

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Ульяновский государственный университет»

На правах рукописи

УДК 612.1121.6:616.092.18

***ФЕДОТОВА АНТОНИНА ЮРЬЕВНА***

**ВЛИЯНИЕ КАНЦЕРОГЕНЕЗА НА ОКИСЛИТЕЛЬНО-  
ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ И МОРФОЛОГИЮ  
ЭРИТРОЦИТОВ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ КРОВИ**

14.03.03 - патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель –  
**Генинг Т.П.**, профессор,  
доктор биологических наук,

Екатеринбург – 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	<b>С.</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	4
<b>ГЛАВА 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	10
1.1 – Общее представление об активных формах кислорода и ферментативном звене антиоксидантной системы	10
1.2 – Роль активных форм кислорода в клеточном метаболизме	15
1.2.1 – Участие активных форм кислорода в механизмах внутриклеточной сигнализации	15
1.2.2 – Роль активных форм кислорода в регуляции пролиферации	17
1.2.3 – Роль активных форм кислорода в механизмах клеточной гибели	18
1.3 – Окислительный стресс	20
1.4 – Редокс-гомеостаз циркулирующей крови при патологии	23
1.4.1 – Перекисное окисление липидов – антиоксиданты в эритроцитах и плазме крови при патологии	23
1.5 – Окислительная модификация белков	27
1.6 – Архитектоника эритроцитов циркулирующей крови в организме-опухоленосителе	30
<b>ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	36
2.1 – Объект исследования	36
2.2 – Характеристика экспериментальной асцитной опухоли яичников	38
2.3 – Схема исследования	39
2.4 – Методы исследования	40
2.4.1 – Биохимические методы	41
2.4.1.1 – Методы определения активности перекисного окисления липидов	41
2.4.1.2 – Методы определения активности ферментативного звена антиоксидантной системы	43
2.4.1.3 – Метод определения количества ретикулоцитов	48
2.4.1.4 – Метод определения содержания эритропоэтина	49
2.4.1.5 – Метод оценки параметров крови с помощью гематологического анализатора	49
2.4.2 – Морфологические методы исследования	50
2.4.3 – Методы статистической обработки данных	52

<b>ГЛАВА 3 – ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОПОЭЗА И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ КРОВИ КРЫС С АСЦИТНОЙ ОПУХОЛЬЮ ЯИЧНИКОВ И БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ</b>	<b>53</b>
3.1 – Параметры эритроцитов периферической крови крыс в динамике развития асцитной опухоли яичников	53
3.2 – Показатели эритропоэза в организме-опухоленосителе при неопластических процессах	54
3.3 – Морфологические параметры эритроцитов периферической крови крыс с асцитной опухолью яичников	55
3.4 – Морфологические параметры эритроцитов периферической крови женщин при раке яичников	63
Резюме	66
Список работ, опубликованных по результатам 3-й главы	70
<b>ГЛАВА 4 – ПАРАМЕТРЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ-АНТИОКСИДАНТЫ В ЭРИТРОЦИТАХ И ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС С АСЦИТНОЙ ОПУХОЛЬЮ ЯИЧНИКОВ</b>	<b>72</b>
4.1 – Параметры перекисного окисления липидов в эритроцитах циркулирующей крови крыс при асцитной опухолью яичников	72
4.2 – Компоненты антиоксидантного звена в эритроцитах и плазме крови при моделировании неопластического процесса	73
4.3 – Система глутатиона в эритроцитах и плазме крови животных с асцитной опухолью яичников	74
4.4 – Окислительная модификация белков в эритроцитах и плазме крови крыс с асцитной опухолью яичников	78
4.5 – Перекисное окисление липидов в плазме крови у животных-опухоленосителей	80
4.6 – Корреляционная связь между параметрами системы «перекисное окисление липидов – антиоксиданты», индексом трансформации и ригидностью мембраны эритроцитов у крыс при асцитной опухоли яичников	81
Резюме	84
Список работ, опубликованных по результатам 4-й главы	95
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	<b>97</b>
<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>101</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	<b>103</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>104</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Развитие неоплазмы провоцирует в тканях организма-опухоленосителя усиленный процесс образования свободных радикалов, что в свою очередь приводит к нарушению окислительно-восстановительного статуса клеток, получившего название окислительного стресса. Данный процесс выступает как один из патогенетических звеньев канцерогенеза [114, 156].

Эритроцит – уникальная модель для оценки состояния организма, которая отражает степень нарушения структуры и метаболизма клеток в патологическом процессе [72].

Существующие на сегодня данные, полученные в результате экспериментальных и клинических исследований, описывающие параметры редокс-зависимых процессов в эритроцитах циркулирующей крови организма-опухоленосителя, достаточно противоречивы и не отражают динамику этих показателей на разных стадиях неопластического процесса.

В научных работах отсутствуют данные по одновременному определению в эритроцитах всех продуктов перекисного окисления липидов в динамике опухолевого процесса. Так, в работах ряда ученых отмечено увеличение уровня малонового диальдегида (МДА) при асцитной опухоли яичников (АОЯ) [11, 28], раке шейки матки, раке тела матки и раке яичников [59, 93, 184, 199], повышение уровня диеновых конъюгатов (ДК) при раке молочной железы [80], раке эндометрия [98].

Данные об активности глутатион-зависимых ферментов в эритроцитах и редокс-статуса глутатиона также противоречивы. Отмечается снижение активности глутатион-S-трансферазы (ГТ) у больных раком эндометрия, раком легкого [63, 98], а также у мышей в динамике развития экспериментального рака шейки матки [29]. Повышение активности ГТ выявлено при раке шейки матки и раке яичников [9, 104]. Снижение активности глутатионпероксидазы (ГПО) в эритроцитах описано у больных раком шейки матки, раком желудка, раком легкого [25, 63, 160].

Увеличение содержания ГПО – у больных раком эндометрия и раком яичников [98, 104]. В то же время в результате клинических и экспериментальных исследований выявлено повышение глутатиона в восстановленной и окисленной формах в эритроцитах крыс на ранних стадиях развития гепатомы Морриса 5123 [127]. Отмечено снижение редокс-статуса глутатиона в эритроцитах мышей с опухолью Эрлиха [190]. Снижение уровня глутатиона (GSH) в эритроцитах отмечалось как у больных со злокачественными образованиями различной локализации [16, 63, 96, 98], так и в эритроцитах мышей в динамике развития рака шейки матки [41].

Разрознены и противоречивы данные об активности антиоксидантных ферментов, супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в эритроцитах при прогрессировании неоплазмы. По данным ряда авторов [1, 59, 93, 104, 114, 227]; активность СОД и каталазы в эритроцитах снижается. Данные других авторов [11, 28, 29, 199] констатируют повышение активности этих ферментов.

Значительный интерес представляет влияние редокс-статуса эритроцитов на их архитектуру в динамике развития неоплазмы.

Публикации, посвящённые вопросам изменения морфологических параметров эритроцитов при канцерогенезе, сегодня редки и фрагментарны. Данные о форме, размерах и топологии эритроцитов, степени влияния на них редокс-статуса плазмы и самих эритроцитов в динамике канцерогенеза обрывочны и противоречивы [75, 92, 94, 102].

Таким образом, влияние канцерогенеза на редокс-статус и морфологию эритроцитов позволит приблизить нас к решению вопроса о механизмах нарушения кислородтранспортной функции, и реологии крови организма-опухоленосителя.

**Цель настоящей работы** – оценить влияние канцерогенеза на окислительно-восстановительные процессы и морфологию эритроцитов циркулирующей крови.

### **Основные задачи исследования:**

1. Оценить параметры перекисного окисления липидов: диеновых конъюгатов, кетодиенов, основания Шиффа и концентрации малонового диальдегида в эритроцитах и плазме крови крыс в динамике асцитной опухоли яичников.
2. Определить активность ферментативного звена антиоксидантной системы: супероксиддисмутазы, каталазы, глутатион-S-трансферазы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, уровня глутатиона в эритроцитах и плазме крови крыс при прогрессировании неоплазмы.
3. Оценить показатели окислительной модификации белков в эритроцитах и плазме крови крыс при развитии неоплазмы.
4. Проанализировать архитектуру, топологию, ригидность эритроцитов крыс в динамике асцитной опухоли яичников и периферической крови женщин при раке яичников.
5. Оценить интенсивность эритропоэза у животных-опухоленосителей и больных раком яичников III стадии.

### **Научная новизна**

В эксперименте на модели асцитной опухоли яичников крыс были выявлены новые данные об изменении уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ), циркулирующих в кровеносном русле эритроцитов.

Впервые оценили уровень активности ферментативного звена системы глутатиона в эритроцитах в стационарную и терминальную фазы при моделировании опухолевого процесса. Оценили архитектуру, ригидность, топологию, морфологические индексы эритроцитов у экспериментальных животных и больных раком яичников (РЯ) с использованием метода атомно-силовой микроскопии (АСМ), световой микроскопии, что позволило наиболее полно изучить их морфологию. Были выявлены корреляционные связи между показателями системы "ПОЛ-антиоксиданты" с индексом трансформации и ригидностью; между ОМБ и индексом трансформации эритроцитов, а также

между индексом трансформации, ригидностью эритроцитов и уровнем гемоглобина как в стационарную, так и терминальную фазы роста экспериментальной неоплазмы.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные данные раскрывают связь редокс-статуса эритроцитов циркулирующей крови с изменением их архитектоники в динамике неопластического процесса и представляют интерес для фундаментальной физиологии, экспериментальной онкологии. Данные научного исследования могут быть использованы для преподавания курсов «Физиология», «Патофизиология», «Биофизика». Результаты исследования, определяющие связь редокс-статуса с цитоархитектоникой эритроцитов и уровнем гемоглобина в организме-опухоленосителе, могут быть использованы при изучении механизмов анемий и разработке модели коррекции морфологии эритроцитов циркулирующей крови в экспериментальной патофизиологии.

Модельная система визуализации архитектоники эритроцитов с использованием оптической и атомно-силовой микроскопии позволит расширить исследовательскую базу современных микроскопических методов.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Прогрессирование экспериментальной асцитной опухоли яичников сопровождается усилением перекисного окисления липидов, окислительной модификации белков, истощением пула глутатиона восстановленного при разнонаправленной динамике активности ферментов глутатионовой системы в эритроцитах и плазме крови экспериментальных животных.

2. В динамике развития неопластического процесса в эритроцитах организма-опухоленосителя изменяется топология, возрастает ригидность мембраны, повышается индекс трансформации с увеличением диаметра, длины, высоты, площади и изменения глубины центральной впадины эритроцитов.

3. У крыс с асцитной опухолью яичников на фоне повышения уровня эритропоэтина снижается уровень гемоглобина и число эритроцитов периферической крови.

4. На фоне появления измененных форм эритроцитов, увеличения индекса трансформации и возрастании ригидности эритроцитов у больных раком яичников III стадии отмечается снижение общего числа эритроцитов циркулирующей крови.

**Внедрение результатов исследования в практику.** Полученные данные внедрены в практику биохимического отдела Научно-исследовательского медико-биологического центра ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» с использованием в качестве референсных значений при обследовании онкологических больных с анемией (2018 г.).

#### **Апробация работы**

Основные положения диссертации были доложены на V Всероссийской конференции, посвящённой 15-летию Института медицины, экологии и физической культуры Ульяновского государственного университета (Ульяновск, 2014), Международной научной конференции, посвящённой 75-летию Адыгейского государственного университета «Механизмы функционирования нервной, эндокринной и висцеральных систем в процессе онтогенеза» (Майкоп, 2015), VIII Международной научной конференции «Приоритеты мировой науки: эксперимент и научная дискуссия» (Северный Чарльстон, Южная Каролина, США, 2015), X Международной (XIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2015), Всероссийской молодежной конференции «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Ростов-на-Дону, 2016), VI Всероссийской конференции, посвящённой 25-летию образования медицинского факультета Ульяновского государственного университета (Ульяновск, 2016), Международно - практической конференции «Кислород и свободные радикалы» (Гродно, 2016), VII Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 30-летию Ульяновского государственного университета (Ульяновск, 2018).



## **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, из них 5 – в изданиях, рецензированных ВАК, 1 – в электронной международной реферативной базе данных Scopus, 1 – монография.

## **Объем и структура диссертации**

Научная работа состоит из введения, глав: «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», 2-х глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 129 страницах, иллюстрирована 18 рисунками и 25 таблицами. Список используемой литературы содержит 236 источников, из которых 119 иностранных.

**Личное участие автора.** Диссертация выполнена в соответствии с планом научной работы ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». Планирование научной работы, постановка цели и задач проводились совместно с научным руководителем – Татьяной Петровной Генинг, д.б.н., профессором.

Автор принимала непосредственное личное участие в подготовке и проведении экспериментов, обработке и обсуждении полученных результатов, подготовке публикаций. С 2013 по 2018 годы выступала с докладами на международных и российских конференциях, семинарах кафедры физиологии и патофизиологии.

Атомно-силовая микроскопия выполнена совместно с инженером-исследователем лаборатории зондовой и электронной микроскопии научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» (зав. лабораторией – к.ф.-м.н. Е.С. Пчелинцева).

Исследование гематологических параметров крови проводилось на гематологическом анализаторе Mindray BC 3600 в ГУЗ Областном клиническом онкологическом диспансере. Клинический материал был получен из гинекологического отделения Ульяновского областного клинического онкологического диспансера. Подбор тематических больных производился при участии д.м.н., профессора И.И. Антонеевой.

## ГЛАВА 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 - Общее представление об активных формах кислорода и ферментативном звене антиоксидантной системы

Молекулярный кислород в организме вступает в реакцию окислительного фосфорилирования, при этом в небольших концентрациях образуются активные формы кислорода (АФК).

АФК – это реакционноспособные молекулы с неспаренным электроном на внешней орбите, способные повреждать клеточные мембраны. Они участвуют в основных физиологических и метаболических процессах, в клеточном росте, передаче информации, активации генов, изменении химических реакций [147].

Существует несколько категорий свободных радикалов. Выделяют супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), гидроксильный радикал ( $OH^{\cdot}$ ), пергидроксильный радикал ( $HO_2^{\cdot}$ ), оксид азота, перекись водорода ( $H_2O_2$ ) [231].

Радикал  $O_2^{\cdot-}$  является и восстановителем, и окислителем. Органические молекулы-катехоламины, низкомолекулярные тиолы являются мишенью для первичного  $O_2^{\cdot-}$ -радикала. Радикал  $O_2^{\cdot-}$  способен образовывать в кислой среде  $HO_2^{\cdot}$ , который является более активным окислителем [153]. Накопление  $O_2^{\cdot-}$  в любой биологической системе сопровождается образованием  $H_2O_2$  [207, 215].

Промежуточный продукт  $H_2O_2$  не является свободным радикалом, но участвует в образовании большинства АФК, в том числе  $OH^{\cdot}$ , который считается одним из наиболее опасных агентов, образующихся в организме [13, 47].

Несмотря на свою реакционность и потенциальную токсичность, радикалы кислорода в небольших концентрациях в живых системах являются постоянными участниками большинства метаболических реакций в клетке [42, 95, 185].

В условиях сниженного содержания кислорода в организме присутствуют постоянные источники образования АФК, вплоть до образования их нестандартными прооксидантами. Несмотря на высокую активность АФК, идет

постоянный процесс их образования. Окисление липидов и белков в клетке осуществляется путем их деструкции с помощью АФК. Это создает условия для дальнейшего действия ферментов, так как они имеют к окисленному субстрату большее сродство [32].

АФК принимают участие в катаболизме и синтезе, адаптируют клетку к незнакомым условиям среды, меняют структуру мембранных фосфолипидов и участвуют в обновлении белкового спектра в организме [90].

Существует предположение, что АФК могут осуществлять свое действие двумя путями:

1 путь – через редокс-опосредованную сигнализацию. Сигнал образуется за счет лиганд-рецепторного взаимодействия, что приводит к запуску протеинкиназных реакций с последующим фосфорилированием.

2 путь – действие АФК на ферменты, участвующие в процессах фосфорилирования/дефосфорилирование [43].

Антиоксиданты – это вещества, которые защищают организм от свободных радикалов и АФК.

В организме имеются соединения одновременно про- и антиоксидантного действия, участвующие в регуляции процессов ПОЛ [32].

Общая сумма биоантиоксидантов создает в тканях «буферную антиоксидантную систему», обладающую определенной емкостью, а соотношение прооксидантных и антиоксидантных систем определяет так называемый «антиоксидантный статус организма» [90].

Среди компонентов антиоксидантной системы (АОС) выделяются следующие группы ферментов:

– ферментативное звено антиоксидантов (супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза (ГПО), каталаза, глутатионредуктаза (ГР), глутатион-S-трансфераза (ГТ));

– неферментативное звено антиоксидантов: гидрофильные антиоксиданты (витамин С, восстановленные тиолы, SH-группы) и липофильные антиоксиданты (витамин Е).

Возникновение и превращение свободных радикалов и других опасных соединений на постоянном уровне поддерживают компоненты антиоксидантной защиты (АОЗ) [27].

Антиоксидантные ферменты могут присутствовать в связанном положении с мембранами или в независимом состоянии в цитозоле и находиться в клеточных органеллах [121].

В качестве первого звена защиты среди антиоксидантных ферментов следует выделить СОД. Данный фермент участвует в ускорении реакции превращения токсичного для организма свободного радикала (супероксид  $OO\cdot$ ), продукта окислительных энергетических процессов, в  $H_2O_2$  и молекулярный кислород.  $H_2O_2$  инактивирует СОД, поэтому фермент работает всегда в паре с каталазой. Каталаза вступает в реакцию с  $H_2O_2$  и тем самым расщепляет  $H_2O_2$  на нейтральные соединения [30].

Каталаза всегда присутствует в системах, где осуществляется транспорт электронов с участием цитохромов, т.е. там, где образуется токсичный для клетки  $H_2O_2$ . Каталаза локализована преимущественно в пероксисомах клетки и цитоплазме [67].

Тиоловые соединения оказывают как прооксидантное, так и антиоксидантное действие. Однако антиоксидантный эффект серосодержащих соединений намного превосходит прооксидантный, который реализуется за счет «реактивных» SH-групп белков, подвергающихся в присутствии АФК обратимой S-тиоляции, и защищает белки от более грубых изменений [32].

Особое место в организме принадлежит компонентам глутатионовой системы: GSH, ГПО, ГТ, ГР.

Центральным метаболитом системы является трипептид-глутатион-глутамилцистеинилглицин (GSH). В организме он находится в двух формах: восстановленной и окисленной (GSSG), при этом 97-99 % приходится на восстановленную форму [81,149, 182].

GSH имеет собственную антиоксидантную систему и становится главным кофактором антиоксидантных ферментов. Также участвует во многих реакциях,

где является донором водорода, субстратом для ферментативных систем, таких как СОД и каталаза, ферменты, имевшие сульфгидрильные группы. GSH осуществляет участие в соединении белков и нуклеиновых кислот, оберегает от АФК, возобновляет, а также изомеризует дисульфидные мостики, оказывает влияние на активность ферментов и других белков, поддерживает функции мембран, участвует в коферментных функциях, включается в обмен эйкозаноидов, в метаболизме ксенобиотиков, становится главным резервом цистеина, усиливает резистентность клеток к патологическим воздействиям, оказывает влияние на пролиферацию [166, 224, 233].

Благодаря высокому уровню глутатиона и тому, что концентрация его восстановленной формы на порядок выше, чем концентрация окисленной формы, глутатион является главным редокс-буфером в клетках. Уровень глутатиона в клетках определяется главным образом скоростью его синтеза, с одной стороны, и скоростью выхода и конъюгации – с другой. Восстановление GSSG катализируется флавоферментом ГР. Важную роль в метаболизме глутатиона играет  $\gamma$ -глутамилтранспептидаза, катализирующая начальный этап деградации глутатиона [138].

Ключевой функцией GSH является снижение  $H_2O_2$  и другие органические пероксиды через ГПО, повторно вызывающий его соответствующие гидроксильные соединения [194, 159].

ГПО – фермент, имеющий в активном центре селен, локализован главным образом в эритроцитах. Фермент способен восстанавливать пероксид водорода до воды, затем происходит восстановление фермента до гидроксипроизводных и в результате – переход в окисленную дисульфидную форму GSSG [178; 218].

Фермент также нейтрализует органические липидные пероксиды, образуемые при активации ПОЛ в организме [233].

Биологическая роль ГПО заключается в защите мембранных структур клетки от действия АФК и продуктов ПОЛ при патологических процессах. Кроме  $H_2O_2$ , образующейся в клетке как самостоятельно, так и из  $O_2^{\cdot-}$ , ГПО способна воздействовать и на полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), стероиды,

нуклеиновые кислоты и ряд органических гидроперекисей. Поскольку активность ГПО в отношении разных гидроперекисей ПНЖК мала, в реакции участвуют любые радикалы липоперекиси, образующиеся в клетке. Продукты восстановления гидроперекисей жирных кислот – алифатические оксикислоты – могут претерпевать дальнейшие превращения по схеме  $\beta$ -окисления [191].

ГТ – семейство мультифункциональных белков, которые используют GSH для метаболизма гидрофобных веществ. ГТ защищает организм от огромного числа токсических веществ, которые вдыхаются или образуются в процессе метаболизма, не действует на  $H_2O_2$ , но обладает выраженной глутатионпероксидазной активностью по отношению к эндогенным субстратам – гидроперекисям ПНЖК (линолевой и арахидоновой), обезвреживает ХС-альфа-оксид, цитотоксичные 4-гидроксиалк-2-енали, не только ингибирует пероксидацию, но и защищает от неё клеточную мембрану [136, 147].

ГР – фермент, который восстанавливает дисульфидную связь окисленного глутатиона (GSSG) до сульфгидрильной формы GSH. Восстановление глутатиона возникает за счёт активности НАДФ-Н, образующегося в пентозном цикле [148].

GSH играет важную роль во множестве клеточных процессов, включая дифференцировку клеток, пролиферацию и апоптоз, а нарушения гомеостаза GSH приводит к прогрессированию многих заболеваний, включая рак. Хотя дефицит GSH или уменьшение соотношения GSH/GSSG приводит к повышенной восприимчивости к окислительному стрессу, связанному с прогрессированием неопластического процесса [212].

Система глутатиона надёжно защищает эукариотические клетки от воздействия окислительного стресса, в эритроцитах она защищает гемоглобин от денатурации  $H_2O_2$  и тормозит ПОЛ. Можно предполагать, что существуют две независимые глутатионовые системы – в плазме и эритроцитах, требующие отдельного рассмотрения [61, 64].

Таким образом, системе глутатиона, включающей GSH и ферменты, придается большое значение в процессах обезвреживания АФК, агрессивных

радикальных продуктов и эндогенных метаболитов, образующихся при окислительном стрессе [18, 35].

## **1.2 – Роль активных форм кислорода в клеточном метаболизме**

### **1.2.1 – Участие активных форм кислорода в механизмах внутриклеточной сигнализации**

Усиление ядерных факторов транскрипции является следствием редокс- и АФК-опосредованной сигнализации, принимающей значимое участие в активизации генов, кодирующих неодинаковые защитные системы: АОС клеток, систему белков быстрого ответа, которые способны образовываться при действии окислителей, при гипоксии и гипероксии. Известно множество рецепторов и соответствующих им медиаторов, вызывающих специфические реакции. К таким воздействиям относят влияние гипоксии, температуры, а также физические нагрузки и различные окислительно-восстановительные реакции. Но ответ клетки на эти действия возникает и без таких специфических рецепторов редокс-сигнализации. Даже медиаторы, имеющие специфические рецепторы, действуют через активацию редокс-сигнализации [210].

В работе Т.Г. Сазонтовой и соавт. (2007) описана активация редокс-сигнального пути. Авторы полагают, что после образования АФК протекает окислительно-восстановительное изменение тиоловых групп сенсорных белков, от них информация поступает к специфическим рецепторам системы организма. Показано, что стадия активации протеин-тирозин-киназы становится связующим звеном при специфической и неспецифической (АФК-зависимом) реакции в получении внешнего сигнала. Затем индуцируются киназные и каспазные каскады, меняется работа ионных каналов, что запускает передачу сигналов ближайшим внутриклеточным медиаторам [90].

Подавление индукции с помощью экзогенно добавленных антиоксидантов не приводит к долговременным положительным изменениям. С учетом последних

научных исследований о редокс-сигнализации, устанавливается причина происходящего явления. Возвращаясь к транскрипционным факторам, следует помнить, что антиоксиданты блокируют их активацию, тогда как АФК, прооксиданты ее активируют. Поэтому при увеличении содержания АФК осуществляется индукция транскрипционных факторов, что приводит к синтезированию протекторных белков, среди которых важную роль занимают ферменты антирадикальной защиты. Вновь синтезированные в ответ на АФК-сигнал белки, в том числе ферментативные антиоксиданты, выполняют ингибирующее действие на транскрипционные факторы, и синтез белков прекращается. Поэтому сбалансированность антиоксидантов и прооксидантов в системе клетки делает возможным после приема АФК-сигнала активацию антиоксидантов только до необходимого для возмещения свободнорадикального сигнала уровня [219].

Низкие дозы АФК могут модулировать структуру белков и их функцию, активируя основные пути сигнальной трансдукции, приводящие к модуляции генной экспрессии. Оксиданты принимают активное участие в регуляции генной экспрессии в качестве вторичных мессенджеров, активируя ряд факторов транскрипции [43].

АФК играют важную роль на ранних этапах внутриклеточной сигнализации, получившей название редокс-сигнализации по начальному звену, чувствительному к изменению уровня свободнорадикального окисления [201].

Можно выделить основные роли свободнорадикального окисления в организме:

1. Образует активные формы кислорода.
2. АФК является разрушающим фактором при избыточной интенсификации свободнорадикального окисления.
3. АФК действуют как медиаторы в образовании сигнальных путей.

Таким образом, АФК принимают участие в основных регуляторных механизмах клетки организма, в частности, во внутриклеточной редокс-сигнализации, которая считается многокомпонентной системой сигнальной



трансдукции к клеточному ядру с вытекающим усилением трансляции и биосинтеза белков [43, 90].

### **1.2.2 – Роль активных форм кислорода в регуляции пролиферации**

АФК могут функционировать как «классические» вторичные мессенджеры: конкретный ответ зависит от типа клеток, большее количество АФК приводит к остановке деления клетки, а при дальнейшем увеличении концентрации АФК наблюдается её гибель. Низкие уровни АФК способствуют пролиферации и выживанию клеток [171].

Небольшое повышение АФК связано с началом и прогрессированием рака [139].

Изучение окислительного стресса (ОС) на клеточном уровне показало, что воздействие одного и того же окислителя на пролиферирующие клетки млекопитающих приводит к широкому спектру клеточных ответов, таких как пролиферация, дифференцировка, миграция и гибель клеток. Показано, что  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  в низких концентрациях стимулируют деление клеток за счет высвобождения арахидоновой кислоты и активации ДНК, что приводит к пролиферативным процессам в опухолевых клетках [171].

Повышение концентрации  $H_2O_2$  вызывает внутриклеточное снижение отношения GSH/GSSG и апоптоз [169]. Клетки могут утрачивать свою биологическую способность осуществлять клеточный цикл, что приводит к нерегулируемому клеточному росту и появлению злокачественных опухолей. Основной причиной является возникновение мутации в генах, продукты которых влияют на клеточную пролиферацию.

Внутриклеточные образования прооксидантов и антиоксидантов являются важным звеном в путях передачи как пролиферативных, так и апоптотических сигналов, поскольку активность многих транскрипционных факторов и компонентов киназных каскадов зависит от состояния SH-групп [142].

Известно, что регуляция клеточной пролиферации определяется контролем синтеза дезоксирибонуклеотидов. Ключевым ферментом этого анаболического пути является фермент S-фазы клеточного цикла – рибонуклеотидредуктаза, которая восстанавливает рибозу до дезоксирибозы [188].

Синтез дезоксирибонуклеотидов идёт с заметной скоростью только в тех клетках, которые вступают в S-фазу клеточного цикла и готовятся к синтезу ДНК и делению.

Дефицит антиоксидантов и возникновение ОС может явиться причиной опухолевой промоции. Так, при дефиците антиоксидантов прооксидантные вещества и внутриклеточные свободные радикалы могут стимулировать активность фосфолипаз и протеинкиназ, вызывать повышение внутриклеточного уровня кальция, мешать сигнальной трансдукции на уровне рецепторов и белков-посредников, индуцировать или подавлять экспрессию протоонкогенов, действию транскрипционных факторов и стимулировать клеточную пролиферацию [90].

Показано, что снижение апоптоза, высокая пролиферативная активность, лекарственная резистентность, иммортализация неопластических клеток опосредованы изменением метаболизма [209]. Основным сигналом такого изменения, возможно, является повышенное содержание АФК, которое приводит к изменению экспрессии генов.

В эксперименте И.В. Кондаковой и соавт. было отмечено снижение способности эритроцитов животных-опухоленосителей разлагать органические гидроперекиси [60].

Таким образом, способность антиоксидантных ферментов контролировать концентрацию радикалов позволяет АОС выступать в качестве регулятора пролиферации [171].

### **1.2.3 – Роль активных форм кислорода в механизмах клеточной гибели**

Существуют три основных типа клеточной смерти – апоптоз, аутофагия и некроз [187].

Механизм апоптоза сложный и включает два основных пути: митохондриальный (внутренний) и путь через рецепторы апоптоза (внешний). Оба пути приводят к активации каспаз и запуску каскада реакций, приводящих к гибели клетки [123, 132, 150].

Характерные признаки апоптоза проявляются в уменьшении размера клетки, уплотнении наружной и цитоплазматической мембраны без выхода содержимого клетки в окружающую среду, что позволяет избежать иммунной активации [129, 144].

В работе С.А. Борисовой, Е.М. Коломойцевой (2003) [19] отмечается, что апоптоз могут вызывать как внутриклеточные, так и внешние сигналы, опосредующие свое действие через рецепторные системы. Авторами применяется термин «регуляция апоптоза», поскольку известна группа физиологических активаторов и ингибиторов программированной клеточной гибели. Одни и те же стимулы могут подавлять и стимулировать указанный процесс: поддерживать выживание в одном типе клетки и включать программу самоубийства в других.

Обзор основных работ по вопросу о факторах, индуцирующих некроз, достаточно обширен. В исследованиях рассматриваются множество физических, химических, биологических факторов, вызывающих некроз [146, 210].

В работе Т.Г. Сазонтовой (2007) некроз рассматривается как процесс, повреждающий мембранные структуры. При этом повышается уровень свободного кальция, прямо активирующего протеазы и фосфолипазы, в результате чего происходит гибель клетки [90].

