

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

Биохимические маркеры оксидативного стресса при диффузном  
токсическом зобе

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

Выпускник \_\_\_\_\_ 30.06.2020

А. А. Тимофеева

Красноярск 2020

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Биохимические маркеры оксидативного стресса при диффузном токсическом зобом» содержит 56 страниц текстового документа, 11 рисунков, 62 использованных источника.

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА, АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА, ДИФФУЗНЫЙ ТОКСИЧЕСКИЙ ЗОБ, КАТАЛАЗА, МАЛОНОВЫЙ ДИАЛЬДЕГИД, МОЧЕВАЯ КИСЛОТА, СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, ЦЕРУЛОПЛАЗМИН.

Объект исследований – плазма крови: 26 человек условно здоровых, 18 – больных диффузным токсическим зобом.

Цель работы – оценить уровень малонового диальдегида и активность антиоксидантной системы для выявления наиболее значимых биомаркеров оксидативного стресса в плазме крови больных диффузным токсическим зобом.

Задачи:

1) Определить содержание малонового диальдегида в плазме крови больных диффузным токсическим зобом.

2) Оценить активность антиоксидантных ферментов у больных диффузным токсическим зобом.

3) Исследовать уровень низкомолекулярных антиоксидантов в плазме крови больных диффузным токсическим зобом.

В ходе исследования было показано, что у больных диффузным токсическим зобом наблюдается повышенный уровень малонового диальдегида – вторичного продукта перекисного окисления липидов, низкомолекулярных антиоксидантов и церулоплазмينا. Активность супероксиддисмутазы и каталазы снижена.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1 Обзор литературы .....	6
1.1 Активные формы кислорода – образование, свойства, роль .....	6
1.2 Антиоксидантная защита тканей .....	11
1.2.1 Супероксиддисмутаза .....	12
1.2.2 Каталаза .....	15
1.2.3 Церулоплазмин .....	16
1.2.4 Аскорбиновая кислота .....	18
1.2.5 Мочевая кислота .....	22
1.3 Перекисное окисление липидов .....	23
1.4 Диффузный токсический зоб .....	26
2 Материалы и методы .....	31
2.1 Объект исследования .....	31
2.2 Определение содержания малонового диальдегида .....	31
2.3 Определение активности каталазы .....	32
2.4 Определение активности супероксиддисмутазы .....	34
2.5 Определение содержания церулоплазмينا .....	35
2.6 Определение содержания аскорбиновой кислоты .....	36
2.7 Определение содержания мочевой кислоты .....	38
2.8 Статистическая обработка результатов .....	39
3. Результаты исследования и их обсуждение .....	41
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	43
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	44

## ВВЕДЕНИЕ

Свободные радикалы влияют на иммунный ответ, передачу сигналов в клетках и экспрессию генов, обладают регуляторной функцией. Они принимают участие в регуляции основных функций клетки, как при обычных условиях, так и при воздействии различных патогенных факторов [11, 17, 52]. Чрезмерное накопление АФК, пероксидов и их вторичных продуктов, лежащих в основе оксидативного стресса, приводит к возникновению патологических последствий [11]. Сам стресс характеризуется дисбалансом между окислителями и антиоксидантами в пользу окислителей, и приводит к нарушению окислительно-восстановительной сигнализации и физиологической функции клеток, а также к необратимым химическим модификациям. Изучению проблем, связанных с биомаркерами окислительного стресса и их потенциальных клинических применений, уделяется огромное внимание [36].

Среди болезней, развивающихся при повреждении клеток АФК и сопутствующем окислительном стрессе, выделяют атеросклероз, инфаркт и инсульт, тяжелые воспалительные заболевания, СПИД, злокачественные процессы, а также нейродегенеративные расстройства, такие как болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона [11, 52].

Заболеваемость диффузным токсическим зобом варьируется в зависимости от региона, и, в среднем, составляет от 20 до 50 случаев на 100 тыс. населения [1]. В настоящее время достаточно безопасных и в то же время высокоэффективных методов патогенетической терапии ДТЗ не имеется. В целом усилия врачей преимущественно направлены на коррекцию уровня тиреоидных гормонов [9]. Выздоровление больных с тиреотоксической патологией зависит от множества факторов. Такие люди нуждаются во внимательном уходе, строгом соблюдении режима питания, допустимых физических нагрузок, и т.д. [19]. Имеются данные о том, что ДТЗ характеризуется повышенным окислительным стрессом [62]. Прогноз и

течение заболевания зависит от своевременной диагностики, что свидетельствует о необходимости его исследования [19].

Цель исследования – оценить уровень малонового диальдегида и активность антиоксидантной системы для выявления наиболее значимых биомаркеров оксидативного стресса в плазме крови больных диффузным токсическим зобом.

Исходя из цели, были сформулированы следующие задачи:

1) Определить содержание малонового диальдегида в плазме крови больных диффузным токсическим зобом.

2) Оценить активность антиоксидантных ферментов у больных диффузным токсическим зобом.

3) Исследовать уровень низкомолекулярных антиоксидантов в плазме крови больных диффузным токсическим зобом.

Данная работа – часть комплексных исследований, проводимых кафедрой медицинской биологии ИФБиТ Сибирского федерального университета совместно с лабораторией клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ ФИЦ КНЦ СО РАН НИИ медицинских проблем Севера.

## **1 Обзор литературы**

### **1.1 Активные формы кислорода – образование, свойства, роль**

Свободный радикал – это частица, атом или молекула, имеющие на внешней орбитали один или несколько неспаренных электронов [18]. Процессы, в ходе которых образуются свободные радикалы происходят в результате реакций окисления или восстановления (спонтанные и ферментативные реакции), а также гомолитических реакций, протекающих под действием ультрафиолетового или ионизирующего излучения [17, 22, 38].

Фосфорилирование белков, активация нескольких транскрипционных факторов, апоптоз, иммунный ответ и дифференцировка зависят от правильной продукции АФК [50]. Они оказывают влияние на синтез гормонов и передачу сигналов с их помощью, а также активацию G-белок-связанных рецепторов, киназ/фосфатаз, факторов транскрипции; и экспрессию генов [33]. Так окислительно-восстановительный статус клеток оказывает влияние на регуляцию различных факторов/активаторов транскрипции (например, AP-1, NF-κB и p53), тем самым влияя на клеточную экспрессию гена-мишени и модулируя клеточные сигнальные пути, соответствующие АФК [47].

АФК могут выступать индукторами процессов адаптации или апоптоза, направление такого воздействия зависит от силы патогенного фактора [17]. При увеличении выработки АФК происходит вредное воздействие на важные клеточные структуры, такие как белки, липиды и нуклеиновые кислоты [50].

Все радикалы, образующиеся в организме, подразделяют на природные и чужеродные. Природные радикалы, в свою очередь, делятся на первичные, возникающие при участии определенных ферментативных систем и ионов металлов переменной валентности; вторичные, образующиеся в неферментативных реакциях и не выполняющие ферментативных функций; и третичные, являющиеся веществами-антиоксидантами. Именно вторая группа свободных радикалов приводит к развитию патологических состояний и лежит

в основе хронических воспалений, нейродегенеративных заболеваний, атеросклероза и канцерогенеза [18].

Источниками АФК могут быть, как эндогенные (иммунная клеточная активация, воспаление, ишемия, инфекция, рак, чрезмерная физическая нагрузка, психический стресс и старение), так и экзогенные факторы (тяжелые металлы – Cd, Hg, Pb, Fe и As, некоторые лекарства, химические растворители, сигаретный дым, алкоголь, радиация и др.) [50].

К АФК относят: супероксид анион-радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ), гидроксильный радикал ( $\bullet OH$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ), синглетный кислород ( $^1O_2$ ), гипохлорит ( $HOCl$ ), оксид азота ( $NO^{\bullet}$ ) и пероксинитрит ( $ONOO^-$ ) [16,17,52].

При физиологической норме в клетке вырабатываются АФК в качестве побочных продуктов биологических реакций с участием митохондрий, пероксисом, цитохрома P-450 и т.д. [27]. В митохондриях АФК продуцируются как во время физиологических, так и патологических состояний, то есть  $O_2^{\bullet-}$  может образовываться как при клеточном дыхании, так и под действием липоксигеназ (ЛГ) и циклооксигеназ (ЦОГ) во время метаболизма арахидоновой кислоты, а также в эндотелиальных и воспалительных клетках [50]. Большое количество АФК образуется в ходе переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий, особенно при переносе электронов из комплексов I и III [38].

В пероксисомах локализованы ферменты, связанные с метаболизмом перекиси водорода, используемой для детоксикации ксенобиотиков, в норме  $H_2O_2$  полностью утилизируется. Другим источником АФК является гладкий эндоплазматический ретикулум, где локализован ряд цитохром-зависимых оксигеназ, продуцирующих супероксидный радикал. НАДФН-оксидазная система, расположенная в плазмалеме макрофагов и эндотелиоцитов, в ходе иммунного и воспалительного ответа принимает участие в продукции супероксид аниона. При этом фагоциты быстро поглощают большое

количество  $O_2$  (дыхательный «взрыв»), образуя с внешней стороны мембраны супероксид  $O_2^{\bullet-}$  за счет окисления цитозольного НАДФН [16].

### **Супероксидный анион-радикал (диоксид)**

Супероксидный радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ) радикал представляет собой относительно небольшой анион, хорошо растворимый в воде. Образуется  $O_2^{\bullet-}$  при присоединении одного электрона к молекуле кислорода, при взаимодействии с протоном переходит в гидродиоксидный радикал ( $HO_2^{\bullet}$ )

[18, 55]:

Образование супероксидного анион-радикала происходит:

- 1) в ферментативных системах, таких как НАДФН-оксидаза фагоцитов, ксантинооксидаза, микросомальные оксигеназы;
- 2) в электротранспортной цепи митохондрий. Предполагается, что образование  $O_2^{\bullet-}$  происходит либо между КоQ и цитохромом *b*, либо между ФМН и серусодержащим белком комплекса I;
- 3) в качестве промежуточного продукта во многих биохимических реакциях: окисление тиолов, флавинов, хинонов, катехоламинов, птеринов;
- 4) при метаболизме ксенобиотиков.

Из вышеназванных первые два источника являются основными [18].

Супероксид поглощает свет в ультрафиолетовом диапазоне с максимумом при 245 нм и коэффициентом экстинкции  $2350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Супероксидный радикал накапливается в клетке вследствие того, что большая его часть присутствует в гидратированной форме и не может проникать через мембраны.  $O_2^{\bullet-}$  и его протонированная форма могут быть как одноэлектронным окислителем, так и одноэлектронным восстановителем [18, 52]. В организме уровень  $O_2^{\bullet-}$  ограничен такими ферментами, как супероксидредуктаза (СОР) и супероксиддисмутаза (СОД) [55].

