Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Е.И.Шишацкая
«22» июня 2016 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА
06.03.01 Биология
Оценка антиоксидантного статуса крови больных диффузно-токсическим зобом

Руководитель _____ 22.06.2016 проф., канд.биол.наук Н.М. Титова

Выпускник _____ 22.06.2016 О.И. Бартицкая

Красноярск 2016

Содержание

ВВЕДЕНИЕ..... 3
1 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ 5
1.1 Свободные радикалы: характеристика, источники образования, биологические эффекты..... 5
1.4 Антиоксидантная система 7
1.5 Щитовидная железа. Строение и функции..... 17
1.6 Диффузный токсический зоб 19
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... 23
2.1 Объект исследования 23
2.2 Определение гемоглобина..... 23
2.3 Определение содержания восстановленного глутатиона 24
2.4 Определение содержания окисленного глутатиона 26
2.5 Раздельное определение восстановленной и окисленных форм аскорбиновой кислоты в эритроцитах 27
2.6 Статистическая обработка результатов 29
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 30
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 31
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 32

ВВЕДЕНИЕ

Одними из самых распространенных эндокринных патологий в настоящее время по праву считаются заболевания щитовидной железы. Диффузный токсический зоб — аутоиммунное заболевание, связанное с избыточной секрецией тиреоидных гормонов щитовидной железой. Широкая распространенность ДТЗ, поражающего до 2—5% популяции, а также сопряженные с ним многочисленные поражения практически всех органов и систем обусловливают медико-социальную значимость этого заболевания [1].

Основные биологические функции щитовидной железы - это участие в углеводном и основном обменах. Поэтому нарушения в нормальном функционировании железы сказывается на работе как отдельного органа и системы, так и на жизнедеятельности всего организма [2].

Гормоны щитовидной железы поддерживают нормальное развитие организма, регулируют основные процессы жизнедеятельности, связанные с обменом веществ. Точной приложения гормонов ЩЖ являются митохондрии, при сбое в работе которых происходит интенсификация процесса образования АФК [2]. В связи с этим, оптимизация работы щитовидной железы является непременным условием успеха комплексной терапии различных патологических состояний [3].

В ряде исследований продемонстрировано влияние изменений функциональной активности ЩЖ на изменение анти/прооксидантного статуса. Вместе с тем данные литературы о влиянии тиреоидных гормонов на интенсивность окислительных процессов достаточно противоречивы [4]. В ряде работ указывается на интенсификацию процессов ПОЛ в условиях гипертиреоза [1]. Другие исследователи утверждают, что часто тиреотоксикоз не сопровождается накопление метаболитов ПОЛ [4]

Актуальность настоящей работы состоит в том, что до сих пор нет четкого представления о состоянии антиоксидантной системы при

заболеваниях щитовидной железы, в частности диффузном токсическом зобе. Данные, свидетельствующие о нарушении функционирования работы антиоксидантной системы при патологиях щитовидной железы противоречивы и неоднозначны.

Целью данной работы явилось исследование уровня низкомолекулярных компонентов системы антиоксидантной защиты – восстановленной и окисленной форм глутатиона и аскорбиновой кислоты при диффузном токсическом зобе.

В задачи входило:

1. Исследование содержания восстановленных и окисленных форм глутатиона и аскорбиновой кислоты в эритроцитах условно здоровых женщин.

2. Анализ содержания восстановленных и окисленных форм глутатиона и аскорбиновой кислоты в эритроцитах женщин с диффузным токсическим зобом.

Данная работа была выполнена на базе кафедры медицинской биологии ИФБиБТ СФУ, гормональной лаборатории Красноярской краевой больницы № 1, Красноярской краевой станции переливания крови и является частью исследований механизмов развития процессов свободнорадикального окисления при патологиях щитовидной железы.

1 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1.1 Свободные радикалы: характеристика, источники образования, биологические эффекты

Вся жизнь человека непосредственно связана с кислородом. Он является той незаменимой частью, без которой наше существование не возможно.

Молекулярный кислород участвует почти во всех процесса организма как в свободном состоянии, так и в составе сложных молекул: липидах, белках, углевода. В основном состоянии молекула кислорода спонтанно не реагирует с другими молекулами, однако многие процессы с участие кислорода сопровождаются образование высокореакционных форм кислорода – АФК [5,6].

Активные формы кислорода (АФК, реактивные формы кислорода) – ионы кислорода, свободные радикалы и перекиси как неорганического, так и органического происхождения, которые имеют на внешней оболочке неспаренный электрон [5]. АФК выполняют в организме регуляторные и имунные функций, но при чрезмерном образовании в ходе интенсификации свободно радикального окисления (СРО) могут действовать цитотоксически на многие биологически важные соединения: аминокислоты, белки, нуклеиновые кислоты. Свободные радикалы могут инициировать перекисное окисление липидов, играющих существенную роль во многих реакциях обмена, формировании структуры клетки и, в частности, мембран [6].

Существуют три категории АФК: первичные, вторичные и третичные.

Первичные АФК синтезируются при окислении ряда молекул и обладают регуляторным или антимикробным действием. К ним относят оксид азота NO, супероксид O_2^-. В результате некоторых процессов, в том числе с участием супероксида, в организме могут образовываться такие активные соединения как пероксид водородам H_2O_2, гипохлорит HOCl и гидроперекиси липидов. При взаимодействии этих веществ с ионами

металлов переменной валентности могут образовываться вторичные свободные радикалы. Например, гидроксильный радикал $HO^{\bullet}$ или радикалы липидов (HO2(-)) может способствовать разушению клеточных структур. Считается, что именно образование вторичных радикалов является неспецифическим универсальным механизмом, который лежит в основе развития канцерогенеза, атеросклероза, хронических воспалений и других заболеваний [7].

При взаимодействии вторичных радикалов с молекулами антиоксидантов и других легко окисляющихся соединений образуются третичные радикалы. Их роль может быть различной [8].

Источником АФК в организме могут быть активированные макрофаги, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы и другие клетки в ходе так называемого «респираторного взрыва».

Главным производителем АФК в клетках являются митохондрии. Обычно примерно 97% всего кислорода, поступающего в клетки, используется для окисления субстратов с образованием АТФ и выделением тепла, и лишь 3% используется в реакциях образования АФК [9], которое может значительно возрастать при чрезмерном поступлении кислорода в клетки или нарушении работы электронно–транспортной цепи митохондрий.

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

Основные механизмы образования АФК в организме связаны с нарушениями функционирования электронтранспортных цепей митохондрий или макросом, а также с модификациями свойств дегидрогеназ.