Считается, что некроз, в отличие от апоптоза, вовлекает в процесс участки располагающихся рядом клеток (Савицкая М.А. и др., 2015). При этом набухает цитоплазма и митохондрии, нарушается целостность наружного слоя мембраны. В ходе процесса активизируются лизосомальные ферменты, и это становится причиной того, что внутриклеточное содержимое, попадая во внеклеточную среду, способствует развитию воспаления [89.]

Аутофагия – естественный процесс, который утилизирует ненужные и дисфункциональные компоненты. Основная причина развития аутофагии —

наличие повреждённых органелл в цитоплазме, денатурации белков и их агрегатов [179].

Ответная реакция клетки на внешний сигнал зависит от прооксидантов и антиоксидантов. Выделяют несколько стадий развития клеточного ответа. Начальная стадия не связана с генетическим аппаратом, а носит исключительно регуляторный характер. Затем происходит активация сигнальных каскадов с передачей сигнала к ядру. В этом случае некоторые гены активируются, происходит синтез матричной РНК и соответствующих белков для улучшения работы в новых условиях [152].

Высокие концентрации АФК могут вызывать апоптотическую или некротическую гибель клеток и приводить к изменению редокс-статуса [177, 210]. Низкие концентрации АФК напрямую модулируют активность ядерных транскрипционных факторов и регулируют многочисленные каскады протеинкиназ, которые участвуют в регуляции перекрестных помех между аутофагией и апоптозом [147].

### **1.3 – Окислительный стресс**

В биологических мембранах свободнорадикальному окислению подвергаются преимущественно ненасыщенные жирные кислоты, содержащие изолированные двойные связи, расположенные через  $\text{CH}_2$ -группу. Свободный радикал от этой  $\text{CH}_2$ -группы легко отнимает электрон, превращая липид, содержащий эту кислоту, в свободный радикал [141].

Существует два пути образования перекисей липидов:

1. Первый – неферментативный – аскорбатзависимый путь, активируемый металлами с переменной валентностью [165].
2. Второй – ферментативный (НАДФН-зависимый) путь, протекающий преимущественно в эндоплазматическом ретикуломе [165].

При возрастании АФК отмечается срыв механизмов антирадикальной защиты, в результате развивается ОС, который проявляется как на клеточном,

тканевом, так и на организменном уровнях. Чрезмерная продукция органических перекисей, усиление процессов ПОЛ приводят к развитию неопластических процессов [14, 105].

Образование первичного продукта ПОЛ-ДК связано с окислением арахидоновой кислоты с перемещением двойной связи [113].

К вторичным продуктам относят алкенали, алканалялы, гидроксипалкеналялы, МДА, триеновые конъюгаты [116].

Диеновые и триеновые конъюгаты на последующей стадии окисления разделяются на альдегиды и кетоны. МДА является одним из продуктов, который сшивает молекулы липидов и понижает текучесть эритроцитарной мембраны. Диальдегиды и ряд других вторичных продуктов ПОЛ, взаимодействуя с N-концевыми остатками аминокислот, белков и аминокруппами фосфолипидов, образуют конъюгированные флуоресцирующие соединения основания Шиффа (ОШ). Непрерывное накопление ОШ дестабилизирует мембраны и способствует деструкции клеток [69].

ОС используется для обозначения широкой группы разнообразных взаимосвязанных явлений, включающих повышенную внутриклеточную генерацию АФК и окислительное повреждение молекулярных компонентов клетки [32, 36].

ОС определяется как дисбаланс между продукцией свободных радикалов и реактивных метаболитов, так называемых окислителей или АФК. Этот дисбаланс приводит к повреждению важных биомолекул и клеток, имеющих потенциальное воздействие на весь организм [143].

Резкое повышение уровня АФК вызывает изменение регуляторных процессов и экспрессию генов модифицируя сигнальные пути [118, 186, 234].

Так, сильный окислитель пероксинитрит и синглетный кислород, вступая в реакцию с остатками триптофана и тирозина в белках, способны тормозить их фосфорилирование с помощью тиразиновых и триптофановых киназ, что создает затруднение для физиологического функционирования внутриклеточных сигнальных систем [175].

В результате ОС может вызвать деструкцию мембран, повреждения ДНК, инактивацию деятельности ферментов и гормонов и в конечном итоге – гибель клетки [214, 216].

Сигналом для активации неспецифической адаптационной реакции на клеточном уровне является изменение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в активации ПОЛ в биологических мембранах и жидкостях [5, 14].

Таким образом, способность АФК изменять функционирование внутриклеточных регуляторных систем можно считать дополнительной, наравне с их прямым повреждающим действием [124].

АФК – высокорекреационные, способные к взаимопревращениям веществами, повышение уровня которых без адекватного изменения ёмкости АОЗ может привести к возникновению оксидативного стресса [43, 174].

Внутриклеточный уровень антиоксидантных ферментов находится под контролем генов. При повышении в клетке концентрации  $O_2$  или  $H_2O_2$  активируется транскрипция генов, запускающих синтез каталазы, ГР, СОД [50].

ОС обладает провоспалительным действием. Эта устойчивая воспалительная окислительная среда способна повредить здоровые соседние эпителиальные и стромальные клетки, и, если данное воздействие наблюдается в течение длительного времени, то оно может привести к формированию неоплазмы [202].

При воспалении тучные клетки и лейкоциты работают в месте повреждения, что приводит к «респираторному взрыву» из-за повышенного поглощения кислорода и, как следствие, к увеличению выброса и накоплению АФК в месте повреждения [54, 137, 170].

Боровская М.А. и соавт. считают интенсификацию процессов свободнорадикального окисления одним из разрушающих факторов, вызывающих характерные деструктивные нарушения мембраны эритроцитов [20].

Таким образом, АФК принимают участие в основных регуляторных механизмах клетки, в частности, внутриклеточной редокс-сигналикации, которая представляет собой многокомпонентную систему сигнальной трансдукции к

клеточному ядру с последующим усилением трансляции и биосинтеза белков. Редокс-сигнализация чувствительна к окислительно-восстановительному статусу, в том числе к уровню АФК [90].

Способность антиоксидантных ферментов контролировать уровень АФК позволяет АОС выступать в качестве регулятора пролиферации [171]. Пролиферация и гибель клеток должны быть точно контролируемы, поскольку дисбаланс в этой системе может приводить к патологическим изменениям всего организма, среди которых важное место занимает и канцерогенез [161].

Системе глутатиона, включающей GSH и ферменты, придается большое значение в процессах снижения уровня активных радикалов и эндогенных метаболитов, образующихся при окислительном стрессе [18, 35].

ПОЛ – нормальный физиологический процесс. В норме уровень продуктов ПОЛ невысок. Усиление продуктов ПОЛ является следствием образования АФК. Повышение уровня ПОЛ приводит к появлению ОС. В свою очередь ОС трактуется как универсальный неспецифический механизм возникновения опухолевого процесса [6, 197].

## **1.4 – Редокс-гомеостаз циркулирующей крови при патологии**

### **1.4.1 – Перекисное окисление липидов – антиоксиданты в эритроцитах и плазме крови при патологии**

Окислительный стресс является результатом дисбаланса между производством свободных радикалов и эффективностью системы антиоксидантной защиты клеток [208], провоцируя повреждения на уровне ДНК и клеточных мембранных липидов [183, 203]. АФК образуются в результате переноса электрона в процессе окислительного фосфорилирования при аэробном метаболизме [229], и их активность сбалансирована ферментативными и неферментативными антиоксидантами, действующими через различные механизмы. Эритроциты обладают эндогенными антиоксидантами, такими как

СОД, каталаза, GSH и GSH-родственные ферменты (ГР, ГТ, ГПО) для защиты клеток от АФК [192, 225].

Эритроциты содержат высокую концентрацию ПНЖК, молекулярного кислорода, ионов железа и очень восприимчивы к реакциям окисления [225]. Оксигемоглобин в эритроцитах является основной мишенью внутриклеточного АФК ( $H_2O_2$ ), что приводит к реакциям автоокисления [189].

Другим важным окислительным процессом в эритроцитах является перекисное окисление липидов, в результате которого происходит окислительное разрушение ПНЖК, что приводит к изменению стабильности мембран, разрушению мембранных транспортных белков и дезактивация мембранных ферментов [225]. Окислительный стресс ускоряет старение, повышает скорость эритроптоза и, следовательно, сокращает продолжительность жизни эритроцитов.

При нарушении работы тиол-зависимой системы возможно нарушение цитоархитектоники эритроцита, связанное с увеличением продуктов ПОЛ. Активация ПОЛ ведет к глубоким нарушениям мембранной структуры, к образованию липид-липидных и липид-белковых межмолекулярных «сшивок», что вызывает изменения физико-химических свойств липидного матрикса, пассивной ионной проницаемости мембраны. При активации ПОЛ отмечается пассивная проницаемость мембраны для ионов калия и натрия и нарушается осмотический баланс в эритроцитах, что вызывает снижение продолжительности жизни красных клеток [31, 172].

В процессе микровезикуляции происходит необратимое уменьшение поверхности эритроцита за счет удаления поврежденных участков цитоплазматической мембраны. Активация ПОЛ усиливает этот процесс. На поверхность клетки выходят мембранные фосфолипиды с тромбопластиновой активностью. Фрагменты мембраны эритроцитов и гемолизированные формы в кровотоке повышают внутрисосудистое свертывание крови [41].

В результате изменения функциональной активности белков и функционирования мембран-рецепторного комплекса повреждаются мембраны эритроцитов, усиливается доступность для протеиназ и фосфолипаз [68, 91, 112].



Белки плазмы крови способны предотвращать гемолиз эритроцитов, возникающий в результате активации ПОЛ. Плазма крови обладает мощным АО-потенциалом [128].

Данные литературы об уровне активности ферментов системы ПОЛ-АОЗ и системы глутатиона достаточно противоречивы. Так, было установлено, что активность ГПО и ГТ в плазме крови у больных II и III стадии развития миеломы снижалась, а активность каталазы была высокой. Уровень МДА в плазме крови был близок к норме, что, как полагают авторы, указывает на подавление ферментативной активности антиоксидантной системы. Параллельно уровень GSH в эритроцитах был снижен, это наиболее выражено на поздних стадиях заболевания. Активность ГПО и каталазы в динамике развития миеломы была выше, чем в контроле. Активность СОД и ГТ снижалась, уровень МДА в эритроцитах также снижался на II и III стадии развития миеломы [96].

Рост альвеолярной карциномы у крыс приводил к снижению уровня неферментативных компонентов АОС в эритроцитах [97]. Об изменении активности каталазы и СОД и снижении уровня неферментативных компонентов АОС у женщин с раком молочной железы свидетельствуют данные [176].

При раке тела матки в эритроцитах крови отмечено повышение активности ГР и каталазы [32].

В исследованиях О.С. Вороновой (2012) [29] установлено, что активность СОД и каталазы в эритроцитах достоверно увеличивается на 20-е сутки роста экспериментальной опухоли, а на 30-е сутки снижается. Активность ГТ и ГР в эритроцитах снижается на всех стадиях роста опухоли, увеличивается содержание продуктов МДА и нарушения функционирования компонентов АОС. По данным А.В. Марусина (2002), интегральная антиоксидантная активность плазмы крови, определяемая по оригинальной авторской методике, зависела от локализации опухоли и возраста пациента [70].

В работе И.А. Горошинской (2013) при раке яичников у пациенток в состоянии ремиссии отмечается повышение производных белков нейтрального и основного характера в плазме крови и активности фермента каталазы. При

прогрессировании заболевания показатели окислительного статуса крови изменяются однонаправлено [53].

При раке эндометрия и раке легкого в эритроцитах отмечается снижение активности ГТ [29, 63, 98], а при раке шейки матки и раке яичников – увеличение ГТ [9, 104].

По данным одних авторов при неоплазме различной локализации [1, 59, 93, 104, 114, 227] активность фермента СОД и каталазы в эритроцитах снижается. По мнению других авторов [28, 29, 120, 199], активность ферментов повышается.

Активность ГПО снижается в эритроцитах у больных раком шейки матки, раком желудка, раком легкого [25, 63, 160]. Усиление активности ГПО отмечается у больных раком эндометрия и рака яичников [98, 104].

Снижение уровня GSH в эритроцитах отмечалось также у больных со злокачественными образованиями различной локализации [16, 63, 96, 98].

Отмечается повышение GSH и GSSG в эритроцитах крыс в эксперименте на ранних стадиях развития гепатомы Морриса 5123 [127], повышение уровня GSH при раке яичников и экспериментальной лимфосаркоме Плисса [28, 104] и снижение окислительно-восстановительного статуса глутатиона в эритроцитах мышей с опухолью Эрлиха [190].

Данные об активности каталазы в плазме крови также противоречивы. Повышение уровня МДА показано при асцитной опухоли яичников [11, 59], раке шейки матки, раке тела матки и рака яичников [59, 93, 184, 199], повышение уровня ДК при раке молочной железы [80], раке эндометрия [98].

Таким образом, основные функции, выполняемые АОС в организме, заключаются в следующем:

- ограничение интенсивности реакции окисления свободных радикалов и перекисного окисления;
- защита молекул биомембран от окислительного повреждения;
- защита внутриклеточных структур от воздействия свободных радикалов и перекисного окисления;

– восстановление молекулярных повреждений, возникших после окисления [88].

В случае недостаточной антиоксидантной системы плазмы крови свободные радикалы атакуют эритроцитарную мембрану извне и внутри, что приводит к образованию значительного количества АФК. В целом, основная задача АОС состоит в предотвращении развития патологических состояний, вызываемых окислительными повреждениями структур организма [46]. В литературе представлены противоречивые данные об активности компонентов ферментативного звена АОС и системы глутатиона, как в эритроцитах, так и в плазме крови.

### **1.5 – Окислительная модификация белков**

Радикал  $\text{OH}^\cdot$  способен провоцировать агрегацию белков, а в паре с супероксиданион радикалом вызывать фрагментацию. Под влиянием АФК в процессе агрегации белков появляются тетрамеры, тримеры и димеры. Процесс разделения белка под действием радикала  $\text{OH}^\cdot$  или супероксиданион радикала происходит благодаря отщеплению водорода от карбоксильной группы аминокислот с помощью  $\text{OH}^\cdot$  с последующим появлением перекисных соединений. Взаимодействие с супероксиданион радикалом или  $\text{O}_2$  в 98% случаев сопровождается образованием низкомолекулярных фрагментов. Комбинация  $\text{OH}^\cdot$  и супероксиданион радикала способна изменять как первичную, вторичную, так и третичную структуры белков.

По мнению исследователей [48], одним из ранних показателей токсической деятельности АФК считается окислительная модификация одного из 240 ферментов под действием свободных радикалов. Интенсивность ОМБ определяется особенностями аминокислотного состава белка.

В настоящее время показано, что усиление редокс-зависимой модификации белков наблюдается при различных патологических процессах [43, 226]. В отличие от продуктов ПОЛ производные белков крови гораздо более специфичны,

что делает их перспективным маркером оценки карбонильного стресса и позволяет использовать в диагностике различных патологий и, в частности, при злокачественных опухолевых заболеваниях [16].

При окислении белков в них образуются альдегидные и кетонные группы аминокислотных остатков (карбонильные группы) [22, 52, 130, 158]. При действии ОН<sup>•</sup> образуются крупные белковые агрегаты, при действии ОН<sup>•</sup> в купе с супероксидными анионами – низкомолекулярные фрагменты, способствующие нарушению нативной конформации белков [73].

Предложены два механизма ОМБ:

1) конъюгация липидных пероксидов с аминокислотными остатками в белках [162];

2) окисление АФК с образованием карбонильных производных белков.

Последние при этом гораздо стабильнее и специфичнее и образуются при металл-катализируемом окислении белков.

Металл-катализируемое окисление – это специфический процесс, реализующийся в области металл-связывающей поверхности белка, где и происходит модификация аминокислотных остатков. Модификация белков по металл-зависимому механизму возможна в случае простых белков – при наличии металл-связывающей поверхности; а в случае сложных белков, имеющих в качестве простетической группы металл переменной валентности, – при условии доступности данного участка для пероксида водорода [43].

ОМБ сопровождается изменением структуры аминокислотных остатков и функций белков в целом. В процессе окислительной модификации белки способны менять молекулярную массу, что сопровождается процессами агрегации или фрагментации белковых молекул. Преобладание тех или иных процессов зависит от наличия определенных свободных радикалов. Окислительное повреждение белков может быть, как обратимым, так и необратимым процессом. Необратимое окисление белков приводит к утрате их биологических свойств, а в дальнейшем – к агрегации или деградации. Агрегация белковых молекул происходит за счет белок-белковых взаимодействий или образования ковалентных

связей, т. е. любой аминокислотный радикал одной полипептидной цепи способен взаимодействовать своими гидрофобными остатками с аминокислотными радикалами другой полипептидной цепи, образуя сшивки. Образование битиризиновых сшивок между отдельными молекулами белков считается одной из основных причин агрегации белка [43].

Устранение модифицированных белков осуществляется с помощью протеаз и протеасом. Модификация белков делает их более чувствительными к процессу ферментативного разложения, катализируемого протеолитическими ферментами. Одной из гипотез, предложенных для объяснения накопления измененных белков, является снижение активности протеасом [154, 196, 223].

Основной результат карбонилового стресса – гликирование и гликоокисление белков под действием активных карбонильных соединений, в том числе МДА [115].

Ряд экспериментальных исследований свидетельствует, что ОМБ – один из маркерных тестов, чувствительных к изменению степени проявлений окислительного стресса [16, 40, 53, 77, 78, 101, 235]. Отмечается повышение содержания карбонильных групп в плазме крови у животных с лимфосаркомой Плисса, больных раком мочевого пузыря, рака легкого, рака яичников, рака шейки матки, острых и хронических лейкозах, колоректальном раке, злокачественном новообразовании эпителиальной ткани [16, 40, 53, 55, 77, 100, 205, 235]. В сыворотке больных неходжкинской лимфомой отмечается усиление ОМБ [181].

Усиление ОМБ в плазме крови может быть связано с риском возникновения рака молочной железы [213].

Инактивация белков усугубляется из-за формирования связей с вторичными продуктами ПОЛ, вследствие чего снижаются функциональные возможности клеток [84].

Таким образом, окисленные производные белков являются надежным маркером карбонилового стресса и способны улавливать от 50 до 75 % свободных радикалов [43]. На сегодня четко определено, что одним из ранних маркеров возникновения карбонилового стресса является ОМБ. В литературе представлены

данные об усилении уровня ОМБ в плазме крови при опухолевых процессах различной локализации в эксперименте и клинике. Однако, нет единой точки зрения об уровне продуктов ОМБ в динамике развития неоплазмы. Данные ОМБ в эритроцитах при опухолевых процессах немногочисленны.

### **1.6 – Архитектоника эритроцитов циркулирующей крови в организме-опухоленосителе**

Одна из существующих моделей организации клеточной мембраны (Даусон и Даниэли) постулирует, что основой мембраны является билипидный слой, а обе поверхности слоя покрыты сплошными слоями белков. Белки мембран способны влиять на липиды, меняя молекулярную упорядоченность. При этом они обеспечивают транспорт молекул внутрь клетки и из нее, а также выступают в роли рецепторов для принятия и преобразования из внешней среды химических сигналов, также определяют механические и морфологические особенности клетки. Белковые молекулы принимают участие в формировании мембранного скелета. По степени влияния на структуру бислоя и силе взаимодействия с ним белки мембран эритроцитов разделяются на периферические и интегральные. Характер липидно-белковых взаимодействий в мембране эритроцитов определяет реализацию специфических мембранассоциированных процессов, в том числе и транспорт ионов [140].

Мембрана эритроцитов содержит набор ферментов гликолиза, пентозофосфатного цикла, системы глутатиона, адениловой системы для реализации анаэробного пути усвоения энергии и является важнейшим компонентом АОС организма [107].

Форма эритроцитов зависит от состояния спектрина – это белок, который формирует структурную сетку и играет важную роль в поддержании целостности клеточной мембраны и структуры цитоскелета. Мутации гена спектрина обычно вызывают наследственные изменения формы эритроцитов, включающие наследственный эллиптоцитоз и наследственный сфероцитоз. Вторым белком

эритроцитов представляет собой анкирин – мембранный периферический белок, который связывает примембранный актин-спектриновый цитоскелет с интегральными мембранными белками. Анкирин соединяет трансмембранный белок полосы 3 со спектрином.

Основные функции эритроцитов включают:

- участие в переносе газов и биологически активных соединений;
- участие в регуляции кислотно-щелочного равновесия, ионном равновесии плазмы, водно-солевом обмене организма;
- участие в формировании иммунитета;
- влияние на образование тромбопластина.

В норме у половозрелых крыс в периферической крови преобладают дискоциты. Они составляют 90,4 % от общего числа эритроцитов. Даже в норме в периферической крови крыс имеется определенное число патологических форм эритроцитов. Чаще всего встречаются эхиноциты – в 7,6 % случаев.

Другой патологической формой являются эритроциты с гребнем. Их число у млекопитающих животных и людей без признаков патологии обычно бывает незначительным и составляют всего 0,5 %.

Следующей патологической формой эритроцитов являются стоматоциты, которые составляют 1,0 % [117].

Структурно-функциональная характеристика форм эритроцитов была представлена в классификации Г.И. Козинца (2001), согласно которой клетки с признаками эхиноцитарной трансформации относят к обратимо деформированным, а куполообразные эритроциты, сфероциты с гладкой поверхностью, сфероциты с шипиками на поверхности, эритроциты в виде «спущенного мяча» – к необратимо деформированным формам. В основном, трансформация выражается в двух видах. Образование выростов клеточной мембраны приводят к эхиноцитарной трансформации. Формирование инвагинации мембраны клетки вызывает стоматоцитарную трансформацию [59].

При всех начальных вариантах трансформации возможно восстановление эритроцитов в дискоциты после прекращения действия факторов, вызвавших сдвиги тех или иных параметров организма [155].

Отрицательное осмотическое давление внутри клетки эритроцита способствует поддержанию нормальной формы (дискоцита) [106].

Высокое отношение площади поверхности к объему позволяет молекуле гемоглобина находиться близко к поверхности, что обеспечивает высокую скорость газообмена [109].

Эхиноциты утрачивают цитоплазматическую мембрану путем отшнуровывания наружных выростов мембраны. В стоматоцитах происходит инвагинация цитоплазматической мембраны внутрь клетки. Потеря мембранного вещества приводит к необратимой трансформации эхиноцита в сфероцит [117].

Главным фактором, определяющим способность эритроцитов выполнять их функции, а также способствующим выживанию эритроцитов, является их способность деформироваться.

Двоковогнутая форма нормального эритроцита связана с избытком поверхности эритроцита относительно его объема. Это дает возможность изменять форму при прохождении ими узких участков. Сокращение поверхности эритроцита приводит к уменьшению его способности деформироваться, он становится ригидным. При старении эритроцит теряет липиды мембраны. Причиной изменения способности деформироваться, возможно, является изменение уровня обменных процессов в эритроците. Было показано, что уменьшение аденозинтрифосфата (АТФ) приводит к изменению способности к деформации тканей эритроцитов. Содержание АТФ уменьшается в эритроците с возрастом клетки [33].

Возможные пути влияния АТФ на форму и деформируемость эритроцитов следующие:

1. Структурные изменения мембран при воздействии АТФ.
2. Изменение активности мембранных аденозинтрифосфатаз.
3. Изменение уровня фосфорилирования мембранных белков.



#### 4. Изменение метаболизма клеточных липидов.

Возрастание количества изменённых форм эритроцитов с нарушениями архитектоники отмечаются при раке опухоли головы и шеи, рака желудка, рака легкого [72; 102].

Наиболее полные данные о структуре эритроцитов получены с использованием АСМ [85, 195, 227].

Изучение фиксированных препаратов в воздушной среде позволяет отказаться от использования жестких методов фиксации (в отличие от электронной микроскопии) и тем самым минимально травмировать клетки или изменять конформацию биомолекул [85].

Принцип работы АСМ основан на сканировании площади поверхности образца острой иглой. При исследовании на воздухе биологического материала основную роль в силовом взаимодействии образца и зонда выполняют силы отталкивания, вызванные механическим контактом образца и зонда – силы Ван-дер-Ваальса.

Со стороны зонда при воздействии на достаточно мягкий образец и со стороны образца на зонд действует сила упругой деформации. Поскольку зонд движется над поверхностью, свой вклад во взаимодействие вносит сила трения. Информация, полученная от образца, хранится в виде двумерной матрицы, которая может быть трансформирована как в 2D-, так и в 3D-изображение. Использование 3D-изображений, полученных методом АСМ, позволяет определять линейные параметры (длину, ширину, высоту) биологических объектов с высокой точностью [85].

Таким образом, основными преимуществами метода АСМ в исследовании биообъектов является высокое разрешение, простота пробоподготовки, определение морфометрических параметров, изучение объектов в нативной для них среде (в растворе), исследование вязкоупругих, зарядовых, гидрофобных свойств объектов.

Деформируемость эритроцитов способствует формированию адекватного потока кислорода в ткани. Гипоксия содействует перераспределению

использования кислорода с оксидазного пути на оксигеназный. Возникает порочный круг: снижение деформируемости эритроцитов ухудшает транспорт кислорода в ткани, его полноценную утилизацию в тканях, что вызывает дальнейшее повышение ригидности мембран эритроцитов. Очевидно, деформируемость эритроцитов является не только важным фактором транспорта молекулы кислорода в ткани, но и механизмом, влияющим на продуктивность функционирования антиоксидантной защиты и поддержание прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме [52, 130].

На изменение эластичности эритроцитарной мембраны влияют состояние мембранных фосфолипидов, которые определяют ее функциональные свойства, активность ферментов и метаболизм клетки в целом. Увеличение концентрации ПНЖК ведет к снижению микровязкости, уменьшению плотности упаковки липидов, что вызывает усиление деформируемости мембран. Уменьшение плотности упаковки липидов ведет к снижению текучести, характеризующейся уменьшением деформирующей способности мембран, повышая хрупкость клеток [2].

Возникновение и развитие неопластических процессов сопровождается нарушениями в эритроцитах организма-опухоленосителя различной степени выраженности. Следствием напряжения эритроидного ростка кроветворения при этом является декомпенсация эритропоэза, изменение функционального состояния мембран эритроцитов, нарушение реологических свойств крови. В результате возникают явления тканевой гипоксии, что также утяжеляет течение неопластического процесса в организме [72].

Изменение цитоархитектоники эритроцитов приводит к изменению микроциркуляторной функции в организме [17, 34, 164].

Почти у каждого второго ракового больного отмечается развитие анемии. Частота развития анемии зависит от локализации опухоли и стадии развития опухолевого процесса. Тяжёлые формы анемии чаще регистрируются на распространённой стадии развития опухолевого процесса [38, 133, 135].

Таким образом, неопластические состояния сопровождаются избыточным образованием АФК. Существует антиоксидантная система, которая способна предотвращать повреждения клеточных структур снижая концентрацию свободных радикалов. В случае недостаточной активности антиоксидантной системы свободные радикалы атакуют мембрану эритроцита, что приводит к нарушению цитоархитектоники эритроцитов, и к дальнейшему образованию АФК [82, 217, 232].

Работы по изучению и анализу морфологии с использованием световой микроскопии и ригидности эритроцитов с использованием АСМ единичны.

## ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационная работа выполнена в ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» (УлГУ): научные исследования проведены на кафедре физиологии и патофизиологии Института медицины экологии и физической культуры (ИМЭиФК УлГУ), в Научно-исследовательском медико-биологическом центре ИМЭиФК УлГУ, в лаборатории сканирующей зондовой микроскопии научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы УлГУ, в Ульяновском областном клиническом онкологическом диспансере.

### 2.1 – Объект исследования

Объектом исследования послужили эритроциты периферической крови первичных больных: 25 больных раком яичников (РЯ), находившихся на лечении с 2015-2017 гг. в гинекологическом отделении Ульяновского областного клинического онкологического диспансера.

Подбор пациенток проводили по строго определённым критериям:

- III стадия по FIGO;
- T3cN<sub>0-1</sub>M<sub>0</sub> стадия по TNM;
- гистотип опухоли первичной – серозная цистаденокарцинома;
- степень дифференцировки – умеренно дифференцированная.

При поступлении у всех больных изучался анамнез: выяснялось время заболевания; первые симптомы и жалобы; обращалось внимание на состояние менструальной и детородной функции; отмечались перенесённые гинекологические заболевания и характер их лечения; наследственность и наличие бытовых вредностей. В дальнейшем пациентки подвергались клинко-лабораторному обследованию, включающему: общий анализ крови, мочи,

биохимические показатели крови, коагулограмму уровень маркера СА-125, УЗИ органов малого таза и брюшной полости, осмотр анестезиолога.

**Таблица 1 – Распределение больных РЯ III стадии заболевания по возрасту**

Исследуемая группы	Число больных	Возраст больных, лет		
		40-49	50-59	60-69
РЯ III стадии	25	8 (32%)	10 (40%)	7 (28%)
Контрольная группа	25	9 (36%)	9 (36%)	7 (28%)

**Таблица 2 – Распределение больных РЯ по сопутствующим заболеваниям**

Сопутствующие заболевания	Число больных
Артериальная гипертензия	20 (80%)
Хронический холецисто-панкреатит	18 (72%)
Хронический гастрит	25 (100%)
Хронический пиелонефрит	5 (20%)
Хронический бронхит	2 (8%)
Язвенная болезнь желудка и 12 перстной кишки	2 (8%)

При осмотре оценивали общее состояние больной в 0–2 балла по шкале Eastern Cooperative Oncology Group, проводилась пальпация живота, обращали внимание на наличие асцита и опухолевых образований, их размеры, подвижность и болезненность. При наличии неподвижной опухоли для уточнения распространённости процесса выполнялась спиральная рентгеноконтрастная компьютерная томография органов грудной, малого таза и брюшной полости.

В контрольную группу вошли 25 соматически здоровых женщин. Информированное письменное согласие было получено у соматически здоровых и больных лиц. Исследование когортное, проведено согласно требованиям комиссии по этике Института медицины, экологии и физической культуры ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» (протокол № 3 от 15.03.2015).

Исследования также проводились на нелинейных половозрелых белых крысах-самцах массой 180-200 гр, содержащихся условиях вивария (температура 22-24<sup>0</sup>С, относительная влажность воздуха 40-50 % с естественным световым режимом на стандартной диете лабораторных животных в соответствии с ГОСТ Р 50258 92 1993, с соблюдением правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ, регламентированных СанПиН 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» и ГОСТ: ГОСТ 33215-2014 «Правила оборудования помещений и организации процедур при работе с лабораторными животными»; ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами», а также руководствуясь принципами Директивы Европейского Союза 2010/63/ EU. Протокол экспериментальной части исследования согласован с Региональным этическим комитетом (Протокол № 109-2010 от 29 января). Протокол экспериментальной части исследования согласован с этическим комитетом Института медицины, экологии и физической культуры ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» (Протокол № 4 от 10.04.2014 г).