Патологические процессы запускаются только при реализации восстановительных свойств радикала, он будет являться родоначальником



других токсических форм кислорода. Помимо этого, данный радикал осуществляет восстановительное высвобождения металлов переменной валентности из комплексов с биологическими молекулами. Так, при высвобождении восстановленного железа будет образовываться гидроксильный радикал [18].

### **Перекись водорода (пероксид водорода)**

Не является радикалом, поскольку не имеет неспаренных электронов. Источники его происхождения те же реакции, что и при образовании  $O_2^{\cdot-}$ , это реакции с участием ксантинооксидазы, моно- и диоксигеназ, митохондриальной и микросомальной цепей переноса электронов.  $H_2O_2$ , являясь незаряженной и более стабильной молекулой, легко проникает через мембраны и мигрирует в другие клетки. Служит субстратом для глутатионпероксидазы (ГП) и каталазы (КАТ) [18,52,59]. Является универсальной сигнальной молекулой, активирующей определенные редокс-чувствительные пути [11].

$H_2O_2$  стабильна в абиотических средах при температуре окружающей среды и нейтральном pH. Обычно  $H_2O_2$  не вступает в реакцию с органическими соединениями и в повседневной жизни 3% (~ 0,8 М) раствор перекиси водорода является обычным бытовым антисептиком с длительным сроком хранения. Как правило, перекись водорода непосредственно с биополимерами (липидами, нуклеиновыми кислотами, полисахаридами, деметаллированными белками) не взаимодействует [42]. Исключением являются сенсорные белки на основе тиола, в таком случае  $H_2O_2$  вызывает реакции окисления (с тиолами или тиоэфирами). Помимо этого,  $H_2O_2$  реагирует с металлами переменной валентности (главным образом железа и меди) посредством одноэлектронного переноса с образованием радикалов [31].

Патологическое действие наступает при превышении физиологической нормы ( $10^{-9} - 10^{-7}M$ ). Обладает цитотоксическим действием, вызывая гибель

клеток в культуре фибробластов, гепатоцитов и гладкомышечных клеток. Ингибирует алкогольдегидрогеназу, инициирует перекисное окисление липидов, уменьшает концентрацию лактата и снижает трансмембранный перенос анионов. При взаимодействии с NO<sup>•</sup>, аскорбиновой кислотой, L-His, L-Cys перекись водорода увеличивает свою цитотоксичность [42].

Цитотоксический эффект реализуется через образование гидроксильного радикала в присутствии определенных доноров, а также через инициирование диссоциации железа из гемоглобина и ферритина [18, 42]. В клетках количество свободного железа существенно ограничено. В том, случае если Fe (II) взаимодействует с перекисью водорода, происходит реакция Фентона (рис. 1), в ходе которой растворимое железо Fe (II) отдает один электрон молекуле H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, вызывая её разложение. При высоких скоростях диффузии образующийся в ходе реакции гидроксильный радикал, способен реагировать с любым органическим соединением, вызывая окислительный стресс [42].

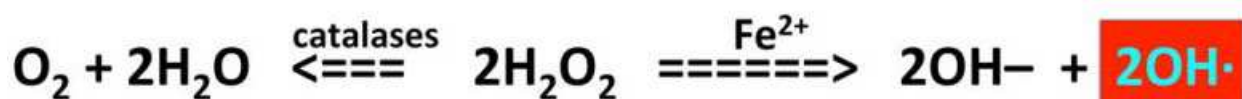


Рисунок 1– Реакции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, происходящие внутри клеток [42]

Источником перекиси водорода являются реакции, в ходе которых происходит перенос двух электронов на молекулу кислорода [18]. Митохондриальная перекись водорода образуется путем катализа переноса электрона на кислород через окисление цитохрома с, данный процесс регулируется адаптерным белком p66Shc [40]. Фагоциты в очагах воспаления образуют до 80% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### Гидроксильный радикал

Гидроксильный радикал (HO<sup>•</sup>) образуется в результате не катализируемого взаимодействия перекиси водорода с ионами металлов, супероксидным анион-радикалом и т.п. [18,52] в ниже приведенных реакциях:

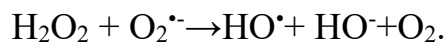
Реакция Фентона:



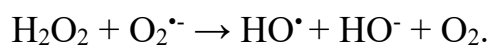
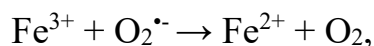
Реакция разложения перекиси водорода в присутствии иона меди:



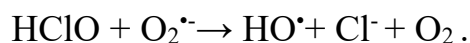
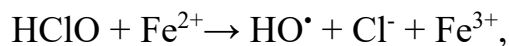
Образование гидроксильного радикала при взаимодействии перекиси водорода с супероксидом:



Реакция Хабера-Вейса:



Образование гидроксильного радикала из гипохлорита:



Образование гидроксильного радикала из воды под действием радиации:



Гидроксильный радикал инициирует перекисное окисление липидов в биологических мембранах вследствие отрыва атома водорода. Таким же способом он взаимодействует с рибозой и дезоксирибозой в составе нуклеиновых кислот. Через присоединение по двойной связи данный радикал может взаимодействовать с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями нуклеиновых кислот [18].

## 1.2 Антиоксидантная защита тканей

Существует два различных механизма, с помощью которых реализуется защита организма при чрезмерной продукции АФК: 1) снижение образования АФК – путем уменьшения  $\text{O}_2$  в клетке или его более быстрого использования дыхательной цепью ввиду снятия ее контроля  $\Delta\mu\text{H}^+$ ; 2) функционирование антиоксидантной системы (АОС), включающей как низкомолекулярные антиоксиданты, так и антиоксидантные ферменты [11].

### 1.2.1 Супероксиддисмутаза

Супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1,  $O_2^{\cdot-} : O_2^{\cdot-}$  - оксидоредуктаза, СОД) – это семейство окислительно-восстановительных металлоферментов, которые катализируют дисмутацию супероксида, превращая его в диоксид кислорода ( $O_2$ ) и перекись водорода  $H_2O_2$  [55,59,61]. Семейство СОД способно селективно реагировать с супероксидом как в окисленном, так и в восстановленном состояниях.

Существует несколько изоформ супероксиддисмутазы: СОД1 (цитозольная), СОД2 (митохондриальная) и СОД3 (внеклеточная) [61]. У всех изоформ сходные функции, но наблюдаются различия в структурной организации, локализации гена, компарментализации и требований к кофактору. Так медь и цинк зависимая супероксиддисмутаза (Cu/ZnСОД) кодируется геном *sod1*, марганец-зависимая супероксиддисмутаза (MnСОД) – *sod2*, а внеклеточная супероксиддисмутаза геном *sod3* [47,50].

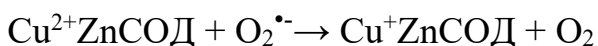
Все изоформы содержат редокс-активные ионы металлов на своих активных сайтах:  $Cu^{1+/2+}$  в цитозольной форме и внеклеточной, а в митохондриальной, например,  $Mn^{2+/3+}$ . Также все они катализируют диспропорционирование  $O_2^{\cdot-}$  по очень похожему механизму «пинг-понга» с супероксидом, действующим поочередно для восстановления окисленного иона металла и затем для его окисления.

Внутриклеточная изоформа СОД1 является гомодимером с молекулярной массой 32 кДа, каждая субъединица которого удерживает один связывающий медь и один цинк сайт в непосредственной близости и внутримолекулярную дисульфидную связь между Cys57 и Cys146. Субъединица состоит из восьмицепочечного бочкообразного греческого ключа с семью соединительными петлями. Из них можно выделить петли, наиболее значимые для нормального функционирования: цинковые (петли IV (остатки 49–83)) и электростатические (VII (остатки 121–142)). Цинковая петля содержит все четыре Zn-связывающих домена и дисульфид цистеина,

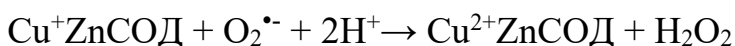
Cys57. Электростатическая петля содержит большую часть остатков активного центра и ограничивает доступ растворителя к сайтам связывания металлов. Структура сайта связывания зависит от степени окисления меди. На пребывание фермента в состоянии димера сильное влияние оказывает уровень металлизации, а также состояние внутрисубъединичных дисульфидных связей [55].

Ген *sod1* локализован на хромосоме 21q22 и состоит из пяти экзонов, прерванных четырьмя интронами. Изменение размера интрона, обнаруженное в различных исследованиях, может быть связано с полиморфизмом генов в различных тканях человека и клеточных линиях [47].

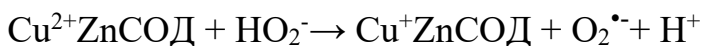
При физиологическом pH реакции, катализируемые СОД1 контролируются диффузией. Первая реакция не зависит от pH вне зависимости от присутствия или отсутствия иона металла в сайте цинка. Молекула  $O_2^{\bullet-}$  восстанавливает ион  $Cu^{2+}$  и образует  $O_2$ :



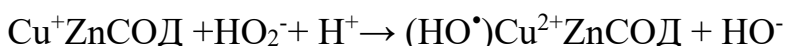
В свою очередь вторая реакция сильно зависит от pH с резким падением активности при  $pH > 6$  в отсутствие металла в сайте цинка. Молекула  $O_2^{\bullet-}$  окисляет ион  $Cu^+$  и образует  $H_2O_2$ :



СОД1 проявляет и пероксидантную активность. Реакция  $Cu^{2+}$ -СОД1 с молекулой  $H_2O_2$  приводит к восстановлению иона меди и образованию супероксида:



$Cu^+$ -СОД1 реагирует со второй молекулой  $H_2O_2$ , образуя гидроксильный радикал в активном центре и гидроксид-ион:



Высокореактивный гидроксильный радикал в активном центре способен окислять лиганды гистидилимидазола, что в конечном итоге приводит к потере иона меди и инактивации фермента [55].

Гомотетрамер СОД2 располагается в митохондриальном матриксе, он связывает один ион марганца на субъединицу и является основным митохондриальным антиоксидантом [50]. Фермент локализуется в митохондриальном матриксе с помощью N-концевой последовательности, которая расщепляется после транспорта [55].

Ген *sod2* располагается на хромосоме 6q25.3, содержит пять экзонов, прерванных четырьмя интронами [47].

Проводились исследования на нокаутных мышах по гену MnСОД, такие животные могли развиваться эмбрионально, но постнатальная продолжительность их жизни составляла всего несколько дней, что ещё раз подчеркивает уровень важности данного фермента для выживания.

