается, если в клетках активизируется образование супероксидного анион-радикала и интенсифицируются процессы ПОЛ [22].

Каталаза является гемопротеином и катализирует реакцию разложения пероксида водорода:

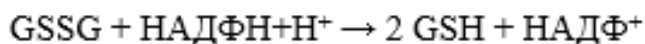


В клетках каталаза локализована в пероксисомах, где образуется наибольшее количество пероксида водорода. Высокое содержание каталазы отмечено в лейкоцитах, где она защищает клетки от последствий «респираторного взрыва», а также в эритроцитах, в которых каталаза защищает гемоглобин от окислительной деградации пероксидом водорода.

Глутатионпероксидаза – важнейший фермент, обеспечивающий инактивацию пероксида водорода и липопероксидных радикалов. Он катализирует восстановление пероксидов при участии трипептида, восстановленного глутатиона, SH-группа которого служит донором электронов и, окисляясь, образует дисульфидную форму глутатиона:



Окисленный глутатион восстанавливается в реакции, катализируемой **глутатионредуктазой**:



Глутатионпероксидаза в качестве кофермента использует селен. При его недостатке активность антиоксидантной защиты снижается [22]

1.5 Колоректальный рак

Колоректальный рак – это злокачественная опухоль толстого кишечника. На первых стадиях заболевания протекает бессимптомно, в дальнейшем проявляется слабость, недомогание, потерей аппетита, болями в животе и кишечными расстройствами. При наличии опухоли имеются кровотечения, но при этом кровь в кале при раке верхних отделов кишечника визуально определить сложно. Болезнь диагностируется с учетом жалоб и множества исследований (анализ кала на скрытую кровь, колоноскопии,

ирригоскопии, УЗИ и др.) Лечение происходит операционным путём, при помощи химиотерапии.

Общие сведения

Колоректальный рак относится к одной из самых частых форм злокачественных опухолей. По статистике 10% из всех злокачественных опухолей эпителия приходится на рак толстого кишечника.

Распространенность колоректального рака

В последнее время считается, что колоректальный рак имеет большое влияние на уменьшение продолжительности жизни человека. Причинами популярности заболевания является множество факторов: низкая физическая активность, употребление большого количества мясных продуктов и малого количества клетчатки. В последние десятилетия в России отмечается большой рост заболеваемости рака толстого отдела кишечника. В 2000 году заболевание колоректальным раком находилось на 6-м месте по распространенности, на данный момент заболевание находится на 3 месте у мужчин и на 4 месте у женщин. Лечение осуществляется специалистами: онкологами, гастроэнтерологами и хирургами. Больше всего заболеваемость распространена в таких странах, как США, Австралия и странах Западной Европы.

К другим факторам, предрасполагающим развитие колоректального рака, относят: возраст (люди старше 50), излишний вес, нехватка физической активности человека, сахарный диабет, гиповитаминоз, иммунодефицитные состояния.

Считается, что негативное воздействие на нормальные ткани путём процесса изменения метаболизма клеток связано с образованием злокачественной опухоли. Регуляция свободно-радикальных процессов, которая может привести к аккумулярованию токсичных продуктов и к разрушению структуры мембран клеток напрямую связана с развитием у

онкологических больных токсического синдрома. К такому заболеванию относится рак толстого кишечника.

К главным причинам злокачественных опухолей можно отнести нарушение свободно-радикальных процессов и стресс окислительного характера. Во многих работах подтверждается, что антиоксиданты способны снижать концентрацию токсичных веществ в организме. Это связано с увеличенной активностью иммунной системы.

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Объектом исследования служили эритроциты и плазма крови условно здоровых людей (контрольная группа – 30 человек) и больных колоректальным раком до и после лечения (50 пациентов). Кровь у больных забиралась в день поступления в стационар и на 7-е сутки после операции. Каждый пациент подписывал согласие на участие в исследовании, которое было одобрено этическими комитетами НИИ медицинских проблем Севера СО РАН и Красноярского краевого клинического онкологического диспансера имени А.И. Крыжановского.

Кровь забиралась из локтевой вены обследуемых в вакутейнеры с антикоагулянтом гепарином. Гепаринизированную кровь центрифугировали 15 мин при 1700g, затем осторожно отбирали плазму и сохраняли для дальнейшего исследования. Эритроциты трижды отмывали 0,9%-ным раствором хлористого натрия. Последнее отмывание осуществляли в течение 20 мин для более плотной упаковки эритроцитов. Эритроциты и плазму крови хранили небольшими порциями (аликвотами) при температуре не выше -20 °С до проведения анализа.