Критерии исключения животных из эксперимента включали в себя: отказ от пищи в течение 2 суток, резкая потеря веса, подвижности.

## **2.2 – Характеристика экспериментальной асцитной опухоли яичников**

Штамм асцитной опухоли яичников (АОЯ) был получен из НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва). Трансплантируемая АОЯ была получена Е.Е. Погосянц,

Е.Л. Пригожиной и Н.Л. Еголиной в 1962 году. Изначально опухоль была обнаружена у одной из крыс Вистар, которые получали во время беременности и лактации дозы 7,12-диметилбенз[ $\alpha$ ]антрацена [86]. Формирующаяся при подкожном введении экспериментальная неоплазма редко вызывает развитие перитонеального карциноматоза и асцита, что характерно для клинической картины заболевания у человека [125]. В случае если опухолевые клетки вводят интраперитонеально, они повторяют процесс диссеминации, характерный для распространения асцитических клеток.

Исходный гистологический тип опухоли – метастазирующая папиллярная аденокарцинома, в настоящее время – асцитная опухоль. Прививаемость – 90-100 % при внутрибрюшинном способе перевивки. Прогрессирование данного типа опухоли проходит в 3 фазы: логарифмическая (с 4-х суток после перевивки), стационарная (с 8-х суток после перевивки), терминальная стадия (с 13-х суток после перевивки)

Асцитическую жидкость (АЖ), содержащую необходимое количество опухолевых клеток для развития асцитной опухоли, получали следующим образом: кожу живота крысы с АОЯ обрабатывали спиртом, иглой среднего диаметра осторожно прокалывали кожу и брюшную стенку, после чего в шприц набирали АЖ. Затем готовили разведение жидкости в соотношении 1:1 – к 0,5 мл асцита (АЖ с  $3,5 \times 10^7$  опухолевых клеток в каждой дозе) добавляли 0,5 мл среды 199 с солями Хенкса, с глутамином и перевивали животным экспериментальной группы.

### **2.3 – Схема исследования**

Схема исследования представлена в таблице 3.

**Таблица 3 – Схема научного исследования**

Определяемые параметры	Биохимические показатели	Морфологические показатели	
		Атомно-силовая микроскопия	Световой микроскоп
Объект исследования			
Животные контрольной группы n=62	СОД, каталаза, ГПО, ГР, ГТ, GSH, GSH/GSSG, МДА, ДК, КД, ОШ, ОМБ, Нб в гемолизате эритроцитов. Каталаза, ГТ, GSH, GSH/GSSG, МДА, ДК, КД, ОШ, ОМБ в плазме крови, эритропоэтин в плазме крови	Топология, боковое сечение профиля и изображение в 3D, процентное распределение эритроцитов по форме, ригидность эритроцитов	Количество эритроцитов и ретикулоцитов. Индекс трансформации (обратимая, необратимая) эритроцитов
Животные с АОЯ 8-12 сутки (стационарная фаза) n=64			
Животные с АОЯ 13-17 сутки (терминальная фаза) n=64			
Периферическая кровь (контрольные доноры) n=25		Топология, боковое сечение профиля и изображение в 3D, процентное распределение эритроцитов по форме, ригидность эритроцитов	Количество эритроцитов и ретикулоцитов. Индекс трансформации (обратимая, необратимая) эритроцитов
Периферическая кровь больных РЯ n=25			

#### 2.4 – Методы исследования

Для оценки состояния процессов ПОЛ в гемолизате эритроцитов и в плазме крови определяли продукты липопероксидации ДК, кетодиены (КД), ОШ, МДА и продукты ОМБ. О функционировании АОС в эритроцитах судили по активности СОД, каталазы, ГТ, ГР, ГПО, уровня GSH и GSH/GSSG. В плазме крови исследовали активность каталазы, ГТ, уровня GSH и GSH/GSSG. Забор крови осуществляли после декапитации наркотизированных (тиопентал натрия) животных в пробирки с гепарином, ЭДТА. Эритроциты отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. Эритроцитарную массу трижды отмывали холодным раствором 0,9 % NaCl. Для получения гемолизата



приливали 10 мл дистиллированной воды к 0,1 мл отмытых эритроцитов (осмотический гемолиз).

Исследование гематологических параметров крови проводилось на гематологическом анализаторе Mindray BC 3600 в Ульяновском областном клиническом онкологическом диспансере.

Исследование морфологии эритроцитов осуществлялось с использованием светового иммерсионного микроскопа Nikon Eclipse E 200. Исследование архитектоники, топологии, и ригидности мазков в крови проводилось в лаборатории сканирующей зондовой микроскопии научно-исследовательского технологического института Ульяновского государственного университета с использованием ACM Solver P47 Pro (NT-MDT, Зеленоград, Россия).

## **2.4.1 – Биохимические методы**

### **2.4.1.1 – Методы определения активности перекисного окисления липидов**

Интенсивность ПОЛ в гемолизате эритроцитов и плазме крови оценивали по уровню ДК, КД, ОШ (232, 278 и 400 нм) в гептановом экстракте (И.А. Волчегорский, 1989).

В 0,1 мл гемолизата эритроцитов или плазмы крови добавляли смесь изопропилового спирта и гептана в соотношении 1:1, экстрагировали липиды при активном встряхивании в течение 15 минут. После центрифугировали при 7 тыс. об/мин добавляли смесь изопропилового спирта и гептана в соотношении 3:5. Затем добавляли 2 мл 2М HCl для четкого разделения фаз и фотометрировали верхнюю гептановую фракцию при 220 нм (изолированные двойные связи), 232 нм (ДК), 278 нм (КД), 400 нм (ОШ).

Измерение оптической плотности (E) производили на спектрофотометре Genesys 10 SUV-Vis Thermo Scientific (США).

Концентрация ДК, КД, ОШ в гемолизате эритроцитов и плазме крови определяли по формулам

$$\text{ДК} = E232/E220, \quad (1)$$

$$\text{КД} = E278/E220, \quad (2)$$

$$\text{ОШ} = E400/E220, \text{ где} \quad (3)$$

где ДК – диеновые конъюгаты

КД – кетодиены

ОШ – основания Шиффа

Результаты выражались в ед.опт.пл/гр Нв для гемолизата эритроцитов и ед.опт.пл/мл для плазмы крови.

Уровень МДА в гемолизате эритроцитов и плазме крови оценивали по методу Л.И. Андреевой (1988) [4] при помощи цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК).

К 0,3 мл гемолизата эритроцитов или плазмы крови добавляли 1 мл 0,6 % раствора ТБК и 3 мл 1 % раствора ортофосфорной кислоты. Затем пробирки находились в кипящей водяной бане в течение 1 часа. По истечении часа пробирки охлаждали и добавляли 4 мл бутанола и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Плотность верхней фазы измеряли при длине волны 535 нм ( $E_{on}$ ) на спектрофотометре Genesys 10 SUV-Vis Thermo Scientific (США).

Содержание продуктов в плазме крови рассчитывали следующим образом:

$$A = \frac{E_{on} \times 10^6 \times 4 \text{ мл}}{1,56 \times 10^5 \times \frac{\text{л}}{\text{моль} \times \text{см}} \times 1 \text{ см} \times 0,3 \text{ мл}}, \quad (4)$$

где А – уровень МДА;

4 мл – объем бутанола;

300 мкл – количество пробы, использованной для определения;

$1,56 \times 10^5$  л/(моль×см) – молярная экстинкция МДА.

Содержание продуктов в эритроцитах рассчитывали по формуле

$$A = \frac{E_{on} \times 10^6 \times 4 \text{ мл}}{1,56 \times 10^5 \times \frac{\text{л}}{\text{моль} \times \text{см}} \times 1 \text{ см} \times 0,3 \text{ мл}} \times 10, \quad (5)$$

где  $A$  – уровень МДА;

4 мл – объем бутанола;

300 мкл – количество пробы, использованной для определения;

$1,56 \times 10^5$  л/(моль $\times$ см) – молярная экстинкция МДА.

Результаты выражались в мкмоль/гр Hb и мкмоль/л.

Содержания продуктов ОМБ в гемолизате эритроцитов и плазме крови оценивалось при 346, 370, 430, 530 нм относительно мочевины на спектрофотометре Genesys 10 SUV-Vis Thermo Scientific (США) по методу Levine R.L. (1990) [179] в модификации Е.Е. Дубининой (2006) [43]. К 0,1 мл гемолизата эритроцитов или плазмы крови приливали 0,1 М 2,4-динитрофенилгидразина и инкубировали в течение 1 часа. Затем осаждали белки с добавлением 20 % трихлоруксусной кислоты, центрифугировали при 3000 об/мин, удаляли супернатант и трижды промывали осадок смесью этанола и этилацетата (1:1) с целью удаления непрореагировавшего 2,4-динитрофенилгидразина и примесей липидов. Подсушенный осадок растворяли в 2,5 мл 8 М мочевины.

Полученные результаты для гемолизата эритроцитов выражались в мкмоль/гр Hb; в плазме крови – на 1 мг белка.

#### **2.4.1.2 – Методы определения активности ферментативного звена антиоксидантной системы**

##### *Определение активности СОД (К.Ф. 1.15.1.1)*

Метод оценки активности СОД в биологическом материале основан на способности конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидный анион по методу Дубининой Е.Е., 1989; Nishikimi M., 1972 [42, 193]. Эти анионы образуются в результате аэробного взаимодействия восстановленной формы НАДН<sub>2</sub> с феназин-метасульфатом. В результате этой реакции нитросиний тетразолий восстанавливается с образованием гидразина тетразолия. В присутствии СОД процент восстановления нитросиния тетразолия уменьшается.

Эритроциты разводили с помощью 0,05 М трис-НСЕ буфера в 10 раз - 1:9. К 1 мл эритроцитарной взвеси добавляли 500 мкл смеси хлороформа и этилового спирта (1:2) и 600 мг  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и растирали на льду 10-15 мин. Центрифугировали на холоде при температуре  $-4\text{ }^\circ\text{C}$  при 7000 об/мин в течение 15 мин. Полученный супернатант в количестве 0,1 мл переносили в пробирки и добавляли 3 мл фосфатного буфера содержащий 0,264 мг этилендиаминтетрауксусную кислоту, 3,33 мг нитросиний тетразолий, 0,550 мг феназин-метасульфат, затем смотрели на приборе при длине волны 540 нм, добавляли 0,1 мл  $\text{NADH}_2$ . После инкубации в термостате в течение 10 мин снова осуществляли проверку на спектрофотометре Genesys 10 SUV-Vis Thermo Scientific (США).

Расчет активности СОД в эритроцитах проводили по формулам :

$$\begin{aligned} T\% &= (E_{\text{ст}} - E_{\text{оп}}) / (E_{\text{ст}} - E_{\text{реак}}), \\ A &= (T\% / 100 - T\%) / 50. \end{aligned} \quad (6)$$

Полученные результаты выражались в усл.ед./гр Нв.

#### *Определение активности каталазы (К.Ф. 1.11.1.6)*

Интенсивность утилизации  $\text{H}_2\text{O}_2$  определяли по скорости снижения экстинкции при 260 нм на спектрофотометре Genesys 10 SUV-Vis Thermo Scientific (США) против 5 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) (Карпищенко А.И., 1999) [57].

К 2,5 мл 0,3 % раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$  добавили 200 мкл гемолизата эритроцитов или плазмы крови. Инкубировали 10 минут при комнатной температуре, затем реакцию останавливали путём внесения 0,3 мл 50 % раствора ТХУ. Параллельно контрольным пробам обрабатывали опытные. Активность каталазы оценивали по разнице экстинкции в контрольных и опытных группах по формуле

$$A = \frac{\Delta E \times V_{\text{р.с.}} \times 10^3 \times 10}{V_{\text{пр}} \times l \times \varepsilon \times t}, \quad (7)$$

где А – активность фермента;

$\Delta E$  – разность экстинкции контрольных и опытных проб;

$V_{p.c.}$  – реакционная смесь;

$V_{np}$  – количество образца;

$l$  – длина оптического пути;

$\varepsilon$  – молярный коэффициент светопоглощения;

$t$  – время инкубации.

Результаты выражались в ммоль/мин/гр Нб и ммоль/мин/л.

#### *Определение уровня ГПО (К.Ф. 1.11.1.9)*

ГПО (глутатион: перекись водорода – оксидоредуктаза) катализирует реакции восстановления молекул  $H_2O_2$  органических гидропероксидов до гидросоединений при использовании несколько молекул GSH.

Данный метод основан на способности фермента ускорять реакцию расщепления гидроперекиси трет-бутила (ГПТБ), используя восстановленный глутатион. Активность фермента определяют в реакции с 5,5-дитио-бис-нитробензойной кислотой (ДТНБ) (Карпищенко А.И., 1999) [57].

0,2 мл гемолизата эритроцитов смешивали со сложным буфером (78 мг азида натрия, 100 мг GSH в 100 мл 0,1 М трис-НСЕ буфера с 0,01 % ЭДТА и рН 8,5). Реакцию запускали с помощью 75 мкл 0,14 % раствора ГПТБ. По истечении 5 минут реакцию приостанавливали 200 мкл 20 % ТХУ. Параллельно опытным обрабатывали контрольные пробы. К 0,2 мл супернатанта добавляли 2,65 мл трис-НСЕ буфера с 0,01 % ЭДТА и 50 мкл ДТНБ. Пробы фотометрировали при 412 нм на спектрофотометре Genesys 10 SUV-Vis Thermo Scientific (США).

Активность фермента в эритроцитах рассчитывали по формуле

$$A = \frac{\Delta C \times V_{p.c.} \times 201}{V_{np}} \times t, \quad (8)$$

где  $A$  – активность фермента;

$\Delta C$  – разность в содержании восстановленного глутатиона (оптическая плотность опытной и контрольной проб);

$V_{p.c.}$  – количество смеси;

$V_{np}$  – количество образца, использованного для определения концентрации восстановленного глутатиона.

Результаты выражались в мкмоль/мин/гр Нб.

#### *Определение уровня ГТ (К.Ф. 2.5.1.18)*

ГТ катализирует несколько типов реакций, которые ответственны в организме человека и животных за обеспечение метаболизма ксенобиотиков, эндогенных токсинов, продуктов обмена и гормонов.

Активность ГТ определяется по скорости образования GS-2,4-динитробензола в реакции восстановления глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом (ДХНБ) (Карпищенко А.И., 1999) [57].

Для осуществления биохимической реакции 100 мкл гемолизата эритроцитов или плазмы крови соединяли с 1,2 мл 2 мМ ДХНБ и 1,2 мл 2 мМ GSH. Время реакции в спектрофотометре составляло 3 мин. Оптическую плотность в исследуемых образцах измеряли при 340 нм на спектрофотометре Genesys 10 SUV-Vis Thermo Scientific (США) относительно дистиллированной воды.

Расчет активности фермента в гемолизате эритроцитов и плазме крови рассчитывался по представленной формуле:

$$A = \frac{\Delta E \times V_{p.c.} \times 10^6}{V_{np} \times l \times \varepsilon \times t}, \quad (9)$$

где  $A$  – активность фермента;

$\Delta E$  – разность экстинкции проб до и после инкубации без величины разницы экстинкции в контроле;

$V_{p.c.}$  – объем реакционной смеси;

$V_{np}$  – объем пробы;

$l$  – длина оптического пути;

$\varepsilon$  – молярный коэффициент поглощения;

$t$  – время инкубации;

$10^6$  – коэффициент пересчета моль на мкмоль.

Полученные результаты выражались в мкмоль/мин/гр Hb для эритроцитов, для плазмы крови – в мкмоль/мин/л.

#### *Определение уровня ГР (К.Ф. 1.6.4.2)*

ГР восстанавливает окисленный глутатион с помощью НАДФ-Н. Активность данного метода оценивали при длине волны 340 нм (Асатиани В.С., 1969) [12].

В пробирку помещали 0,2 мл гемолизата эритроцитов, 2,4 мл фосфатного раствора (рН=6,8), 0,2 мл GSSG и 0,2 мл NAD(P)H<sub>2</sub>. Время реакции в спектрофотометре составляло 3 мин. Активность ГР определяли на спектрофотометре Genesys 10 SUV-Vis Thermo Scientific (США).

Расчет активности фермента в гемолизате эритроцитов рассчитывался по формуле

$$A = \frac{\Delta E \times V_{p.c.} \times 10^6 \times 10}{V_{np} \times l \times \varepsilon \times t}, \quad (10)$$

где А – активность фермента;

$\Delta E$  – разность экстинкции контрольных и опытных проб;

$V_{p.c.}$  – объем реакционной смеси;

$V_{np}$  – объем пробы;

$l$  – длина оптического пути;

$\varepsilon$  – коэффициент микромолярной экстинкции NAD(P)H<sub>2</sub>;

$t$  – время инкубации;

$10^6$  – коэффициент пересчета моль на мкмоль.

Полученные результаты выражались в мкмоль/мин/грHb.

#### *Определение уровней GSH и GSSG*

Глутатион –  $\gamma$ -глутамил-цистеинил-глицин – «неправильный» трипептид – является важным внутриклеточным метаболитом, который не только защищает клетку от токсичных свободных радикалов, но и определяет окислительно-восстановительные характеристики внутриклеточной среды. Определение

концентрации GSH основано на способности кислоторастворимых тиоловых группировок при взаимодействии с 5,5-ДТНБ образовывать окрашенное соединение – тио-2-нитробензойную кислоту, водный раствор которого имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм. Поскольку GSH является преобладающим низкомолекулярным тиолом, концентрация последних принимается за концентрацию GSH. К 0,6 мл гемолизата эритроцитов или плазмы крови добавляли 0,2 мл 20 % раствора сульфосалициловой кислоты. Пробы перемешивали и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант в количестве 0,2 мл переносили в пробирки, содержащие 2,55 мл 0,1 М трис-НСЕ буфера с 0,01 % ЭДТА. К полученной смеси добавляли 50 мкл 5,5-ДТНБ. Пробы фотометрировали при длине волны 412 нм относительно дистиллированной воды. Полученные результаты выражали в мкмоль/л (Карпищенко А.И., 1999) [57].

Для оценки содержания GSSG его с помощью ГР восстанавливали до GSH и определяли в реакции с 5,5-ДТНБ при 412 нм на спектрофотометре Genesys 10 SUV-Vis Thermo Scientific (США) (Ellman G.L., 1972) [145].

Данные по активности антиоксидантных ферментов и уровню продуктов ПОЛ пересчитывались на 1 грамм гемоглобина для эритроцитов.

#### **2.4.1.3 – Метод определения количества ретикулоцитов**

Исследование молодых ретикулоцитов в мазках крови после фиксации их специальными красителями является на практике наиболее используемым методом подсчета количества ретикулоцитов.

В 0,3 мл крови добавлялось 100 мкл 1 % красителя бриллиантового крезилового синего (краситель был приготовлен на основе 0,9 % NaCl), затем выдерживали при комнатной температуре в течение 40 мин. После истечения времени готовили мазки, которые фиксировались в метаноле. Высушивали мазки на воздухе. Поиск и подсчёт ретикулоцитов производили в 1000 эритроцитов с помощью микроскопа Eclipse Ni Nikon (Япония) [65].



#### **2.4.1.4 – Метод определения содержания эритропоэтина**

Набор реагентов Mouse/Rat Epo Immunoassay (США) и набор реагентов «Эритропоэтин-ИФА-Бест» предназначен для определения концентрации эритропоэтина в плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

К 50 мкл плазмы крови добавляли разбавитель RD1W и затем инкубировали при комнатной температуре. После инкубации промывали 5 раз промывочным раствором. Затем добавляли 100 мкл эритропоэтина в каждую лунку. Инкубировали в течение 2 часов на термошейкере. Добавляли 100 мкл стоп-раствора, а затем оценивали оптическую плотность при длине волны 450 нм.

После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывали концентрацию эритропоэтина в анализируемых образцах.

#### **2.4.1.5 – Метод оценки параметров крови с помощью гематологического анализатора**

Исследование гематологических показателей крови проводилось на базе Ульяновского клинического онкологического диспансера с помощью гематологического анализатора Mindray BC 3600.

Оценивали следующие параметры крови:

RBC – количество эритроцитов;

Hb – уровень гемоглобина;

Ht % – гематокрит;

MCV – средний объем эритроцита;

MCH – содержание гемоглобина в отдельном эритроците;

MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах;

RDW-CV – коэффициент вариации размеров эритроцитов;

RDW-SD – относительная ширина распределения эритроцитов по объему.

Кровь была собрана в отдельные вакутейнеры с антикоагулянтом.

#### 2.4.2 – Морфологические методы исследования

Морфологическое исследование позволяет определить ряд особенностей клеток: форму, величину, количество форменных элементов и их соотношение.

Мазок крови высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 15 минут и проводили сканирование на атомно-силовом микроскопе Solver P47 Pro (NT-MDT, Зеленоград, Россия) в полуконтактном режиме, используя кантилевер с жесткостью 0,2 N/m и радиусом закругления кончика зонда около 10 нм. Получали как 2D-, так и 3D-изображение. Во всех исследуемых группах была оценена топология и по модулю Юнга – ригидность мембраны эритроцита. Число точек в скане равнялось 600. Поле сканирования имело размеры 100×100, 50×50 мкм. Процесс преобразования осуществлялся благодаря программному обеспечению Nova («НТ-МДТ», Россия). На полученных силовых кривых находили значения  $Dx$  (нм),  $Dy$  (нН),  $Y$  (нН), согласно которым производили расчёт глубины проникновения зонда в образец [66]:

$$x = \Delta Z \cdot (SetPoint - DFL0), \quad (11)$$

где  $\Delta Z$  – преобразованное значение силовой кривой по  $Dx$ , нм;

$SetPoint$  – функциональный параметр, который определяет величину входного сигнала цепи обратной связи при сканировании, нА;

$DFL0$  – преобразованное значение силовой кривой по  $Y$ , нА.

Расчет силы прижатия зонда к образцу производили согласно закону Гука:

$$F = k \cdot x, \quad (12)$$

где  $k$  – жесткость зонда;

$x$  – глубина проникновения зонда в образец.

Модуль Юнга рассчитывали по формуле [122]:

$$F = \frac{4}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \delta^{\frac{3}{2}} \sqrt{R}, \quad (13)$$

где  $F$  – приложенная сила;

$E$  – модуль Юнга, характеризующий упругоэластические свойства;

$\nu$  – коэффициент Пуассона;

$\delta$  – продавливание;

$R$  – радиус иглы.

Структурную организацию мембран эритроцитов оценивали по предложенной классификации Г.И. Козинца (2001), согласно которой клетки с признаками эхиноцитарной трансформации (дискоциты, дискоциты с одним выростом, дискоциты с гребнем, дискоциты с множественными выростами, эритроциты в виде тутовой ягоды) относят к обратимо деформированным, а куполообразные эритроциты, сфероциты с гладкой поверхностью, сфероциты с шипиками на поверхности, эритроциты в виде «спущенного мяча», дегенеративные формы эритроцитов – к необратимо деформированным формам [59].

Морфологические изменения поверхностной архитектоники эритроцитов подсчитывали под световым микроскопом Nikon Eclipse E 200. Мазок окрашивали по методу Романовского-Гимзе. Количество эритроцитов с неизменной и измененной формой выражалось в процентах, подсчёт производился на 300 эритроцитов.

Для статистической обработки полученных результатов морфологического исследования применялись расчётные индексы [58]:

1. Индекс трансформации – ИТ – количественная оценка соотношения патологических и нормальных форм эритроцитов

$$\text{ИТ} = (\text{ОД}\% + \text{НД}\%) / \text{Д}\%, \quad (14)$$

где  $\text{Д}\%$  – процент дискоцитов;

$\text{ОД}\%$  – процент обратимо деформированных эритроцитов;

$\text{НД}\%$  – процент необратимо деформированных эритроцитов.

2. Индекс обратимой трансформации ИОТ

$$\text{ИОТ} = \text{ОД}\% / \text{Д}\%. \quad (15)$$

3. Индекс необратимой трансформации – ИНОТ

$$\text{ИНОТ} = \text{НД}\% / \text{Д}\%. \quad (16)$$

### **2.4.3 – Методы статистической обработки данных**

Полученные данные представлены в виде среднего арифметического ( $M$ )  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $m$ ). Достоверность различий с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни и коэффициента корреляции Спирмена ( $r$ ) с помощью компьютерной программы математического анализа Stata v.6.0 и стандартных пакетов Microsoft Excel, 2007. В качестве достоверного уровня значимости при оценке результатов использовалась вероятность  $p < 0,05$ , принятая в биологических исследованиях.

### ГЛАВА 3 – ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОПОЭЗА И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ КРОВИ КРЫС С АСЦИТНОЙ ОПУХОЛЬЮ ЯИЧНИКОВ И БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

#### 3.1 – Параметры эритроцитов периферической крови крыс в динамике развития асцитной опухоли яичников

В результате проведённого исследования нами установлено достоверное прогрессирующее снижение показателя гематокрита (Ht) как в стационарной, так и в терминальной фазах роста опухоли (таблица 4).

**Таблица 4 – Параметры эритроцитов периферической крови крыс в динамике развития асцитной опухоли яичников**

Показатели	Контроль	Стационарная фаза	Терминальная фаза
Ht %	38,1±0,5	34,3±0,5*	31,3±0,3*
MCV, фл	52,8±0,8	53,3±0,7	53±0,5
MCH, пг/мл	21,30±2,01	15,8±1,6*	17,2±1,3
MCHC, г/л	401±±38	295,7±31,3*	318,5±28,1*
RDW-CV	0,166±0,002	0,185±0,002*	0,2±0,001*
RDW-SD	32,1±0,2	33,1±0,2*	34±0,2*

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

По мнению В.С. Антонова и соавт. (2016), показатель среднего содержания гемоглобина в отдельном эритроците (MCH) является вторичным, зависящим от среднего объёма эритроцита (MCV), самостоятельной диагностической ценности не имеет и менее всего подвержен изменениям при неопластических состояниях [10].

Авторы считают, что все состояния, которые приводят к уменьшению объёма эритроцита, увеличению количества эритроцитов и занижению уровня

гемоглобина, вызывают также и снижение содержания гемоглобина в клетке крови. В нашем экспериментальном исследовании при моделировании опухолевого процесса у крыс отмечается статистически достоверное снижение параметра MCH.

Нами выявлено, что коэффициент вариации размеров эритроцитов (RDW-CV) значимо повышался относительно контроля на всех стадиях роста опухоли (таблица 4), что позволило предположить возникновение пойкилоцитоза как в стационарную, так и терминальную фазы роста экспериментальной опухоли.

RDW-SD – относительная ширина распределения эритроцитов по объему – была значимо повышена в стационарную и терминальную фазы у животных-опухоленосителей, что свидетельствовало о возможности возникновения анизоцитоза (таблица 4).

MCV является стабильным показателем объема эритроцита и изменяется при макроцитозе или микроцитозе эритроцитов. По данному показателю можно диагностировать анемию. Нами выявлена тенденция к увеличению MCV эритроцитов циркулирующей крови в организме-опухоленосителе (таблица 4).

Таким образом, эритроциты циркулирующей крови в организме-опухоленосителе характеризовались изменением объема эритроцитов, снижением средней концентрации гемоглобина в эритроцитах, возникновением пойкилоцитоза и анизоцитоза.

### **3.2 – Показатели эритропоэза в организме-опухоленосителе при неопластических процессах**

Для оценки эритропоэза определяли содержание эритроцитов, уровень гемоглобина, количество ретикулоцитов и концентрацию эритропоэтина в периферической крови животных-опухоленосителей (таблица 5).

Из представленных в таблице 5 данных следует, что количество эритроцитов в периферической крови значимо снижалось в стационарную и терминальную фазы роста экспериментальной опухоли по сравнению с контролем.

Одновременно значимо уменьшалось количество гемоглобина, что, на наш взгляд, может привести к нарушению дыхательной функции крови (таблица 5).

**Таблица 5 – Показатели эритропоэза в организме-опухоленосителе**

Показатели	Контроль	Стационарная фаза	Терминальная фаза
Эритроциты $\times 10^{12}/л$	7,2 $\pm$ 0,05	6,4 $\pm$ 0,08*	6,0 $\pm$ 0,04*
Гемоглобин г/л	156,7 $\pm$ 9,66	112,23 $\pm$ 7,87*	102,67 $\pm$ 7,01*
Ретикулоциты (абс.знач) $\times 10^{12}/л$	0,075	0,074	0,080
Эритропоэтин пг/мл	23,7 $\pm$ 0,34	74,2 $\pm$ 8,82*	48,1 $\pm$ 6,45*

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

Эритропоэтин выступает как гемопоэтический фактор роста, активность его проявляется даже при самых низких концентрациях. Нами выявлено статистически значимое повышение уровня эритропоэтина в плазме крови, наиболее выраженное в стационарную фазу роста опухоли (таблица 5). При этом увеличение уровня эритропоэтина не приводило к повышению количества ретикулоцитов (таблица 5).

### **3.3 – Морфологические параметры эритроцитов периферической крови крыс с асцитной опухолью яичников**

Анализ окрашенных мазков крови с использованием светового микроскопа остаётся ключевым исследованием при оценке морфологии эритроцитов. Понимание механизмов деформации эритроцитов важно для представления о структурной организации и динамическом состоянии мембранных белков и

липидов, а также факторах окружающей среды, которые могут влиять на свойства и целостность мембраны.

Представленные нами данные (таблица 6) позволили выявить статистически значимое повышение индекса трансформации эритроцитов (ИТ) в стационарную и терминальную фазы роста экспериментальной опухоли. Параллельно отмечено достоверное повышение индекса обратимости эритроцитов (ИОТ) на разных сроках роста опухоли. Также наблюдалось достоверное повышение индекса необратимости эритроцитов (ИНОТ) в стационарную и терминальную фазы (таблица 6).