СОД3 является внеклеточная изоформой СОД1, и гомологичен ему, однако является тетрамером [55]. Его ген *sod3* локализован на четвёртой хромосоме и состоит из 3 экзонов и 2 интронов. Непрерывная кодирующая область присутствует в экзоне 3, который гомологичен гену *sod1* [47].

Таким образом, семейство супероксиддисмутаз играет ключевую роль в антиоксидантной защите, и обладает потенциалом для терапевтического использования. Изменения в уровне экспрессии или каталитической активности СОД были обнаружены при различных патологических состояниях, включая некоторые из наиболее распространенных возрастных заболеваний, таких как сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные заболевания и рак. Они являются единственными ферментами, которые специфически взаимодействуют с супероксидом и таким образом контролируют уровни АФК, а также служат ключевыми регуляторами передачи сигналов [59].

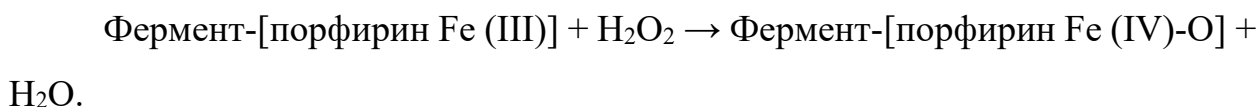
### 1.2.2 Каталаза

Каталаза (КФ 1.11.1.6, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – оксидоредуктаза», КАТ) – монофункциональный гемсодержащий фермент, расщепляющий перекись водорода, образующуюся при дисмутации O<sub>2</sub><sup>•-</sup> супероксиддисмутазой [41,42,54]. Это тетрамер с молекулярной массой 220-244 кДа, 59,7 кДа на каждую из четырех идентичных субъединиц. В состав каждой субъединицы входит: 527 аминокислотных остатка, гем-группы железа (III), простетическая группа протопорфириа IX, молекула НАДФН.

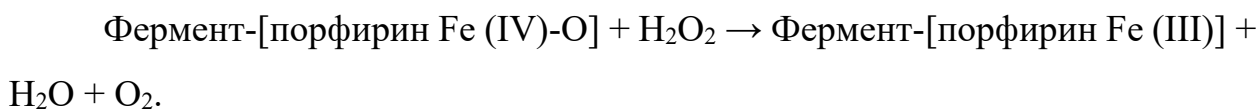
Железо активного центра является пятикоординированным. Гем-карбоксилатный радикал заряжен отрицательно и образует солевые мостики с тремя остатками аргинина (72, 117 и 365 положения), что повышает окислительно-восстановительный потенциал.

У млекопитающих самые высокие концентрации каталазы регистрируются в эритроцитах и печени, а иногда и в почках [41]. Фермент локализуется преимущественно в пероксисомах, а также в цитоплазме [54]. В физиологических условиях эритроциты содержат 1,31–2,71 мкг КАТ / мг Нв. Эти значения соответствуют ожидаемой концентрации 6,6 к 13,7 мкМ для связанного с каталазой НАДФН в эритроцитах человека [42]. Ген каталазы располагается в 11 хромосоме, полоса p13 и расщеплен на 13 экзонов и 12 интронов, имеет восемь точек инициации транскрипции [41].

Основной функцией каталазы является разложение двух молекул перекиси водорода на две молекулы воды и одну молекулу кислорода в ходе двухстадийной реакции. На первой стадии путем восстановления одной молекулы пероксида водорода образуется спектроскопически различное промежуточное соединение I, которое является ковалентной формой оксиферрила (Fe IV O), имеющей π- катионный радикал порфирина:



На второй стадии соединение I восстанавливается посредством переноса двух электронов от донора (вторая молекула перекиси водорода) с образованием свободного фермента, кислорода и воды [49]:



Во время длительного воздействия фермента на  $\text{H}_2\text{O}_2$ , происходит окисление связанного с каталазой НАДФН до  $\text{НАДФ}^+$ , что снижает её активность примерно на треть от начальной. Помимо основной реакции КАТ также может катализировать 2-электронное перекисное окисление короткоцепочечных алифатических соединений. При концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$  выше  $10^{-4}$  М преобладает каталазная реакция, а ниже, при наличии соответствующего донора водорода – пероксидазная реакция [41]. Активность КАТ ингибируется любым простым химическим реагентом, который прочно связывает гемовое железо в её активных центрах [42].

Каталаза одни из наиболее важных антиоксидантных ферментов, дефицит или нарушение функционирования которого связано со многими заболеваниями, такими как анемия, сахарный диабет, гипертония, сердечно-сосудистые патологии, витилиго, болезнь Вильсона, некоторые дерматологические расстройства, болезнь Альцгеймера, биполярное расстройство и шизофрения. Фермент используется в качестве терапевтического средства при лечении многочисленных заболеваний, связанных с окислительным стрессом [49].

### **1.2.3 Церулоплазмин**

Церулоплазмин (ЦП) – это медьсодержащая оксидаза (КФ.1.16.3.1) являющаяся основным Cu-содержащий белком плазмы крови ( $\alpha$ -2-глобулиновая фракция) [4, 51]. Белок острой фазы синтезируется в печени гепатоцитами на мембраносвязанных полисомах, и отвечает за транспорт циркулирующей меди, а также участвует в метаболизме железа [3, 28]. В основном ЦП находится в плазме крови, однако он также присутствует в



некоторых других жидкостях организма (цереброспинальных, амниотических) и молоке. В плазме значительная часть ЦП всегда находится в апо-форме [51].

Молекулярная масса белка составляет около 120 кДа – 1046 аминокислотных остатка, и 12 кДа – N-связанного углеводного компонента, представленного девятью олигосахаридными цепями, содержащими глюкозамин, лактозу, мальтозу, фукозу и сиаловые кислоты [5, 51]. Молекула содержит 6 доменов, образующих тригональную структуру, и 6 ионов Cu. В зависимости от структурного строения домены разделяются на две группы: нечетные домены 1, 3 и 5 и четные домены – 4 и 6. Один ген кодирует экспрессию 3 форм белка, отличающихся только несколькими аминокислотными остатками, посредством альтернативного сплайсинга C-концевого экзона первичного транскрипта. Фермент многофункционален, поскольку участки для связывания различных субстратов расположены в разных частях молекулы [51].

Ионы меди, представленные в медьсодержащих оксидазах, делят на три типа: T1Cu-ион, T2Cu-ион (так называемых «не синих»), и T3Cu-ион (биядерные). T1Cu-ион меди первого типа – имеет пик оптического поглощения при 610 нм и определяет интенсивный голубой цвет ферментов данного класса. В основном медь именно этого типа принимает электроны от субстратов или радикалов [5,51]. Для высвобождения меди в ЦП должно произойти значительное изменение конформации, возможное при взаимодействии с другими белками (например, белками, расположенными на поверхности клетки). Не менее половины меди в плазме крови находится в составе церулоплазмينا.

Основная функция белка – связывание меди в плазме крови, он является циркулирующим источником Cu, доставляя её из печени в клетки других тканей и органов, особенно к клеткам сердца, плаценты и плода [51].

ЦП обладает антиоксидантным действием, так как способен связывать железо и медь, которые являются основными компонентами, участвующими в эндогенных реакциях генерирующих АФК. Церулоплазмин, благодаря своей ферроксидазной активности, предотвращает образование внеклеточных АФК путем окисления  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$ , способствуя секвестрации железа апотрансферрином, и препятствуя тому вступить в реакцию Фентона [28, 56, 58]. ЦП также ингибирует процессы ПОЛ, благодаря своей способности связывать свободные супероксидные радикалы.

Таким образом, данный фермент исполняет роль ингибитора на ряде этапов образования АФК и их метаболитов [51]. Как положительный белок острой фазы ЦП участвует в процессах защиты и восстановления иммунной системы. Отсутствие функционального ЦП приводит к накоплению железа в некоторых тканях, включая печень и мозг [58].

#### **1.2.4 Аскорбиновая кислота**

Аскорбиновая кислота (АК, витамин С) представляет собой водорастворимый кетолактон с двумя ионизируемыми гидроксильными группами [34]. АК является производным моносахарида L-ряда, имеет два асимметрических атома углерода в положениях 4 и 5 и образует четыре оптических изомера и два рацемата (рис 2). В отличие от D-(-) формы, не существующей в природе, L-(+)-форма является биологически активной [20]. В чистом виде АК представляет собой белый кристаллический порошок, растворимый в воде, и образующий бесцветный раствор.

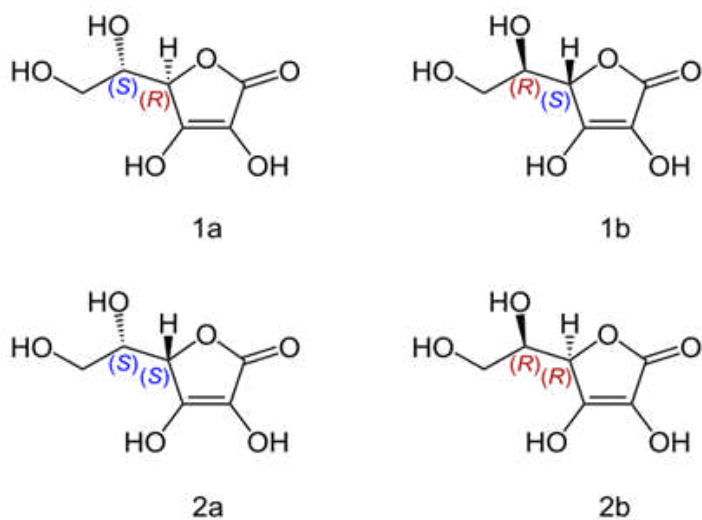
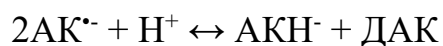


Рисунок 2 – Оптические изомеры аскорбиновой кислоты. 1a – L-аскорбиновая кислота; 2a – L-изоаскорбиновая кислота; 1b – D-изоаскорбиновая кислота; 2b – D-аскорбиновая кислота [20]

Витамин С является хорошим восстановителем, легко подвергается двум последовательным одноэлектронным окислениям с образованием аскорбатного радикала ( $AK^{\cdot-}$ ) и дегидроаскорбиновой кислоты (ДАК). Реакция обратима, регенерация ДАК осуществляется как ферментативным способом, так и неферментативно:



С помощью сульфгидрильной группы глутатиона ДАК легко регенерируется обратно в аскорбиновую кислоту [20]. ДАК транспортируется через транспортер GLUT1 в митохондрии, где она превращается в аскорбиновую кислоту и действует как мощный антиоксидант [45]. В процессе окислительного и гидролитического расщепления дегидроаскорбиновая кислота превращается в 2,3-дикето-L-гулоновую кислоту (ДКГК).

АК легко подвергается pH-зависимому аутоокислению с образованием перекиси водорода, при наличии каталитических металлов наблюдается ускорение окисления, обладает низким потенциалом восстановления электронов [34,45].