АФК могут проявлять выраженное цитотоксическое действие на клетки. Они обычно появляются первыми в цепи реакций свободнорадикального окисления и дают начало серии более агрессивных радикалов, инициируя перекисное окисление липидов (далее – ПОЛ), что

ведет к накоплению пероксидных радикалов, моно- и димерных, циклических и полимерных перекисей и гидроперекисей. Конечными метаболитами ПОЛ являются альдегиды, кетоны и предельные углеводороды [10]. Многие метаболиты ПОЛ способны оказывать пагубное действие на клетки. В частности, ненасыщенные альдегиды являются мутагенами и обладают выраженной цитотоксичностью: ингибируют активность гликолиза и окислительного фосфорилирования, подавляют синтез белка и нуклеиновых кислот, окисляют SH-группы, ингибируют различные цитозольные и мембраносвязывающие ферменты.

Одним из основных эффектов АФК является деструкцию жирных кислот, являющихся основными компонентами клеточных мембран. В итоге таких реакций происходит усилении проницаемости каналов в клеточной стенке, что дезорганизует жизнедеятельность клетки и приводит к ее гибели. Повреждение свободными радикалами белковых структур и молекул ДНК делает возможным развитие многих патологических состояний [11].

Мутагенное воздействие АФК может быть причиной злокачественного перерождения клеток или их апоптозной гибели. Известно, что мишенями для свободных радикалов могут быть почти все органы и системы организма.

Борьбой с постоянно образующимися в организме АФК занимается антиоксидантная система. Она препятствует подверженному действию активных форм кислорода, а так же поддерживает концентрации активных форм кислорода на постоянном уровне, для нормальной работы всех структур клетки

1.4 Антиоксидантная система

Антиоксидантная система (АОС) является одним из показателей изменений в организме. При аккумулировании активных форм кислорода или сбое в работе АОС усиливаются процессы перекисного окисления липидов, окислительной модификации белков и нуклеиновых кислот, что

критически сказывается как на состоянии самой клетки, так и на состоянии всего организма.

По химической природе антиоксиданты представляют широкий красс соединений: ферменты (СОД, каталаза, ГПО), фенолы и полифенолы (токоферолы, пирокатехин, и др.), флаваноиды, стероидные гормоны и многие другие соединения. В зависимости от растворимости различают жирорастворимые и водорастворимые антиоксиданты. По молекулярной массе выделяют группу высокомолекулярных АО, не способных проникать через биологические барьеры и низкомолекулярные (глутатион, аскорбат, мочевая кислота, α- токоферолы).

По мнению большинства исследователе АОС прийто делить на ферментативную и неферментативную.

1.4.1 Ферментативная антиоксидантная система

Функция антиоксидантных ферментов в организме заключается в поддержании постоянной концентраций кислородсодержащих радикалов. К антиоксидантным ферментам относят: супероксиддисмутазу, каталазу, глутатионпероксидазу, глутатионтрансферазу.

Исключительно важным моментом эффективности ферментативного звена АОС является сбалансированность активности супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы. Ингибирование активности одного из ферментов может привести к излишнему накоплению АФК и размушению клеток. При различных патологических состояниях концентрация и активность ферментов АОС может меняться в различных направлениях.

1.4.2 Неферментативная антиоксидантная система

Данная система включает естественные АО: жирорастворимые - витамин Е, β-каротин, убихиноны [15,16] и водорастворимые - аскорбат, рутин, глутатион [15, 16, 17, 18] значительно ингибирующие окисление

субстрата. Главным субстратом в эритроцитах служат жирные ненасыщенные кислоты клеточных мембран [12].

В отличие от специализированных ферментов низкомолекулярные вещества, способные снижать интенсивность свободнорадикальных процессов, осуществляют другие метаболические функции. В основном это относится к группе низкомолекулярных водорастворимых антиоксидантов. Известны многочисленные биохимические процессы, протекающие с участием глутатиона, аскорбата, аминокислот, напрямую не связанные с их антиоксидантными свойствами. Тканевой уровень низкомолекулярных АО складывается из соотношения активности ферментных систем их образования и метаболических превращений, транспорта и выведения из организма (мочевина, урат) [13].

Большинству низкомолекулярных антиоксидантов характерна прямая зависимость между их концентрацией и степенью ингибирования свободнорадикальных процессов. Прогрессивное увеличение тканевой концентрации веществ с выраженными антиоксидантными свойствами в конкретных условиях может способствовать активации побочных реакций с синтезом токсичных метаболитов, прооксидантов и даже АФК. Можно считать, что совокупность низкомолекулярных водорастворимых соединений этого типа регулирует интенсивность свободнорадикальных процессов в тканях и способствует их участию в других метаболических путях [13].

1.4.2.1 Глутатион

Глутатион – трипептид, L-γ-глутамил-L-цистеинил-глицин, главный низкомолекулярный тиол АОС в эритроцитах. Существует две формы глутатиона: восстановленная (GSH) и окисленная (GSSG). Участие GSH в реакциях вероятна благодаря присутствию тиоловой группы остатка цистеина, которая служит донором протонов [20,21].

Синтез глутатиона происходит в эритроцитах. Основными структурными компонентами служат: глутаминовая кислота, цистин и глицин. Синтез осуществляется в несколько стадий, каждая из которых катализируется специфическим ферментом и требует присутствия ионов Mg^{2+} и АТФ [14].

1)L- Глу + L- Цис + АТФ - Mg^{2+}- E_1--→АДФ + H_3PO_4 + +γ-L- Глу -L- Цис;
2)γ-L- Глу -L- Цис + Гли + АТФ - Mg^{2+}- E_2--→АДФ + H_3PO_4 + γ-L- Глу -L- Цис - Гли.

E_1 – γ-глутамилцистеин синтетаза;
E_2 – глутатионсинтетаза (лимитирующий фермент).

ГSH имеет специфическую пептидную связь, образованную γ-COOH группой глутаминовой кислоты и NH_2-группой цистеина, и поэтому не является субстратом для активности внутриклеточных пептидаз [15]. Единственным ферментом, расщепляющим ГSH, является γ-глутамилтрансфераза. Но этот фермент, являющийся незаменимым компонентом γ-глутамильного цикла, в эритроцитах отсутствует [16]. Существует гипотеза, что глутатион возник у аэробных эукариот для защиты клеток от токсического действия кислорода [23, 25].