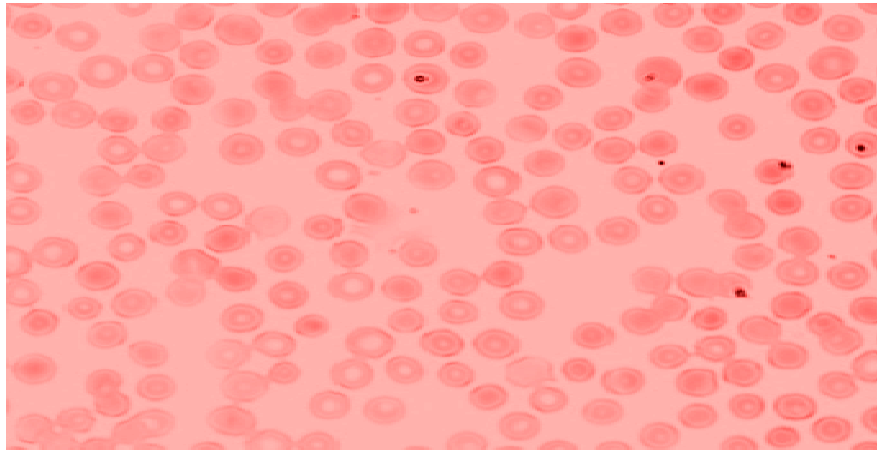
**Таблица 6 – Индексы трансформации эритроцитов крыс в динамике прогрессирования неоплазмы**

Показатель	Группа	Индекс трансформации, %	Индекс обратимой трансформации, %	Индекс необратимой трансформации, %
Контроль (n=24)		0,108	0,097	0,011
Стационарная фаза развития экспериментальной неоплазмы (n=22)		7,308*	3,635*	3,673*
Терминальная фаза развития экспериментальной неоплазмы (n=22)		6,938*	3,538*	3,400*

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

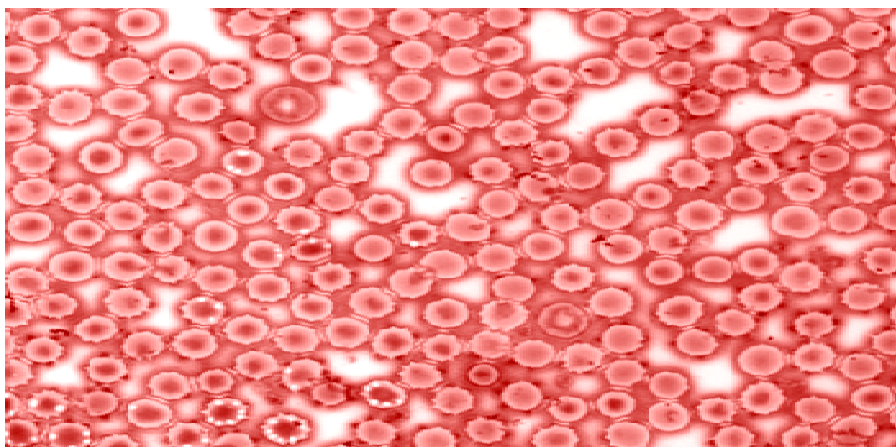
Таким образом, на всех сроках АОЯ в нашем исследовании выявлено статистически значимое повышение морфологических индексов в эритроцитах (таблица 6).





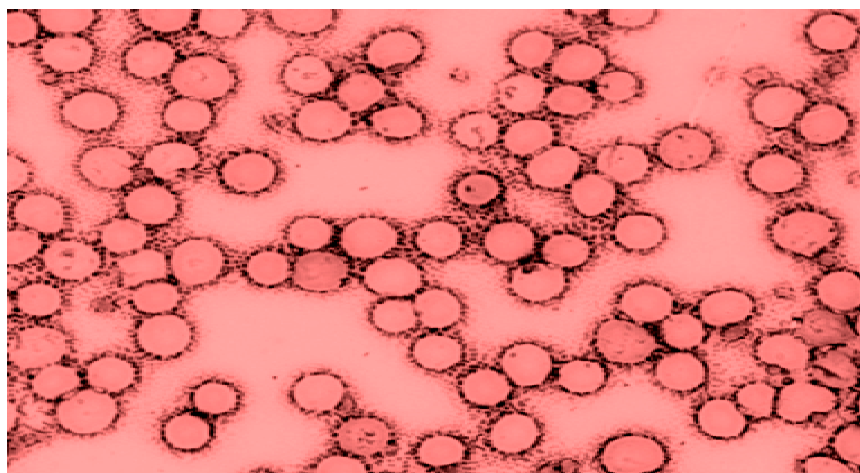
**Рисунок 1 – Морфология эритроцитов крыс в контрольной группе**

*Примечание: Метод окраски по Романовскому-Гимзе (показаны дискоциты), увеличение  $\times 100$*



**Рисунок 2 – Изменения морфологии эритроцитов крыс в стационарную фазу  
асцитной опухоли яичников**

*Примечание: Метод окраски по Романовскому-Гимзе (показаны эхиноциты), увеличение  $\times 100$*



**Рисунок 3 – Изменения морфологии эритроцитов крыс в терминальную фазу  
асцитной опухоли яичников**

*Примечание: Метод окраски по Романовскому-Гимзе (показаны сфероциты), увеличение  $\times 100$*

На рисунке 1 приведен мазок контрольной группы крыс, на котором отмечается большое количество дискоцитов.

Повышение ИОТ в стационарную фазу роста неоплазмы сопровождался снижением количества дискоцитов и повышением количества обратимых (эхиноциты) трансформированных эритроцитов (рисунок 2). Появление эхиноцитов может быть связано с изменениями ионной проницаемости мембраны, нарушением работы каналов.

Увеличение ИНОТ в терминальную фазу роста неоплазмы связано с увеличением сфероцитов (рисунок 3) и вызывает гипоксические изменения в организме, поскольку такие формы эритроцитов быстрее распадаются, приводя к анемии [39].

Основными преимуществами метода АСМ для изучения биологических и медицинских объектов являются: высокое разрешение, простота пробоподготовки при исследованиях в воздушной среде, точность определения морфометрических параметров данных объектов, в частности: длины, ширины, высоты [85].

Нами выявлено (таблица 7) значимое повышение высоты эритроцита в стационарную фазу и статистически значимое снижение в терминальную фазу роста опухоли. При этом изменялась глубина впадины в стационарную фазу роста АОЯ. В терминальную фазу углубления центральной впадины не отмечалось. Также выявлялось статистически значимое повышение средней величины диаметра эритроцита на разных сроках роста АОЯ. Наблюдалось достоверное увеличение длины эритроцита. Средняя площадь эритроцита значимо увеличивалась на всех этапах прогрессирования опухоли.

При оценке содержания различных форм эритроцитов периферической крови крыс с АОЯ в стационарную фазу роста опухоли отмечалось достоверное повышение количества обратимых эритроцитов – эхиноцитов относительно данных контроля. Также выявлено статистически значимое увеличение количества необратимых форм эритроцитов – сфероцитов и стоматоцитов.

**Таблица 7 –Морфометрические параметры эритроцитов циркулирующей крови животных-опухоленосителей**

Показатели	Контроль	Стационарная фаза	Терминальная фаза
Высота эритроцита, мкм	0,453±0,010	0,505±0,020*	0,364±0,010*
Глубина впадины, мкм	0,374±0,013	0,163±0,020*	Без впадины
Средний диаметр эритроцита, нм	6,03±0,17	6,78±0,12*	7,17±0,14
Длина, нм	7,603±0,118	8,35±0,246*	9,09±0,185*
Площадь, мкм <sup>2</sup>	45,50±1,42	55,25±3,08*	65,27±3,01*

Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).

При дальнейшем прогрессировании опухоли отмечалось статистическое снижение количества обратимых форм эритроцитов – дискоцитов, эхиноцитов и в большом количестве наблюдался рост необратимых форм эритроцитов – сфероцитов (таблица 8).

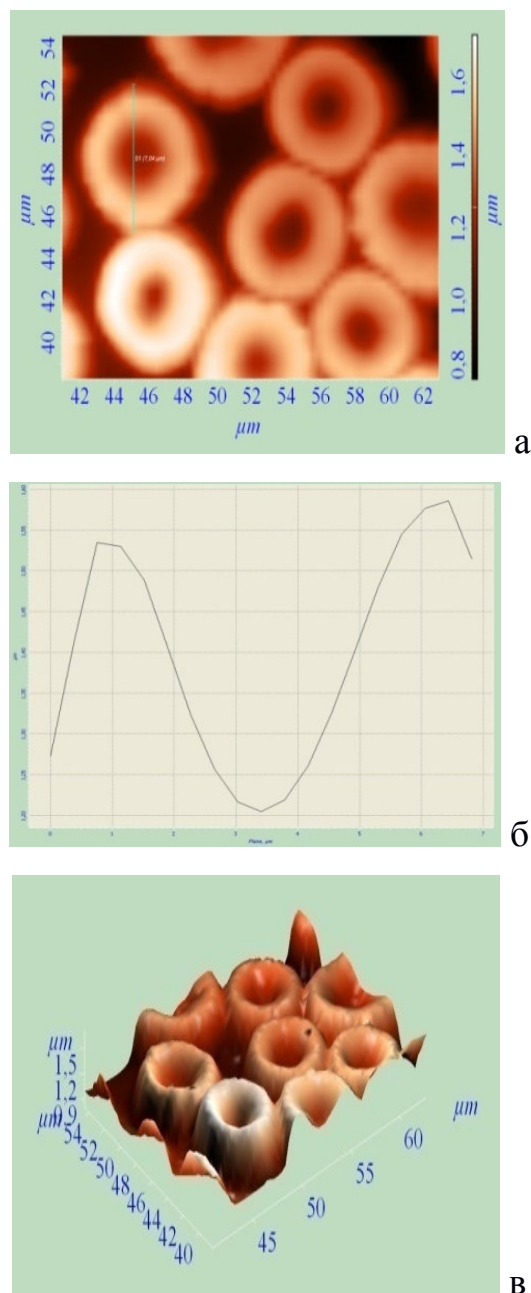
**Таблица 8 – Содержание различных форм эритроцитов в крови крыс с асцитной опухолью яичников**

Показатели	Контроль	Стационарная фаза	Терминальная фаза
Дискоциты (абс.знач)	7,08±0,003	2,534±0,153*	0,762±0,024*
Эхиноциты (абс.знач)	0,094±0,004	3,334±0,070*	0,457±0,012*
Стоматоциты (абс.знач)	0,014±0,002	0,345±0,013*	1,728±0,006*
Сфероциты (абс.знач)	0,008±0,001	0,185±0,019*	3,048±0,042*

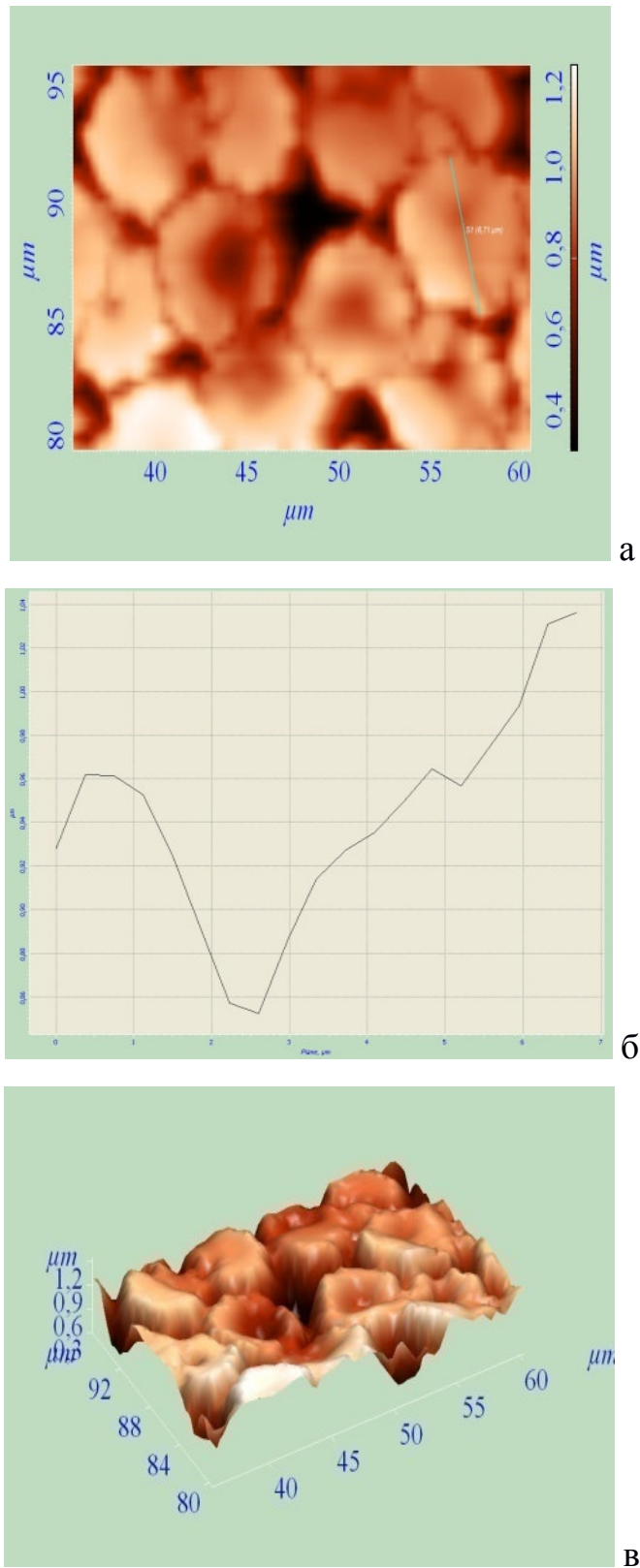
Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).

АСМ позволяет получить пространственное изображение поверхности. На рисунках 4-6 представлены: топология, боковое сечение профиля, изображение в 3D эритроцитов здорового животного и животных-опухоленосителей. При сканировании образцов интактных эритроцитов, в основном, наблюдались нормоциты с типичной дисковидной формой (рисунок 4).

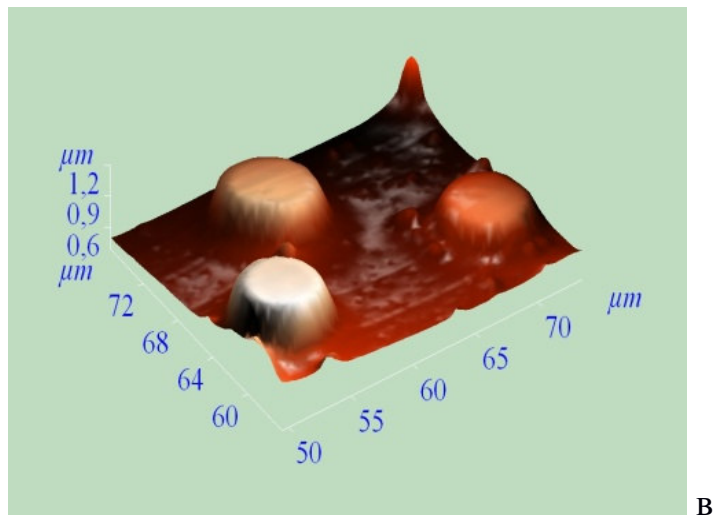
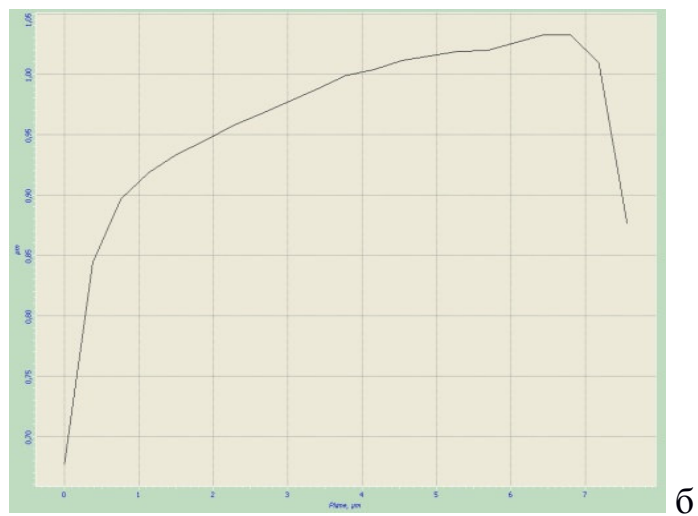
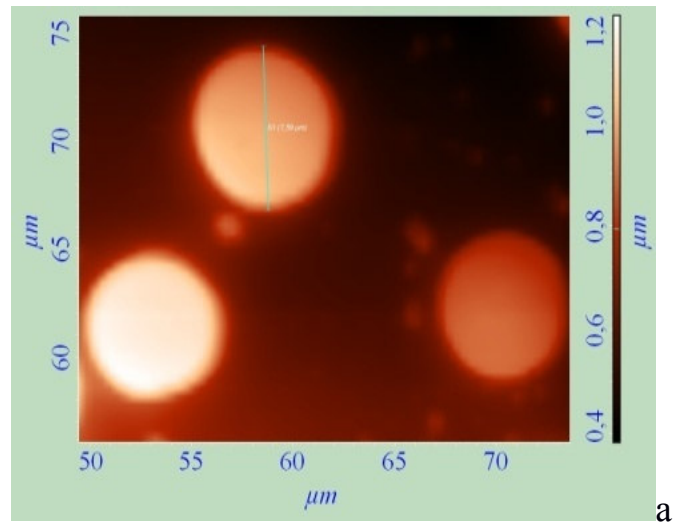
В стационарную фазу роста экспериментальной опухоли на поверхности клетки наблюдались грубые выросты - эхиноциты (рисунок 5). Эхиноцит считается обратимо деформируемым до стадии потери мембранного вещества [134]. Их появление в физиологических условиях связано с изменением ионной проницаемости мембраны, с нарушением работы каналов. В терминальную фазу, при необратимой трансформации дискоцита в сфероцит, выросты плазмолеммы превращались в произвольные микросферулы - сфероциты (рисунок 6).



**Рисунок 4 – Топология (а), боковое сечение профиля (б) и изображение в 3D (в) интактных эритроцитов**



**Рисунок 5 –Топология (а), боковое сечение профиля (б) и изображение в 3D (в) эритроцитов в стационарную фазу**



**Рисунок 6 –Топология (а), боковое сечение профиля (б) и изображение в 3D (в) эритроцитов в терминальную фазу**

Механические свойства «мягких» клеток, таких как эритроциты, определяются в первую очередь элементами цитоскелета и физическим взаимодействием с окружающей средой [85]. Ригидность мембраны оценивается по модулю Юнга и отражает ее упруго-эластические свойства. Нами выявлено, что ригидность мембраны эритроцитов в организме-опухоленосителе возрастает в динамике прогрессирования неоплазмы (таблица 9).

**Таблица 9 – Ригидность мембраны эритроцитов в крови крыс при экспериментальной опухоли**

Показатели	Контроль	Стационарная фаза	Терминальная фаза
кПа	101,1±4,4	133,1±1,7*	136±2,2*

Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).

### **3.4 – Морфологические параметры эритроцитов периферической крови женщин при раке яичников**

Эритропоэз — процесс образования эритроцитов в костном мозге. Развитие эукариотической клетки происходит в капиллярах костного мозга. На ретикулоцитарной стадии клетки выходят из костного мозга в кровеносные капилляры. Ретикулоциты растягивают стенку капилляра и вымываются в кровоток, где за 35-45 ч превращаются в молодой нормоцит.

В таблице 10 представлены показатели, характеризующие эритропоэз у женщин с раком яичников. Отмечалась чёткая тенденция к снижению содержания эритроцитов у больных РЯ. Параллельно у пациенток с РЯ наблюдалось значимое снижение уровня гемоглобина.

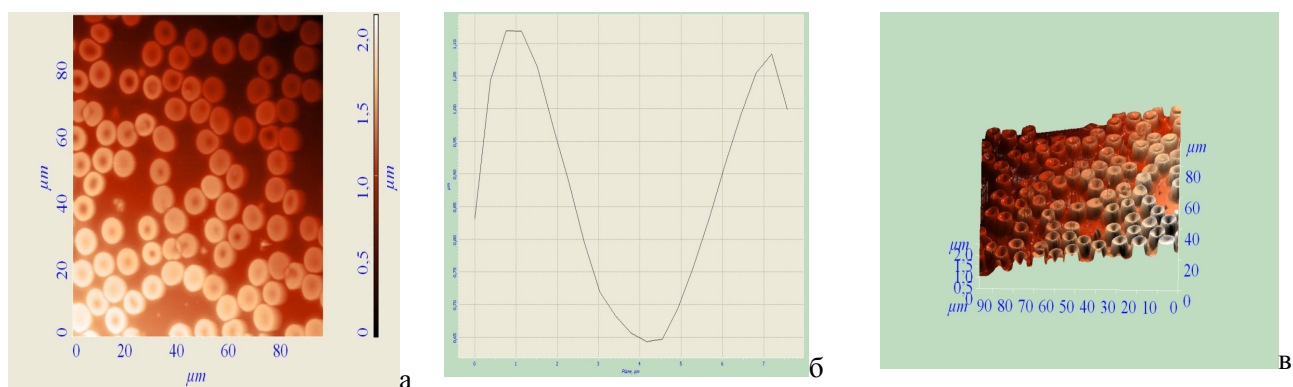
**Таблица 10 – Показатели эритропоэза у женщин с раком яичников**

Показатели	Контрольная группа доноров (n=25)	Больные РЯ (n=25)
Эритроциты $\times 10^{12}/л$	4,68±0,051	4,11±0,190
Гемоглобин г/л	142,28±2,75	115±5,64*
Ретикулоциты (абс.знач) $\times 10^{12}/л$	0,056	0,060
Эритропоэтин пг/мл	15,8±2,0	14,43±1,83

Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).

Основным стимулятором эритропоэза является эритропоэтин. В нашем исследовании у женщин с РЯ концентрация эритропоэтина и содержание ретикулоцитов не отличались от показателей контрольной группы доноров (таблице 10).

На рисунках 7- 8 представлены: топология, боковое сечение, изображение в 3D эритроцитов контрольной группы доноров и больных РЯ III стадии. При сканировании образцов эритроцитов доноров выявлены нормоциты с типичной дисковидной формой (рисунок 7).



**Рисунок 7 – Топология (а), боковое сечение профиля (б) и изображение в 3D (в) у соматически здоровых женщин**



**Рисунок 8 – Топология (а), боковое сечение профиля (б) и изображение в 3D (в) у больных раком яичников**

У пациентов с опухолевым процессом менялась цитоархитектоника эритроцитов. При этом у пациентов с РЯ появлялись обратимо деформированные формы эхиноцитов (рисунок 8). Они могут быть неправильной формы с измененными линейными размерами. Эхиноциты способны увеличивать внутрисосудистый гемолиз и приводить к гипоксическим состояниям.



**Таблица 11 – Ригидность мембраны эритроцитов периферической крови больных раком яичников**

Показатели	Контрольная группа доноров (n=25)	Больные с РЯ (n=25)
кПа	7,88±0,326	16,2±0,449*

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

Нами выявлено, что ригидность мембраны эритроцитов у больных РЯ III стадии было значимо выше таковой в контроле (таблица 11).

Полученные нами данные (таблица 12) свидетельствовали о морфометрических изменениях в комплексе «нормоцит-эхиноцит» у женщин с РЯ III стадии относительно контрольной группы доноров, где отмечалось значимое повышение ИТ, ИОТ, ИНОТ.

**Таблица 12 – Индексы трансформации эритроцитов женщин с раком яичников**

Группы Показатели	Индекс трансформации %	Индекс обратимой трансформации %	Индекс необратимой трансформации %
Контрольная группа доноров (n=25)	0,122	0,110	0,011
III стадия РЯ (n=25)	2,382*	0,793*	1,589*

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

При исследовании эритроцитов периферической крови доноров преобладали типичные формы эритроцитов-нормоцитов (таблица 13). У женщин с РЯ III стадии (таблица 13) отмечалось повышение количества обратимых форм (эхиноциты и стоматоциты).

Обратимые формы эритроцитов могут быть возвращены в нормальное состояние после прекращения действия факторов.

**Таблица 13 – Содержание различных форм эритроцитов у женщин с раком яичников III стадии**

Показатели	Контрольная группа доноров (n=25)	Больные с РЯ (n=25)
Дискоциты (абс.зн)	4,41±0,023	1,33±0,001*
Эхиноциты (абс.знач)	0,262±0,00003	0,100±0,0003*
Стоматоциты (абс.знач)	0,006±0,00001	0,131±0,0005*
Сфероциты (абс.знач)	0,006±0,00001	0,193±0,0005*

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

### Резюме

Способность эритроцитов изменять форму является одним из его важнейших свойств, определяется эластичностью плазматической мембраны и обеспечивает полноценный газообмен [130].

В нашем исследовании у животных-опухоленосителей отмечалось достоверное изменение объема эритроцитов, снижение показателей гематокрита и концентрация гемоглобина. При прогрессировании неоплазмы наблюдались пойкилоцитоз и анизоцитоз.

Концентрация гемоглобина, по мнению ряда авторов [10], менее всего подвержена изменениям при неопластических состояниях и может служить маркером при диагностике железодефицитной анемии, свинцовой интоксикации, некоторых гемоглобинопатий.

Также нами выявлено снижение количества эритроцитов и уровня гемоглобина циркулирующей крови у животных-опухоленосителей. Отмечалась тенденция к снижению количества эритроцитов и значимое снижение уровня гемоглобина у больных с РЯ III стадии. Подобные изменения зарегистрированы у больных с колоректальным раком, раком шейки матки и раком легкого [37, 87, 103], у крыс Вистар при развитии карциносаркомы [3, 65], и предполагают токсическое влияние опухоли на систему кроветворения. Усиленное разрушение

эритроцитов отмечается при раке легкого, пищевода, языка, рака простаты и у экспериментальных животных [72, 111]. В то же время в работе А.П. Трашкова (2012) [108] показано снижение количества эритроцитов циркулирующей крови у животных-опухоленосителей с АОЯ на 4 и 8 сутки роста опухоли.

Для оценки эритропоэза мы определяли уровень эритропоэтина, содержание ретикулоцитов у животных-опухоленосителей и больных РЯ III стадии. Нами было выявлено повышение концентрации эритропоэтина у крыс с АОЯ. Количество ретикулоцитов не отличалось от контрольной группы. Повышение уровня эритропоэтина у крыс с карциносаркомой отмечено в работе М.Е. Тулеутаева (2016) [3], в то же время, в ряде работ показано, что на фоне повышения эритропоэтина имеет место снижение количества эритроцитов в крови [126, 220].

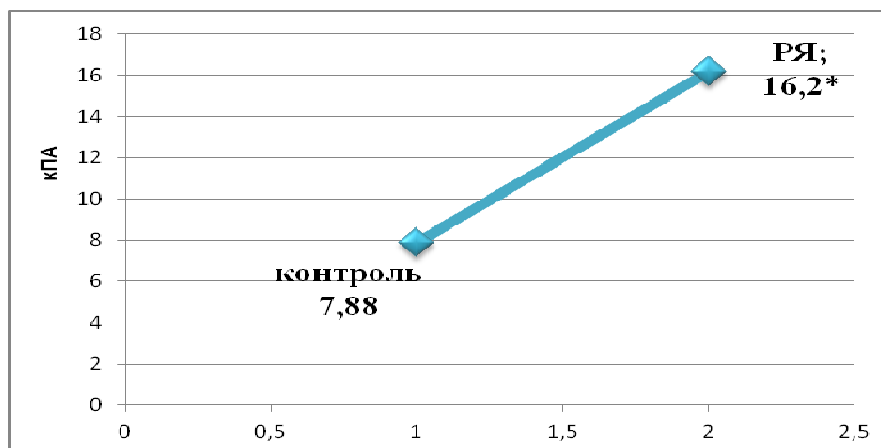
В нашем исследовании у больных РЯ III стадии концентрация эритропоэтина и количество ретикулоцитов не отличалось от соматически здоровых женщин.

Изменение состояния белков мембранного скелета эритроцита, метаболизма липидов мембраны, приводит к изменению формы эритроцита. При этом, имеет место, либо образование выростов клеточной мембраны (эхиноцитарная трансформация), либо инвагинация участков мембраны (стомацитарная трансформация) [117]. Конечной стадией в обоих случаях является образование сфероцитов [59, 134]. Считается, что сфероциты – это результат необратимой трансформации эритроцита [167]. Показано изменение формы эритроцитов в периферической крови при различной локализации (раке опухоли головы и шеи, рака желудка, рака легкого) [72, 102]. При этом деформируемость эритроцитов резко снижается, что затрудняет их прохождение через капилляры [173].

Нами также выявлено резкое и статистически значимое возрастание ИТ, свидетельствующее о возрастании количества сфероцитов в периферическом кровотоке животных при экспериментальной неоплазме.

Появление обратимых форм эхиноцитов у больных РЯ III стадии приводило к повышению индекса трансформации эритроцитов и увеличению ригидности

(рисунок 9). Данные изменения способны запускать быстрый процесс разрушения эритроцитов.



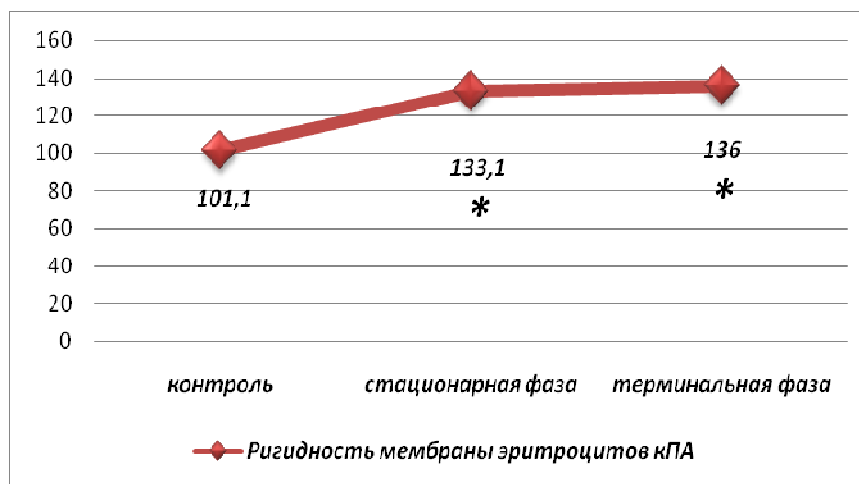
**Рисунок 9 – Показатели ригидности эритроцитов больных раком яичников III стадии**

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

Основным источником энергии в эритроцитах является гликолиз, в ходе которого образуется АТФ. Оптимальный уровень гликолиза требует определенного уровня GSH. Система глутатиона в целом защищает эритроцит от действия окислителей [130, 131, 167].

Согласно данным литературы накопление продуктов липопероксидации в эритроцитах сопровождается повышением вязкостных свойств крови [76], определяемой, в основном, деформируемостью («жесткостью») эритроцитов [107].

Нами было выявлено статистически значимое возрастание ригидности мембраны эритроцитов циркулирующей крови крыс в динамике прогрессирования опухолевого процесса (рисунок 10). Возрастание ригидности мембраны эритроцитов при экспериментальной неоплазме установлено в работе Сладковой Е.А. и др., 2013 [94].