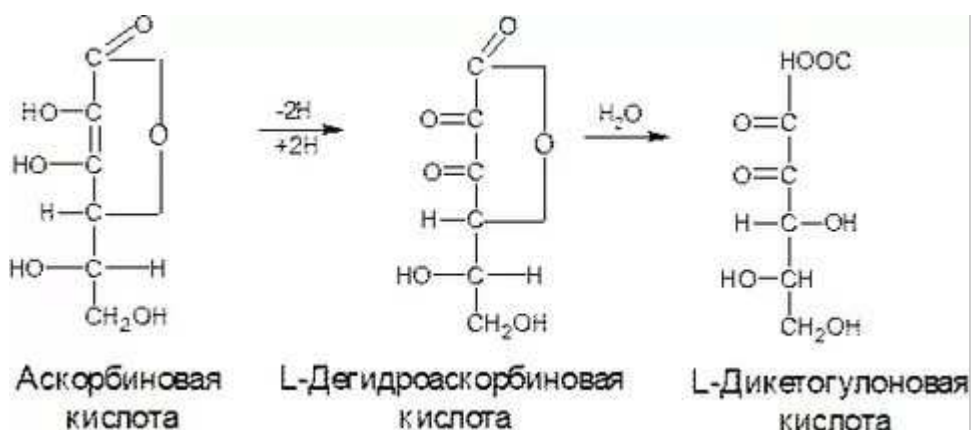


Рисунок 3 – Окисление аскорбиновой кислоты с образованием ДАК И ДКГК [20]

У человека не функционирует ген, кодирующий L-гулонолактоноксидазу, фермент, необходимый для последней стадии синтеза аскорбиновой кислоты. АК является витамином, получаемым с пищей, всасывание происходит в энтероцитах тонкой кишки. Накопление АК в клетках осуществляется при помощи  $Na^+$ -зависимых переносчиков витамина С (SVCT). Из-за ограниченного средства SVCT1 к АК её концентрация в плазме строго контролируется, и в норме составляет около 40–80 мкМ. За исключением эритроцитов внутриклеточные концентрации аскорбата выше, чем во внеклеточных жидкостях. В тканях человека и животных АК в самых высоких концентрациях находится в клетках надпочечников и гипофиза [34].

Аскорбат, благодаря своей способности легко отдавать электроны, служит эффективным экзогенным антиоксидантом ряда ферментов, содержащих железо и медь [30, 39, 45]. Внутриклеточный аскорбат может гасить внеклеточные окислители путем переноса электронов через плазматическую мембрану, а его высвобождение из клеток также может снижать не связанное с трансферрином железо, стимулируя тем самым поглощение железа клетками [34].

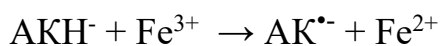
Как антиоксидант витамин С непосредственно удаляет свободные радикалы кислорода, восстанавливает другие клеточные антиоксиданты, включая тетрагидробиоптерин и  $\alpha$ -токоферол. Он детоксицирует как

экзогенные окислители, проникшие в клетки, так и образующиеся в них из-за гиперпродукции  $O_2^{\bullet-}$  митохондриальным метаболизмом, НАДФН-оксидазой, ксантинооксидазой или несвязанной синтазой оксида азота [45].

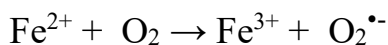
АК может влиять на всасывание железа в кишечнике, влияя на снижение содержания  $Fe^{3+}$  до  $Fe^{2+}$ , регулирует гомеостаз железа, ингибируя экспрессию гепсидина (например, в клетках HepG2), потенциально помогая уменьшить дефицит железа [39]. АК также является кофактором лизил- и пролилгидроксилаз, необходимых для стабилизации третичной структуры коллагена.

Витамин С – кофактор гидроксилаз, участвующих в биосинтезе карнитина, молекулы, участвующей в транспорте жирных кислот в митохондрии для генерации метаболической энергии и т.д. Витамин С способствует иммунной защите, поддерживая различные клеточные функции как врожденной, так и адаптивной иммунной системы [30].

Аскорбат также может оказывать прооксидантное действие. Комбинация железа и аскорбата давно используется в качестве прооксидантной системы, ее называют системой Udenfriend и используют для гидроксирования алканов, ароматических и других соединений. Аскорбат является отличным одноэлектронным восстановителем, который может восстанавливать железо ( $Fe^{3+}$ ) до двухвалентного ( $Fe^{2+}$ ) состояния, в то же время окисляясь до аскорбатного радикала:



В зависимости от среды  $Fe^{2+}$  может легко реагировать с  $O_2$ , превращая его в супероксидный радикал:



В свою очередь супероксидный радикал превращается в  $H_2O_2$  и  $O_2$  [34]:



В присутствии свободного железа витамин С может восстанавливать свободное трехвалентное железо до двухвалентной формы, которая может взаимодействовать с перекисью водорода в реакции Фентона, приводя к гидроксильным или гидроксиподобным реакциям. Таким образом, витамин С может генерировать АФК [45].

### **1.2.5 Мочевая кислота**

Мочевая кислота (МК) представляет собой 7,9-дигидро-1Н-пурин-2,6,8-(3Н)-трион),  $C_5H_4N_4O_3$  – гетероциклическое органическое соединение с молекулярной массой 168 Да [43]. Она является слабой кислотой ( $pK_{a1}=5.4$  и  $pK_{a2}=9,8$ ) и при физиологических значениях pH существует в качестве аниона – дигидроурата натрия, распределенного во внеклеточной жидкости [6]. МК является конечным продуктом катаболизма пуринов, который выводится в основном почками через трубчатые транспортеры [53]. Растворимость в воде низкая. Экзогенный пул значительно варьируется в зависимости от диеты, а эндогенное производство МК происходит главным образом в клетках печени, кишечника и других тканей, таких как мышцы, почки и сосудистый эндотелий [43].

Острое повышение уровня мочевой кислоты в плазме увеличивает её антиоксидантную способность. На урат приходится 60% от общего антиоксидантного потенциала плазмы крови [32, 43, 53]. Было показано, что МК инактивирует синглетный кислород, гидроксильные радикалы, пероксид водорода и пероксинитрит. Взаимодействуя с пероксинитритом, мочевая кислота образует производное, которое действует как донор вазоактивного оксида азота и предотвращает повреждение ДНК, вызванное свободными радикалами.

Урат также обладает комплексообразующими свойствами, что позволяет ему связываться с ионами железа и меди. МК стабилизирует другие антиоксидантные системы, включая супероксиддисмутазу, тетрагидробиоптерин и аскорбат (благодаря хелатирующим железо

свойствам) [32, 43]. Предотвращая деградацию СОД, урат позволяет вывести супероксид из клетки, тем самым предотвращая его реакцию с оксидом азота и уменьшая образование пероксинитрита. Урат предотвращает инактивацию клеточных ферментов и модификацию цитоскелета, ингибируя нитрование пероксинитритом остатков тирозина в белках [32]. На физиологическом уровне мочевая кислота устраняет повреждение органов, вызванное активированными полиморфноядерными клетками крови и эритроцитов, которые являются хорошо известными продуцентами свободных радикалов [53].

Мочевая кислота действует как сильный антиоксидант в плазме, но после попадания в клеточную среду она способствует развитию окислительного стресса. Мочевая кислота может выступать в качестве прооксиданта в гидрофобной среде внутри клетки, в отличие от гидрофильной внеклеточной среды. Одним из возможных объяснений служит образование алкилирующих соединений, которые могут легко растворяться в процессе циркуляции во внеклеточной среде, но в клеточной действуют как свободные радикалы [53]. Прооксидантные и провоспалительные действия, приписываемые МК, могут быть в значительной степени результатом преобразования ксантидегидрогеназы в ксантиноксидазу и последующего накопления АФК, которое происходит параллельно с продукцией мочевой кислоты.

### **1.3 Перекисное окисление липидов**

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) – это процесс, при котором липиды, подвергаясь свободно-радикальной атаке, теряют атом водорода, переходят в свободно радикальную форму ( $L^{\bullet}$ ) и с легкостью взаимодействуют с молекулярным кислородом, то есть переокисляются ( $LO^{\bullet}$ ). Скорость протекания данного процесса при физиологических условиях довольно низкая, однако при патологии быстро возрастает. Если ПОЛ становится более интенсивным, то оно способно привести к повреждению основных

макромолекул организма. [18, 22]. Поэтому ПОЛ может служить основным патогенетическим фактором многих заболеваний. Это происходит вследствие нарушения липидной основы мембран, вызывной увеличением образования супероксидного радикала митохондриями [10].

В качестве основного субстрата ПОЛ выделяют полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), в особенности представители  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 семейств. Некоторые ПНЖК являются предшественниками при синтезе регуляторных соединений именуемых эйкозаноидами (простагландины, тромбоксаны, лейкотриены) [10,22]. От количества ненасыщенных связей в углеродной цепочке ПНЖК зависит чувствительность к перекисному окислению, чем их больше, тем сильнее жирные кислоты поддаются данному процессу [22]. В частности, важными мишенями для перекисного окисления липидов являются такие ПНЖК как линолевая и арахидоновая [36]. Начальный этап ПОЛ стартует с удаления атома водорода от несопряженного двойной связью углеродного атома полиненасыщенной жирной кислоты при взаимодействии со свободным радикалом ( $\cdot\text{OH}$ ) [22,24].