Восстановленная форма глутатиона является одним из ведущих компонентов АОС эритроцитов [26, 27] . Восстановление ГSSГ происходит благодаря ферменту глутатионредуктазы (ГР), а также через восстановленный никотинамидадениндифосфат (НАДФН) и в основном зависит от активности пентозофосфатного шунта.

Антиоксидантные свойства ГSH проявляются в ходе непосредственного взаимодействия с АФК и обменными реакциями с дисульфидными связями, так и функционированием ряда ферментов

глутатионового цикла – глутатионпероксидаза (ГПО), глутатион-S-трансфераза (ГST) и др.

ГSH улавливает радикалы с образованием ГS-радикала и последующей димеризацией в дисульфид (ГSSГ). ГSH хорошо перехватывает $HO^{\bullet}$, $^{1}O_2$. Существует информация о способности ГSH непосредственно реагировать вступать в реакцию H_2O_2 [17]. ГSH вместе с аскорбиновой кислотой (АК) способствует восстановлению метгемоглобина [17]. Роль этого процесса незначительна при физиологических условиях (около 13% восстанавливается), но бесценна в условиях стресса, когда концентрация метгемоглобина в эритроцитах достигает 15-20% [20, 28].

ГSH выполняет важную роль в поддержании внутриклеточного пула аскорбата [15], способствует образованию метилглиоксаля, являющегося эндогенным регулятором клеточной пролиферации, является стабилизатором мембран, обладает защитным действием в отношении репликативной системы клетки [10], выполняет коферментные функции.

Обнаружено, что SH-содержащие соединения вовлекаются в окисление в первую очередь. Вместе с тем в условиях окислительного стресса окисление SH-групп приводит к тому, что глутатион преобладает в форме цитотоксических радикалов $ГS^{\bullet}$ и $ГSO^{\bullet}_2$. Наличие легкоокисляющегося ГSH способствует восстановлению металлов переменной валентности:

$2Fe^{3+} + 2ГSH \rightarrow 2Fe^{2+} + ГSSГ + 2H^{+}$

и даже O_2:

$ГSH + O_2 \rightarrow ГS^{\bullet} + HO_2^{\bullet}$ [12]

ГSH нужен для нормального функционирования эритроцитов и кроветворной ткани. В крови содержится достаточно высокое содержание ГSH, 96% которого находится в восстановленной форме. При этом в норме практически весь ГSH ассоциирован с форменными элементами (4мкмоль/мл

клеток). В эритроцитах функционируют ферменты синтеза ГSH, в них же он претерпевает окислительное разрушение [17]. Сущестует информация о том, что ГSH, синтезирующийся в печени, всасывается в кровь и утилизируется тканями организма через клеточные мембраны и ресинтез внутри клетки посредством γ-глутамильного цикла.

ГSSГ может восстанавливаться в глутатионредуктазной реакции до ГSH [18] или подобно ГS-конъюгатам удаляться из клеток с помощью одностороннего активного транспорта, осуществляемого специальным мембранным гликопротеином MRP (multygrug resistance protein), относящимся к семейству АТФ-зависимых транспортных насосов [30, 31].

Глутатионовый статус ткани играет важную роль при гипероксических состояниях. Когда концентрация O_2 в системе оказывается ниже, чем содержание ГSH, наблюдается обрыв цепей и регенерация радикалов в исходную молекулу RH. Однако при изменении концентрационного соотношения O_2 и ГSH на обратное развивается цепная реакция окисления, ГSH выступает лишь в роли ограничителя свободнорадикального окисления (СРО).

Снижение таких показателей, как суммарное содержание ГSH и ГSSГ и отношение их концентраций положительно коррелирует с интенсификацией ПОЛ. Накопление ГSSГ в печени рассматривается как индикатор окислительного стресса (ОС). Напротив, повышение содержания ГSH свидетельствует о развитии адаптивного ответа ткани на ОС [12].

ГSSГ может синтезировать в клетке смешанные дисульфиды с тиолсодержащими ферментами, нарушая их функциональную активность. Ткань будет эффективно противостоять развитию ОС при высокой индуцируемости в ней процессов освобождения от ГSSГ через связывание с белками, восстановление в глутатионредуктазной реакции либо активный экспорт дисульфида из клеток [19].

ГSH начинает цепь антирадикального ингибирования:

ГSH – α-токоферол – аскорбат.

1.4.2.2 Аскорбиновая кислота

Витамин С (L-аскорбиновая кислота) по химическому строению является лактоном гулоновой кислоты со структурой, близкой α-глюкозе. Благодаря наличию двух асимметричных атомов углерода, аскорбиновая кислота образует четыре стереоизомера, биологической активностью обладает только L-аскорбат [15].

В организме человека и животных отдельных видов синтез АК не происходит из-за утраты гена, ответственного за образование микросомальной оксидазы L-гулонолактата – фермента заключительной стадии биосинтеза витамина С в печени. У животных, способных синтезировать АК, он образуется как конечный продукт одного из разветвлений глюкуронатного пути обмена глюкозы [23, 32, 33].

При окислении АК в тканях человека и животных образуется дегидроаскорбиновая кислота (ДАК), превращающийся затем в дикетогулоновую кислоту (ДКГК). При распаде последнего образуются щавелевая и трионовая кислоты, а при декарбоксилировании – ксилулоза, превращающаяся, как обычно, в глюкозу [20].

Вследствие легкой окисляемости АК восстанавливает многие соединения, чем объясняется ее участие в окислительно-восстановительных процессах в клетке [21]. У растений окисление АК с образованием ДАК катализирует специфический медьсодержащий фермент аскорбатоксидаза. Эту же функцию выполняют и другие терминальные оксидазы растительных и животных тканей – цитохромоксидаза, фенолооксидаза, а также многие металлы, гемохромогены и т.д. Возможно, роль оксидазы аскорбата выполняет и церулоплазмин – белок, синтезирующийся в печени и

осуществляющий транспорт меди [22].

В меньшей степени катализируют окисление АК катионы железа и серебра. Окисление АК ускоряют хиноны, некоторые антибиотики, в частности, стрептомицин. Известны вещества, которые способны тормозить окислительный распад АК – флавоноиды, многие комплексоны. Некоторые белки ингибируют окисление АК путем ее связывания или образования ее комплекса с медью. Окисление АК также тормозится в присутствии тиоловых соединений [15].

Значительная часть витамина С (30-40%) в тканях животных, у растений связана с белками, нуклеиновыми кислотами и другими соединениями. Биологическое значение связанной формы витамина С (так называемого аскорбигена) еще неясно. Возможно, что он представляет собой транспортную форму витамина и, что ему присущи не известные еще коферментные функции.