**Рисунок 10 – Показатели ригидности эритроцитов крыс в динамике прогрессирования неоплазмы**

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

Возрастание ригидности мембраны эритроцитов, понижение их деформируемости сопровождается уменьшением кислородтранспортной функции крови и является следствием активации процессов липопероксидации и недостаточности антиоксидантной защиты эритроцитов [112, 211]. При этом возрастание вязкости крови может рассматриваться как маркер гипоксемии [211]. По мнению авторов, на этом фоне снижается способность эритроцита деформироваться. Вокруг эритроцита с поврежденной мембраной образуется рыхлое микроокружение, что может быть связано с начальным этапом образования фибрина на эритроците. Образующиеся затем эритроцитарные комплексы повышают вязкость крови.

Интерес к изучению деформируемости эритроцитов обусловлен тем, что ригидные эритроциты способны окклюзировать часть капиллярного русла и таким образом, блокировать кровообращение в системе микроциркуляции. Основной причиной снижения деформационной способности эритроцитов [41] считает гипоксическое состояние организма.

Система антиоксидантов, тормозящих перекисное окисление, в норме успешно справляется с "перекисной опасностью", но нарушение какого-либо звена в данных защитных системах ведет к повреждению мембран красных кровяных клеток [26].

Таким образом, развитие АОЯ приводило к возникновению пойкилоцитоза в эритроцитах периферической крови как в стационарную, так и терминальную фазы роста опухоли. Повышение уровня эритропоэтина не приводило к усилению числа ретикулоцитов циркулирующей крови крыс. У женщин с раком яичников концентрация эритропоэтина и содержание ретикулоцитов не отличались от показателей контрольной группы доноров. При прогрессировании асцитной опухоли яичников крыс и больных раком яичников III стадии изменялась цитоархитектоника эритроцитов, увеличивался индекс трансформации и ригидность эритроцитов.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ 3-Й ГЛАВЫ**

*Публикации в изданиях, рецензированных ВАК, и в международной реферативной базе данных Scopus*

1. Морфология эритроцитов периферической крови при раке яичников / А.Ю. Федотова, Т.П. Генинг, Т.В. Абакумова, Д.Р. Долгова // Казанский медицинский журнал. 2019. Т.100, № 5. С. 855–859 DOI: 10.17816/КМЖ2019-855.

2. Особенности редокс-статуса периферического звена эритрона при различных локализациях неоплазмы органов женской репродуктивной сферы / Т.П. Генинг, А.Ю. Федотова, Д.Р. Долгова, Т.В. Абакумова // Клиническая лабораторная диагностика. 2017. № 8. С.468–472 DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-8-468-472. (Scopus; РИНЦ - 0,493)

3. Параметры эритропоэза и цитоархитектоника циркулирующих эритроцитов крыс с асцитной опухолью яичников / Т.П. Генинг, А.Ю. Федотова, Д.Р. Долгова, Т.В. Абакумова // Ульяновский медико-биологический журнал. 2019. № 1. С.119–125 (РИНЦ – 0,248).

*Монография:*

4. Атомно-силовая микроскопия в биомолекулярной аналитике: монография / Т.А. Абакумова, И.И. Антонеева, М.Н. Артамонова, Р.И. Бахтияров, Д.Р. Долгова, Е.С.Махмутова, Б.Б. Костишко, И.Б. Костишко, И.С. Немова, А.С. Нестеров, А.В. Нестерова, Н.И. Потатуркина-Нестерова, А.С. Хитрова, О.В. Столбовская,

*А.Ю. Федотова, Р.М. Хайруллин. Ульяновск: Ульянов. гос. ун-т., 2018. 122 с.*

*Публикации в других изданиях:*

5. *Тузеева (Федотова) А.Ю.* Использование атомно-силовой микроскопии и оценка концентрации продуктов липопероксидации в эритроцитах при экспериментальном канцерогенезе / *А.Ю. Тузеева (Федотова), Д.Р. Долгова // Механизмы функционирования нервной, эндокринной и висцеральных систем в процессе онтогенеза: междунар. науч. конф., посв. 75-летию АГУ. Майкоп, 2015. С. 52–55.*

6. *Федотова А.Ю.* Система глутатиона и индекс трансформации эритроцитов в динамике канцерогенеза / *А.Ю. Федотова, Д.Р. Долгова, А.А. Михеенко // Кислород и свободные радикалы: материалы Междунар. науч.-практ. конф. Гродно, 2016. С.169–171.*

7. Use of Atomic Force Microscopy for Assessing Paraneoplastic Changes in Red Blood Cells in Carcinogenesis Dynamics / *T.P. Gening, A.Yu. Fedotova, D.R.Dolgova, I.I. Antoneeva, T.V. Abakumova, V.I. Midlenko // Translational Biomedicine. 2016. Vol. 7, № 1, Iss. 43. P. 1–7.*

## ГЛАВА 4 – ПАРАМЕТРЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ - АНТИОКСИДАНТЫ В ЭРИТРОЦИТАХ И ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС С АСЦИТНОЙ ОПУХОЛЬЮ ЯИЧНИКОВ

### 4.1 – Параметры перекисного окисления липидов в эритроцитах циркулирующей крови крыс при асцитной опухоли яичников

В процессе ПОЛ образуются первичные (гидроперекиси, ДК, эндоперекиси), вторичные продукты (альдегиды, кетоны, МДА, триеновые конъюгаты) и конечные продукты, в частности, диальдегиды [69].

Результаты оценки параметров ПОЛ в динамике развития экспериментальной неоплазмы представлены в таблице 14. Как следует из данных (таблица 14), уровень МДА значительно возрастал по сравнению с контролем в эритроцитах в стационарную фазу и продолжал увеличиваться в терминальную фазу АОЯ.

**Таблица 14 – Параметры перекисного окисления липидов в эритроцитах крыс при прогрессировании экспериментальной неоплазмы**

Показатели Группы	Малоновый диальдегид, мкмоль/гр Нб	Диеновые конъюгаты, ед.опт.пл/гр Нб	Кетодиены, ед.опт.пл/гр Нб	Основания Шиффа, ед.опт.пл/гр Нб
Контроль (n=62)	4,379±0,801	0,108±0,01	0,016±0,002	0,005±0,001
Стационарная фаза (n=64)	6,696±0,611*	0,180±0,016*	0,018±0,002	0,004±0,001
Терминальная фаза (n=64)	7,197±0,501*	0,170±0,016*	0,022±0,003 *	0,007±0,001

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

Статистически значимое увеличение (по сравнению с контролем) наблюдалось в группе первичных продуктов ДК как в стационарную, так и терминальную фазы роста неоплазмы (таблица 14).



Возрастание КД по сравнению с контрольной группой было отмечено только в терминальной фазе роста опухоли. При этом уровень ОШ значимо не изменился.

#### **4.2 – Компоненты антиоксидантного звена в эритроцитах и плазме крови при моделировании неопластического процесса**

Антиоксиданты обеспечивают связывание и модификацию свободных радикалов, предупреждают образование перекисей или разрушают их. Снижение уровня антиоксидантов, равно как и разнонаправленное изменение активности компонентов ферментативного звена АОС, приводит к возникновению оксидативного стресса [74].

Результаты оценки активности ферментного звена АОС в эритроцитах крыс в норме и при экспериментальной неоплазме представлены в таблице 15.

**Таблица 15 – Активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах крыс в норме и при экспериментальной неоплазме**

Группы	Показатели	Супероксиддисмутаза, усл.ед./гр Hb	Каталаза, ммоль/мин/гр Hb
Контроль (n=62)		1,178±0,064	10,37±0,890
Стационарная фаза (n=64)		1,245±0,075	16,13±0,140*
Терминальная фаза (n=64)		1,372±0,122	13,16±1,242*

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

СОД является ключевым ферментом антирадикальной защиты клеток, инактивирующим супероксиданион-радикал. В нашем исследовании выявлено, что активность СОД в стационарную и терминальную фазы роста неоплазмы статистически значимо не изменялась относительно группы контроля (таблица 15).

Каталаза обладает меньшим сродством к субстрату, но обеспечивает очень высокую скорость реакции окисления (способна за секунду разложить 44 000 молекул) и потому является необходимой в условиях окислительного стресса.

Из данных (таблица 15) следует, что в эритроцитах (в стационарную фазу) наблюдалось значимое повышение активности каталазы и достоверное снижение фермента, не достигающего, однако, контрольных величин в терминальную фазу.

В нашем исследовании отмечалось статистически значимое повышение активности фермента каталазы в плазме крови как в стационарную (фазу роста опухоли), так и терминальную (таблица 16).

**Таблица 16 – Активность каталазы в плазме крови у животных-опухоленосителей**

Группы	Показатели	Каталаза, ммоль/мин/л
Контроль (n=62)		0,235±0,038
Стационарная фаза (n=64)		0,275±0,165*
Терминальная фаза (n=64)		0,690±0,179*

Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).

#### **4.3 – Система глутатиона в эритроцитах и плазме крови животных с асцитной опухолью яичников**

Высокая реакционная способность системы глутатиона обеспечивает ее участие в метаболических реакциях, направленных на поддержание клеточного гомеостаза и защиту от окислительного стресса [56].

Показано участие глутатиона в поддержании структурной целостности эритроцитов и в защите гемоглобина от действия разнообразных окислителей. Состояние системы глутатиона в эритроцитах существенно влияет на активность гемоглобина и механизмы регуляции кислородтранспортной функции крови [151, 228].

В нашем исследовании в стационарную фазу в эритроцитах отмечалась тенденция к снижению уровня GSH и статистически значимое снижение фермента в терминальную фазу роста экспериментальной неоплазмы (таблица 17).

**Таблица 17 – Уровень глутатиона и отношения GSH/GSSG в эритроцитах при экспериментальной неоплазме**

Показатели Группы	Контрольная группа(n=62)	Стационарная фаза (n=64)	Терминальная фаза (n=64)
Глутатион восстановленный (GSH), мкмоль/гр Hb	2,438±0,532	2,005±0,443	1,391±0,340*
Отношения GSH/GSSG	200,9±23,49	149,7±19,96*	158,7±20,32*

Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).

Наиболее показательной с точки зрения антиоксидантного потенциала глутатиона является величина отношения GSH к GSSG, которая в настоящее время воспринимается как один из маркеров оксидативного стресса [71]. Нами выявлено достоверное снижение в эритроцитах отношения GSH/GSSG в обоих фазах развития неоплазмы (таблица 17).

**Таблица 18 – Система глутатиона в плазме крови крыс при экспериментальной неоплазме**

Показатели Группы	Глутатион-S-трансфераза, мкмоль/мин/л	Глутатион восстановленный (GSH), мкмоль/л	Отношения GSH/GSSG
Контроль(n=62)	0,042±0,003	0,459±0,039	13,6±4,41
Стационарная фаза(n=64)	0,034±0,003*	0,425±0,108*	15,88±5,75*
Терминальная фаза(n=64)	0,036±0,002	0,417±0,023	20,25±4,54*

Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).

Одновременно наблюдалось статистическое снижение уровня GSH в плазме крови крыс в стационарную фазу. В терминальную фазу роста опухоли достоверных изменений уровня GSH не наблюдалось (таблица 18).

Нами выявлено, что в плазме крови животных-опухоленосителей имеет место увеличение отношения GSH/GSSG в стационарную и терминальную фазы при одновременном снижении активности ГТ (таблица 18).

ГПО – фермент, содержащий селен, локализованный главным образом в эритроцитах. Способен с помощью GSH защищать липиды мембран и гемоглобин от окисления перекисями, препятствуя развитию патологических состояний при действии различных факторов [194]. Является главным компонентом ферментативной АОС [21].

В результате проведенных исследований (таблица 19) отмечено значимое снижение ( $p \leq 0,02$ ) активности ГПО в эритроцитах в терминальную фазу роста неоплазмы. В стационарную фазу достоверных отличий с контрольной группой не обнаружено.

Деятельность ГПО связана с работой другого фермента – ГР, которая катализирует реакцию восстановления, окисленного глутатиона с помощью восстановленного НАДФ, образующегося в ходе пентозофосфатного пути обмена глюкозы [110].

Известно, что фермент ГР восстанавливает дисульфидную связь в молекуле окисленного глутатиона (GSSG) до его сульфгидрильной формы (GSH). Реакция восстановления глутатиона в эритроцитах, в которых уровень окислительного стресса высок, НАДФН-зависимая. Важным поставщиком восстановленной формы НАДФ в эритроцитах является пентозофосфатный путь за счет работы глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, активность которой может выступать в качестве лимитирующего фактора в восстановлении глутатиона. Таким образом, ГР с функцией контроля за редокс-циркулированием глутатиона способна сдерживать свободнорадикальное окисление [64]. Было выявлено значимое снижение активности ГР в стационарную фазу роста неоплазмы (таблица 19).

**Таблица 19 – Активность системы глутатиона в эритроцитах крыс при неопластическом процессе**

Ферменты АОС	Глутатион-S-трансфераза, мкмоль/мин/гр Hb	Глутатион-редуктаза, мкмоль/мин/гр Hb	Глутатион-пероксидаза, мкмоль/мин/гр Hb
Контроль (n=62)	0,063±0,003	0,089±0,026	0,584±0,057
Стационарная фаза (n=64)	0,087±0,005*	0,045±0,010*	0,617±0,051
Терминальная фаза (n=64)	0,076±0,007*	0,069±0,015	0,367±0,045*

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

Глутатион-зависимый фермент ГТ относится к системе эндогенной детоксикации, нейтрализующий разрушительное влияние различных гидрофобных и электрофильных соединений в результате конъюгации с восстановленным глутатионом.

ГТ способна восстанавливать гидропероксигруппы окисленных фосфолипидов непосредственно в мембранах без их предварительного фосфолипидного гидролиза свободными жирными кислотами. Конъюгирование токсичных продуктов ПОЛ при участии ГТ и GSH способствует их выведению из организма. Таким образом, ГТ является важным компонентом антиоксидантной защиты эритроцитов, особенно от эндогенных метаболитов, образующихся при окислительном стрессе [27].

В результате эксперимента наблюдалось статистически значимое увеличение уровня ГТ в стационарную и терминальную фазы в эритроцитах в динамике развития экспериментальной неоплазмы (таблица 19).

#### 4.4 – Окислительная модификация белков в эритроцитах и плазме крови крыс с асцитной опухолью яичников

ОМБ играет важную роль в обмене белков в организме. Повышенное содержание окисленных белков оценивается как фактор регуляции синтеза и распада белков, активации мультিকаталитических протеаз, избирательно разрушающих окисленные белки [163].

Показано, что в отличие от продуктов липопероксидации карбонильные белки плазмы и эритроцитов более специфичны и стабильны, что позволяет называть их маркерами ОС при неопластических процессах [43].

**Таблица 20 – Уровень карбонильных производных белков в эритроцитах при экспериментальной неоплазме**

Показатели Группы	346 нм, мкмоль/гр Hb/мл	370 нм, мкмоль/гр Hb/мл	430 нм, мкмоль/гр Hb/мл	530 нм, мкмоль/гр Hb/мл
Контроль (n=62)	108,5±7,45	141,32±9,119	74,05±5,42	24,66±2,04
Стационарная фаза (n=64)	139,28±10,42 *	176,22±11,95*	95,21±5,78*	33,60±2,58*
Терминальная фаза (n=64)	132,05±11,25 *	173,05±12,69*	89,57±8,35*	30,35±3,67*

Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).

Нами выявлено, что содержание альдегидных групп нейтрального характера в гемолизате эритроцитов ( $\lambda=346$  нм) статистически значимо увеличивалось относительно контроля как в стационарную ( $p_1=0,002$ ), так и терминальную фазы роста неоплазмы ( $p_2=0,05$ ) (таблица 20). Такая же динамика сохранялась для кетонных групп нейтрального характера при  $\lambda=370$  нм ( $p_1=0,001$ ,  $p_2=0,05$ ) (таблица 20). При этом содержание продуктов ОМБ альдегидных групп основного характера при  $\lambda=430$  нм и кетонных групп основного характера при  $\lambda=530$  нм также было достоверно выше контрольных значений (таблица 20): при  $\lambda=430$  нм в

стационарную ( $p_1=0,004$ ) и терминальные фазы экспериментальной неоплазмы ( $p_2=0,003$ ); при  $\lambda=530$  нм в стационарную ( $p_1=0,003$ ) и терминальную фазы роста экспериментальной неоплазмы ( $p_2=0,005$ ).

**Таблица 21 – Уровень карбонильных производных белков в плазме крови при экспериментальной неоплазме**

Показатели Группы	346 нм, мкмоль/мг белка	370 нм, мкмоль/мг белка	430 нм, мкмоль/мг белка	530 нм, мкмоль/мг белка
Контроль (n=62)	23,8±1,06	21,5±0,96	12,7±1,98	1,73±6,46
Стационарная фаза (n=64)	30,9±3,96*	27,3±3,35*	15,6±1,70*	8,87±1,05*
Терминальная фаза (n=64)	28,7±3,80*	26,03±3,59*	15,01±2,24*	8,26±1,64*

Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).

Проведенный нами сравнительный анализ параметров окисления белков в плазме крови показал, что при  $\lambda = 346$  нм в стационарную и терминальную фазы отмечается статистически значимое увеличение продуктов относительно контроля ( $p_1=0,03$ ,  $p_2=0,02$ ) (таблица 21). Уровень кетонных групп нейтрального характера ( $\lambda=370$  нм) в стационарную и терминальную фазы роста также статистически значимо повышался ( $p_1=0,01$ ,  $p_2=0,01$ ) (таблица 21). Установлено, что уровень карбонильных производных при  $\lambda=430$  нм и  $\lambda=530$  нм в стационарную и терминальную фазы также был достоверно выше контрольных значений ( $p_1 = 0,007$ ,  $p_2 = 0,01$ ) и ( $p_1 = 0,002$ ,  $p_2 = 0,005$ ) (таблица 21).

Таким образом, содержание карбонильных производных белков в эритроцитах и плазме крови животных с АОЯ возрастал по мере прогрессирования опухоли.

#### 4.5 – Перекисное окисление липидов в плазме крови у животных-опухоленосителей

В результате проведённых исследований (таблица 22) нами установлено статистически значимое возрастание МДА при одновременном снижении уровня ДК и КД в плазме крови в стационарную и терминальную фазы роста опухоли.

**Таблица 22 – Продукты липопероксидации в плазме крови у животных-опухоленосителей**

Показатели Группы	Малоновый диальдегид, мкмоль/л	Диеновые конъюгаты, ед.опт.пл/мл	Кетодиены, ед.опт.пл/мл	Основания Шиффа, ед.опт.пл/мл
Контроль (n=62)	4,207±0,244	0,925±0,012	0,075±0,003	0,006±0,001
Стационарная фаза (n=64)	7,906±0,744*	0,902±0,017	0,072±0,006	0,005±0,001*
Терминальная фаза (n=64)	7,981±0,475*	0,883±0,019	0,071±0,007	0,011±0,003

*Примечание:* \* – статистически достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).

Уровень ОШ в плазме крови статистически значимо снижался в стационарную фазу (таблица 22).



#### **4.6 – Корреляционная связь между параметрами системы «перекисное окисление липидов – антиоксиданты», индекса трансформации и ригидностью мембраны эритроцитов у крыс при асцитной опухоли яичников**

В ходе исследования выявлено, что между показателями параметров системы «ПОЛ – антиоксиданты» с ИТ эритроцитов установлена высокая положительная корреляционная зависимость между содержанием ДК в терминальную фазу роста неоплазмы и ИТ эритроцитов ( $r=0,6910$ ,  $p\leq 0,05$ ) (таблица 23).

Также обнаружена положительная корреляционная зависимость между уровнем КД и ригидностью эритроцитов в терминальную фазу роста модельной неоплазмы ( $r=0,4954$ ,  $p\leq 0,01$ ) (таблица 23). Нами также была отмечена отрицательная корреляционная зависимость между активностью GSH и изменением ригидности эритроцитов ( $r=-0,772$ ,  $p\leq 0,05$ ) (таблица 23).

Отношение GSH/GSSG в терминальную фазу имеет отрицательную высокую корреляционную зависимость с ИТ эритроцитов ( $r=-0,6916$ ,  $p<0,05$ ) и отрицательную корреляционную зависимость с ригидностью мембраны эритроцитов ( $r=-0,569$ ,  $p<0,05$ ) (таблица 23).

**Таблица 23 – Показатели корреляционных связей по Спирмену между параметрами системы «ПОЛ – антиоксиданты», ИТ и ригидностью мембраны эритроцитов у крыс при экспериментальной неоплазме**

Показатели			МДА	ДК	КД	ШО	СОД	ГТ	Каталаза	GSH	GSH / GSSG
Группа											
Стационарная фаза	ИТ	r	0,2340	0,100	0,2883	0,1576	-0,0748	0,3365	-0,3571	0,3819	-0,1261
		p	≤0,02	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,02	≤0,02	≤0,02	≤0,02
	Ригидность	r	0,1790	0,4040	0,2150	0,1670	0,4190	0,3330	0,1430	<b>-0,772</b>	<b>- 0,569</b>
		p	≤0,02	≤0,05	≤0,01	≤0,02	≤0,05	2≤0,02	≤0,01	<b>≤0,05</b>	<b>≤0,05</b>
Терминальная фаза	ИТ	r	0,2910	<b>0,6910</b>	<b>0,4954</b>	0,3084	-0,3333	0,3455	-0,1273	0,0805	<b>-0,6916</b>
		p	≤0,02	<b>≤0,05</b>	<b>≤0,01</b>	≤0,02	≤0,05	≤0,02	≤0,01	≤0,01	<b>≤0,05</b>
	Ригидность	r	0,3130	0,1070	0,1560	0,2170	0,2060	0,3470	0,3710	- 0,3190	- 0,235
		p	≤0,02	≤0,01	≤0,01	≤0,02	≤0,01	≤0,02	≤0,02	≤0,02	≤0,02

**Таблица 24 – Корреляционная зависимость показателей окислительной модификации белков между параметрами ИТ и ригидностью мембраны эритроцитов у крыс при экспериментальной неоплазме по Спирмену**

Показатели			ОМБ			
			346 нм	370 нм	430 нм	530 нм
Группа						
Стационарная фаза	ИТ	r	<b>0,500</b>	0,357	0,214	0,185
		p	<b>≤0,05</b>	≤0,02	≤0,01	≤0,01
	Ригидность	r	0,248	0,199	0,153	0,318
		p	≤0,02	≤0,01	≤0,01	≤0,02
Терминальная фаза	ИТ	r	0,211	0,327	<b>0,764</b>	<b>0,605</b>
		p	≤0,02	≤0,02	<b>≤0,05</b>	<b>≤0,05</b>
	Ригидность	r	0,369	0,336	0,255	0,185
		p	≤0,02	≤0,02	≤0,02	≤0,01

Проведенный корреляционный анализ между показателями ОМБ и параметрами ИТ эритроцитов у животных-опухоленосителей позволил выявить сильную положительную связь в стационарную фазу роста неоплазмы при 346 нм (альдегиды нейтрального характера) ( $r=0,500$ ,  $p<0,05$ ) и высокую – в терминальную фазу при 430 и 530 нм (альдегиды и кетоны основного характера) ( $r=0,764$ ,  $p <0,05$ ;  $r=0,605$  нм,  $p<0,05$ ) (таблица 24).

**Таблица 25 – Корреляционная взаимосвязь ИТ и ригидности мембраны эритроцитов с гемоглобином у крыс при экспериментальной неоплазме по Спирмену**

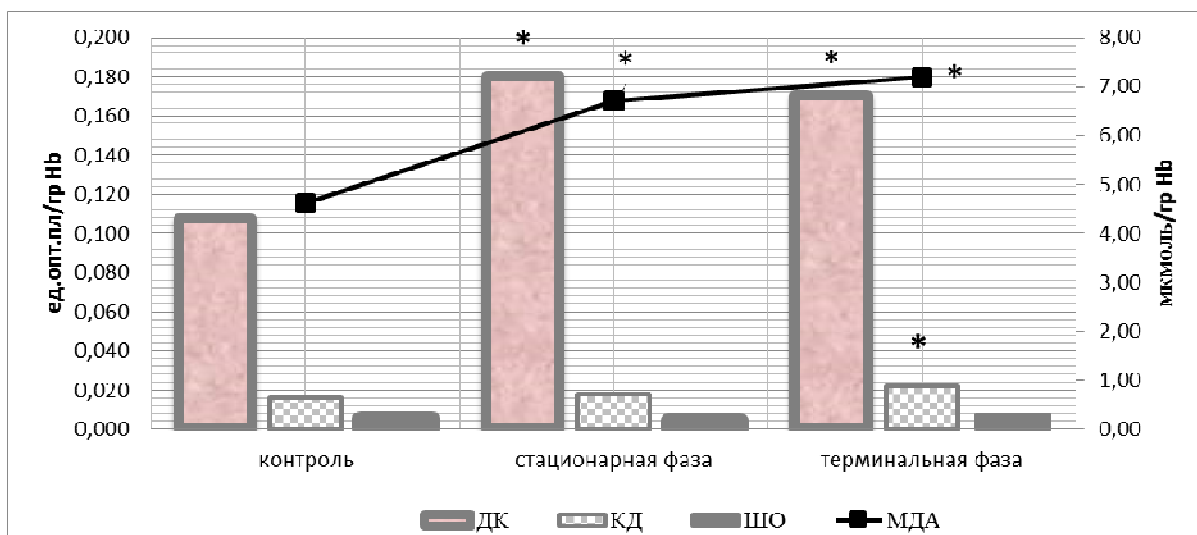
Группа	Стационарная фаза				Терминальная фаза			
	ИТ		Ригидность		ИТ		Ригидность	
	г	р	R	р	г	р	г	р
Показатели								
Нб	<b>-0,667</b>	<b>≤0,05</b>	-0,395	≤0,02	-0,353	≤0,02	<b>-0,619</b>	<b>≤0,05</b>

Из представленных данных (таблица 25) индекс трансформации эритроцитов сильно отрицательно коррелировал с уровнем гемоглобина в стационарную фазу ( $r=-0,667$ ,  $p<0,05$ ). В терминальную фазу роста неоплазмы у животных-опухоленосителей также отмечалась высокая отрицательная корреляционная зависимость изменения ригидности мембраны эритроцитов и содержания гемоглобина ( $r=-0,619$ ,  $p <0,05$ ) (таблица 25).

### Резюме

Согласно полученным данным динамика изменения редокс-статуса эритроцитов характеризовалась повышением уровня МДА в эритроцитах циркулирующей крови при различной локализации неоплазмы [8, 59, 93, 184, 176, 198, 199] и у животных с экспериментальной опухолью [9, 29, 57, 97].

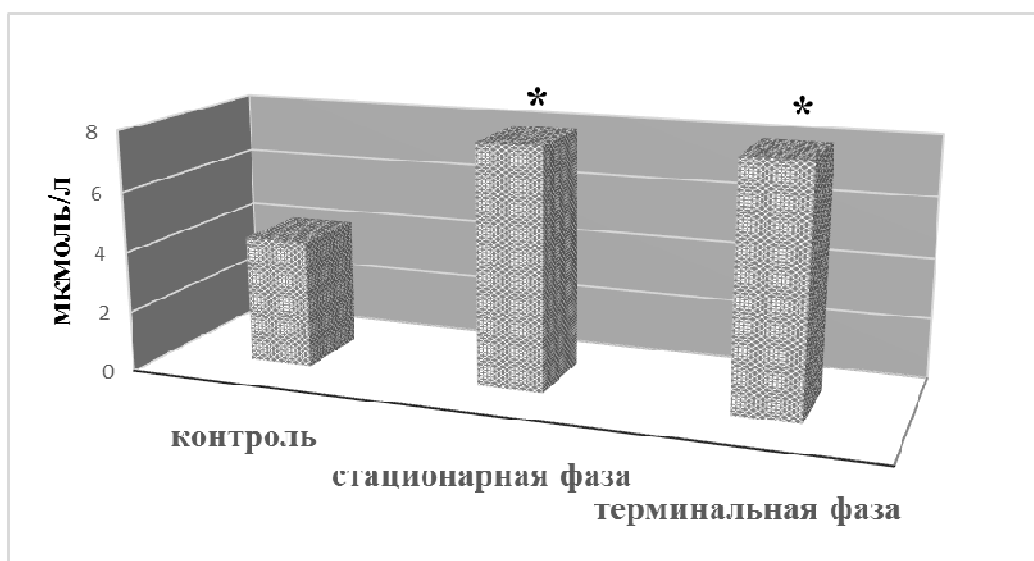
На сегодня существует точка зрения, согласно которой активация свободнорадикального окисления является типовым эфферентным звеном реализации патогенных эффектов различных факторов, в том числе и системного действия неоплазмы на организм [48]. Нами были проанализированы параметры различных этапов ПОЛ: первичные продукты – ДК, промежуточные – КД и МДА и третичные продукты – ОШ. В научной литературе мы не нашли данных по одновременному определению продуктов всех этапов ПОЛ.



**Рисунок 11 – Продукты перекисного окисления липидов в эритроцитах крыс в динамике развития асцитной опухоли яичников**

*Примечание. \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

Нами выявлено повышение уровня МДА в эритроцитах (рисунок 11) и плазме крови крыс с АОЯ по сравнению с группой контроля (рисунок 11а).



**Рисунок 11а – МДА в плазме крови крыс в динамике развития асцитной опухоли яичников**

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

Существует мнение, что образование МДА способствует формированию перекрестных сшивок между фосфолипидами и белками мембраны. Результатом является нарушение функции мембраны, деформируемости клетки и ограничение жизни эритроцита [73].

В нашем исследовании отмечалось достоверное повышение содержания

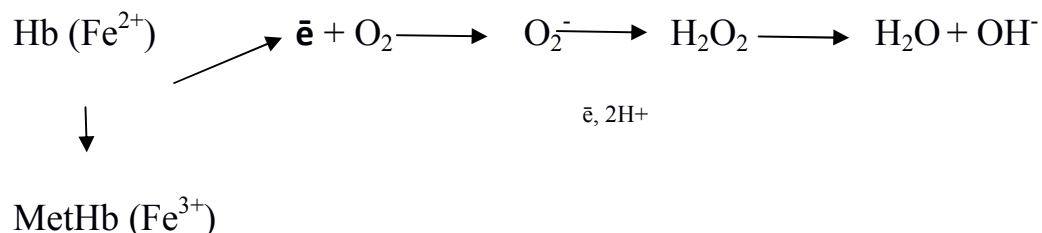
ДК в эритроцитах (рисунок 11). Повышенное содержание ДК было выявлено в эритроцитах женщин с раком молочной железы [80], у пациенток со злокачественными опухолями эндометрия [98], в эритроцитах больных эритремией [45]. В литературе также имеется информация об увеличении первичных и вторичных продуктов ПОЛ в эритроцитах крови у больных раком прямой кишки III стадии (диеновых конъюгатов в 3 раза, МДА в 2 раза). Возникновение ОС в липидах эритроцитов при онкологических заболеваниях (раком молочной железы и кишечника) связывают с уменьшением уровня линолевой и арахидоновой кислот [230].