Процесс перекисного окисления липидов является автокаталитической реакцией и проходит в несколько стадий (рис.4):

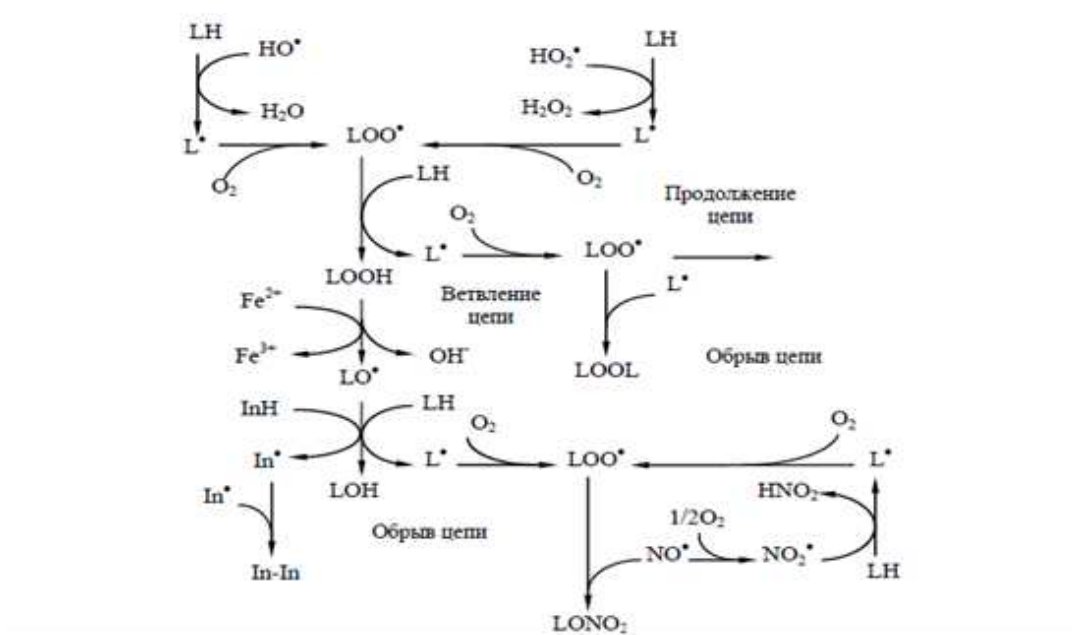


Рисунок 4 – Схема перекисного окисления липидов [15]



I. Инициация: в ходе работы дыхательной цепи в митохондриях происходит утечка электронов на молекулы кислорода, что приводит к образованию АФК [15]. Свободный радикал (инициатор), преимущественно  $\cdot\text{OH}$ , взаимодействует с ПНЖК (LH) [22]. Сначала свободный радикальный инициатор отделяет атом водорода от углеродного атома, соседнего с двойной связью, образуя алкильный радикал ( $\text{L}\cdot$ ):  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2- \rightarrow -\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}\cdot + \text{H}$ ; что приводит к образованию конъюгированных двойных связей [22,26,36].

## II. Развитие цепи:

1. К алкильному радикалу ( $\text{L}\cdot$ ) присоединяется молекула кислорода с формированием липид-пероксильного радикала ( $\text{LOO}\cdot$ ).

2. Липид-пероксил ( $\text{LOO}\cdot$ ) отделяет водородный атом от близлежащих молекул полиненасыщенной жирной кислоты с образованием нового метастабильного (неустойчивые) липидного гидропероксида ( $\text{LOOH}$ ).

III. Обрыв цепи: происходит образование кислородных мостиков, либо образование С-С связей алкильных радикалов, и процесс перекисного окисления липидов завершается [15,22].

Цепная реакция перекисного окисления липидов может быть прервана низкомолекулярными антиоксидантами, например,  $\alpha$ -токоферолом посредством реакции с распространяющимся в цепи пероксидным радикалом липида  $\text{LOO}\cdot$ , который превращается в нерадикальный продукт  $\text{LOOH}$ . Образующийся при этом  $\alpha$ -токоферильный радикал, в свою очередь может быть восстановлен до  $\alpha$ -токоферола с помощью определенных восстановителей (аскорбата) или реагировать со второй молекулой  $\text{LOO}\cdot$  с образованием нерадикального продукта.

Продукты перекисного окисления липидов подразделяют на следующие группы: первичные (гидроперекиси, диеновые конъюгаты, эндоперекиси), вторичные (малоновый диальдегид (МДА), триеновые конъюгаты), конечные (полимерные соединения – основания Шиффа) [18,22].

Образование малонового диальдегида происходит при перекисном окислении жирных кислот, имеющих в своём составе три или более двойных связей (линоленовая и арахидоновая кислоты) [14,22]. МДА является мутагенным, генотоксическим и канцерогенным соединением, представляющим собой органическое соединение с трехчленной углеродной цепью и двумя альдегидными группами на концах [37].

МДА легко подвергается диффузии через клеточные мембраны, вызывая их повреждение. Данный процесс происходит вследствие связывания и полимеризации мембранных компонентов, что влечет за собой нарушение таких функций, как ионный транспорт, рецепторная и ферментативная активности, текучесть, агрегирующая способность детерминантов клеточной поверхности. Помимо этого, МДА способен связываться с азотистыми основаниями ДНК [8,22]. Альдегид ковалентно модифицирует белки в цитоплазме и связывается с ними с образованием МДА-белковых аддуктов, которые в свою очередь являются иммуногенными и могут действовать как нео-аутоантигены в инициации сильного аутоиммунного ответа [37].

#### **1.4 Диффузный токсический зоб**

Диффузный токсический зоб (ДТЗ, болезнь Грейвса, Базедова) – мультифакториальное аутоиммунное органоспецифическое генетически обусловленное заболевание, сопровождающееся синтезом антител к рецептору тиреотропного гормона (АТ-рТТГ), которые вызывают гиперпродукцию тиреоидных гормонов щитовидной железой (ЩЖ)[2,9,25]. Увеличение размеров ЩЖ сопровождается формированием зоба и клиническими проявлениями гипертиреоза, приводящим к изменениям нервной, сердечно-сосудистой систем, а также к перерождению в рак ЩЖ [9,12]. В 80 % случаев ДТЗ является причиной тиреотоксикоза [1]. Патогенез ДТЗ может представлять собой сложное взаимодействие между орбитальными фибробластами, иммунными клетками, цитокинами, аутоантителами, генетикой и факторами окружающей среды [57].

Частота заболеваемости ДТЗ от 15 до 50 человек на 100 тыс. населения в год, а в регионах, не испытывающих дефицита по йоду, ДТЗ выявляется у 70–80 % пациентов с гипертиреозом [2,9]. По возрастным категориям наиболее подверженными данному заболеванию считаются люди в возрасте 20-50 лет, причём преимущественно болеют женщины трудоспособного и детородного возраста [1,2]. Среди детей первичная заболеваемость ДТЗ невысока и в среднем составляет 1–2 на 100 тыс. детского населения в год [25]. Во всех возрастных категориях женщины страдают чаще, заболеваемость колеблется в зависимости от региона от 4:1 до 10:1 между женщинами и мужчинами, в среднем же в различных источниках описывается соотношение 1:8 [1,2,9,19].

ДТЗ развивается под действием факторов двух групп: предрасполагающих и провоцирующих. К первой группе относится наследственная (генетическая) предрасположенность к аутоиммунным реакциям. Наиболее часто развитие ДТЗ связывают с носительством генов HLA-B8 или DR-3 [2].

Провоцирующими же факторами являются – стресс (психическая травма), черепно-мозговые травмы, инфекционные заболевания (грипп, частые острые респираторные заболевания, корь и т.д.), курение, инсоляции, которые выступают пусковым механизмом, реализующим генетическую предрасположенность к ДТЗ [2,19]. Ряд авторов связывает патофизиологические изменения в ЩЖ с изменившейся экологической обстановкой [13]. Также заболевание может быть вызвано беременностью [19].

В результате взаимодействия вышеперечисленных факторов происходит активированию клеток иммунной системы на фоне врожденного дефекта иммунного ответа в виде образования аутоантител [2]. Вследствие чего происходят нарушения иммунологической толерантности к рецепторам тиреотропного гормона (ТТГ), и нарушению регуляции его выработки по

принципу отрицательной обратной связи [19]. Возникает частичная не функциональность Т-лимфоцитов (супрессоров), которые в норме подавляют «запрещенные» клоны Т-лимфоцитов (хелперов). Такие «запрещенные» клоны созревают и пролиферируют, в дальнейшем взаимодействуя с антигенами ЩЖ. В результате этого взаимодействия в иммунологический процесс вовлекаются В-лимфоциты, отвечающие за образование антител к рецептору тиреотропного гормона (АТ-рТТГ, тиреоидстимулирующие иммуноглобулины), которые, в свою очередь, усиливают синтез и секрецию тиреоидных гормонов [2]. Характер структурных изменений зависит от длительности и тяжести протекания патофизиологического процесса в ЩЖ [12].

Антитела к рецептору ТТГ подразделяют на две группы. К первой относят тиреоидстимулирующие антитела – при увеличении уровня цАМФ происходит активный захват йода в результате чего повышается синтез ТТГ, одновременно с этим ЩЖ увеличивается в своих объемах. Ко второй группе антител относят ТТГ-блокирующие антитела, препятствующие связыванию ТТГ с рецептором, в результате чего снижается выработка цАМФ. Образование ТТГ-блокирующих антител является причиной развития гипотиреоза [7].

Среди морфологических изменений, наблюдаемых при ДТЗ, выделяют такие, как: перестройка сосудистой системы в виде различных гемодинамических нарушений, гиперпластические процессы (гиперплазия тиреоидного эпителия, активация фолликулов генеза и лимфоидной инфильтрации), а также перестройка параметров фолликулов. Нарушение сосудистой проницаемости связано с изменением состояния основного межклеточного вещества, в частности с его распадом. При ДТЗ часто встречается плазматическое пропитывание и пролиферация клеток сосудистой стенки [12].

Было показано, что цитокины оказывают влияние на развитие ДТЗ. Обнаружена прямая взаимосвязь между концентрацией ИЛ-1, ИЛ-4, ФНО- $\alpha$  и переходом заболевания к тяжелому тиреотоксикозу и тиреотоксической кардиомиопатии. На начальной стадии заболевания отмечается повышение концентрации как провоспалительных (ИЛ-4,6,8, ФНО- $\alpha$ ), так и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10) [23].

Происходит и перестройка микро топографических взаимоотношений фолликулов ЩЖ и окружающих ее структурных организаций. Среди таких преобразований можно отметить изменение микроангиоархитектоники, увеличение ее проницаемости, нарушение агрегатного состояния крови, очаговые лимфоцитарные инфильтраты, разрастание соединительной ткани, расширение интерфолликулярного пространства, появление островков тиреоидного эпителия и т.д. [12].

С последующим развитием клинической картины тиреотоксикоза возникает гиперплазия ЩЖ, ткани ЩЖ разрастаются, это ведёт к гиперфункции и повышению концентрации вырабатываемых гормонов Т3 и Т4 [19]. В активной фазе заболевания АТ-рТТГ определяются у 90% больных ДТЗ [2].

В клинических проявлениях ДТЗ характеризуется триадой симптомов: гипертиреозидизм, зоб и экзофтальм (выпученные глаза). Сердечные проявления: аритмия, тахикардия, экстрасистолия, артериальная гипертензия, хроническая сердечная недостаточность. К эндокринным проявлениям можно отнести: потерю веса при повышенном аппетите, непереносимость жары, потливость, повышенный основной обмен. Неврологические проявления: тремор конечностей, слабость, головная боль, беспокойство, тревога, гиперактивность. Офтальмологические проявления: экзофтальм, усиленный блеск глаз, редкое мигание, отставание верхнего века от края радужки при взгляде вниз, изменения полей зрения и повышенное внутриглазное давление, сухость в глазах [19].