Способность АК и ДАК легко подвергаться окислительно-восстановительным превращениям лежит в основе широкого участия витамина С в обмене веществ: дыхании и фотосинтетической активности, транспорте электронов, окислении и восстановлении никотинамидных коферментов и т.д. В оксидоредуктазных реакциях АК превращается в нестабильные ион-радикалы хинонного типа, например в монодигидроаскорбат, способный окислять НАДН. АК необходима для процессов гидроксилирования многих ароматических соединений, стероидов, для превращения пролина в гидроксипролин. АК оказывает активирующее влияние на активность ряда оксидоредуктаз, гидролаз, трансфераз. Это связано с его редуцирующими свойствами, благодаря которым АК влияет на тиоловые и дисульфидные группы белков, на валентность связанных с белками металлов [32, 35].

Антиоксидантные свойства АК основаны на функционировании одноэлектронных циклических переходов между дигидро-, семигидро- и

дегидроаскорбатными формами, чему способствуют весьма подвижные протоны. Скорость этих превращений зависит от металлов переменной валентности, других пар окислитель-восстановитель и pH [23]. АК может выступать в качестве донора и акцептора водорода благодаря наличию в структуре молекулы двух енольных групп [24].

АК обладает чрезвычайно широким спектром антиоксидантных свойств: является наилучшим тушителем O_2^-, обезвреживает HOCl, $HO_2^{\cdot}$, $RO_2^{\cdot}$, $^1O_2$, $HO^{\cdot}$, восстанавливает α-токоферильный радикал, тем самым возвращая α-токоферолу антиоксидантные свойства, также тиильный ($ГS^{\cdot}$) и тиопероксильный ($ГSO_2^{\cdot}$) радикалы. H_2O_2 может восстанавливаться аскорбатом как непосредственно, так и с помощью фермента аскорбатпероксидазы. Так, в хлоропластах растений описанная ферментативная реакция – основной механизм удаления H_2O_2 [17, 23]. АК превосходит другие АО плазмы в защите липидов от перекисного окисления, так как только это соединение достаточно реакционноспособно, чтобы эффективно ингибировать инициацию ПОЛ.

В присутствии ионов меди и железа АК становится мощным прооксидантом. Система Fe - АК во фракциях микросом инициирует ПОЛ, сопровождающееся генерацией $^1O_2$ по механизму Руссела. Кроме того, АК может частично заменить O_2^- в восстановлении Fe в реакции Габера-Вайса, ответственной за синтез $HO^{\bullet}$. На долю последнего относят основную часть сайт-специфических повреждений биоструктур при развитии свободнорадикальных процессов. Трансферрин – наиболее значительное депо Fe в сыворотке крови – не стимулирует окисление АК. Однако, АК и O_2^- могут восстанавливать Fe^{3+} в составе ферритина и способствовать его высвобождению [23, 37].

Проявление анти- и прооксидантных свойств АК зависит также от концентрации субстрата и условий протекания реакций; такая ее функциональная пластичность важна для поддержания в биологических

системах окислительно-восстановительного гомеостаза. В качестве стабилизатора АК выступает мочевая кислота, которая ингибирует радикалы аскорбата и предотвращает его окисление Fe [11].

Редукция ДАК в АК в эритроцитах человека, по-видимому, происходит при участии ГSH и зависит от внутриклеточного уровня данного тиола и активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионредуктазы [21].

ДАК, являясь неионизированной формой витамина С, более способна к диффузии через эритроцитарные мембраны, чем АК. ДАК – транспортная форма витамина С – поступает в эритроциты без энергетических затрат с помощью простой или облегченной диффузии, где восстанавливается до АК [25].

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

Аскорбатзависимая неферментативная система переокисления обладает абсолютной потребностью в ионах железа. Каталитическую роль в системе играет негеминовое железо, которое в комплексе с нуклеофильными группами аминокислотных остатков мембранных белков образует центры генерации свободных радикалов. Эта система также способна функционировать в качестве ферментативной, поскольку возможно восстановление монодегидроаскорбиновой кислоты НАДФН -зависимой цепью переноса электронов с участием цитохрома b_5.

1.5 Щитовидная железа. Строение и функции.

Щитовидная железа — непарный орган, относится к эндокринным железам организма и состоит из 2 долей, соединенных перешейком. Щитовидная железа долями прилегает к трахее. В нормальном состоянии масса щитовидной железы составляет от 20 до 65 г

В щитовидной железе происходит синтез двух йодсодержащих гормонов — тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3), и одного пептидного гормона — кальцитонина. Биологическая функция щитовидной железы (ЩЖ) реализуется через действие тиреоидных гормонов.

Хорошо известно, что тиреоидные гормоны необходимы для нормального роста и развития организма. Они контролируют образование тепла, скорость поглощения кислорода, участвуют в поддержании нормальной функции дыхательного центра, оказывают инотропный и хронотропный эффекты на сердце, увеличивают количество b – адренергических рецепторов в сердечной и скелетной мышцах, жировой ткани и лимфоцитах, увеличивают образование эритропоэтина и повышают эритропоэз, стимулируют моторику желудочно-кишечного тракта, стимулируют синтез многих структурных белков организма [26].

Внутриклеточное действие тиреоидных гормонов обусловлено изменением активности Na^+ и K^+ - АТФазы и $5'$-нуклеотидазы, что ведет к увеличению поглощения кислорода митохондриями. Трансформации энергии происходит с участием Na^+ и K^+ - АТФазы. При этом повышается активность РНК полимеразы, путем транскрипции ДНК увеличивается синтез мРНК и образование специфического белка или фермента в зависимости от ткани – мишени. Этим механизмом можно объяснить влияние гормонов ЩЖ на дифференцировку органов и тканей, их созревании и на поддержание клеточного обмена веществ [26].

Недостаточное поступление йода с пищей вызывает перестройку функции ЩЖ. В условиях дефицита йода снижается синтез и секреция

гормонов ЩЖ — тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3), для которых йод является субстратом, что по принципу обратной связи приводит к активации секреции тиреотропного гормона (ТТГ) [27]. Под влиянием ТТГ в ЩЖ происходит адаптация к дефициту йода, стимулируются механизмы захвата йода щитовидной железой и последующие этапы внутритиреоидного метаболизма. Эти этапы включают: ускорение реутилизации эндогенного йода, освобождающегося в процессе деградации тиреоидных гормонов, преимущественный синтез и секрецию более активного T_3, ускорение конверсии T_4 в T_3 в крови и тканях, увеличение тиреоидной массы, которое объясняется как за счет гипертрофии, так и компенсаторной гиперплазии в ответ на низкое поступление йода в организм, недостаточное для нормальной секреции тиреоидных гормонов. В ответ на снижение уровня тиреоидных гормонов в крови наблюдается повышение секреции ТТГ, что в свою очередь является причиной сначала диффузной гиперплазии железы, а затем и развитие узловых форм зоба.