Таким образом, полученные нами данные позволили предположить, что накопление в эритроцитах промежуточных продуктов ПОЛ – ДК и МДА – следствие системного действия неоплазмы на организм.

В плазме крови МДА возрастает на поздних стадиях рака тела матки, рака легкого и при экспериментальной лимфосаркоме Плисса [28, 32, 79]. Снижение уровня МДА выявлено при раке шейки матки на IV стадии при раке яичников [8, 93]. В сыворотке больных неходжкинской лимфомой отмечается повышение МДА [181]. У больных с миеломой содержание МДА в плазме крови близка к норме [96].

Несколько иная ситуация имела место при оценке в эритроцитах активности ферментативного звена антиоксидантной системы.

Источником супероксидного аниона  $O_2^-$  в эритроцитах является спонтанное окисление  $Fe^{2+}$  в геме гемоглобина. И поскольку кислорода в эритроцитах много, скорость образования  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  и  $OH$  высокая.

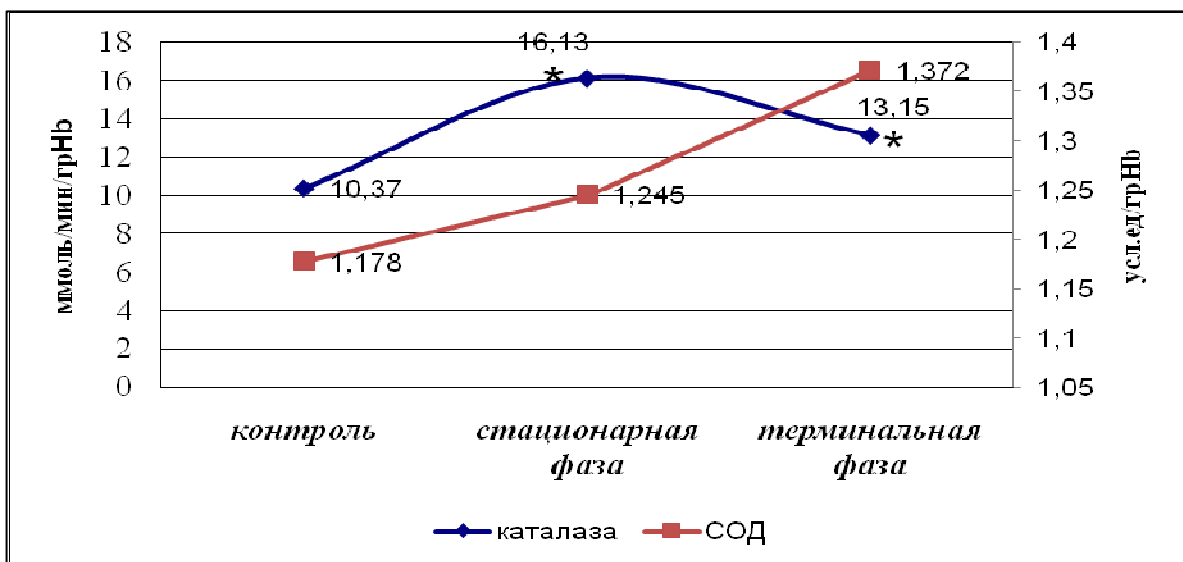


Далее СОД превращает в  $H_2O_2 + O_2$ , а уже каталаза расщепляет  $H_2O_2$ . В клетках каталаза, в основном, сосредоточена в пероксисомах, в которых содержатся и ферменты, продуцирующие  $H_2O_2$ , необходимую, в частности, в

процессах неспецифической иммунной защиты. Каталаза во внеклеточных жидкостях способна быстро терять свою активность в результате деятельности протеолитических ферментов [221].

Нами выявлено повышение активности СОД и каталазы в эритроцитах по сравнению с контролем в стационарную и терминальную фазы роста неоплазмы (рисунок 12). На сегодня не существует единого мнения относительно активности СОД и каталазы в динамике развития неоплазмы. По данным одних авторов [1, 59, 93, 104, 114, 227], активность СОД и каталазы в эритроцитах снижается. При этом авторы полагают, что прогрессирующая недостаточность активности СОД определяет системную активацию процессов ПОЛ при неопластических процессах определённой локализации [49].

Данные других авторов [11, 29, 199] свидетельствуют о повышении активности СОД и каталазы. При этом существует предположение, что увеличение в эритроцитах активности антиоксидантных ферментов может быть компенсаторной в ответ на усиление ОС [199].



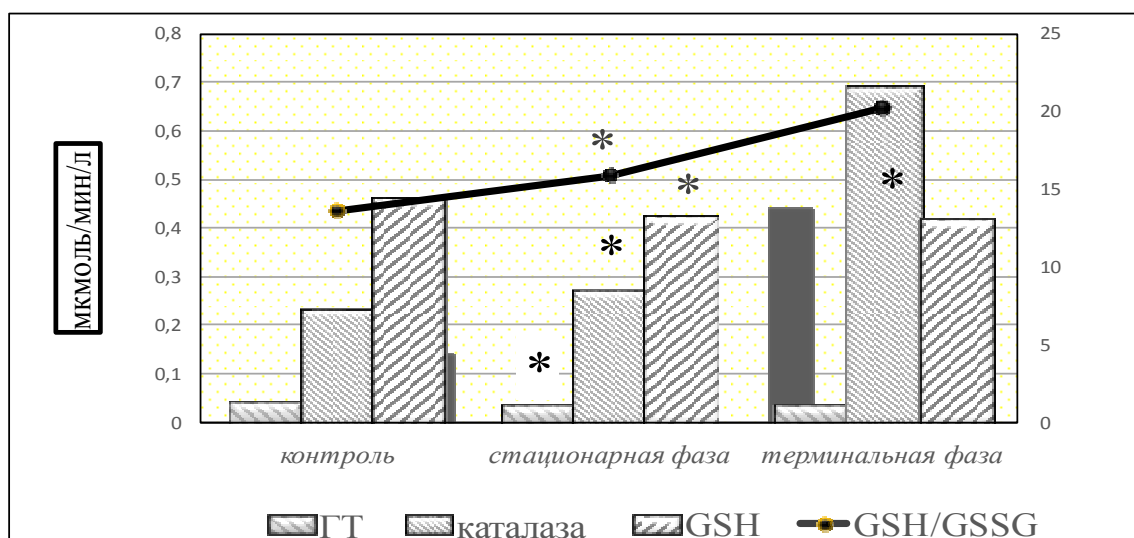
**Рисунок 12 – Активность супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах крыс в динамике неопластического процесса**

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

Нет единого мнения по поводу активности СОД и каталазы в эритроцитах животных в динамике развития неоплазмы [11, 29, 114].

В литературе также представлены данные о фазности изменений антиоксидантной активности крови [23], где было высказано предположение, что неоплазма «выкачивает» антиоксиданты из других органов и тканей. При этом удаление неоплазмы приводит к нормализации активности ПОЛ в крови, что позволяет предполагать определяющую роль неоплазмы в формировании антиоксидантного статуса у животного с неопластическим процессом.

Мы получили значимое повышение активности каталазы в плазме крови на всех стадиях роста опухоли (рисунок 13). Подобное увеличение отмечают у больных с множественной миеломой и раком яичников [53, 93, 96]. Снижение активности каталазы отмечается при раке шейки матки [9]. Одновременно наблюдалось снижение уровня GSH и увеличение GSH/GSSG в стационарную фазу в плазме крови крыс (рисунок 13).



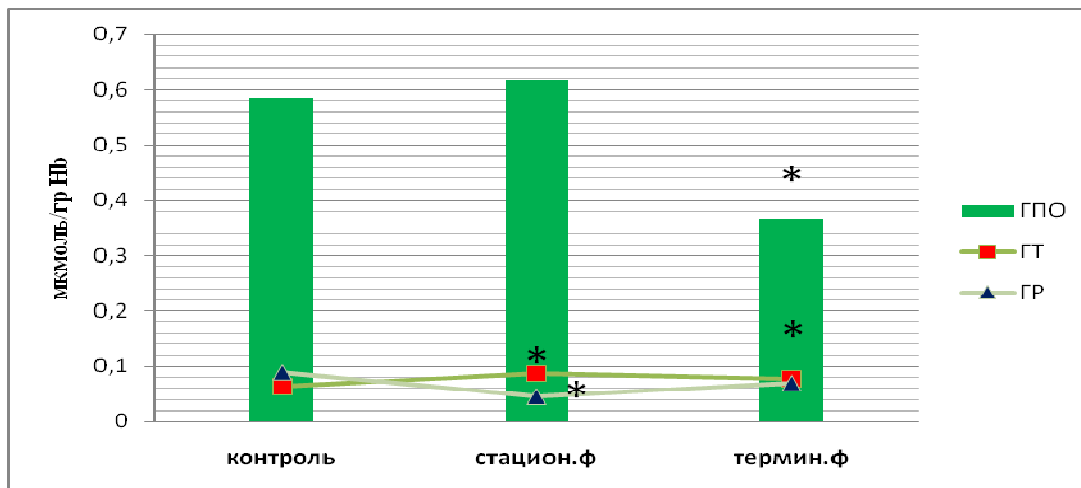
**Рисунок 13 – Активность каталазы и глутатионовой системы в плазме крови крыс при экспериментальной неоплазме**

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

Расщеплять  $H_2O_2$  в эритроцитах может также ГПО, активность которой, по нашим данным в терминальную фазу была значимо снижена по сравнению с контролем (рисунок 14). Снижение активности ГПО в эритроцитах зарегистрировано также у больных раком шейки матки и раком желудка [25, 160]. Повышенное содержание ГПО в эритроцитах отмечается у больных раком эндометрия и раком яичников [98, 104]. Окисленный глутатион восстанавливает ГР, активность которой, по нашим данным, также была



снижена в эритроцитах в динамике развития неоплазмы (рисунок 14). Снижение уровня ГР отмечается при экспериментальном раке шейки матки и на поздних стадиях рака яичников [29, 93]. Повышение уровня ГР отмечается при раке яичников [104].



**Рисунок 14 – Активность глутатионзависимых ферментов в эритроцитах при экспериментальной неоплазме**

*Примечание.* \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).

Анализ вышеизложенного позволяет предположить, что активность ферментативного звена АОС в эритроцитах экспериментальных животных, определяемая условиями гипоксии, развивающейся в организме при развитии неопластического процесса, усилением активности моноцитов, осуществляющих противоопухолевый иммунный ответ, является важной составляющей биологического портрета неоплазмы в динамике ее развития.

Глутатион – тиолсодержащий трипептид, который осуществляет защиту клетки от ксенобиотиков, свободных радикалов и гидропероксидов. Он функционирует в качестве антиоксиданта, участвуя в разрушении  $H_2O_2$  и пероксидов липидов, обеспечивая субстрат для ГПО. В эритроцитах периферической крови, наиболее страдающих от активности свободных радикалов при развитии в организме неоплазмы, его содержится значительное количество [212].

При снижении потенциала глутатионовой защиты в эритроцитах повышается содержание АФК, которые вызывают окисление SH-групп молекул Hb.

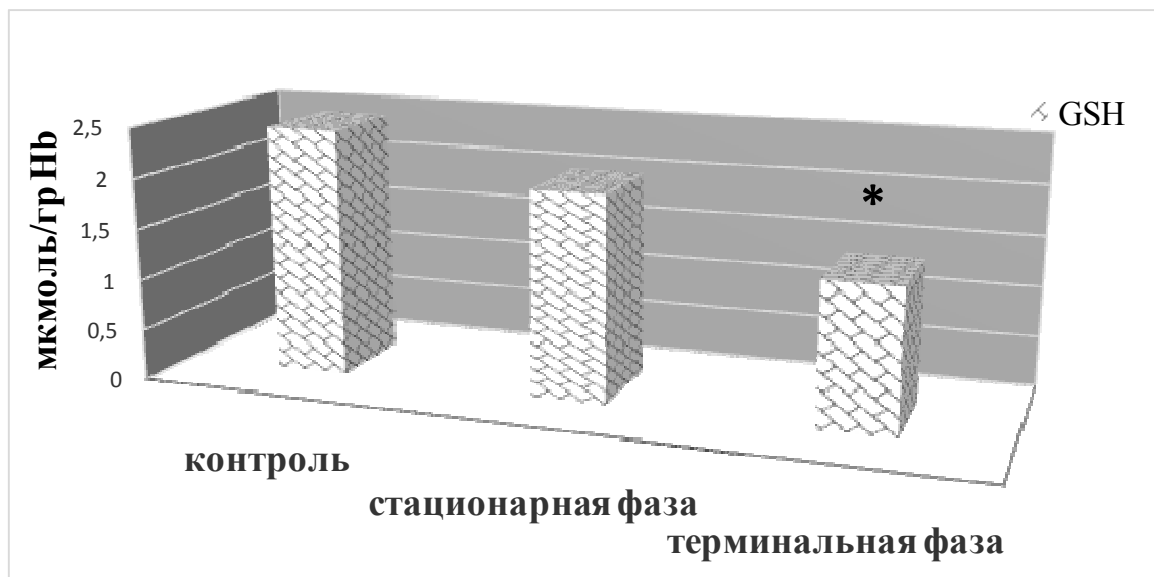
Образование дисульфидных связей между протомерами Hb и метHb приводит к их агрегации – образованию телец Хайнца, которые способствуют разрушению эритроцитов при попадании их в мелкие капилляры.

Нами выявлено прогрессирующее падение уровня GSH и отношения GSH/GSSG в эритроцитах при моделировании опухолевого процесса (рисунок 15 и рисунок 15a). Снижение окислительно-восстановительного статуса глутатиона (GSH/GSSG) имело место в крови мышей с опухолью Эрлиха [190], в эритроцитах у пациентов с опухолевыми процессами различной локализации [7, 119, 222]. В то же время в литературе доступны данные о повышении GSH и GSSG в эритроцитах крыс на ранних стадиях развития гепатомы Морриса 5123 [127]. Повышение уровня GSH отмечается также при раке яичников и экспериментальной лимфосаркоме Плисса [57, 104]. При этом авторы отмечали на поздних стадиях понижение уровня GSH и соотношения GSH/GSSG при сохраняемом повышенном уровне GSSG. Снижение уровня GSH в эритроцитах отмечалось также у больных со злокачественными образованиями [16, 63, 96, 98], в эритроцитах мышей в динамике развития рака шейки матки [41].

Существует мнение, что использование GSH в окислительных реакциях сопровождается генерацией GSSG, взаимодействующего с SH-группами белков. При этом величина отношения GSH/GSSG значительно снижалась, что свидетельствует о сокращении редокс-потенциала системы глутатиона. При снижении величины отношения GSH/GSSG в условиях окислительного стресса тиоловые группы белков могут модифицироваться обратимо с образованием смешанных дисульфидов между белковыми SH-группами и SH-группами молекул с низкой молекулярной массой [157].

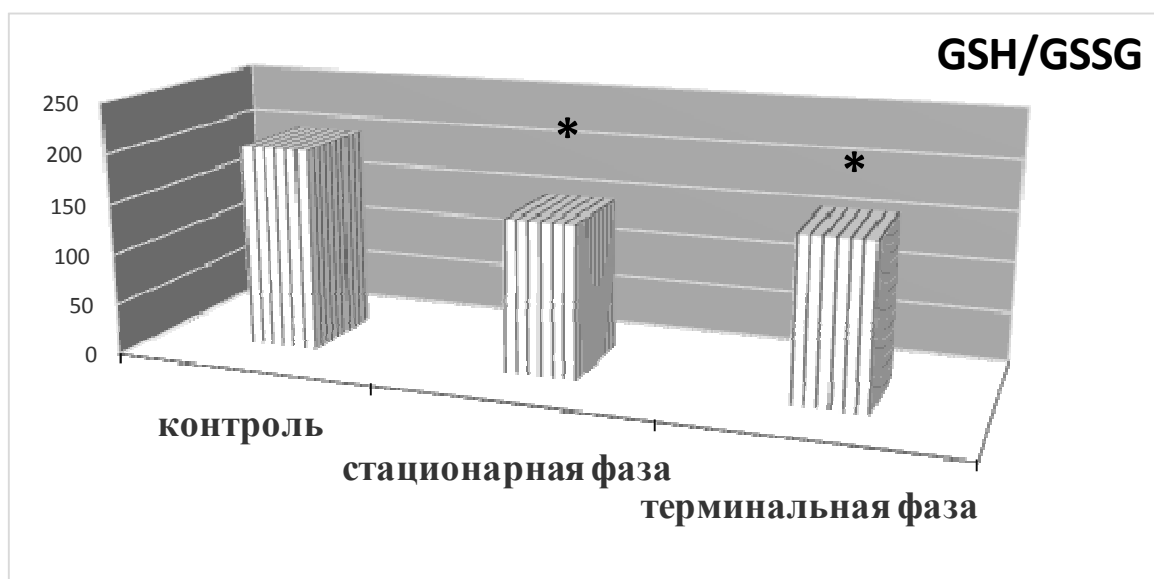
В качестве «ловушки» для свободных радикалов выступает GSH [56], а опухолевые состояния вызывают истощение GSH [119]. Полученные нами данные о динамике ГПО и ГР (снижение активности которых, возможно, является результатом влияния неоплазмы) позволяют предполагать не только и не столько истощение GSH, сколько снижение его образования в

эритроцитах при развитии экспериментальной неоплазмы.



**Рисунок 15 – Изменение уровня глутатиона в эритроцитах при развитии экспериментальной неоплазмы**

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*



**Рисунок 15а – Изменение отношения GSH/GSSG в эритроцитах при развитии экспериментальной неоплазмы**

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

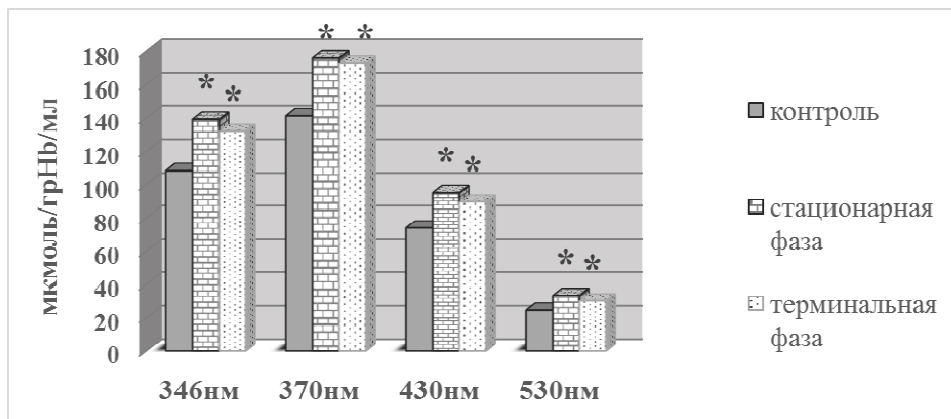
GSH также использует ГТ при детоксикации ксенобиотиков и пероксидов. Нами выявлено увеличение активности ГТ в эритроцитах (рисунок 14) и одновременное снижение активности ГТ в плазме крови (рисунок 13) в динамике развития неоплазмы. Повышение активности ГТ в эритроцитах больных раком яичников и раком шейки матки показано в работах [9, 104].

Повышение активности ГТ в эритроцитах представляется оправданным на фоне повышения концентрации АФК и усиления ПОЛ, однако это также ведет к истощению пула GSH. Снижение активности ГТ показано при раке эндометрия и при развитии экспериментального рака шейки матки [29, 63, 98].

Содержание в клетках окисленных белков обусловлено генетически и является характеристикой фенотипической изменчивости. На сегодня в литературе представлены результаты целой серии исследований, подтверждающие усиление ОМБ при различной неопластической локализации. Так в работе Горошинской И.А. при раке яичников отмечается усиление уровня карбонильных производных белков при 430 нм и 530 нм с образованием карбонилового стресса [53]. Отмечается увеличение карбонильных белков в плазме крови за счет альдегидных и кетонных производных при распространённом новообразовании эпителиальной ткани [77]. Усиление спонтанного окисления белков плазмы отмечается при прогрессировании рака шейки матки [101]. Также повышение содержания производных белков в плазме крови отмечается у животных с лимфосаркомой Плисса, больных раком мочевого пузыря, раком легкого, раком яичников, раком шейки матки, острых и хронических лейкозах, колоректальном раке, злокачественном новообразовании эпителиальной ткани [16, 40, 53, 55, 77, 100, 205, 235].

Увеличение в эритроцитах продуктов ОМБ отмечается на II и IV стадии развития рака легкого [83]. Увеличение количества ОМБ в эритроцитах (370 нм) встречается при экспериментальном раке шейки матки. При 346, 430 и 530 нм данные не отличались от контроля [41]. В инициации свободно-радикальных процессов играет роль реакция Фентона, при этом окислительное повреждение белков вызывают даже такие физиологические комплексы железа, как железо/цитрат и железо/АФК в присутствии и без  $H_2O_2$ . Возникает кислород-зависимая инактивация ферментов. Наиболее чувствительной к действию радикальных продуктов оказалось СОД [44, 204]. Существует мнение, что в состоянии ОС при окислении белков включается не только радикал  $OH^\cdot$ , но и другие реакционноспособные соединения (феррил-перферрил-ионы) [200]. В

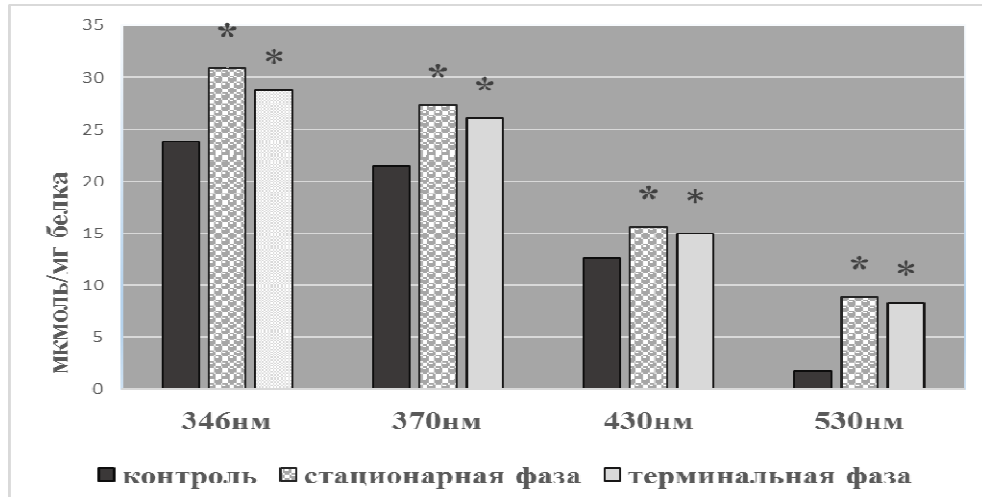
результате ОМБ появляется большое количество окисленных соединений радикальной и нерадикальной природы. Считается, что физиологическая роль белковых радикалов окончательно не выяснена. Однако то, что они способны участвовать в реакциях окисления биомолекул и, в конечном счете, повреждать биологические системы, может свидетельствовать об их прооксидантном действии [168, 206]. В результате возможно окисление восстановленного глутатиона. Полагают также, что гидроперекиси белков, образующиеся в условиях оксидативного стресса, являются патогенетическим звеном при ряде патологических состояний.



**Рисунок 16 –Уровень карбонильных производных белков в эритроцитах в динамике экспериментальной неоплазмы**

*Примечание. \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

Нами выявлено статистически значимое повышение уровня карбонильных производных нейтрального и основного характера в эритроцитах (рисунок 16) и плазме крови крыс в динамике развития неоплазмы (рисунок 17). При этом нарастание уровней продуктов ОМБ от стационарной к терминальной фазе роста неоплазмы, возможно, объясняется тем, что на начальных стадиях ОС образуются комплексы окисленных липидов с реактивными группировками белков. И эти комплексы, обладая антиоксидантными свойствами, защищают липиды и белки от окислительной модификации с участием АФК, образующихся в системах, содержащих железо  $H_2O_2$  [236].



**Рисунок 17 – Уровень карбонильных производных белков в плазме крови в динамике экспериментальной неоплазмы**

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с показателями контроля ( $p \leq 0,05$ ).*

Модификация белков делает их более чувствительными к протеолизу. Удаление модифицированных белков идет по двум двумя механизмам: с помощью протеасом и протеаз [154, 223]. Следовательно, накопление поврежденных белков может быть также результатом снижения активности протеазных систем или функции протеасом. Было также высказано предположение, что развитие карбонильного стресса может быть и без избыточной генерации АФК, снижения АОЗ и активности протеаз. Этот путь карбонилирования связан с образованием абберантных белков при действии стресс-факторов либо нарушении трансляции [196].

Таким образом, разнонаправленная динамика активности ферментов антиоксидантной системы и уровня GSH в эритроцитах и плазме крови при повышенной концентрации продуктов ПОЛ позволили предположить возникновение в организме животных-опухоленосителей окислительного стресса. Увеличение продуктов карбонильных производных белков в эритроцитах и плазме крови способствовало возникновению карбонильного стресса.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ 4-Й ГЛАВЫ

### *Публикации в изданиях, рецензированных ВАК*

1. Изучение про– и антиоксидантного статуса эритроцитов при прогрессировании экспериментального рака яичников / *А.Ю. Тузеева (Федотова)*, Д.Р. Долгова, Т.В. Абакумова, Д.Н. Сенина // *Фундаментальные исследования*. 2014. № 1, прил. С.145–149. (РИНЦ - 0,492).

2. К вопросу о механизмах возникновения оксидативного стресса в эритроцитах организма-опухоленосителя / Т.П. Генинг, *А.Ю. Федотова*, Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева, О.С. Воронова // *Ульяновский медико-биологический журнал*. 2017. № 3. С. 107–115. DOI: 10.23648/UMBJ.2017.27.7082 (РИНЦ - 0,164).

3. Роль редокс-зависимых процессов в нарушении морфофункционального состояния эритроцитов при распространенных формах рака яичников / *А.Ю. Федотова*, Д.Р. Долгова, Т.П. Генинг, Т.В. Абакумова, С.О. Генинг, Е.Ю. Насырова, Т.И. Величко // *Вестник уральской медицинской академической науки*. 2015. № 4 (55). С.71–75 (РИНЦ - 0,143).

4. *Тузеева (Федотова) А.Ю.* Окислительная модификация белков в эритроцитах и в плазме крови в динамике экспериментального рака яичников / *А.Ю. Тузеева (Федотова)*, Т.П. Генинг, Д.Р. Долгова // *Ульяновский медико-биологический журнал*. 2014. № 4. С. 78–81. (РИНЦ - 0,164).

### *Публикации в других изданиях*

5. Редокс-гомеостаз эритроцитов крыс при прогрессировании неоплазмы / Д.Р. Долгова, Т.П. Генинг, *А.Ю. Тузеева (Федотова)*, А.А. Михеенко // *Медико-физиологические проблемы экологии человека: V Всерос. конф. с междунар. участием*. Ульяновск, 2014. С. 67–69.

6. *Тузеева (Федотова) А.Ю.* Окислительная модификация белков в эритроцитах в динамике экспериментального рака яичников / *А.Ю. Тузеева (Федотова)*, Д.Р. Долгова, Д.Н. Сенина // *Вестник Российского Государственного Медицинского Университета*. Москва, 2015. № 2: X

Междунар. (XIX Всерос.) Пироговская науч. мед. конф. студентов и молодых ученых. С. 327–328.

7. *Тузеева (Федотова) А.Ю.* Про-и антиоксидантный статус в эритроцитах при экспериментальном канцерогенезе / *А.Ю. Тузеева (Федотова)*, Т.П. Генинг, Д.Р. Долгова // Приоритеты мировой науки: эксперимент и научная дискуссия: материалы VIII междунар. науч. конф. (17-18 июня 2015 г., Северный Чарльстон, Южная Каролина, США). Северный Чарльстон, 2015. С. 27–31.

8. *Федотова А.Ю.* Активность глутатионовых ферментов и оценка морфологии эритроцитов при экспериментальном канцерогенезе / *А.Ю. Федотова*, Д.Р. Долгова, Т.П. Генинг // Медико-физиологические проблемы экологии человека: VI Всерос. конф. с междунар. участием. Ульяновск, 2016. С. 166–167.

9. *Федотова А.Ю.* Паранеопластические процессы в эритроцитах в динамике канцерогенеза / *А.Ю. Федотова*, Д.Р. Долгова, Т.В. Абакумова // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии: материалы Всерос. молодеж. конф. (Ростов-на-Дону, 2 сент. 2016 г.). Ростов-на-Дону, 2016. С. 98–100.

10. *Федотова А.Ю.* Редокс-гомеостаз в плазме крови при неопластическом процессе / *А.Ю. Федотова*, А.Н. Минаева // Медико-физиологические проблемы экологии человека: материалы VII Всерос. конф. с междунар. участием, посв. 30-летию Ульянов. гос. университета. Ульяновск, 2018. С.285–287.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным данным динамика изменения редокс-статуса эритроцитов характеризуется повышением содержания первичных продуктов ПОЛ-ДК, КД в эритроцитах и вторичного продукта ПОЛ-МДА в эритроцитах, плазме крови, и прогрессирующей динамикой опухолевого процесса. Это может рассматриваться как результат действия неоплазмы на организм.

При оценке ферментативного звена АОС достоверным и значимым явилось повышение активности каталазы как в эритроцитах, так и плазме крови.

Изучение глутатионовой системы позволило установить прогрессирующее снижение уровня GSH в плазме крови и эритроцитах. Также наблюдалось снижение отношения GSH/GSSG в эритроцитах в динамике развития неоплазмы. При этом в плазме крови отмечалось увеличение GSH/GSSG.

Полученные данные могут свидетельствовать о снижении редокс-потенциала глутатионовой системы в эритроцитах.

Одновременное снижение в эритроцитах активности ГПО и ГР позволяют предполагать не только и не столько истощение GSH, сколько снижение его образования в эритроцитах при развитии экспериментальной неоплазмы.

Установленное увеличение активности ГТ в эритроцитах в динамике развития неоплазмы представляется оправданным на фоне повышения концентрации АФК и усиления ПОЛ, однако это также ведёт к истощению пула GSH.

Нами выявлено значимое повышение уровня карбонильных производных нейтрального и основного характера в эритроцитах, плазме крови крыс в динамике развития неоплазмы. Подобное повышение отмечено рядом исследователей при неоплазме различной локализации и может свидетельствовать о возникновении карбонилового стресса.