2.2 Определение содержания диеновых конъюгатов

Принцип метода: вследствие π - π переходов спектры конъюгированных гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот характеризуется интенсивным поглощением в ультрафиолетовой области спектра с максимумом 232-234 нм.

Реактивы:

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

Ход определения: содержание диеновых конъюгатов определяли в экстрактах эритроцитов и плазмы крови. Для этого липиды экстрагировали стократным избытком смеси растворителей. В гомогенизатор вносили 0,1 мл упакованных эритроцитов (плазмы крови), добавляли 5 мл изопропилового спирта и тщательно растирали до получения гомогенной суспензии. Содержимое гомогенизатора количественно переносили в мерную центрифужную пробирку, в которую затем добавляют 5 мл гептана.

Экстракт центрифугировали в течение 10 мин при 1700 г. Надосадочную фракцию переносили в градуированную пробирку и добавляли 1/5 объёма раствора KCl для отмывки липидного экстракта от нелипидных примесей. После тщательного встряхивания образовавшаяся эмульсия расслаивалась на две прозрачные фазы. В гептановом экстракте (верхняя фаза) на спектрофотометре Thermo Scientific Genesys 10s UV-vis определяли оптическую плотность сопряженных диенов в кювете с длиной оптического пути 1,0 см против гептана при длине волны 232 нм.

Расчёт количества ДК производили с учётом молярного коэффициента экстинкции $27000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ и выражали в микромолях на 1 грамм Hb в эритроцитах или на 1 г белка в плазме крови [21].

2.3 Определение содержания малонового диальдегида

Принцип метода: в липидных системах в результате процессов перекисного окисления липидов образуется малоновый диальдегид (МДА), взаимодействие которого с 2-тиобарбитуровой кислотой приводит к образованию хромогена с максимумом поглощения в красной области видимого спектра при длине волны 532 нм [19].

Реактивы:

1. 0,9 %-ный раствор NaCl (физиологический раствор).
2. 30 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

3. 0,1 М раствор динатриевой соли этилендиаминтетрацетата (ЭДТА) $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$, $M_r=372,24$ г/моль.

4. 1 %-ный раствор 2-тиобпрбитуровой кислоты (ТБК).

5. 0,05 н раствор NaOH.

Ход определения: к 0,2 мл упакованных эритроцитов (плазмы) добавляли 0,8 мл физиологического раствора и 0,5 мл раствора ТХУ, тщательно перемешивали. Затем центрифугировали 15 мин при 1700 g. Аналогичным образом готовили контрольную пробу, в которой биологический образец заменяли равным объемом дистиллированной H_2O .

В новые пробирки переносили 1 мл супернатанта, добавляли 0,075 мл ЭДТА и 0,25 мл раствора ТБК, приготовленного на 0,05 н растворе NaOH, содержимое перемешивали. Пробирки помещали в кипящую водяную баню на 15 мин. Затем пробирки охлаждали до комнатной температуры.

Оптическую плотность опытных проб измеряли на спектрофотометре Thermo Scientific Genesys 10s UV-vis при 532 нм против контрольной пробы в кюветах с толщиной слоя 1,0 см.

Содержание МДА рассчитывали с учётом коэффициента молярной экстинкции образовавшегося хромогена, равного $1,56 \cdot 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ и выражали в мкмоль/г Hb (если определение проводили в эритроцитах) или мкмоль/г белка (при определении в плазме крови) [21].

2.4 Определение содержания 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. Для определения белка в плазме крови использовали набор реагентов фирмы «Витал-Диагностикум» (г. Санкт-Петербург).

Реактивы: 1. Биуретовый реагент (натрия гидроокись – 0,5 моль/л; калий-натрий виннокислый – 80 ммоль/л; калий йодистый – 75 ммоль/л; сульфат меди – 30 ммоль/л) – 100 мл (стоковый раствор).

2. Рабочий раствор биуретового реагента готовили разведением необходимого для работы количества реактива 1 бидистиллированной или деионизованной водой в 5 раз (1 часть биуретового реагента: четыре части воды). Стабильность рабочего раствора биуретового реагента составляет не менее 6 месяцев при температуре 18-25°C, в темном месте, в плотно закрытой посуде. Не рекомендуется использовать рабочий реагент, если его оптическая плотность против воды более 0,2 единиц оптической плотности (кювета – 1 см, длина волны 540 нм).

3. Калибратор (альбумин сывороточный – 70г/л, натрий хлористый – 154 ммоль/л) – 2 мл.