Таким образом, формирование зоба является компенсаторной реакцией, направленной на поддержание гомеостаза тиреоидных гормонов в организме. В дальнейшем, если дефицит йода сохраняется, компенсаторные возможности железы истощаются, активация ТТГ не приводит к увеличению биосинтеза T_4, формируется субклинический и явный гипотиреоз, который приводит к нарушениям умственного и физического развития [41, 42].

Кроме того, недостаточность функции ЩЖ при йоддефицитных состояниях является тем метаболическим фоном, который удлиняет время жизни и деструктивного воздействия свободных радикалов [28].

Изменения секреции тиреоидных гормонов и нарушения функции ЩЖ могут происходить в результате поломки биосинтеза тиреоидных гормонов на разных его этапах поступления йодида из крови, окисления его в элементарный йод, включения йода в состав тирозинов с образованием монойодтирозина и дийодтирозина, конденсации молекул йодтирозина с

образованием T_4 и T_3 [39, 42]

1.6 Диффузный токсический зоб

Диффузный токсический зоб – заболевание, обусловленное избыточной секрецией тиреоидных гормонов диффузно увеличенной ЩЖ. Это наиболее частое заболевание, которое проявляется синдромом тиреотоксикоза и на долю которого приходится до 80% всех его случаев [29].

Понятия, часто использующиеся как синонимы термина “диффузный токсический зоб” - “тиреотоксикоз” или “гипертиреоз” неоднозначны. Термин “тиреотоксикоз” применим к патологическому состоянию, клинические и биохимические проявления которого связаны с избытком содержания тиреоидных гормонов в крови. К тиреотоксикозу относятся также состояния, при которых имеются клинические и биохимические проявления избыточного содержания тиреоидных гормонов в крови без учета генеза повышения их уровня. Термин “гипертиреоз” правомерен в тех случаях, когда высокое содержание тиреоидных гормонов в крови является следствием повышенной их секреции.

ДТЗ - аутоиммунное заболевание и развивается у лиц с наследственной предрасположенностью, чаще у женщин. По мнению одних авторов, он наследуется аутосомно-рецессивным, по мнению других – аутосомно-доминантным путем. Вероятнее всего имеет место многофакторный (полигенный) тип наследования [30].

Аутоиммунные механизмы заболеваний человека были впервые охарактеризованы при заболеваниях щитовидной железы. За последние 20-25 лет были получены экспериментальные и клинические данные, четко устанавливающие аутоиммунные механизмы при диффузном токсическом зобе.

В ЩЖ в качестве антигенов выступают следующие белки тироцита: тиреоглобулин (мол. м. 660 кДа, состоящий из 5496 аминокислот и

представляющий основной компонент фолликулярного коллоида), пероксидаза щитовидной железы или тиропероксидаза (мол. м. 102 кДа, молекула включает 926 аминокислотных остатков, тесно связана с мембранами апикальной части тироцита), рецептор к ТТГ (мол. м. 100 кДа, состоит из 744 аминокислот).

При ДТЗ в 20-30% случаев обнаруживаются антитела к тиреоглобулину, в 85 % случаев антитела к тиреопероксидазе (что указывает на аутоиммунный характер), в 50 % случаев обнаруживаются антитела ко второму коллоидному антигену. Тироидстимулирующие антитела являются антителами к рецепторам ТТГ или другим белковым структурам, тесно связанным с рецепторами. Взаимодействие этих антител с рецепторами приводит к стимуляции синтеза и высвобождения тиреоидных гормонов в кровь аналогичного действию, оказываемому ТТГ. Однако следует подчеркнуть, что не во всех случаях под влиянием таких антител наблюдается усиление продукции гормонов щитовидной железы. Определенный класс антител к рецептору ТТГ, связываясь с последним и конкурируя, таким образом, с ТТГ, приводит к угнетению секреции тиреоидных гормонов (в случае гипотиреоза).

К настоящему времени антиген, к которому при диффузном токсическом зобе образуются тироидстимулирующие антитела, не установлен. Таким образом, наличие в сыворотке крови больных различных тироидстимулирующих иммуноглобулинов не объясняет полностью патогенез диффузного токсического зоба. Надо полагать, что в механизме его развития, помимо гуморального иммунитета, большое место занимают нарушения клеточно-опосредованного иммунитета [31].

Как было указано выше, тиреоидные гормоны влияют на все основные функции организма

При гипертиреоидных состояниях избыток тиреоидных гормонов вызывает усиление катаболизма и ускорение окислительных процессов

внутри клетки. Снижается масса тела больного, быстро расходуются источники энергии – уменьшается содержание гликогена и жира в печени. Катаболизм белков мышц сопровождается резкой мышечной слабостью. Повышение окислительных процессов на периферии (окисление жиров, углеводов и в последнюю очередь белков), с одной стороны, требует постоянного достаточного количества кислорода, а с другой – образуется избыточное количество тепловой энергии (вследствие разобщения окисления и фосфорилирования), которая вызывает гипертермию, иногда до 40°С. Наблюдаемые при этом тахикардия, тахипноэ, повышение систолического объема крови и систолическая артериальная гипертензия являются до известной степени компенсаторными реакциями для удовлетворения повышенной потребности периферических тканей в кислороде и рассредоточения образовавшейся тепловой энергии. Кроме того, тиреоидные гормоны могут оказывать прямое токсическое влияние на сердечную мышцу [45,46].

При гипотиреоидных состояниях снижается активность ферментных систем тканевого дыхания, сопровождаемая усиленным образованием СР, которые прежде всего выступают в качестве инициаторов процесса ПОЛ .

Чрезмерная активация процессов ПОЛ при сниженной мощности систем антиоксидантной защиты приводит к снижению радиорезистентности и лежит в основе развития многих патологических процессов в организме [10], в полной мере это можно отнести и к патологиям ЩЖ .