Лечение ДТЗ включает в себя комплекс мероприятий, подразделяющихся на консервативные (фармакологические), радиологические (радиойодтерапия) и хирургические, и в зависимости от тяжести заболевания, применяемые как в совокупности, так и отдельно [1,19]. Основным методом всё ещё остаётся консервативная терапия с использованием антитиреоидных препаратов в течение 1,5–2 лет [7]. Среди хирургических методов чаще применяется субтотальная тиреоидэктомия (полное удаление щитовидной железы), приводящая к гипотиреозу для устранения последствий которого необходим прием препаратов L-тироксина [1,12,19]. Стоит отметить, что применение радиоактивного йода, антитиреоидных препаратов и различные оперативные вмешательства на ЩЖ не гарантируют выздоровления и зачастую осложняются развитием серьезных побочных эффектов [9].

Для прогнозирования предполагаемых послеоперационных исходов необходимо исследовать гормональные, иммунологические и клинические показатели. В настоящее время исследователями уделяется огромное внимание воздействию маркеров апоптоза и пролиферации на аутоиммунную патологию ЩЖ. Причины различий в послеоперационных исходах у прооперированных больных ДТЗ до конца не выявлены. Предполагается, что сочетание разных аутоиммунных процессов ЩЖ у одного пациента будут определять послеоперационный прогноз [7].

## **2 Материалы и методы**

### **2.1 Объект исследования**

Была исследована плазма крови здоровых людей и людей больных диффузно токсическим зобом. Были проанализированы образцы плазмы крови 44 человек, из них условно здоровых людей 26, больных ДТЗ 18 человек.

Забор крови производили из локтевой вены натошак, и помещалась в вакутейнер с гепарином в качестве антикоагулянта. Затем цельную кровь центрифугировали в течение 15 минут при 3000 об/мин, плазма отбиралась для определения показателей окислительной модификации липидов, низкомолекулярных антиоксидантов и ферментативной активности. Хранение плазмы производили небольшими порциями при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2 Определение содержания малонового диальдегида**

Принцип метода основан на том, что в результате ПОЛ в липидных системах происходит образование малонового диальдегида (МДА). Его взаимодействие с 2-тиобарбитуровой кислотой приводит к появлению хромогена с максимумом поглощения в видимой области спектра при длине волны 532 нм [21].

Реактивы:

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

Ход определения:

В пробирку вносили 0,8 мл физиологического раствора и добавляли к нему 0,2 мл плазмы крови и 0,5 мл раствора ТХУ, перемешивали. Затем центрифугировали 15 минут при 3000g. Контрольная проба готовилась

аналогичным образом, только в ней плазму заменяли равным объемом дистиллированной воды. Следующим этапом в чистую пробирку переносили 1 мл супернатанта, добавляли 0,25 мл раствора ТБК и 0,075 мл ЭДТА. После перемешивания содержимого пробирки помещали в кипящую водяную баню. Через 15 минут пробирки снимали для охлаждения до комнатной температуры. Измерение поглощения опытной пробы производили против контроля при длине волны 532 нм в кюветах с толщиной слоя 1,0 см на спектрофотометре.

Для расчета содержания МДА применялся коэффициент молярной экстинкции образовавшегося хромогена, равного  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , который выражается в мкмоль/г белка.

$$C = \frac{D_{532} \cdot V_{p.c} \cdot 1000}{V_{пр} \cdot \varepsilon \cdot d \cdot ОБ}, \text{ где}$$

C – содержание МДА, мкмоль/г белка;

D532 – оптическая плотность при длине волны 532 нм;

V<sub>p.c.</sub> - объем реакционной смеси (1,325 мл);

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

V<sub>пр.</sub> – объем супернатанта, используемый для определения содержания МДА (1 мл);

d – толщина слоя кюветы (1 см);

1000 – коэффициент пересчета на г/белка.

ОБ – содержание общего белка в сыворотке крови.

### 2.3 Определение активности каталазы

Метод основан на том, что неразрушенная в ходе каталазной реакции перекись водорода взаимодействуя с молибдатом аммония, образует комплекс, имеющий желтую окраску [21].

Реактивы:

1. 0,03 %-ный раствор перекиси водорода.



2. 4 %-ный раствор молибдата аммония.

Ход определения:

Готовили опытную и контрольную пробы. В обе пробирки наливали по 2 мл раствора перекиси водорода. Затем в опытную пробу вносили 0,01 мл плазмы крови, а в контрольную – 0,01 мл дистиллированной воды. После перемешивания пробы инкубировали в течение 10 минут в темноте (температура комнатная). После инкубации проводили остановку реакции при добавлении к пробам 1 мл раствора молибдата аммония.

Для определения активности фермента проводили измерение экстинкции опытной и контрольной проб против воды на спектрофотометре при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 1,0 см.

Коэффициент экстинкции перекиси водорода, применяемый для расчёта каталазной активности, равен  $22,2 * 10^3 \text{ mM}^{-1} * \text{см}^{-1}$ . Выражается в мкмоль разрушенной  $\text{H}_2\text{O}_2$  за мин на литр плазмы крови, или в нмоль\*мин/г Нв [36].

Расчет активности каталазы осуществляли по формуле:

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

где:

$E_x$  – оптическая плотность контрольной пробы;

$E_0$  – оптическая плотность опытной пробы;

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

$F$  – фактор разведения (50);

$v$  – количество плазмы (0,01 мл);

$t$  – время (10 мин);

$\varepsilon$  – коэффициент экстинкции перекиси водорода ( $22,2 * 10^3 \text{ mM}^{-1} * \text{см}^{-1}$ )

$d$  – длина оптического пути (1,0 см)

$1000/\text{Hb}$  – коэффициент пересчета на г Нв, не используется при расчёте на л плазмы.

## 2.4 Определение активности супероксиддисмутазы

Принцип метода по определению активности СОД основан на ингибировании реакции аутоокисления адреналина в присутствии СОД в щелочной среде вследствие дисмутации супероксидных анион-радикалов, являющихся продуктом одного из этапов [21].

Реактивы:

1. этанол-хлороформная смесь (2:1).
2. 0,2 М бикарбонатный буфер, рН11.
3. 5,46 мМ раствор адреналина (0,1% аптечный раствор).

Приготовление бикарбонатного буфера: 2,12 г  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,168 г  $\text{NaHCO}_3$ , 0,074 г ЭДТА, растворяли в дистиллированной воде (до отметки 200 мл); рН доводили до нужного значения добавлением  $\text{NaOH}$  (конц).

Ход определения:

В пробирку вносили 50 мкл плазмы и 450 мкл дистиллированной воды, охлажденной до  $0^\circ\text{C}$ . Добавляли 250 мкл этанол- хлороформной смеси, устраняющей мешающее влияние  $\text{Hb}$ . Далее перемешивали пробы и оставляли инкубироваться при комнатной температуре 10 мин. Полученную суспензию перемешивали и центрифугировали 10 мин при 6000g. Для определения СОД использовали супернатант.

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

Таблица 3 – Порядок внесения реагентов в пробу, мл

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

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

Для расчета активности СОД был использован показатель величины поглощения контрольной и опытной проб. Активность СОД выражают в усл. ед.\* мин/л, либо в усл. ед.\* мин/гНб.

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

где:

$\frac{E_x - E_0}{E_x} * \frac{100\%}{50}$  – единица активности, 50% ингибирование реакции окисления адреналина;

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

F – фактор разведения (15);

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

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

1000/Нб – коэффициент пересчета на г Нб, не используется при расчёте на л плазмы.

## 2.5 Определение содержания церулоплазмينا

Модифицированный метод Ревина основан на участии церулоплазмينا (ЦП) в окислении р-фенилендиамина [21]

Реактивы:

1. 0,4 М ацетатный буфер (рН 5,5) приготовленный путем смешивания растворов 1 и 2 (в соотношении 9:1): 1-й раствор – 54,44 г ацетата натрия помещали в мерную колбу на 1 л и доводили дистиллированной водой до метки, и 2-й раствор – 22,6 мл ледяной уксусной кислоты растворяли и доводили до метки 1 л дистиллированной воды.

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

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

Ход определения:

В пробирки поочередно добавляли по 8 мл ацетатного буфера и 0,1 мл плазмы. К контрольным пробам вносили 2 мл раствора фтористого натрия (с целью инактивировать ферментативную активность церулоплазмينا), опытные оставляли без изменений. Следующим этапом в обе пробирки вносили по 1 мл раствора солянокислого р-фенилендиамина. Пробирки встряхивали, помещали в термостат и подвергали инкубированию в течение часа при температуре 37°C. По завершению этого времени во все пробирки (за исключением контрольной) вносили по 2 мл раствора фтористого натрия. Содержимое пробирок вновь перемешивали и отправляли в холодильник на 30 мин. Колориметрирование проб производилось против контроля с бледно-розовой окраской в кюветах с толщиной слоя 1,0 см при длине волны 530 нм.

Расчет концентрации ЦП в мг/л производили умножение значения оптической плотности на коэффициент пересчета 875:

$$\text{ЦП (мг/л)} = D \cdot 875, \text{ где:}$$

D – оптическая плотность анализируемого образца.

## **2.6 Определение содержания аскорбиновой кислоты**

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

Принцип метода основан на образовании окрашенных в красный цвет азазонов при взаимодействии ДАК и ДКГК с 2,4-динитрофенилгидразином в серной кислоте, используемой для фотометрического определения. Чтобы было возможным вычислить суммы всех кислот их окисляют 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия. Содержание АК определяют по разности между суммой всех окисленных форм аскорбиновой кислоты и содержанием ДАК и ДКГК [21].

Реактивы:

1. 5% - ный раствор ТХУ.

2. 85%- ный раствор  $H_2SO_4$ .

3. 0,9% - ный раствор NaCl

4. 9 н  $H_2SO_4$

5. 2%-ный раствор 2,4-динитрофенилгидразина (2,4-ДФГ) – в который входит 0,5 г 2,4-ДФГ, 0,0625 г тиомочивины, навески растворить в 25 мл 9 н  $H_2SO_4$ .

6. 0,001 н раствора 2,6-ДХФФН (2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия или краска Тильманса).

7. Стандартный раствор аскорбиновой кислоты. Навеску аскорбиновой кислоты 200 мг растворяют в 10 мл 5%-ной ТХУ (основной стандартный раствор). Для приготовления рабочего стандартного раствора аскорбиновой кислоты (2 мг%-ный) к 0,005 мл основного раствора приливают 4,995 мл 5%-ной ТХУ.