Нами наблюдалось повышение в плазме крови уровня эритропоэтина, наиболее выраженное в стационарную фазу роста опухоли. Повышение уровня эритропоэтина не приводило к усилению числа ретикулоцитов циркулирующей крови крыс. На фоне выброса эритропоэтина количество эритроцитов и уровень гемоглобина циркулирующей крови организма-опухоленосителя снижались, что возможно связано с истощением красного костного мозга, либо снижение чувствительности к эритропоэтину. У женщин с раком яичников концентрация эритропоэтина и содержание ретикулоцитов не отличалась от показателей контрольной группы доноров. Исследование цитоархитектоники эритроцитов показало уменьшение количества нормоцитов (дискоцитов) в стационарную фазу и возникновение обратимо деформированных форм эхиноцитов. В терминальную фазу роста опухоли отмечалось увеличение необратимых форм эритроцитов — сфероцитов. У пациентов с опухолевым процессом цитоархитектоника эритроцитов также менялась. У больных с РЯ III стадии появляются обратимо деформированные формы эхиноцитов. Появление измененных форм эритроцитов у животных-опухоленосителей и больных РЯ приводит к увеличению показателей индекса трансформации эритроцитов и возрастанию ригидности. Изменение морфометрических параметров эритроцитов у крыс-опухоленосителей характеризуется значимым повышением высоты клетки в стационарную и снижением в терминальные фазы роста опухоли; уменьшением глубины впадины в стационарную фазу, а в терминальную фазу — появление форм без углубления центральной впадины; повышение диаметра, длины и площади эритроцитов на всех сроках прогрессирования неоплазмы.

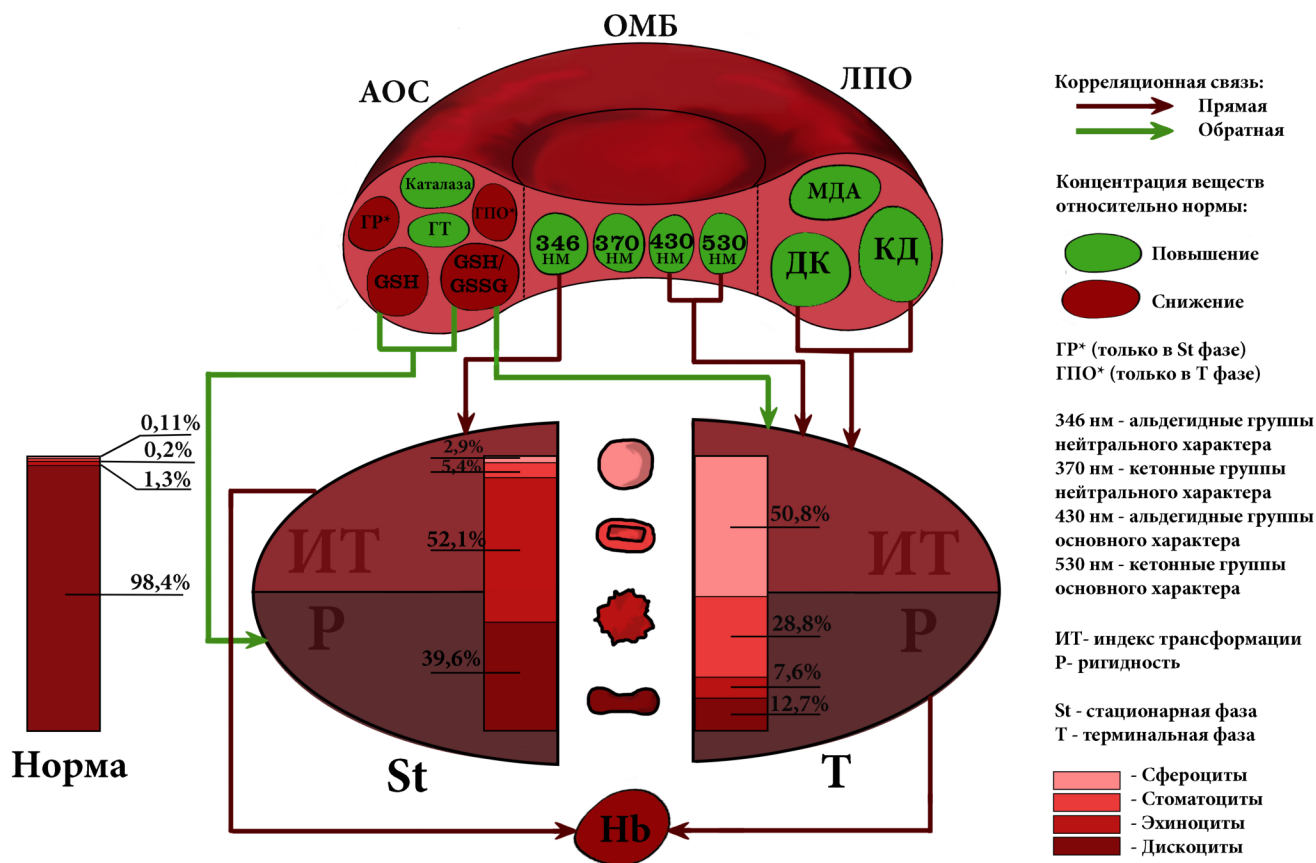
Нами было показано, что индекс трансформации эритроцитов достоверно коррелировал с уровнем диеновых конъюгатов и кетодиенов ( $r=0,6910$ ;  $p\leq 0,05$ ;  $r=0,4954$ ;  $p\leq 0,01$ ). Возрастание промежуточных продуктов ПОЛ приводят к патологическим изменениям эритроцитов циркулирующей крови у животных с экспериментальной опухолью яичников. При этом повышение индекса трансформации эритроцитов ( $r=-0,6916$ ;  $p\leq 0,05$  и ригидности ( $r=-0,569$ ,  $\leq 0,05$ )

коррелирует со снижением отношения GSH/GSSG. Снижение уровня GSH сопровождается повышением ригидности эритроцитов ( $r=-0,772$ ;  $p\leq 0,05$ ).

Таким образом, усиление ПОЛ уже на начальных этапах неопластического процесса и истощение системы глутатиона сопровождается возрастанием ригидности, а также появлением патологических форм эритроцитов. Возрастание индекса трансформации также сопровождается снижением содержания гемоглобина на всех сроках роста неоплазмы ( $r=-0,667$ ,  $p<0,05$ ;  $r=-0,619$ ,  $p<0,05$ ).

Корреляционный анализ между показателями окислительной модификации белков и ИТ, ригидностью мембраны эритроцитов у животных-опухоленосителей позволил выявить зависимость возрастания уровня ОМБ (альдегидов нейтрального характера ( $r=0,500$ ,  $p<0,05$ ), альдегидов основного характера ( $r=0,764$ ,  $p<0,05$ ) и кетонных групп основного характера ( $r=0,605$ ,  $p<0,05$ )), которая сопровождается увеличением патологических форм эритроцитов в кровеносном русле.

Таким образом, в результате диссертационного исследования нами было выявлено развитие окислительного и карбонилового стресса в эритроцитах организма-опухоленосителя при асцитной опухоли яичников. Результаты исследования позволили обнаружить взаимосвязь изменений окислительно-восстановительного статуса эритроцитов и плазмы крови с изменением морфологических свойств и ригидности эритроцитов циркулирующей крови. Данные изменения могут свидетельствовать о снижении способности деформации эритроцитов в микроциркуляторном русле и предполагать значимое нарушение микроциркуляции в тканях организма-опухоленосителя при развитии экспериментальной асцитной опухоли яичников (рисунок 18).



**Рисунок 18 – Морфология и окислительно-восстановительный статус эритроцитов циркулирующей крови в организме-опухоленосителе**

## ВЫВОДЫ

1. В эритроцитах периферической крови крыс с асцитной опухолью яичников имеет место увеличение параметров различных этапов перекисного окисления липидов: повышение уровня диеновых конъюгатов и прогрессирующее возрастание малонового диальдегида, что может свидетельствовать о возникновении оксидативного стресса.

2. Ферментативная активность антиоксидантной системы в эритроцитах и плазме крови животных-опухоленосителей характеризуется значимым возрастанием уровня каталазы; истощением глутатиона восстановленного в эритроцитах и плазме крови при одновременном увеличении отношения GSH/GSSG в плазме крови, а также снижением активности глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы при возрастании активности глутатион-S-трансферазы в эритроцитах.

3. Усиление окислительной модификации белков в эритроцитах и плазме крови крыс с асцитной опухолью яичников при развитии неоплазмы может свидетельствовать о возникновении карбонильного стресса.

4. Эритроциты циркулирующей крови крыс с экспериментальной асцитной опухолью яичников изменяют свою архитектонику: в стационарную фазу возрастает количество эхиноцитов, а в терминальную фазу – сфероцитов, увеличивается индекс трансформации и ригидность мембраны на фоне повышения высоты, изменения глубины впадины, увеличения диаметра, длины и площади эритроцитов.

5. На фоне повышения уровня эритропоэтина снижается количество циркулирующих эритроцитов и уровень гемоглобина у крыс – опухоленосителей в динамике развития неоплазмы.

6. Повышение индекса трансформации эритроцитов крыс-опухоленосителей значимо коррелирует с возрастанием в эритроцитах диеновых конъюгатов, кетодиенов, продуктов окислительной модификации белков, а также со снижением отношения GSH/GSSG и степенью насыщения

гемоглобином. Повышение ригидности мембраны эритроцитов коррелирует со снижением уровня глутатиона восстановленного и отношения GSH/GSSG.

7. У больных распространенным раком яичников на фоне изменения топологии, возрастания ригидности мембраны и повышения индекса трансформации циркулирующих эритроцитов снижается их общее количество и уровень гемоглобина.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АЖ	асцитическая жидкость
АОЗ	антиоксидантная защита
АОС	антиоксидантная система
АОЯ	асцитная опухоль яичника
АСМ	атомно-силовая микроскопия
АФК	активные формы кислорода
ГПО	глутатионпероксидаза
ГР	глутатионредуктаза
ГТ	глутатион-S-трансфераза
ДК	диеновые конъюгаты
КД	кетодиены
МДА	малоновый диальдегид
ОМБ	окислительная модификация белков
ОС	окислительный стресс
ОШ	основания Шиффа
ПНЖК	полиненасыщенные жирные кислоты
ПОЛ	перекисное окисление липидов
ПОЛ-АО	перекисное окисление липидов – антиоксиданты
РЯ	рак яичников
СОД	супероксиддисмутаза
GSH	глутатион восстановленный
GSSG	глутатион окисленный
MCH	параметр среднего содержания гемоглобина в отдельном эритроците
MCHC	средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах
MCV	средний объем эритроцита
RDW-CV	коэффициент вариации размеров эритроцитов
RDW-SD	относительная ширина распределения эритроцитов по объему

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агабеков, А.И. О роли активации процессов липопероксидации и недостаточности антирадикальной защиты крови в патогенезе рака ободочной кишки. Современный взгляд на будущее науки / А.И. Агабеков, В.Ю. Барсуков, Н.П.Чеснокова // Международная научно-практическая конференция: науч. центр «АЭТЕРНА». – 2014. – С. 44–47.
2. Адаптационные реакции эритроцитов при действии электромагнитного излучения терагерцового диапазона / А.В. Дерюгина, М.Н. Таламанова, Ю.Н. Хламова, и др. // Международный научно-исследовательский журнал. – 2017. – № 1. – С.6–8.
3. Анализ клеток крови, костного мозга и медиаторов гемопозеза у крыс Вистар в динамике развития карциносаркомы Walker 256 / М.Е. Тулеутаев, О.Ж. Узаков, А.В. Ефремов, и др. // Медицина Кыргызстана. – 2016. – Т. 1, № 3. – С. 35 – 38.
4. Андреева, Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиорбарбитуровой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // Лабораторное дело. –1988. – № 11. – С. 41– 43.
5. Анисимов, В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения / В.Н. Анисимов. – Санкт-Петербург: Наука, 2003. – 468 с.
6. Антиоксидантная активность и перекисное окисление липидов у больных раком эндометрия / Е.А. Винокурова, Н.Н. Франк, Н.В. Боярских, и др. // Сиб. онкол. журн. – 2007. – № 1. – С. 125 –126.
7. Антипенко, Е.А. Влияние антиоксидантной терапии на систему глутатиона эритроцитов при хронической ишемии мозга / Е.А. Антипенко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 147, № 1. – С. 25–26.
8. Антонеева, И.И. Уровень перекисного окисления липидов и ферментативное звено антиоксидантной системы эритроцитов при раке шейки



матки / И.И. Антонеева, Т.П. Генинг, Е.Г. Сидоренко // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – № 1. – С. 17.

9. Антонеева, И.И. Оксидативный стресс на разных стадиях рака шейки матки / И.И. Антонеева, Е.Г. Сидоренко, Т.П. Генинг // Современные наукоёмкие технологии. – 2010. – № 10. – С. 33-36.

10. Антонова, В.С. Автоматизация гематологического анализа. Интерпретация показателей гемограммы / В.С. Антонова, А.С. Волков // Инновационные технологии. – 2016. – № 2. – С. 6 – 28.

11. Арсланова, Д.Р. Система перекисное окисление липидов-антиоксиданты у крыс на разных стадиях онтогенеза и канцерогенеза: дис. ... канд.биол.наук; УлГУ / Д.Р. Арсланова. –Ульяновск, 2009. – 96 с.

12. Асатиани, В.С. Ферментные методы анализа / В.С. Асатиани. – Москва: Медицина, 1969. – С. 607–610.

13. Ашмарин, И.П. Патологическая физиология и биохимия / И.П. Ашмарин, Е.П. Каразеева, М.А. Карабасова. – Москва: Экзамен, 2005. – 480 с.

14. Барабой, В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / В.А. Барабой // Успехи современной биологии. – 2002. – Т. 3. – С. 923–931.

15. Барабой, В.А. Перекисное окисление и стресс / В.А. Барабой, И.И. Брехман, В.Г. Голожин. – Москва: Наука, 2004. – 148 с.

16. Белоногов, Р.Н. Изменение показателей тиолового гомеостаза в эритроцитах больных раком легкого на различных стадиях опухолевой прогрессии / Р.Н. Белоногов, Н.М. Титова, А.А. Савченко // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С.47 – 50.

17. Бессмельцев, С.С. Исследование жёсткости мембран эритроцитов у больных с множественной миеломой на фоне терапии, включающей лечебный плазмаферез / С.С. Бессмельцев, Ю.А. Скворцова, В.А. Тарлыков // Эфферентная терапия. – 2000. – Т. 6, № 1. – С. 36 – 41.

18. Бессонова, Л.О. Роль системы глутатиона в антиоксидантной защите при сочетанной патологии гипоксического генеза / Л.О. Бессонова, Н.В. Верлан,

Л.С. Колесниченко // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – № 6. – С.19 – 21.

**19.** Борисов, С.А. Апоптоз: патогенетические и биорегуляторные механизмы гибели клетки в норме и при глазной патологии / С.А. Борисов, Е.М. Коломойцева // Вестник офтальмологии. – 2003. – Т.119, № 2. – С. 50–54.

**20.** Боровская, М.К. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза / М.К. Боровская, Э.Э. Кузнецова, В.Г. Горохова // Бюллетень Восточно-сибирского научного центра СО РАМН. – 2010. – № 3 (73). – С.334 – 354.

**21.** Брискин, Б.С. Панкреонекроз в свете современных представлений диагностики и лечения / Б.С. Брискин, Г.С. Рысбаков // Тезисы докладов IX съезда хирургов. – Волгоград, 2000. – С.20.

**22.** Булгакова, Е.Б. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты / Е.Б. Булгакова // Успехи химии. – 2006. – № 9. – С. 105 –110.

**23.** Бурлакова, Е.Б. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте / Е.Б. Бурлакова, Ф.В. Алесенко, Е.М. Молочкина. – Москва, 1975. – 214 с.

**24.** Величковский, Б.Т. Свободнорадикальное окисление как звено срочной и долговременной адаптации организма к факторам окружающей среды / Б.Т. Величковский // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2001. – № 6. – С.45 – 52.

**25.** Взаимосвязь углеводного обмена и системы антиоксидантной защиты эритроцитов при язвенной болезни и раке желудка / Я.Г. Жебеленко, Е.М. Бакурова, К.О. Миронова, и др. // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2012. – № 2 (28). – С. 70–72.

**26.** Владимиров, Ю.А. Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембран митохондрий, некроз и апоптоз / Ю.А. Владимиров // Биологические мембраны. – 2001. – 19 (5). – С.356 – 377.

**27.** Владимиров, Ю.А. Перекисное окисление липидов в биомембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – Москва: Наука, 2003. – С. 230–272.

**28.** Влияние наночастиц железа на показатели свободнорадикального окисления в крови крыс с лимфосаркомой Плисса / П.С. Качесова, И.А. Горошинская, В.Б. Бородулин, и др. // Биомедицинская химия. – 2016. – Т.62, № 5. – С. 555–560.

**29.** Влияние фемтосекундного лазерного излучения на про-антиоксидантный статус мышечной ткани с экспериментальным раком шейки матки / О.С. Воронова, Т.П. Генинг, А.А. Сысолятин, и др. // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2012. – № 3. – С.123–128.

**30.** Габитова, Д.М. Антиоксидантная защитная система организма / Д.М. Габитова, В.О. Рыжикова, М.А. Рыжикова // Башкирский химический журнал. – 2006. – Т. 13, № 2. – С. 94 – 96.

**31.** Гематологические показатели и окислительно-восстановительный баланс крови крыс в динамике иммобилизации / А.В. Новожилов, Т.В. Тавровская, В.А. Иванов, и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины: ежемесячный международный научно-теоретический журнал. – 2013. – Т. 155, № 4. – С. 439–442.

**32.** Генинг, Т.П. Система перекисное окисление липидов – антиоксиданты в норме и при патологии / Т.П. Генинг. – Ульяновск, 2008. – 236 с.

**33.** Генинг, Т.П. Эритроциты млекопитающих в направленном транспорте биологических активных веществ / Т.П. Генинг. – Ульяновск, 1996. – 306 с.

**34.** Герасимов, Л.В. Микрореологические нарушения при критических состояниях / Л.В. , В.В. Мороз, А.А. Исакова // Общая реаниматология. – 2010. – Т.6, № 1. – С.74–78.

**35.** Глушков, С.И. Состояние глутатион-зависимой антирадикальной системы и процессов перекисного окисления липидов в различных тканях лабораторных животных при острых отравлениях тиопенталом натрия / С.И. Глушков, С.А. Куценко, Г.А. Ливанов // Токсикологический вестник. – 2002. – № 1. – С.11– 17.

**36.** Горожанская, Э.Г. Свободнорадикальное окисление и механизмы антиоксидантной защиты в нормальной клетке и при опухолевых заболеваниях:

лекция / Э.Г. Горожанская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 6. – С. 28–44.

**37.** Даулетпаева, Ж.О. Состояние параметров красной периферической крови при наличии опухолей легкого / Ж.О. Даулетпаева, Е.В. Демина, С.С. Паньшина // Science Time. – 2016. – № 5 (29). – С. 159-160.

**38.** Дизрегуляторная патология системы крови / Е.Д. Гольдберг, Г.Н. Крыжановский. – Москва, 2009. – 432 с.

**39.** Диккер, В.Е. Диабетическая микроангиопатия и нарушение транспорта кислорода / В.Е. Диккер, В.А. Галенок // Терапевтический архив. – 1986. – № 6. – С.106 –110.

**40.** Динамика окислительной модификации белков и особенностей структуропостроения плазмы крови животных с лимфосаркомой Плисса / К.В. Кулакова, Т.Г. Щербатюк, Д.В. Давыденко, и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – № 12. – С. 746 – 749.

**41.** Долгова, Д.Р. Редокс-зависимые процессы в эритроцитах в динамике развития экспериментального рака шейки матки / Д.Р. Долгова, Т.В. Абакумова, А.Ю. Федотова // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2015. – № 3. – С. 80 – 85.

**42.** Дубинина, Е.Е. Биологическая роль супероксидного анион-радикала и супероксиддисмутазы в тканях организма / Е.Е. Дубинина // Успехи современной биологии – 1989. – Т. 108, вып. 1 (4). – С. 3–18.

**43.** Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты / Е.Е. Дубинина. – Санкт-Петербург: Медицинская пресса, 2006. – 400 с.

**44.** Дубинина, Е.Е., Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона / Е.Е. Дубинина // Биохимия. – 2002. – Т.6, № 3. – С. 413–421.

**45.** Елкина, Н.М. Процессы пероксидации липидов, метгемоглобинообразования и генерирования активных форм кислорода в

эритроцитах больных эритремией / Н.М. Елкина // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Т. 26 (65), № 4.– С. 39 – 45.

**46.** Журавлев, А.И. Антиоксиданты. Свободнорадикальная патология: учебное пособие для вузов / А.И. Журавлев, С.М. Зубкова. – Москва: Изд -во Моск. гос. акад. ветеринар, медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, 2008. – 270 с.

**47.** Зависимость активности антиоксидантных ферментов от митотического индекса опухолей молочной железы / Л.П. Смирнова, И.В. Кондакова, Е.М. Слонимская, и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2002. – № 2. – С. 47–51.

**48.** Закономерности изменений гормонального баланс в динамике опухолевой прогрессии у больных раком молочной железы / Н.П. Чеснокова, В.Ю. Барсуков, О.А. Злобнова // Успехи современного естествознания. – 2011. – № 4. – С. 47–54.

**49.** Закономерности изменений процессов свободнорадикальной дестабилизации биологических мембран при аденокарциноме восходящего отдела ободочной кишки, их роль в развитии опухолевой прогрессии / Н.П. Чеснокова, В.Ю. Барсуков, Е.В. Понукалина, и др. // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 1. – С. 164 –168.

**50.** Зенков, Н.К. Окислительный стресс / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньшикова. – Москва: Наука, Интерпериодика, 2001. – 340 с.

**51.** Зинчук, В.В. Кислородтранспортная функция крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние при реперфузии печени / В.В. Зинчук, М.Н. Ходосовский, И.К. Дремза // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2002. – № 4. – С. 8 –11.

**52.** Имянитов, Е.Н. Молекулярная патология рака лёгкого: Клинические аспекты / Е.Н. Имянитов // Практическая онкология – 2006.– Т. 7, № 3. – С. 131 – 136.

**53.** Интенсивность хемилюминесценции, состояние антиоксидантной системы и окислительная модификация белков плазмы крови при развитии рецидива рака яичников / И.А. Горошинская, Г.А. Неродо, Е.И. Сурикова, и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – № 4 (58). – С.45 – 49.

**54.** Искусных, А.Ю. Исследование механизмов окислительно-восстановительного гомеостаза на примере системы «активированные нейтрофилы-пероксидное окисление липидов- антиоксиданты»: дис. ... к.б.н. / А.Ю. Искусных. – Воронеж, 2004. – 158 с.

**55.** Исследование состояния перекисного окисления липидов у больных раком вульвы / Г.А. Неродо, И.А. Горошинская, В.А. Иванова, et.al. // International journal of applied and fundamental research. – 2014. – № 8. – С. 62–66.

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

**57.** Карпищенко, А.И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика / А.И. Карпищенко. – Санкт-Петербург: Интермедика, 1999. – С. 27–28.

**58.** Козинец, Г.И. Клетки крови. Современные технологии их анализат / Козинец, Г.И., Погорелов В.М., Шмаров и др. – Москва: Триада-Фарм, 2002. – 200 с.

**59.** Козинец, Г.И. Кровь и инфекция / Г.И. Козинец, В.В. Высоцкий, В.М. Погорелов. – Москва: Триада-фарм, 2001. – 182 с.

**60.** Кондакова, И.В. Утилизация органической гидроперекиси эритроцитами крови мышей при злокачественном росте / И.В. Кондакова, О.А. Полушина, А.В. Ситожевский // Актуал. Пробл. Совр. Онкологии. – 1994. – № 11. – С.87 –89.

**61.** Коржов, В.И. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты (обзор литературы) / В.И. Коржов, В.Н. Жадан, М.В. Коржов // Журн. ЛМН України. – 2007. – Т.13, № 1. – С. 3 –19.

**62.** Крыжановский, Г.Н. Дизрегуляторная патология / Г.Н. Крыжановский. – Москва, 2002. – 632 с.

**63.** Кудряшова, Е.В. Содержание глутатиона и активность ферментов его метаболизма в злокачественных опухолях и эритроцитах больных раком легкого / Е.В. Кудряшова, Н.М. Титова // Здоровье. Медицинская экология Наука. – 2009. – № 4–5. – С.89 – 92.

**64.** Кулинский, В.И. Система глутатиона. I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55. – С.255 – 277.

**65.** Лаврова, В.С. Дизрегуляторные процессы в системе крови при заболевании раком / В.С. Лаврова, Е.Н. Чернова, Г.В. Карпова, и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – № 2. – С. 75-83.

**66.** Ландау, Л.Д. Теория упругости / Л.Д. Ландау, Е.М. Лившиц. – Москва: Наука, 1987. – 246 с.

**67.** Латюшин, Я.В. Динамика антиоксидантных ферментов в костном мозге животных на фоне коррекции церулоплазмином при действии эмоционально-болевого и гипокинетического стресса / Я.В. Латюшин, В.И. Павлова // Вестн. ЧГПУ. – 2009. – № 12. – С. 319 – 326.

**68.** Липунова, Е.А. К методике определения цитокинетических показателей эритроцитарного баланса крови птиц / Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. – 2007. – Т.5, № 5. – С. 65–68.

**69.** Луцкий, Ю.П. Свободнорадикальное окисление липидов и белков – универсальный процесс жизнедеятельности организма / Ю.П. Луцкий, Т.В. Куксова, М.А. Смелянец // Успехи современного естествознания. – 2014. – № 12. – С. 24 – 28.

**70.** Марусин, А.В. Антиоксидантная активность плазмы крови в группах лиц с новообразованиями / А.В. Марусин, В.Б., Салюков, Е.Ю. Брагина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т.133, № 5. – С. 556–558.

**71.** Меньщикова, Е.Б. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.

**72.** Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – № 2. – С. 62 – 69.

**73.** Муравлева, Л.Е. Белки эритроцитов: миниобзор / Л.Е. Муравлева, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Ключев // Успехи современного естествознания. – 2013. – № 4. – С. 28–31.

**74.** Нагоева, М.Х. Активность внутриклеточного антиоксиданта каталазы эритроцитов у больных ангиной / М.Х. Нагоева // Естествознание и гуманизм: сб.научн. тр. – Томск, 2007. – Т.4, № 3. – С. 147.

**75.** Новицкий, В.В. Структурная дезорганизация мембраны эритроцитов как универсальная типовая реакция целостного организма при болезнях дисрегуляция / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева // Дисрегуляционная патология. – М.: Медицина, 2002. – С. 395–405.

**76.** О патогенетической взаимосвязи нарушений метаболического статуса, клеточного состава и реологических свойств крови при поверхностной термической травме, их диагностическое и прогностическое значение / Н.В. Полутова, Н.П. Чеснокова, Н.В. Островский, и др. // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2011.– Т. 7, № 4. – С.795 – 800.

**77.** Обухова, Л.М. Белки плазмы крови и свободнорадикальная активность при злокачественных новообразованиях эпителиальных тканей / Л.М. Обухова, Е.И. Ерлыкина, Т.В. Копытова / Вестник Удмуртского университета. – 2017. – Т. 27 (3). – С. 380 – 385.

**78.** Окислительно-восстановительный потенциал неоплазмы и асцитической жидкости в динамике экспериментального канцерогенеза / Т.П. Генинг, Т.В. Абакумова, Д.Р. Арсланова, и др. // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. – 2012. – № 3 (23). – С. 3 – 9.



**79.** Окислительная модификация белков и липидов плазмы крови больных раком легкого / Р.Н. Белоногов, Н.М. Титова, Ю.А. Дыхно, и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – №4 (34). – С. 48 – 51.

**80.** Окрут, И.Е. Изменение концентрации оксида азота и активности свободнорадикального окисления в крови больных раком молочной железы / И.Е. Окрут, Д.А. Шакерова, Т.А. Веселова // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. – 2011. – Т. 5, № 1. – С. 118–121.

**81.** Октябрьский, О.Н. Редокс-регуляция клеточных функций (обзор) / О.Н. Октябрьский, Г.В. Смирнова // Биохимия. – 2007. – № 2. – С.158 –175.

**82.** Орлов, Ю.П. Роль ионов железа в нарушении микроциркуляции и реологических свойств крови при ишемии-реперфузии в эксперименте / Ю.П. Орлов, В.Н. Лукач, В.Т. Долгих // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2012. – Т. 9, № 3. – С. 51– 54.

**83.** Особенности редокс-зависимой модификации белков в эритроцитах больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от стадии заболевания / Р.Н. Белоногов, Н.М. Титова, Ю.А. Дыхно, и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – № 6. – С. 32 – 35.

**84.** Перетока, Е.С. Перекисное окисление липидов и глутатионовое звено антиоксидантной системы при раке почки / Е.С. Перетока // Молодёжь и наука: сб. материалов VI Всерос. науч.-техн. конф. студентов, аспирантов и молодых учёных; Сибир. федерал. ун-т. – Красноярск, 2011.

**85.** Плескова, С.Н. Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях / С.Н. Плескова. – Долгопрудный: Издат. дом «Интеллект», 2011. – 184 с.

**86.** Погосянц, Е.Е. Перевиваемая опухоль яичника крысы / Е.Е. Погосянц, Е.Л. Пригожина, Н.А. Еголина // Вопр. Онкол. – 1962. – № 11. – С. 29–36.

**87.** Пумпур А.С. Роль оценки показателей общего анализа крови, биохимического анализа крови и гемостэзиограммы пациентов с

колоректальным раком / А.С. Пумпур // Актуальные материалы. – Воронеж, 2017. – № 3 (61). – С. 64.

**88.** Роль процессов свободнорадикального окисления липидов в патогенезе инфекционных болезней / А.П. Шепелев, И.В. Корниенко, А.В. Шестопапов и др. // Вопросы медицинской химии. – 2000. – № 2. – С. 780-785.

**89.** Савицкая, М.А. Механизмы апоптоза / М.А. Савицкая, Г.Е. Онищенко // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 11. – С. 1613–1627.

**90.** Сазонтова, Т.Г. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов – равнозначных участников метаболизма / Т.Г. Сазонтова, Ю.В. Архипенко // Патофизиология и экспериментальная терапия. – 2007. – № 3. – С. 2–18.