Продукты ПОЛ всегда присутствуют в клетке, но накопление продуктов ПОЛ происходит при истощении антиоксидантной защиты. Опасность для организма эти продукты представляют лишь в случае снижения мощности этой системы. Основную нагрузку по защите биомембран от продуктов пероксидации и поддержанию стационарного уровня восстановленных SH-групп белков, ферментов, гормонов и рецепторов несет регуляторная система глутатиона. Полагают, что уровень

восстановленных тиолов в биологических объектах в существенной мере определяет радиочувствительность тканей. Связывая гидроперекиси, тиолы тормозят ПОЛ, стимулированное облучением, и снижают возросший в результате облучения уровень малонового диальдегида. Выявленное уменьшение содержания ГSH и падение активности ГПО свидетельствует о снижении способности мембран эритроцитов крови с патологией ЩЖ противостоять пероксидной деструкции.

Сведения по поводу нарушения АОЗ при заболеваниях щитовидной железы (ЗЩЖ), противоречивы и неоднозначны, но многие исследователи сходятся в том, что при прогрессирующем течении ЗЩЖ компенсаторные возможности АОС истощаются, о чем свидетельствует снижение активности ферментативного звена и снижение содержание низкомолекулярных компонентов АОС [1].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования служили упакованные эритроциты. Для этого кровь забиралась из локтевой вены, утром натощак, в качестве антикоагулянта использовали гепарин. эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин. Затем трехкратно отмывали 0,9%-ным раствором NaCl, центрифугируя после каждой отмывки 15 мин при 3000 об/мин.

В данной работе для исследования низкомолекулярных компонентов АОС использовалась кровь 29-ти условно здоровых и 27-ми больных с диагнозом диффузный токсический зоб до лекарственной терапии. Все пациенты были женщины, а средний возраст составлял 43±5 года. Исследования проводились с согласия пациентов.

2.2 Определение гемоглобина

Содержание гемоглобина (Hb) определяют унифицированным ге- миглобинцианидным методом с использованием набора реактивов фирмы «Агат-Мед».

Принцип метода

Hb крови при взаимодействии с железосинеродистым калием (крас- ная кровяная соль) окисляется в Met-Hb, образующий с ацетонциангидри- ном гемиглобинцианид (цианметгемоглобин), оптическая плотность кото- рого при 540 нм пропорциональна концентрации Hb в образце крови. Содержание Hb в опытных образцах выражают в граммах на литр (г/л) упакованных эритроцитов.

Реактивы

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

2. Ацетонциангидрин.

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

Ход работы

К 5 мл трансформирующего раствора добавляли 0,02 мл крови (разведение в 251 раз) или гемолизата (разведением не более, чем в 10 раз), хорошо перемешивают. Определение проводят через 10 минут против холостой пробы (трансформирующего раствора), окраска устойчива в течение не менее 1 часа. При использовании спектрофотометра определение оптической плот- ности проводят при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 1 см[32].

Содержание гемоглобина рассчитывали по формуле:

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

где:

А – концентрация гемоглобина в мг/мл;

В – оптическая плотность контрольной пробы;

D – оптическая плотность опытной пробы;

120 – коэффициент пересчета.

2.3 Определение содержания восстановленного глутатиона

Для определения количества ГSH использовалась стандартная методика, описанная E. Beutler 1990 [33].

Принцип метода

Определение основано на взаимодействии восстановленного глутатиона с ДТНБК с образованием окрашенного в желтый цвет аниона 2-нитро-5-тиобензоата. Увеличение концентрации желтого аниона в ходе данной реакции регистрируют спектрофотометрически при длине волны 412 нм (Beutler, 1990).

Реактивы

1. Осаждающий раствор (1,67 г ледяной ортофосфорной кислоты, 0,2 г

ЭДТА и 30 г хлористого натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки 100 мл).

2. Фосфатный буфер (0,3 М Na2HPO4).

3. 1 %-ный раствор цитрата натрия.

4. 0,02 %-ный раствор дитионитро(бис)бензойной кислоты, приготовленный на 1 %-ном растворе цитрата натрия.

Ход работы

Готовили гемолизат добавлением 0,1 мл отмытых от плазмы и упакованных эритроцитов к 0,9 мл дистиллированной воды, охлажденной до 0 ºС. Осаждали белки добавлением 1,5 мл осаждающего раствора. Пробы тщательно перемешивали и после 20-минутного стояния при комнатной температуре фильтруют через крупнопористый фильтр («красная лента»). В спектрофотометрическую кювету с толщиной слоя 1,0 см помещают 0,5 мл фильтрата, добавляют 2,0 мл фосфатного буфера. Параллельно с опытной пробой готовили контрольную, содержащую вместо фильтрата осаждающий раствор, разведенный дистиллированной водой в отношении 2:5. Пробы фотомет- рируют до и после добавления ДТНБК. Затем в контрольную и опытную пробы вносят по 0,25 мл раствора ДТНБК. Пробы фотометрировали при длине волны 412 нм в кювете с толщиной слоя 1,0 см против воздуха. [32]

Содержание глутатиона рассчитывают по формуле:

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

где:

С – концентрация восстановленного глутатиона в мкмоль/гHb;

E_1 – оптическая плотность опытной пробы до добавления ДТНБК;

E_2 – оптическая плотность опытной пробы после добавления ДТНБК;

138 – разведение эритроцитов в реакционной пробе;

Hb – гемоглобин в г/л;

1000 – коэффициент для пересчета концентрации глутатиона от молярной к миллимолярной;

F – отношение оптической плотности контрольной пробы до добавления ДТНБК (E_1) и после добавления (E_2);

13600 – коэффициент молярной экстинции окрашенного аниона, образующегося при взаимодействии ГSH с ДТНБК.

2.4 Определение содержания окисленного глутатиона

За основу количественного определения ГSSГ в эритроцитах был взят метод, описанный в монографии В.С. Асатиани [34].

Принцип метода

Содержания окисленного глутатиона основано на его количественном восстановлении в ГSH под действием фермента глутатионредуктазы и участием восстановленного НАДФ. Убыль восстановленного НАДФ регистрировалась спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Измерялась начальная оптическая плотность инкубационной пробы, и ее изменение через 10 минут.

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

Инкубационная проба готовилась последовательным внесением следующих компонентов:

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

0,1 мл восстановленного НАДФ;

7,5 мкл глутатионредуктазы

0,5 мл хлорного экстракта эритроцитов.