Ход определения:

В две пробирки вносили по 0,25 мл плазмы, 0,75 мл 0,9%-ного NaCl и 1 мл 5%-ной ТХУ. Содержимое пробирок перемешивали, затем центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Далее, в две чистые пробирки вносили по 1 мл супернатанта. В одну из пробирок с супернатантом по каплям добавляли 0,001 н раствор 2,6-ДХФФН до появления слабо-розового окрашивания, устойчивого в течение 30 с. Затем в каждую пробирку вносили по 0,25 мл 2%-ного раствора 2,4-ДФГ. Пробы инкубировали в течение 10 мин при температуре 100°C. Затем помещали пробирки в ледяную баню и добавляли по 1,25 мл 85%-ного раствора  $H_2SO_4$ .

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

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

При отсутствии воздействия прямого солнечного света окраска проб после инкубации стабильна не менее 30 минут.

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

$$C = \frac{E_1 \cdot 2}{E_2}, \text{ где}$$

$C$  – концентрация кислот, мг%;

2 – концентрация стандартного раствора аскорбиновой кислоты, мг%;

$E_1$  - оптическая плотность опытной пробы;

$E_2$  – оптическая плотность стандартного раствора аскорбата.

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

$C_{\text{мкмоль/л}}$  – концентрации кислот, мкмоль/л;

$C_{\text{мг\%}}$  - концентрация кислот, мг%;

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

176 – молекулярная масса аскорбата (г/моль).

## 2.7 Определение содержания мочевой кислоты

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

Суть метода заключается в том, что мочевая кислота, содержащаяся в пробе, окисляется под действием фермента уриказы с образованием перекиси водорода, окисляющей хромогены в присутствии пероксидазы. В ходе такой реакции образуется окрашенный продукт, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации мочевой кислоты в пробе [21].

Реактивы:

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

Ход определения:

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

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

Расчетная формула:

$$C = \frac{E_{on}}{E_k} \cdot 357 \text{ мкмоль / л, где}$$

C – концентрация мочева кислоты в мкмоль/л;

$E_{on}$  – оптическая плотность опытной пробы;

$E_k$  – оптическая плотность калибратора;

357 мкмоль/л – концентрация мочева кислоты в калибраторе.

## 2.8 Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка полученных результатов производилась при помощи таких программ, как Statistica 8 и Microsoft Office Excel 365.

Обработку данных проводили с помощью подсчета медианы и интервального разброса (С25-С75 процентели). Достоверность различия оценивалась по критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).



### **3. Результаты исследования и их 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 малонового диальдегида в плазме крови больных диффузным токсическим зобом достоверно превышает контрольный показатель, что свидетельствует об интенсивно протекающих процессах липопероксидации.

2) Установлено, что активность антиоксидантных ферментов в плазме больных ДТЗ изменяется разнонаправлено: супероксиддисмутаза и каталаза снижается, фероксидазная активность церулоплазмينا повышается по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе.

3) Уровень низкомолекулярных антиоксидантов значительно повышен в плазме крови больных ДТЗ, что, по-видимому, служит компенсаторной реакцией в ответ на снижение активности ферментативных антиоксидантов.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 2,4-ДНФГ – 2,4-динитрофенилгидразин  
8-OHdG – 8-окси-2 -дезоксигуанозин  
АК – аскорбиновая кислота  
АОС – антиоксидантная система  
АТ-рТТГ – рецептор тиреотропного гормона  
АФК – активные формы кислорода  
ГП – глутатионпероксидаза  
ДАК – дегидроаскорбиновая кислота  
ДКТК – дикетоглулоновая кислота  
ДТЗ – диффузный токсический зоб  
ИЛ – интерлейкин  
КАТ – каталаза  
МДА – малоновый диальдегид  
МК – мочевая кислота  
НАДФН– никотинамидадениндинуклеотидфосфат  
ОБ – общий белок  
ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты  
ПОЛ – перекисное окисление липидов  
СОД – супероксиддисмутаза  
СОР – супероксидредуктаза  
ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота  
ТТГ – тиреотропный гормон  
ТХУ – трихлоруксусная кислота  
ФНО – фактор некроза опухолей  
ЦП – церулоплазмин  
ЩЖ – щитовидная железа  
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Агаева, А. Р. Хирургическое лечение диффузно-токсического зоба / А. Р. Агаева, С. Ю. Юсифов, Р. А. Агаев, Н. А. Агаева // Онкология - XXI век. – 2017. – С. 9-11.
2. Арсланбекова, А. Ч. Диффузный токсический зоб / А. Ч. Арсланбекова // Экологическая эндокринология. – 2017. – С. 5-15.
3. Белова, С.В. Церулоплазмин – структура, физико-химические и функциональные свойства / С.В. Белова, Е.В. Крякина // Успехи современной биологии. – 2010. – Т.130, № 2. – С.180–189.
4. Вавилова, Т.П. Роль церулоплазмينا при развитии неопластических процессов / Т.П. Вавилова и [др.] // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, вып. 3. – С. 263–275.
5. Ващенко, В. И. Церулоплазмин – от метаболита до лекарственного средства / В. И. Ващенко, Т. Н. Ващенко // Психофармакология и биологическая наркология. – 2006. – Т. 6, № 3. – С. 1254–1269.
6. Галунска, Б. Двумликий янус биохимии: мочева я кислота- оксидант или антиоксидант? / Б. Галунска, Д. Паскалев // Нефрология. – 2004. – Т.8, №4. –С.25-30.
7. Дора, С. В. Апоптоз и пролиферация тиреоцитов как предикторы послеоперационных исходов у пациентов, прооперированных по поводу диффузного токсического зоба / С. В. Дора, М. Г. Рыбакова, Д. А. Алексеев, Ю. С. Крылова, А. Р. Волкова, Л. А. Белякова, Е. В. Волкова // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2017. - № 2. – С. 86-91.
8. Жуков, В. И. Система перекисного окисления липидов и активность апоптоза при экспериментальном хроническом гастроэнтероколите / В. И. Жуков, А. С. Ткаченко // Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. – 2013. - № 18 (161). – Вып. 23. – С. 138- 141.
9. Каде, А. Х. Разработка модели диффузного токсического зоба в эксперименте у самцов крыс / А. Х. Каде, С. А. Занин, И. Ю. Вавринюк, Д. А.

Губайдуллин, А. И. Трофименко // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2019. - № 3. – С. 99-101. doi: 10.19163/1994-9480-2019-3(71)-99-101

10. Кеца, О.В. Перекисное окисление липидов митохондриальной фракции сердца крыс в условиях различного обеспечения полиненасыщенными жирными кислотами / О.В. Кеца, И.А. Шмарakov, М.М. Марченко // Биомедицинская Химия. – 2016 Т.62, № 1 – 50-55 с.

11. Кулинский, В. И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В. И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 2–7.

12. Курбонов, С. Комплексное изменение структуры щитовидной железы при диффузном токсическом зобе / С. Курбонов, М. К. Гулов, И. А. Давлатов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2018. - № 9. – С. 46-49.

13. Курбонов, С. Патоморфологические изменения в щитовидной железе при диффузном токсическом зобе / С. Курбонов, М. К. Гулов, И. А. Давлатов, Э. Х. Тагайкулов // Вестник Авиценны. – 2017. – Т. 19. - № 3. – С. 320-324.

14. Ланкин, В. З. Итоги изучения патофизиологических последствий нарушения регуляции свободнорадикальных процессов: тупик или новый импульс? / В. З. Ланкин, А. К. Тихазе // Медицина и здравоохранение. – 2016. – Т.1. – №3(109). С. – 160 –165.

15. Меньщикова, Е. Б. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков // Фирма «Слова». – М, 2006. – 556 с.

16. Новиков, В. Е. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция / В. Е. Новиков, О. С. Левченкова, Е. В. Пожилова // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. –Т. 12. - С. 13– 34

17. 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. С. 13-21.
18. Путилина, Ф.Е. Свободнорадикальное окисление: учеб. пособие / Ф. Е. Путилина, О. В. Галкина, Н. Д. Ещенко, Г.П. Диге, И. Е. Красовская; под ред. д-ра биол. наук Н. Д. Ещенко. – СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2008. – 161 с.
19. Стяжкина, С. Н. Анализ клинического случая диффузного токсического зоба / С. Н. Стяжкина, Е. Т. Колесникова, А. Н. Люкина // Авиценна. – 2018. - № 18. – С. 91-92.
20. Тимирханова Г. А., Абдуллина Г. М., Кулагина И. Г. Витамин С: классические представления и новые факты о механизмах биологического действия/ Г. А. Тимирханова, Г. М. Абдуллина и др. // Вятский медицинский вестник. - 2007. – №4. – С. 158-160
21. Титова, Н. М. Оценка структурно-функционального состояния клетки//Замай, Т. Н., Субботина, Т. Н., Савченко, А. А.// Методические указания к практическим занятиям // Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – 60 с.
22. Узбеков, М. Г. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психиатрических заболеваниях Сообщение II / М. Г. Узбеков // Социальная и клиническая психиатрия. – 2014. – Т. 24, - № 4. – С. 97–103.
23. Фролова, А. В. Значение цитокинового ответа в развитии поражения сердечно-сосудистой системы при диффузном токсическом зобе / А. В. Фролова, М. М. Орлова, Т. И. Родионова // Научный диалог: вопросы медицины. – 2017. – С. 27-31.
24. Чебышев, Н. В. Инфекционные и паразитарные болезни развивающихся стран / Н. В. Чебышев, С. Г Пак // ГЭОТАР-Медиа. – М, 2007. – 496 с.
25. Чернышова, В. С. Особенности клинической картины диффузного токсического зоба у детей воронежской области / В. С. Чернышова, Т. Г.

Стольников, О. В. Евтухова, Е. Н. Кулакова // Медицина: теория и практика. – 2019. – Т. 4. - № 5. – С. 601.

26. Чернядьев, А. С. Осложненный колоректальный рак: анализ современного состояния проблемы / А. С. Чернядьев, А. А. Засорин, К. И. Максимова // Уральский медицинский журнал. – 2016. - № 7. – С. 156-160.

27. André-Lévigne, D. Reactive Oxygen Species and NOX Enzymes Are Emerging as Key Players in Cutaneous Wound Repair / D. André-Lévigne, A. Modarressi, M. S. Pepper, B. Pittet-Cuénod // International Journal of Molecular Sciences. – 2017, par. 18(10): 2149, pp. 1-28.

28. Arenas de Larriva, A. Circulating Ceruloplasmin, Ceruloplasmin-Associated Genes, and the Incidence of Atrial Fibrillation in the Atherosclerosis Risk in Communities Study / A. P. Arenas de Larriva, F. L. Norby, L. Y. Chen, E. Z. Soliman, R. C. Hoogeveen, D. E. Arking, L. R. Loehr, A. Alonso // International Journal of Cardiology. – 2017, vol. 241, a.n 223-228. doi: 10.1016/j.ijcard.2017.04.005.