**91.** Сашенков, С.Л. Оценка реактивности периферического отдела эритрона у детей с воспалительными заболеваниями органов дыхания / С.Л. Сашенков, Л.В. Алачева // Экология и природопользование. – 2015. – Т. 1, № 4 (4). – С.145–153.

**92.** Сипров, А.В. Морфофункциональное состояние эритроцитов крыс с карциномой Walker-256 при сочетанном применении доцетаксела и ксимедона / А.В. Сипров, М.А. Соловьева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 164, № 7. – С. 56 – 60.

**93.** Система «Перекисное окисление липидов-антиоксидантов» в организме-опухоленосителе в клинике и эксперименте / Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, И.И. Антонеева, и др. // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 11. – С. 13–16.

**94.** Сладкова, Е.А. Морфофункциональные особенности клеток крови в условиях опухолевого роста / Е.А. Сладкова, М.Ю. Скоркина, Н.А. Забиняков // Биомедицина. – 2013. – № 3. – С. 63 – 67.

**95.** Смирнова, Л.П. Зависимость активности антиоксидантных ферментов от выраженности процессов пролиферации и типа тканевой организации карциномы Эрлиха / Л.П. Смирнова, И.В. Кондакова // Биомедицинская химия. – 2004. – Т. 50. – С. 566 – 575.

**96.** Смирнова, О.В. Особенности прооксидантной и антиоксидантной системы у больных множественной миеломой в зависимости от стадии заболевания / О.В. Смирнова, Н.М. Титова, Н.Г. Елманова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 157, № 3. – С.357–361.

**97.** Смолякова, Р.М. Показатели окислительного метаболизма крови крыс в процессе роста альвеолярной карциномы РС-1 печени / Р.М. Смолякова, В.И. Прохорова, Э.А. Жаврид // Экспериментальная онкология. – 2004. – Т. 26. – С. 23–29.

**98.** Солопова, Н.В. Липопероксидация эритроцитарных мембран у женщин с доброкачественными и злокачественными новообразованиями эндометрия / Н.В. Солопова, А.А. Самойлова, А.И. Пашов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – № 4. – С. 421–423.

**99.** Сопоставление различных продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах / И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов, Б.Г. Яровинский, и др. // Вопр.мед. химии. – 1989. – № 1. – С.127 – 131.

**100.** Состояние окислительной модификации белков при острых и хронических лейкозах / Л.Г. Тургунова, Л.Е. Муравлева, Н.С. Умбеталина и др. // [http:// www.rusnauka.com/TIP/ All/Medicine/33.html](http://www.rusnauka.com/TIP/All/Medicine/33.html).

**101.** Сравнительное исследование некоторых параметров свободнорадикальных процессов в плазме крови у больных раком шейки матки с метастазами и без метастазов / Г.А. Неродо, И.А. Горошинская, Е.А. Калабанова, и др. // Международный журнал экспериментального образования. – 2014. – № 3. – С. 65–67.

**102.** Степовая, Е.А. Роль нарушений структуры мембраны и метаболизма эритроцитов в развитии анемии у больных со злокачественными новообразованиями / Е.А. Степовая, В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева // Гематология и трансфузиология. – 2003. – № 5. – С. 11–18.

**103.** Стуклов, Н.И. Оценка эритроцитарных показателей периферической крови и активности гемостаза у больных раком шейки матки /

Н.И. Стуклов, Т.В. Сушинская // Исследования и практика в медицине. – 2016. – Т.3, № 1. – С. 17 – 23.

**104.** Сурикова, Е.И., Состояние антиоксидантной системы эритроцитов и содержание гаптоглобина в крови больных раком яичников с различной васкуляризацией локальной рецидивной опухоли / Е.И.Сурикова, М.М. Сергеева, И.А. Горошинская, и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2. – С. 1– 8.

**105.** Суханова, Т.А. Патохимия клетки / Т.А. Суханова // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 40. – С. 82 –104.

**106.** Сынин, В.В. Различие кинетики кислотного и осмотического гемолиза эритроцитов при микрореоскопии / В.В. Сынин, В.Г. Лычев, А.В. Аннлриенко, и др. // Гемореология в микро-и макроциркуляции: материалы междунар. конф. – Ярославль, 2005. – С. 214.

**107.** Термины, понятия и подходы в исследовании реологии крови в клинике / Е.В. Ройтман, Н.Н. Фирсов, М.Г. Дементьев и др. // Тромбоз, гемостаз и реология. 2000. – №3(3). – С. 5 –12 .

**108.** Трашков, А.П. Особенности роста экспериментальной АОЯ крыс и изменение гематологических показателей у животных-опухоленосителей под действием гемцитабина / А.П. Трашков, А.В. Панченко, А.Г. Васильев // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2012. – № 2 (38). – С. 90–96.

**109.** Трошкина, Н. А. Эритроцит: строение и функции его мембраны / Н.А. Трошкина, В.И. Циркин, С.А. Дворянский // Вятский медицинский вестник. – 2007. – № 2–3. – С. 32–40.

**110.** Тугушева, Ф.А. Процессы перекисного окисления липидов и защитная роль антиоксидантной системы в норме и у больных с хроническим гломерулонефритом: ч. I / Ф.А. Тугушева // Нефрология. – 2001. – Т. 5, № 1. – С.19–27.

**111.** Чернова, Е.Н. Морфофункциональное состояние эритрона в процессе роста индуцированных и перевивных опухолей: дис. ...канд. мед.наук / Е.Н. Чернова. – Томск, 1988. – 189с.

**112.** Чеснокова, Н.П. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Успехи совр.естествознания. – 2006. – № 7. – С.29–36.

**113.** Чеснокова, Н.П. Типовые патологические процессы / Н.П. Чеснокова. – Саратов: Изд-во ун-та, 2004. – 400 с.

**114.** Шарипов, Ф.К. Динамика свободнорадикального окисления в ткани штамма саркома-45 как показатель взаимодействия опухоли и организма / Ф.К. Шарипов, Ю.О. Беленков, Г.В. Киреев // Вопросы Онкологии. – 2005. – Т. 51, № 2. – С. 227 – 229.

**115.** Шумаев, К.Б. Роль динитрозильных комплексов железа в защите биомолекул и клеточных структур от окислительного, нитрозативного и карбонильного стрессов: автореф. дис. ... д.б.н. / К.Б. Шумаев. – Москва, 2010. – 50 с.

**116.** Щербатюк, Т.Г. Свободнорадикальные процессы и их коррекция у животных с экспериментальными опухолями: дис. .... д.б.н. / Т.Г. Щербатюк. – Нижний Новгород, 2003. – 315 с.

**117.** Эритроциты в норме, патологии и при лазерных воздействиях / И.М. Байбеков, Р.Ш. Мавлен-Ходжаев, А.Г. Эрстекис, и др. – Тверь: Триада, 2008. – 256 с.

**118.** Allen, R.G. Oxidative stress and gene regulation / R.G. Allen, M. Tressini // Free Radical Biol. Med. – 2000. – Vol.28. – P. 463–499.

**119.** Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification / A Pastore, G. Federici, E. Bertini, et al. // Clinica Chimica Acta. – 2003. – Vol.333 (1). – P.19–39.

**120.** Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in erythrocytes of patients with oesophageal and gastric cancer / H.Dursun, M. Bilici, A. Uyanik, et.al. // *J Int Med Res.* – 2006. – Vol.34 – P.193–199.

**121.** Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species / L.He, T. He, S. Farrar, et.al. // *Cell Physiol Biochem.* – 2017. – Vol.44 (2). – P.532–553.

**122.** Atomic force microscopy comes of age / L.W. Francis, [et al.] // *Biol. Cell.* – 2010. – V. 102, № 2. – P. 133–143.

**123.** Ayala, A. Apoptosis in sepsis: mechanisms, clinical impact and potential therapeutic targets / A. Ayala, M. Perl, F. Venet, et al. // *Curr Pharm Des.* – 2008. – Vol. 14, № 19. – P. 1853 – 1859.

**124.** Balwant, R. Lipid Peroxidation Product Malonaldehyde in Pre-Cancer and Cancer / R. Balwant, D.S. Kharb, S.C. Anand // *Advances in Medical Sciences.* 2008. – Vol. 2, № 1. – P. 7–8.

**125.** Barlett, J.M.S. Ovarian cancer: methods and protocols / J.M.S. Bartlett. – New Jersey: Humana Press Inc., 2001. – 818 p.

**126.** Barosi, G. Inadequate erythropoietin response to anemia: definition and clinical relevance // *Annals of Hematology.* – 1994. – Vol. 68, Iss. 5. – P. 215-223.

**127.** Batko, J. The effect of experimental neoplastic disease on malondialdehyde level and glutathione status in erythrocytes of rats / Batko J. // *ActaBiochim Pol.* – 1997. – Vol.44 (4). – P.767–769.

**128.** Beder, I. Effect of selected substances with antigycative and antioxidative properties on erythrocyte deformability in diabetic patients / I. Beder, J. Aarsky, A. Maea-Eje // *Scripta Medica (Brno).* – 2002. – Vol. 75, № 5. – P. 239–244.

**129.** Bergsbaken, T. Pyroptosis: host cell death and inflammation / T. Bergsbaken, S.L. Fink, B.T. Cookson // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2009. – V. 7. – P. 99-109.

**130.** Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation / R.T. Dean, S. Fu, R. Stacker // *Biochem. J.* – 1997. – Vol. 324. – P. 1–18.

**131.** Bonner, H. The blood and the lymphoid organs / H. Bonner, A. Erslev // Pathology. – Philadelphia, 2004. – P. 994–1097.

**132.** Broker, L.E. Cell death independent of caspases: a Review / L.E. Bröker, FAE Kruyt, G. Giaccone // Clin Cancer Res. – 2005. – № 11 (9). – P. 3155 – 3162.

**133.** Bron, D. Biological basis of anemia / D. Bron, N. Meuleman, C. Mascaux // Semin. Oncol. – 2001. – Vol.28. – P. 1–16.

**134.** Calcium-dependent human erythrocyte cytoskeleton stability analysis through atomic force microscopy / F. Liu, H. Mizukami, S. Sarnaik, et al. // J Struct Biol. – 2005. – 150 (2). – P.200–210.

**135.** Cazzola, M. Mechanisms of anemia in patients with malignancy: implications for the clinical use of recombinant human erythropoietin / M. Cazzola // Med Oncol. – 2000. – Vol.17, Suppl.1. – P.511– 516.

**136.** Characterization of a class alpha glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes / K.S. Prabhu, P.V. Reddy, E.C. Jones, et al. // Reddy Arch. Biochem. Biophys. – 2004. – Vol. 424. – P. 72-80.

**137.** Coussens, L.M. Inflammation and cancer / L.M. Coussens, Z. Werb // Nature. - 2002. – Vol. 420. – P. 860 –867.

**138.** Couto, N. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network / N. Couto, J. Wood, J. Barber // Free Radic Biol Med. – 2016. – Vol.95. – P. 27– 42.

**139.** CQ synergistically sensitizes human colorectal cancer cells to SN-38/CPT-11 through lysosomal and mitochondrial apoptotic pathway via p53-ROS cross-talk / P. Chen, X. Luo, P. Nie, et.al. // Free Radic Biol Med. – 2017. – V.104 – P.280– 297.

**140.** Denisov, I.G., Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins / I.G. Denisov, S.G. Sligar // Nat Struct Mol Biol. – 2016. – Vol. 23(6). – P. 481–486.

**141.** Dix, T.A. Mechanisms and biological significance of lipid peroxidation initiation / T.A. Dix, J. Aikens // Chem. Res. Toxicol. – 2005. – Vol. 6. – P.2–18.

- 142.** Droge, W. Free radicals in the physiological control of cellruction / W. Droge // *Physiol. Rev.* – 2001. – Vol.82. – P. 47–95.
- 143.** Durackova, Z. Some current insights into oxidative stress / Z. Durackova // *Physiol. Res.* – 2010. – № 59. – P.459–469.
- 144.** Edinger, A.L. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy / A.L. Edinger, C.B. Thompson // *Current opinion in cell biology.* – 2004. – № 16. – P. 663–669.
- 145.** Ellman, G.L. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components / G.L. Ellman, A.F. Boyne // *Anal Biochem.* – 1972. – Vol. 46 (2). – P.639 – 53.
- 146.** Environmentally Persistent Free Radicals Cause Apoptosis in HL-1 Cardiomyocytes / G.C. Chuang, H. Xia, S.E. Mahne, et.al. // *Cardiovasc Toxicol.* – 2017. – V.17 (2). – P.140–149.
- 147.** Evaluation of chalcones as inhibitors of glutathione S-transferase / M.S. Özaslan, Y., Demir, H.E. Aslan, et.al. // *J Biochem Mol Toxicol.* – 2018. – Vol. 32(5). – P. 22047.
- 148.** Fahey, R.C. Glutathione analogs in prokaryotes / R.C. Fahey // *Biochim Biophys Acta.* – 2013. –Vol. 1830 (5). – P. 3182–3198.
- 149.** Ferguson G.D. The glutathione system and the related thiol network in *Gaenorhabditis elegans* / G.D. Ferguson, W.J. Bridge // *Redox Biol.* – 2019. – Vol. 24. – P. 101171.
- 150.** Fink, S. L. Apoptosis, pyroptosis and necrosis: mechanistic description of dead and dying eucariotic cells / S.L. Fink, B.T. Cookson // *Infection and Immunity.* – 2005. –Vol. 73, № 4. – P. 1906–1917.
- 151.** Forman, H.J. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis / H.J. Forman, H. Zhang, A. Rinna // *Molecular Aspects of Medicine.* – 2009. – Vol. 30, № 1–2. – P. 1–12.
- 152.** Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis / Kaminsky, V.O. Zhivotovsky B. // *Antioxid Redox Signal.* – 2014. – Vol.1, № 21 (1). – P. 86–102.



**153.** Fridovich, I. Oxygen: how do we stand it? / I. Fridovich // *Med Princ Pract.* – 2013. – № 22 (2). – P. 131–137.

**154.** Friguet, B. Protein degradation by the proteasome and its implications in aging / B Friguet, A.L Bulteau, N Chondrogianni // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 2000. – Vol. 908. – P. 143 – 54.

**155.** Gallagher, P.G. Disorders of the erythrocyte membrane / P.G. Gallagher // In Nathan DG, Orkin SH (eds): *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*, 5th ed. – Philadelphia, WB Saunders, 1998. – 544 p.

**156.** Gedik, C. M. Oxidative stress in humans validation of biomarkers of DNA damage / C.M. Gedick, S.P. Boyle, S.G. Wood, et al. // *Carcinogenesis.* – 2002. – V. 23. – P. 1441–1446.

**157.** Gilge, J.L. The effect of oxidant and the non-oxidant alteration of cellular thiol concentration on the formation of protein mixed-disulfides in HEK 293 cells / J.L. Gilge, M. Fisher, Y.C. Chai // *PLoS One.* – 2008. – Vol. 3, № 12. – P. 4015.

**158.** Giulivi, C. Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance / C. Giulivi, N.J. Traaseth, K.J.A. Davies // *Aminoacids.* – 2003. – Vol. 25. – P. 227–232.

**159.** Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses / M. Jozefczak, T. Remans, J. Vangronsveld, et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – P. 3145–3175.

**160.** Glutathione level and its relation to radiation therapy in patients with cancer of uterine cervix / H. Mukundan, A.K. Bahadur, A Kumar, et al. // *Exp Biol.* – 1999. – Vol. 9. – P.859–864.

**161.** Green, D.R. A matter of life and death // D.R. Green, G.I. Evan // *Cancer Cell.* – 2002. – № 1. – P.19–30.

**162.** Grimsrud, P. A. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioaktivealdehydes / P.A. Grimsrud, H. Xie, T.J. Griffin // *Journal of Biological Chemistry.* – 2008. – Vol. 283 (32). – P. 21837–21841.

- 163.** Grune, T. Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxyxynitrite / T. Grune, L. Klotz, J. Gieche // *Advances in Free Radical Biology & Medicine*. – 2001. – Vol. 30, № 11. – P. 1243–1253.
- 164.** Gustot, T. Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response / T. Gustot // *Current Opinion in Critical Care*. – 2011. – Vol. 17, № 2. – P.153 –159.
- 165.** Gutteridge, J.M. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future / J.M. Gutteridge, B.H. Halliwell // *Ann. N.Y. Acad. SCI*. – 2000. – Vol. 899. – P. 136–147.
- 166.** Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases / N. Ballatori, S.M. Krance, S. Notenboom, et al // *Biol. Chem.* – 2009. – P. 191–214.
- 167.** *Hematology Basic Principles and Practice* / R. Hoffman, E.J. Benz, S.J. Shattik, et. al. // Churchill Livingstone. – 2001. – P.1970.
- 168.** Histone H1-and other protein – and amino acid hydroperoxides can give rise to free radicals which oxidize DNA / C. Luxford, B. Morin, R.T. Dean, et al. // *Biochem. J.* – 1999. – Vol. 344. – P. 125 –134.
- 169.** Hoidal, J.R. Reactive oxygen species and cell signaling / J.R. Hoidal // *Am J Respir Cell Mol Biol*. – 2001. – Vol. 25(6). – P. 661– 663.
- 170.** Hussain, S.P Radical causes of cancer / S.P. Hussain, L.J. Hofseth, C.C. Harris // *Nat Rev Cancer*. – 2003. – Vol .3. – P. 276–285.
- 171.** Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy / Z. Zou, H. Chang, H. Li, et al. // *Apoptosis*. 2017. – Vol. 22 (11). – P. 1321– 1335.
- 172.** Jankowska, E.A. Molecular changes in myocardium in the course of anemia or iron deficiency / E.A. Jankowska, P. Ponikowski // *Heart Fail Clin*. – 2010. – Vol. 6 (3). – P. 295–304.
- 173.** Kaul, D.K. In vivo studies of sickle red blood cells / D.K. Kaul, M.E. Fabry // *Microcirculation*. – 2004. – Vol. 11. – P.153 –165.

**174.** Kinnula, V.L. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors / V.L. Kinnula, J. D Crapo // *Free radicals biology and medicine*. – 2004. – Vol. 36, № 6. – P. 718–744.

**175.** Klotz, L.O. Oxidant-induced signaling: Effects of peroxynitrite and singlet oxygen // *Biol. Chem.* – 2002. – V. 383. – P. 443–456.

**176.** Kumar, K. Changes observed in antioxidant system in the blood of postmenopausal women with breast cancer / K. Kumar, M. Thangaraju, P. Sachdanandam // *Biochem Int.* –1991. – V. 25 (2). – P. 371–380.

**177.** Lee, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: Cross-talk and redox signalling / J. Lee, J. Zhang // *Biochemical Journal*. – 2012. – Vol. 441. – P. 523–540.

**178.** Legrain, Y. Interplay between selenium levels, selenoprotein expression, and replicative senescence in WI-38 human fibroblasts / Y. Legrain, Z. Touat-Hamici, L. Chavatte // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289. – P. 6299–6310.

**179.** Levine, B. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy / B. Levine, D.J. Klionsky // *Dev. Cell*. – 2004. – Vol. 6 (4). – P. 463–77.

**180.** Levine, R.L. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L. Levine, D.Garland, C.N. Oliver // *Methods Enzymology*. – 1990. – Vol. 186. – P. 464–478.

**181.** Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma / F. Morabito, M. Cristani, A. Saija, et.al. // *Mediators Inflamm.* – 2004. – Vol. 13, N 56. – P. 381–383.

**182.** Lu, S.C. Glutathione synthesis / S.C. Lu // *Biochim Biophys Acta.* – 2013. – 1830 (5). – P. 3143–3153.

**183.** Lushchak, V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification / V.I. Lushchak // *Chem Biol Interact.* – 2014. – Vol.224. – P. 164–175.

**184.** Manoharan, S. Enhanced lipid peroxidation and impaired enzymic antioxidant activities in the erythrocytes of patients with cervical carcinoma /

S. Manoharan, K. Kolanjiappan, M. Kayalvizhi // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2004. – Vol. 9. – P. 699–707.

**185.** Mittal, R.D. Correlation of serum retinol and its relation with lipid profile in Indian cancer patients/ R.D. Mittal, B. Mittal // *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* – 2004. – Vol. 19, № 1. – P. 36 – 39.

**186.** Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology / K.K. Griendling, D. Sorescu, B. Lassegue, et al. // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology.* – 2000. – V. 20. – P.2175–2183.

**187.** Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 / L. Galluzzi, I.J. Vitale, J.M. Abrams, et al. // *Cell Death & Differentiation.* – 2012. – Vol. 19, № 1. – P. 107–20.

**188.** Motexafin gadolinium, a tumor-selective drug targeting thioredoxin reductase and ribonucleotide reductase / S.I. Hashemy, J.S. Ungerstedt, F. Zahedi Avval, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – P. 10691–10697.

**189.** Nagababu, E. Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase // E. Nagababu, F.J. Chrest, J.M. Rifkind // *Biochim Biophys Acta.* – 2003. – Vol. 1620 (1-3). – P. 211– 217.

**190.** Navarro, J. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo / J. Navarro, E. Obrador, J. Carretero // *Free Radic. Biol Med.* – 1999. – Vol. – P.410–418.

**191.** New glutathione peroxidase mimetics-Insights into antioxidant and cytotoxic activity / A.J. Pacuła, K.B Kaczor, A. Wojtowicz, et al. // *Bioorg Med Chem.* – 2017. – Vol. 1, № 25 (1). – P. 126-131.

**192.** Niki, E Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo / E. Niki // *Free Radic Biol Med.* – 2010. – Vol. 49 (4). – P. 503–515.

**193.** Nishikimi, M. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenacine methosulfate and molecular oxygen / M. Nishikimi, N. Appa, K.Yagi // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1972. – Vol. 46. – P. 849–854.

**194.** Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes / R. Masella, R. Di Benedetto, R. Vari, et al. // *J. Nutr. Biochem.* – 2005. – № 16. – P. 577–586.

**195.** Nowakowski, R. Imaging the surface details of red blood cells with atomic force microscopy / R. Nowakowski, P. Luckham // *Surface and Interface Analysis.* – 2002. – Vol. 33, № 2. – P. 118–121.

**196.** Nyström, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence / T. Nyström // *The EMBO Journal.* – 2005. – Vol. 24. – P. 1311–1317.

**197.** Obeidat, B. The diagnosis of endometrial hyperplasia on curettage: how reliable is it? / B. Obeidat, A. Mohtaseb, I. Matalka // *Arch. Gynecol. Obstet.* – 2009. – Vol. 279, № 4. – P. 489–492.

**198.** Overexpression of HER-2/neu protein attenuates the oxidative systemic profile in women diagnosed with breast cancer / V.J. Victorino, F.C. Campos, A.C. Herrera, et al. // *Tumour Biol.* – 2014. – V. 35 (4). – P. 3025–34.

**199.** Oxidant/antioxidant status in blood of patients with malignant breast tumour and benign breast disease / M.F. Polat, S. Taysi, M. Gul, et al. // *Cell Biochem Funct.* – 2002. – Vol. 20. – P. 327–331.

**200.** Oxidative modification and inactivation of Cu, Zn-superoxide dismutase by 2,2'-azobis (2-antidinopropane) dihydrochloride / H.Y. Kwon, S.Y. Choi, M.N. Won, et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1543, № 1. – P. 69–76.

**201.** Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review / R.K. Gupta, A.K. Patel, N. Shah, et al. // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2014. – V. 15 (11). – P. 4405–4409.

**202.** Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? / S. Reuter, S.C. Gupta, M.M. Chaturvedi, et al. // *Free radical biology and medicine.* – 2010. – Vol. 49. – P. 1603–16.

**203.** Pelicano, H. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications / H. Pelicano, D. Carney, P. Huang // *Drug Resist Updat.* – 2004. – Vol. 7 (2). – P. 97–110.

**204.** Platis, I.E. Oxidative polypeptide cleavage mediated by EDTA-Fe covalently linked to cysteine residues / I.E. Platis, M.R. Ermacora, R.O. Fox // *Biochemistry*. – 1993. – Vol. 32, № 47. – P. 12761–12767.

**205.** Protein carbonyl levels, glutathione S-transferase polymorphisms and risk of colorectal cancer / C.C. Yeh, C.Y. Lai, L.L. Hsieh, et.al. // *Carcinogenesis*. – 2010. – Vol. 31 (2). – P.228 – 33.

**206.** Qstdal, H. Formation of long-lived protein radicals in the reaction between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activated metmyoglobin and other proteins / H. Qstdal, L.H. Skibsted, H.J. Andersen // *Free Radic. Biol. Med.* – 1997. – Vol. 23. – P. 754–761.

**207.** Ray, G. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis / G. Ray, S.A. Husain *Indian J Exp Biol.* – 2002. – Vol. 40. – P. 1213–1232.

**208.** Ray, P.D. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling / P.D. Ray, B.W. Huang, Y. Tsuji // *Cell Signal.* – 2012. – Vol. 24 (5). – P. 981–990.

**209.** Redox regulation of calcium signaling in cancer cells by ascorbic Acid involving the mitochondrial electron transport chain / G.G. Martinovich, E.N. Golubeva, I.V. Martinovich, et al. // *J. Biophys.* –2012.– Vol.2012. – P. 921653.

**210.** Redza-Dutordoir, M. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species / M. Redza-Dutordoir, D.A. Averill-Bates // *Biochim Biophys Acta.* – 2016. – Vol. 1863 (12). – P. 2977–2992.

**211.** Rojitzman, E.V. Kliničeskaja gemoreologija / E.V Rojitzman // *Tromboz, gemostaz i reologija.* – 2003, № 3. – P.13–27.

**212.** Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance / N. Traverso, R. Ricciarelli, M. Nitti, et al. // *Oxid Med Cell Longev.* – 2009. – Vol. 2013. – P. 972913.

**213.** Rossner, P. Plasma protein carbonyl levels and breast cancer risk / P. Rossner, M.B. Terry, M.D. Gammon // *J. Cell. Mol. Med.* – 2007. – Vol.11, № 5. – P. 1138–1148.

**214.** Saada, H.N. Grape seed extract *Vitis vinifera* protects against radiation-induced oxidative damage and metabolic disorders in rats / H.N. Saada, U.Z. Said, N.H. Meky // *Phiother Res.* – 2008. – № 11. – P. 341–346.

**215.** Sanchez-Jimenez, F.M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy / F.M. Sanchez-Jimenez // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2000. – Vol. 32 (2). – P. 157–170.

**216.** Sasazuki, S. Protective effect of vitamin C on oxidative stress: a randomized Controlled trial / S. Sasazuki, T. Hayashi, K Nakachi // *International Journal for Vitamin and Nutrition Research.* – 2008. – Vol. 78, № 3. – P. 121–128.

**217.** Saukkonen, K. Heme oxygenase 1 polymorphisms and plasma concentrations in critically ill patients / K. Saukkonen, P. Lakkisto, M.A. Kaunisto // *Shock.* – 2010. – Vol. 34, № 6. – P. 558–654.

**218.** Selective up-regulation of human selenoproteins in response to oxidative stress / Z. Touat-Hamici, Y. Legrain, A.-L. Bulteau, et.al. // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289. – P. 14750–14761.

**219.** Selenium compounds in redox regulation of inflammation and apoptosis / N.Y. Rucetskaya, I.V. Fedotov, V.A. Koftina, et al. // *Biomed Khim.* – 2019. – Vol. 65 (3). – P.165–179.

**220.** Serum erythropoietin level in anemic cancer patients / M. Ozguroglu, B. Arun, G. Demir, et.al. // *Med Oncol.* – 2000. – Vol. 17 (1). – P. 53 – 65.

**221.** Scibior, D Catalase: structure, properties, functions / D. Scibior, H. Czeczot // *Postepy Hig Med Dosw.* – 2006. – Vol. 60. – P. 170–180.

**222.** SH groups and glutathione in cancer patient's blood / F. della Rovere, A. Granata, A. Saija, et al. // *Anticancer Res.* – 2000. – Vol. 20 (3A). – P. 1595–1598.

**223.** Shringarpure, R. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome / R. Shringarpure, T. Grune, J. Mehlhase // *J.BiolChem.* – 2003. – Vol. 278 (1). – P. 311–318.

**224.** Significance of polymorphisms and expression of enzyme-encoding genes related to glutathione in hematopoietic cancers and solid tumors /

S. Zmorzynski, G. Swiderska-Kończak, D. Koczkodaj, et al. // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – P. 1–6.

**225.** Silva, L. Possible role of glutamine synthetase in the NO signaling response in root nodules by contributing to the antioxidant defenses / L. Silva, H. Carvalho // *Front Plant Sci.* – 2013. – Vol. 19. – P. 372.

**226.** Stadtman, E.R. Protein oxidation / E.R. Stadtman, R.L. Levine // *Ann N Y Acad Sci.* – 2000. – Vol. 899. – P. 191–208.

**227.** Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy / I. Dulińska, M. Targosz, W. Strojny, et al. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2006. – Vol. 66. – P. 1–11.

**228.** Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity / R.M.Green, M. Graham, M.R. O'Donovan, et al. // *Mutagenesis.* – 2006. – Vol. 21. – P. 383–390.

**229.** Takahashi, M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos / M. Takahashi // *J Reprod Dev.* – 2012. – Vol. 58 (1). – P. 1–9.

**230.** The effects of lighting conditions on responses of cells selective for face views in the temporal cortex / J.K. Hietanen, D.I. Perrett, M.W. Oram, et al. // *Experimental Brain Research.* – 1992. – P. 157–171. DOI:[10.1007/BF00229013](https://doi.org/10.1007/BF00229013).

**231.** Trachootham, D. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? / D.Trachootham, J. Alexandre, P. Huang // *Nat Rev Drug Discov.* – 2009. – Vol. 8 (7). – P. 579 – 591.

**232.** Tsuchihashi, S. Heme oxygenase system in ischemia and reperfusion injury / S. Tsuchihashi, C. Fondevila, J.W. Kupiec-Weglinski // *Ann Transplant.* – 2004. – Vol. 9, № 1. – P. 84–87.

**233.** Wendel, T. Enzymes acting against reactive oxygen / T. Wendel // *Enzymes.* – 2004. – Vol. 34. – P. 161–167.

**234.** Wolin, M.S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems / M.S. Wolin // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – V. 20. – P. 1430–1442.



**235.** Ylmaz, I.A. Relation between bladder cancer and protein oxidation / I.A. Ylmaz, T. Akcay, U. Cakatay // *Int. Urol. Nephrol.* – 2003. – Vol. 35, N 3. – P. 345–350.

**236.** Zamora, R. Feed-back inhibition of oxidative stress by oxidized lipid/amino acid reaction products / R. Zamora, M. Alaiz, F.J. Hidalgo // *Biochemistry.* – 1997. – Vol. 36, № 50. – P. 15765–15771.