Вычисление содержание ГSSГ в пробе проводили по формуле

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

где:

ΔE/10 – изменение оптической плотности инкубационной пробы за минуту;

d - ширина кюветы;

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

6,22 – коэффициент экстинции для восстановленного НАДФ, $см^2$/мкм при λ = 340 нм;

1000 = коэффициент пересчета гемоглобина, %;

Hb – гемоглобин, г/л

2,2 – объем инкубационной пробы;

С – количество ГSSГ , нмоль/г Hb

2.5 Раздельное определение восстановленной и окисленных форм аскорбиновой кислоты в эритроцитах

Для количественных определений аскорбиновой (АК), дегидроаскорбиновой (ДАК) и дикетогулоновой кислот (ДКГК) использовали метод J.H. Roe., C.A. Kuether (1943) в модификации В.В. Соколовского с соавт [15].

Метод основан на взаимодействии 2,4-динитрофенилгидразина с ДАК с образованием в серной кислоте соответствующего озазона. ДАК и ДКГК

дают красное окрашивание, используемое для фотометрического определения. Для вычисления суммы всех кислот их окисляют 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия. Содержание АК определяют по разности. Для дифференцированного определения ДАК и ДКГК смесь подвергают действию восстановителей, при этом в АК восстанавливается только ДАК. В качестве восстановителя используют димеркаптопропансульфат натрия (унитиол) [35].

Реактивы:

- Унитиол 0,84 мл 5%-ного раствора ампулированного препарата в 100 мл 0,2 фосфатного буфера pH 7;
- 5% ТХУ;
- 85% Серная кислота (к 900 мл концентрированной серной кислоты добавляют 100 мл дистиллированной воды);
- 2% 2.4-динитрофенилгидразина в 9 Н серной кислоте, содержащей 0,25 % ;
- 0,001 Н 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия (краска Тильманса)

Ход работы

В три пробирки помещали по 0,5 мл упакованных и отмытых от плазмы эритроцитов. В первую добавляли 0,25 мл 0,9 % раствора NaCl и 0,25 мл 2,5 мМ унитиола. После 15-минутной инкубации отбирали 0,5 мл экстракта, к которому прибавляли 1,5 мл 5% раствора ТХУ. В две другие пробирки, содержащие по 0,5 мл упакованных эритроцитов, также добавляли по 1,5 мл 5% раствора ТХУ. Далее в три чистые пробирки вносили по 0,75 мл супернатанта, полученного после центрифугирования в течение 10 минут при 1700 g смеси эритроцитов с ТХУ. В одну из пробирок с супернатантом по каплям добавляли 0,001 н раствора 2,6-ДХФФН до появления слабо-розового окрашивания, устойчивого в течение 30 секунд. А затем во все пробирки вносили по 0,25 мл 2% раствора 2,4-динитрофенилгидразина и доводили объем до 1,25 мл дистиллированной водой; после инкубировали 10

минут при температуре 100 °С. После этого добавляли 1,25 мл 85 % раствора H2SO4, охлаждая пробирку в ледяной бане. Окрашенные растворы фотометрировали через час при длине волны 540 нм в 1,0 см кюветах. Параллельно с опытными пробами готовили контрольную – 5% ТХУ, обработанную так же как и опытную. Окрашенные растворы спектрофотометрировали против контроля при длине волны 540 нм через 1 час инкубации в кюветах с длиной светового пути 1 см[32].

Концентрацию кислот определяли по формуле:

$$C = \frac{C_{ст} \times A \times F}{A_{ст}}; \qquad (4)$$

где:

С – концентрация кислот, мг%

$C_{ст}$ – концентрация стандартного раствора АК, мг%

А – оптическая плотность пробы, отн. ед.

F – разведение эритроцитов

$A_{ст}$ – оптическая плотность стандартного раствора, отн. ед.

2.6 Статистическая обработка результатов

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

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

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АО – антиоксиданты

АОС – антиоксидантная система

АОЗ – антиоксидантная защита

АК – аскорбиновая кислота

АФК – активные формы кислорода

АЗЩЖ – аутоиммунные заболевания щитовидной железы

ГSH, ГSSГ – восстановленный и окисленный глутатион

ГР – глутатионредуктаза

ГПО – глутатионпероксидаза

ГST – глутатион-S-трансфераза

Глу – глутаминовая аминокислота

ДАК – дегидроаскорбиновая кислота

ДКГК – дикетогулоновая кислота

ДТЗ – диффузный токсический зоб

ЗЩЖ – заболевания щитовидной железы

НАД(Ф)Н – восстановленный никотинамидадениндинуклеатид(фосфат)

$HO^{\bullet}$ – гидроксильный радикал

H_2O_2 – перекись водорода

$^1O_2^{\bullet}$ – синглетный кислород

$O^{\bullet}_2{}^-$ – супероксидный радикал

ОС – окислительный стресс

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СРО – свободно радикальное окисление

T_4 – тироксин

T_3 – трийодтиронин

ТТГ – тиреотропный гормон

Цис – цистеиновая аминокислота

ЩЖ – щитовидная железа

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

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

10. Зайцев, В. Г. Методологические аспекты исследований свободно-радикального окисления и антиоксидантной системы организма / В. Г Зайцев // Вестн. Волгоград. мед. акад. – 1984. – № 4. –С. 49-53.
11. Меньщикова, Е. Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окисли-тельных процессов / Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков // Ин-т общ. пат. и экол. чел-ка СО РАМН. Успехи современной биологии. – 1993. – Т.113. – № 4. – С. 442-445.
12. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты : учеб. пособие для специалистов в области изучения радикальных окислительных про-цессов в биологических системах / Е. Б. Менщикова, В. З. Ланкин, Н. К, Зенков, И. А. Бондар, Н. Ф. Круговых, В. А. Труфакин. – М.: Слово, 2006. – 556 с.
13. Lemaitre, D. Effects of Fatty Acids on Human Platelet Glutathione Peroxidase: Possible Role of Oxidative Stress / D. Lemaitre, E. Vericel, A. Polette // Biochem. Pharmacology. – 1997. – № 53. – P. 479-486.
14. Sun, W.-M. Regulation of g-glutamyl-cysteine synthetase by protein phosphorylation / W.-M. Sun, Z.-Z. Huang, S.C. Lu // Biochem. J. – 1996. – №320. – P. 321-328.
15. Диагностика и лечение окислительного стресса при остром панкреа-тите / Д. В. Черданцев, Ю. С. Винник, Э. В. Каспаров, Н. М. Титова. – Красноярск : АРТЭ, 2002. – 148 с.
16. Meister, A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection / A. Meister // Canser research (suppl.). – 1994. – № 6. – P.1969-1975.
17. Кения, М. В. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окисли-тельном стрессе / М. В. Кения, А. И. Лукаш, Е. П. Гуськов // Успехи современной биологии. – 1993. – № 4. – С.456-470.
18. Sato, Y. Novel assay for glutathione reductase activity by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection / Y. Sato, M. Naoi, T. Ohkuwa // J. Chromatography B : Biomedical science. Appl. – 1998. – №

705. – P. 23-28.