29. Bednarek, J. Oxidative Stress Peripheral Parameters in Graves' Disease: The Effect of Methimazole Treatment in Patients With and Without Infiltrative Ophthalmopathy / J. Bednaker, H. Wysocki, J. Sowinski // Clinical Biochemistry. – 2005, vol. 38, a.n 13-18. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.09.015.

30. Carr, A. Vitamin C and Immune Function / A. C. Carr, S. Maggini // Nutrients. – 2017, vol. 9, p. 1211. doi: 10.3390/nu9111211.

31. Casaril, A. Selenium-containing indolyl compounds: Kinetics of reaction with inflammation-associated oxidants and protective effect against oxidation of extracellular matrix proteins / A. M. Casaril, M. T. Ignasiak, C. Y. Chuang, B. Vieira, N. B. Padilha, L. Carroll, E. J. Lenardão, L. Savegnago, M. J. Davies // Free Radical Biology & Medicine. – 2017, vol. 113, pp. 395-405.

32. Crotty, G. Targeting Urate to Reduce Oxidative Stress in Parkinson Disease / G. F. Crotty, A. Ascherio, M. A. Schwarzschild // Experimental Neurology. – 2017, vol. 298, a.n 210-224. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.06.017.

33. Diana, T. Stimulatory TSH-Receptor Antibodies and Oxidative Stress in Graves Disease / T. Diana, A. Daiber, M. Oelze, S. Neumann, P. D. Olivo, M. Kanitz, P. Stamm, G. J. Kahaly // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2018, vol. 103, a.n 3668-3677. doi: 10.1210/jc.2018-00509.
34. Du, J. Ascorbic Acid: Chemistry, Biology and the Treatment of Cancer / J. Du, J. J. Cullen, G. R. Buettner // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012, vol. 1826, a.n 443-457. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.06.003.
35. Erdamar, H. The Effect of Hypothyroidism, Hyperthyroidism, and Their Treatment on Parameters of Oxidative Stress and Antioxidant Status / H. Erdamar, H. Demirci, H. Yaman, M.K. Erbil, T. Yakar, B. Sancak, S. Elbeg, G. Biberoglu, I. Yetkin // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. – 2008, vol. 46, a.n 1004-1010. doi: 10.1515/CCLM.2008.183.
36. Frijhoff, J. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress / J. Frijhoff, P. G. Winyard, N. Zarkovic, S. S. Davies, R. Stocker, D. Cheng, A. R. Knight, E. L. Taylor, J. Oettrich, T. Ruskovska, A. C. Gasparovic, A. Cuadrado, D. Weber, H. E. Poulsen, T. Grune, H. H. Schmidt, P. Ghezzi // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2015, vol. 23, a.n 1144-1170. doi: 10.1089/ars.2015.6317.
37. Gargouri, B. Oxidative Stress Enhances the Immune Response to Oxidatively Modified Catalase Enzyme in Patients With Graves' Disease / B. Gargouri, M. Mseddi, F. Mnif, M. Abid, H. Attia, S. Lassoued // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. – 2020, vol. 34. doi: 10.1002/jcla.23051.
38. Holzerová, E. Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production? / E. Holzerová, H. Prokisch // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2015, par. 64, pp. 16-20.
39. Imam, M. Antioxidants Mediate Both Iron Homeostasis and Oxidative Stress / M. U. Imam, S. Zhang, J. Ma, H. Wang, F. Wang // *Nutrients*. – 2017, vol. 9, p. 671. doi: 10.3390/nu9070671.
40. Kim, Y. ROS-induced ROS Release Orchestrated by Nox4, Nox2, and Mitochondria in VEGF Signaling and Angiogenesis / Y. Kim, S. Kim, R. Tatsunami,



H. Yamamura, T. Fukai, M. Ushio-Fukai // *The American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2017, vol. 312, a.n 749-764. doi: 10.1152/ajpcell.00346.2016.

41. Kodydková, J. Human Catalase, Its Polymorphisms, Regulation and Changes of Its Activity in Different Diseases / J. Kodydková, L. Vávrová, M. Kocík, A. Žák // *Folia biologica*. – 2014, vol. 60, a.n 153-167.

42. Mahaseth, T. Potentiation of Hydrogen Peroxide Toxicity: From Catalase Inhibition to Stable DNA-iron Complexes / T. Mahaseth, A. Kuzminov // *Mutation Research*. – 2017, vol. 773, a.n 274-281. doi: 10.1016/j.mrrev.2016.08.006.

43. Maiuolo, J. Regulation of Uric Acid Metabolism and Excretion / J. Maiuolo, F. Oppedisano, S. Gratteri, C. Muscoli, V. Mollace // *International Journal of Cardiology*. – 2016, vol. 213, a.n 8-14. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.08.109.

44. Marcocci, C. Oxidative Stress in Graves' Disease / C. Marcocci, M. Leo, M. A. Altea // *The European Thyroid Journal*. – 2012, vol. 1, a.n 80-87. doi: 10.1159/000337976.

45. Marik, P. Hydrocortisone, Ascorbic Acid and Thiamine (HAT Therapy) for the Treatment of Sepsis. Focus on Ascorbic Acid / P. E. Marik // *Nutrients*. – 2018, vol. 10, p. 1762. doi: 10.3390/nu10111762.

46. Mayer, L. Antioxidants in Patients With Hyperthyroidism / L. Mayer, Z. Romić, F. Skreb, V. Bacić-vrca, I. Cepelak, T. Zanić-grubisić, M. Kirin // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. – 2004, vol. 42, a.n 154-158. doi: 10.1515/CCLM.2004.028

47. Miao, L. Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Disease / L. Miao, D.K. Clair // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2009, vol. 47, a.n 344-356. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018.

48. Mseddi, M. Proteins Oxidation and Autoantibodies' Reactivity Against Hydrogen Peroxide and Malondialdehyde -Oxidized Thyroid Antigens in Patients' Plasmas With Graves' Disease and Hashimoto Thyroiditis / M. Mseddi, R. B. Mansour, B. Gargouri, F. Mnif, S. E. Ghawi, B. Hammami, A.Ghorbel, M. Abid, S.

Lassoued // *Chemico-Biological Interactions*. – 2017, vol. 272, a.n 145-152. doi: 10.1016/j.cbi.2017.04.013.

49. Nandi, A. Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases / A. Nandi, L. Yan, C. K. Jana, N. Das // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2019. doi: 10.1155/2019/9613090.

50. Pizzino, G. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health / G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, G. Pallio, F. Mannino, V. Arcoraci, F. Squadrito, D. Altavilla, A. Bitto // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2017. doi: 10.1155/2017/8416763.

51. Ramos, D. Mechanism of Copper Uptake From Blood Plasma Ceruloplasmin by Mammalian Cells / D. Ramos, D. Mar, M. Ishida, R. Vargas, M. Gaite, A. Montgomery, M. C. Linder // *PLOS One*. – 2016, vol. 11. doi: 10.1371/journal.pone.0149516.

52. Ribeiro, T. P. Iron, copper, and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress/ T. P. Ribeiro [et al.]// *Free Radical Biology and Medicine*. – 2015. – V. 80. – p. 67-76.

53. Roumeliotis, S. Dietary Antioxidant Supplements and Uric Acid in Chronic Kidney Disease: A Review / S. Roumeliotis, A. Roumeliotis, E. Dounousi, T. Eleftheriadis, V. Liakopoulos // *Nutrients*. – 2019, vol. 11, p. 1911. doi: 10.3390/nu11081911.

54. Scaglione, C. Direct Measurement of Catalase Activity in Living Cells and Tissue Biopsies / C. Scaglione, Q. Xu, V. K. Ramanujan // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2016, vol. 470, a.n 192-196. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.026.

55. Sheng, Y. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases / Y. Sheng, I. A. Abreu, D. E. Cabelli, M. J. Maroney, A. Miller, M. Teixeira, J. S. Valentine // *Chemical Reviews*. – 2014, vol. 114, a.n 3854-3918. doi: 10.1021/cr4005296.


56. Tisato, V. TRAIL and Ceruloplasmin Inverse Correlation as a Representative Crosstalk Between Inflammation and Oxidative Stress / V. Tisato, S. Gallo, E. Melloni, C. Celeghini, A. Passaro, G. Zauli, P. Secchiero, C. Bergamini, A. Trentini, G. Bonaccorsi, G. Valacchi, G. Zuliani, C. Cervellati // *Mediators of Inflammation*. – 2018. doi: 10.1155/2018/9629537.
57. Tsai, C-C. Increased Oxidative DNA Damage, Lipid Peroxidation, and Reactive Oxygen Species in Cultured Orbital Fibroblasts From Patients With Graves' Ophthalmopathy: Evidence That Oxidative Stress Has a Role in This Disorder / C-C. Tsai, S-B. Wu, C-Y. Cheng, S-C. Kao, H-C. Kau, S-H. Chiou, W-M. Hsu, Y-H. Wei // *Eye*. – 2010, vol. 24, a.n 1520-1525. doi: 10.1038/eye.2010.31.
58. Wang, Q. Iron Together With Lipid Downregulates Protein Levels of Ceruloplasmin in Macrophages Associated With Rapid Foam Cell Formation / Q. Wang, J. J. Shuangying Hao, M. Zhang, K. Li, T. Qiao // *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. – 2016, vol. 23, a.n 1201-1211. doi: 10.5551/jat.32292.
59. Wang, Y. Superoxide Dismutases: Dual Roles in Controlling ROS Damage and Regulating ROS Signaling / Y. Wang, R. Branicky, A. Noë, S. Hekimi // *Journal of Cell Biology*. – 2018, vol. 217, a.n 1915-1928. doi: 10.1083/jcb.201708007.
60. Wen, J. Manganese Superoxide Dismutase Deficiency Exacerbates the Mitochondrial ROS Production and Oxidative Damage in Chagas Disease / J. J. Wen, N. J. Garg // *PLOS Neglected Tropical Diseases*. – 2018, vol. 12. doi: 10.1371/journal.pntd.0006687.
61. Wert, K. Extracellular Superoxide Dismutase (SOD3) Regulates Oxidative Stress at the Vitreoretinal Interface / K. J. Wert, G. Velez, M. Cross, B. A. Wagner, M. L. Teoh-fitzgerald, G. R. Buettner, J. J. Mcanany, A. Olivier, S. H. Tsang, M. M. Harper, F. E. Domann, A. G. Bassuk, V. B. Mahajan // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2018, vol. 124, a.n 408-419. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.024.

62. Zarković, M. The Role of Oxidative Stress on the Pathogenesis of Graves' Disease / M. Zarković // Journal of Thyroid Research. – 2012. doi: 10.1155/2012/302537.

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 » июля 2020 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Биохимические маркеры оксидативного стресса при диффузном  
токсическом зобе

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

Выпускник  30.06.2020 А. А. Тимофеева

Красноярск 2020