Ход определения: в пробирки (опытную, калибровочную и холостую) вносили 5,0 мл рабочего раствора биуретового реагента. В опытную пробирку добавляли 0,1 мл плазмы крови; в калибровочную – 0,1 мл стандартного раствора белка и в холостую – 0,1 мл дистиллированной воды.

Пробы тщательно перемешивали, инкубировали 30 мин при 18-25°C и затем измеряли оптическую плотность опытной ($E_{оп}$) и калибровочной ($E_{к}$) проб против холостой пробы. Окраска стабильна не менее 30 мин после окончания инкубации при предохранении от прямого солнечного света.

Содержание белка рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{E_{оп}}{E_{к}} \cdot 70 \text{ г/л}, \text{ где}$$

C – концентрация общего белка в г/л; $E_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы; $E_{к}$ – оптическая плотность калибратора; 70 г/л – концентрация белка в калибраторе.

2.5 Статистическая обработка результатов

Для выполнения расчетов использовался пакет Microsoft Office Excel 2010. Для обработки результатов использовались стандартные методы математической статистики (расчёт среднего значения, отклонения от среднего значения и стандартного отклонения). Была рассчитана медиана и

интерквартильного разброса (С25-С75 процентиля). При помощи критерия Манна-Уитни оценивали достоверность разницы у исследуемых групп (при $p < 0,05$).

3 Результаты исследований и обсуждение

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

Заключение

1. Содержание диеновых конъюгатов достоверно увеличено в плазме крови и снижено в эритроцитах больных колоректальным раком до и после операции относительно контрольных показателей.
2. Содержание малонового диальдегида в плазме крови и эритроцитах у больных раком прямой кишки изменяется однонаправленно – превышает контрольные показатели как до, так после оперативного вмешательства.
3. Уровень малонового диальдегида выше в плазме крови и эритроцитах на ранних стадиях заболевания до и после операции относительно показателей контроля и второй группы больных колоректальным раком (III и IV стадии).

Список использованных источников

1. Кулинский, В. И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В. И. Кулинский // Сорос. общеобразоват. журн. – 1999. – №1. – С.2–7.
2. Скулачев, В. П. Кислород в живой клетке: добро и зло / В. П. Скулачев // Сорос. образоват. журн. – 1996. – №3. – С.4–16.
3. Зайцев, В. Г. Методологические аспекты исследований свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / В. Г. Зайцев // Вестн. Волгоградск. мед. академии. – 1998. – №4. – С.49–53.
4. Болевич, С. Б. Генерация активных форм кислорода лейкоцитами крови, перекисное окисление липидов и антипероксидная защита у больных бронхиальной астмой / С. Б. Болевич // Терап. Арх. – 1998. – №3. – С.54–57.
5. Коган, А. Х. Фагоцитзависимые кислородные свободнорадикальные механизмы ауторегрессии в патогенезе внутренних болезнейю / А. Х. Коган // Вестник РАМН. – 1999. – №2. – С.3–10.
6. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю. А. Владимиров // Соросовский общеобразовательный журнал. – 2000. – №12. – С.13–19.
7. Зенков, Н. К., Активированные кислородные метаболиты в биологических системах / Н. К. Зенков, Е. Б. Меньшикова // Успехи соврем. биологии 1993. – №3. – С.286–296.
8. Гамалей, И. А. Перекись кислорода как сигнальная молекула/И. А. Гамалей, И. В. Клюбин // Цитология. – 1996. – №12. – С.1233–1247.
9. Сазонтова, Т. Г. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов – равнозначных участников метаболизма / Т. Г. Сазонтова, Ю. В. Архипенко // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2007. – С.2–18.

10. Roberts, A. Prostacyclin (PGI₂) mediates hypoxic relaxation of bovine coronary arterial strips. / A. Roberts, E. Messina, G. Kaley // Prostaglandins. – 1981. – P. 555–69.
11. Маянский, А. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге / А. Н. Маянский, Д. Н. Маянский. – Новосибирск: Наука. – 1983. – С.344.
12. Шанин, Ю. Н. Антиоксидантная терапия в клинической практике / Ю. Н. Шанин, В. Ю. Шанин, Е. В. Зиновьев // СПб.: ЭЛБИ-СПб. – 2003. – С.128.
13. Рязанцева, Н. В. Редокс-зависимая регуляция апоптоза: адаптивная роль активных форм кислорода при окислительном стрессе / Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2008. – С.710–718.
14. Донцов, В. И. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / В. И. Донцов, В.Н. Крутько // Информатика здоровья и долголетия: Сборник трудов ИСА РАН. М.: УРСС. – 2006. – С.85–96.
15. Дубинина, Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. / Е. Е. Дубинина. – СПб.: Мед. пресса. – 2006. – 400 с.
16. Барабой, В. А. Перекисное окисление и радиация. / В. А. Барабой, В. Э. Орел, И. М. Карнаух. – Киев: Наукова Думка, 1991. – 256 с.
17. Нейланд, О. Я. Органическая химия / О. Я. Нейланд. – М.: Высшая школа. – 1990. – 751 с.
18. Бобырев В. Н. Специфичность систем антиоксидантной защиты органов и тканей — основа дифференцированной фармакотерапии антиоксидантами / В. Н. Бобырев, В. Ф. Почерняева, С. Г. Стародубцев // Эксперим. и клин. фармакология. – 1994. – С.47-54.