19. Huisman, M. Derivated fetal haemoglobin as a marker for red cell age in the human fetus reflecting stimulated or impaired red blood cell production / D. Huisman, D. Busch, D. Burkholder // Prenatal diagnostic. – 2001. – № 7. – P. 523-528.
20. Селочник, Л.И. Определение содержания аскорбиновой кислоты в надпочечнике крысы / Л. И. Селочник, К. Ф. Кацер // Лаб. дело. – 1967. – № 5. – С.179-180.
21. May, J.M. Interaction of ascorbate and a-tocopherol in resealed human erythrocyte ghosts-Transmembrane electron transfer and protection from lipid peroxidation / J. M. May, Z.-C. Qu, J. D. Morrow // Biological chemistry. – 1996. – № 271. – P. 10577-10582.
22. Халмурадов, А.Г. Механизмы транспорта аскорбиновой кислоты через биологические мембраны / А. Г. Халмурадов, В. Н. Тоцкий // Украинский биохимический журнал. – 1982. – № 1. – С. 96-107.
23. Кулинский, В. И. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатиона / В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко // Успехи современной биологии. – 1993. – Вып.3. – С. 187-195.
24. Van Duijn, M. N. Erythrocytes reduce extracellular ascorbate free radicals using intracellular ascorbate as an electron donor / M. N. Van Duijn // Biological chemistry. – 2000. – № 36. – P. 27720-27725.
25. Николаева, М. Я. О причине накопления дегидроаскорбиновой кислоты в крови больных инсулинзависимым сахарным диабетом / М. Я. Николаева, Б. С. Балмуханов, Р. М. Пархимович // Вопросы медицинской химии. – 1994. – № 4. – С. 14-17.
26. Эскин, И.А. Основы физиологии эндокринных желез : учеб. пособие для биол. специальностей ун-тов / И. А. Эскин. – М.: Высшая школа, 1996. – 356 с.

27. Тепперман, Дж. Физиология обмена веществ и эндокринной системы : учеб. пособие для вузов / Дж. Тепперман, Х. Тепперман ; под ред. Я. И. Ажипы ; Вводный курс : пер. с англ. – М.: Мир, 1989. – 656 с.
28. Дедов, И. И. Йоддефицитные заболевания в Российской федерации / И. И. Дедов, Н. Ю. Свириденко // Вестник РАМН. – 2001. – № 6. – С.3-12.
29. Левченко, И. А. Субклинический гипотиреоз / И. А. Левченко, В. В. Фадеев // Проблемы эндокринологии. – 2002. – № 2. – С. 21-23.
30. Благосклонная, Я. В. Заболевания щитовидной железы: современное лечение и профилактика : науч. изд. / Я. В Благосклонная, А. Ю. Бабенко, Е. И. Красильникова. –СПб. : Невский проспект, 2005. – 124 с.
31. Валидипа, Е.А. Заболевания щитовидной железы: науч. изд / Е.А. Благосклонная. – СПб.: Спутник врача, 2006. – 355с.
32. Оценка структурно-функционального состояния клетки: учеб. пособие / Н.М. Титова [и др.] – Красноярск. ИПК СФУ, 2009. – 61с.
33. Beutler, E. Red cell metabolism. A Manual of Bio- chemical Method / E. Beutler. - Orlando: Grune and Stratton, 1990. – 188 p.
34. Асатиани, В.С. Биохимический анализ: науч. изд / В.С. Асатиани. – Тбилиси: Грузмедгиз, 1953 – 943с.
35. Шпаков, А.Е. К методике раздельного определения общей, редуцированной и дегидроаскорбиновой кислот / А.Е. Шпаков // Лаб. дело. – 1967. - №5. – С. 305 – 306.
36. Resch, U. Antioxidant status in thyroid dusfunction / U. Resch, G. Helses, F. Tatzber, H. Sinzinger // Clim Lab Med. – 2002. - № 40. – P. 1132-113
37. Кольтовер, В.К. Свободнорадикальная теория старения: науч. изд / В.К. Кольтовер // Успехи геронтологии. – 2000. - №4.- С. 273.
38. Розен, В.Б. Основы эндокринологии: учебник / В.Б. Розен. – М.: Высш.шк, 1984 – 336с.
39. Wu, D. Interaction of 1-Hydroxyethyl Radical With Glutathi-one, Ascorbic

Acid and a-Tocopherol /D. Wu, D.A. Stoyanovsky, A.I. Cederbaum // Free Radic. Biology & Med, - 1998. - № 1. - P. 132 – 138.

40. Попов, С.С. Влияние мелатонина на свободнорадикальный гомеостаз в таканях крыс при тиреотоксикозе /С.С. Попов, А.Н. Пашков, Т.Н. Попова, В.И. Золоедов, А.В. Семенихина, Т.И. Рахманова // Биомедицинская химия, - 2008.- С. 114-121.

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

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

43. Полесская, О.Г. Растительная клетка и активные формы : науч. изд / О.Г. Полесская. – М.: 2007. - 140с.

44. Bouvier, F Induction and Control of Choroplast-Speeific Carotenoid Genes by Oxidative Stress / F. Bouvier, R.A. Backhaus, B. Camara // J. Biol. Chem., - 1998. - V. 273. - P. 30651-30659.

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

46. Никинченко, Ю.В. Ферментативная регуляция свободно-радикального окисления липидов при действии факторов, влияющих на скорость старения / Ю.В. Никинченко // Свобод.- радикал. процессы: экол., фармокол. и клин. аспекты, 1999.

47. Коновалова, Г.К. Комплекс витаминов – антиоксидантов эффективно подавляет свободнорадикальное окисление фосфолипидов в ЛПНП плазмы крови и мембранных структур печени и миокарда/ Г.Г.Коновалова, М.О. Лисина, А.К. Тихазе, В.З. Ланкин // Бюллетень эксперим. биол. и мед, - 2003. - № 2. – С.166-169.

48. Wang, P.J. Vitamin E and its function in membranes / P.J. Wang, P.J. Quinn, J.A. // Lee Progr. Lip. Res., - 1999. - № 4. - P. 309 – 336.

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