19. Владимиров, Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. – М: Наука. – 1972. – 252 с.
20. Северин, Е. С. Биохимия / Е. С. Северин. – М.: ГЭОТАР-МЕД. – 2014.
21. Титова, Н. М. Оценка структурно-функционального состояния клетки: метод. указания к практическим занятиям / Н. М. Титова и [др.]. – Красноярск: ИПК СФУ. – 2009.– С.10, 18.
22. Бобырев, В. Н. Специфичность систем антиоксидантной защиты органов и тканей — основа дифференцированной фармакотерапии антиоксидантами / В. Н. Бобырев, В. Ф. Почерняева, С. Г. Стародубцев // Эксперим. и клин. Фармакология. – 1994. – С.47-54.
23. Хамадянова, А.У/Роль свободнорадикального окисления в патогенезе воспалительных заболеваний органов малого таза и возможность фармакологической коррекции / Хамадянова А.У // Медицинский вестник Башкортостана. – 2016. – Т.11, №6(66) С.35– 39.
24. Лифшиц, В.М. Биохимические анализы в клинике / В.М Лифшиц, В.И. Сидельникова // – 2001. – С.234.
25. Тимофеев, Ю.М. Опыт тотальных эвисцераций малого таза при раке прямой кишки / Ю.М. Тимофеев, В.Б. Матвеев // Весник. –2004. – Т.15. –№3. – С. 58-60.
26. Решетов, И.В. Синхронное первично–множественное злокачественное новообразование: бифенотипная синозальная саркома и колоректальный рак / И.В. Решетов, И.И. Быков, А.А. Шевалкин // Новости хирургии. – 2018. – Т.26. – №5. – С. 629-635.
27. Карпищенко, А.И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика / А.И. Карпищенко // Интермедика. –1999. – С.656.
28. Рослый И.М. Правила чтения биохимического анализа. Руководство для врача / И.М Рослый, М.Г.Водолажская –2010. – С. 189.

29. Tatiele C. do Nascimento. Microalgae carotenoids intake: Influence on cholesterol levels, lipid peroxidation and antioxidant enzymes / Tatiele C. do Nascimento, Pricila P. Nass, Andrêssa S. Fernandes // Food Research International. – 2020. – №128. – P.105.

30. Carmen Peña-Bautista, Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers / Carmen Peña-Bautista, Miguel Baquero, Máximo Vento // Clinica Chimica Acta. – 2019. – №491. – P. 85-90.

31. Hadi Ali, Lipid peroxidation derived reactive aldehydes in alcoholic liver disease / Hadi Ali, Mohammed A.Assiri, Colin T.Shearn // Current Opinion in Toxicology. – 2019. – №13. – P. 110-117.

32. Nurşen Başaran, Evaluation of oxidative stress and immune parameters of boron exposed males and females / Nurşen Başarana, Yalçın Duydub, Merve Bacanlı // Food and Chemical Toxicology. – 2020. – №142.


33. Maiza Lacerda Barbosa, Oxidative stress, antioxidant defense and depressive disorders: A systematic review of biochemical and molecular markers / Maiza Lacerda Barbosa, Ag-Anne Pereira Melode Meneses, Rai Pablo Sousade Aguiar // Neurology, Psychiatry and Brain Research. – №36. – 65-72.

34. Etsuo Niki, Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? / Etsuo Niki // FEBS Letters. – 2012. – V. 586. – №21. – P. 3767-3770.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинская биология

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

 Е.И.Шишацкая
« 6 » июня 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в крови
больных колоректальным раком

Руководитель  30.06.2020 Доцент, канд. биол. наук Н. М. Титова

Выпускник  30.06.2020

А. Е. Курченко

Красноярск 2020