

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ДОНЕЦКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ДОНЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. М. ГОРЬКОГО»

На правах рукописи



ЗУЙКОВ СЕРГЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 616.33-006-092:612.015.1

**ЗНАЧЕНИЕ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В
ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА ЖЕЛУДКА**

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,

профессор,

Зинкович Игорь Иванович

Печатный экземпляр идентичный всем существующим
экземплярам диссертации. Секретарь Диссозвета Д 01.022.05

Секретарь Стрельченко Ю.И.



Донецк – 2018

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ДОНЕЦКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ДОНЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. М. ГОРЬКОГО»

На правах рукописи

ЗУЙКОВ СЕРГЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 616.33-006-092:612.015.1

**ЗНАЧЕНИЕ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В
ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА ЖЕЛУДКА**

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Экземпляр идентичный всем существующим
у ученого секретаря Диссовета Д 01.022.05

Ученый секретарь Стрельченко Ю.И.

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор,
Зинкович Игорь Иванович

Донецк – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	4
РАЗДЕЛ 1. КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПРИ СТАРЕНИИ ОРГАНИЗМА И ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	11
1.1. Катаболизм пуриновых нуклеотидов, как один из основных путей генерации активных форм кислорода	13
1.2. Роль ферментативного звена антиоксидантной защиты при старении и онкопатологии	23
1.3. Участие оксида азота и его метаболитов в регуляции окислительного статуса	29
1.4. Окислительная модификация белков, как маркер окислительного стресса	37
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	45
2.1. Объекты исследований. Характеристика групп больных	45
2.2. Методы биохимических исследований	48
2.3. Методы статистической обработки полученных результатов	59
РАЗДЕЛ 3. ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ СВЯЗАННЫЕ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИЕЙ	61
3.1. Исследование катаболизма пуриновых нуклеотидов, для оценки прооксидантного статуса в плазме крови, эритроцитах и в гомогенатах тканей	61
3.2. Исследование антиоксидантной защиты в плазме крови, эритроцитах и в гомогенатах тканей	65

3.3. Исследование неферментативных показателей свободно-радикального окисления в плазме крови, эритроцитах и гомогенатах тканей	69
РАЗДЕЛ 4. ВЛИЯНИЕ СТАРЕНИЯ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА.....	79
4.1. Изменение компонентов системы свободно-радикального окисления в зависимости от возраста в плазме крови	80
4.2. Изменение компонентов системы свободно-радикального окисления в зависимости от возраста в эритроцитах.....	94
4.3. Изменение компонентов системы свободно-радикального окисления в зависимости от возраста в гомогенатах тканей	115
РАЗДЕЛ 5. ВЛИЯНИЕ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА	125
5.1. Изменение компонентов системы свободно-радикального окисления в зависимости от стадии рака в плазме крови.....	125
5.2. Изменение компонентов системы свободно-радикального окисления в зависимости от стадии рака в эритроцитах	129
5.3. Изменение компонентов системы свободно-радикального окисления в зависимости от стадии рака в гомогенатах тканей.....	131
АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ	142
ВЫВОДЫ	149
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	151
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	152
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	154

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Злокачественные новообразования являются одной из основных проблем здравоохранения во всём мире, а в странах СНГ, считаются второй по значимости причиной смертности среди населения, после заболеваний сердечно-сосудистой системы [1]. В структуре общемировой онкологической заболеваемости лидирующее место среди злокачественных новообразований занимает рак желудка (РЖ) [2]. При этом пик заболеваемости РЖ приходится на возраст 65 ± 5 лет, однако, в последние годы наметилась тенденция по существенному омоложению онкозаболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [3]. Установлено, что показатель заболеваемости и смертности от РЖ очень зависит от множества факторов, как клинических, так и биологических [4] при этом до сих пор остается не полностью изучен патогенез опухолевого роста, особая роль в котором принадлежит свободно-радикальному окислению (СРО) [5]. Известно, что с возрастом ухудшаются защитные функции организма, снижается активность антиоксидантной системы (АОС), изменяется скорость обмена белков и нуклеотидов, усиливаются процессы катаболизма и при этом одновременно накапливается большое количество токсических веществ, в том числе и канцерогенных [6]. Существует мнение, что старение защищает организм от рака с помощью механизмов запрограммированной гибели клеток, в которых участвуют активные формы кислорода (АФК), но развивающийся при этом окислительный стресс (ОС), в свою очередь, может способствовать возникновению новообразований. Следовательно, старение является одним из ключевых факторов риска развития онкопатологий [7].

Выявлено, что для онкологических больных присущ целый ряд метаболических нарушений, тесно связанных между собой [8]. Одним из важных аспектов изучения патогенеза опухолевого роста является исследование состояния окислительной модификации белков (ОМБ), СРО и антиоксидантной защиты (АОЗ). Было установлено, что в процессе онкогенеза важную роль играет разобщение соотношения про- и антиоксидантных систем в клетке, а так же

нарушения метаболизма нуклеотидов [9]. Более «подготовленными» к развитию злокачественных опухолей считаются органы и ткани с быстрообновляющимся клеточным составом и высоким уровнем пролиферации. К таким органам и тканям относится, в частности, слизистая оболочка желудка (СОЖ) [10]. Высокая активация ОМБ и стимуляция СРО – универсальная составляющая патогенеза онкологических заболеваний [11]. Причем изменения соотношения прооксидантных систем (ПОС) и АОС в клетке указывают на нарушение механизма контроля апоптоза и пролиферации в ткани опухоли как надклеточной системы [12]. Это определяет актуальность изучения некоторых показателей АОС и ПОС, что может дать более четкую картину в понимании онкогенеза. Установлено, что при РЖ происходит нарушение кровотока в слизистой оболочке желудка, что приводит к гипоксическим явлениям различной выраженности, с последующим нарушением утилизации кислорода и усиленной генерации АФК. Такие особенности как активация пуринового обмена, усиление синтеза клеточных структур - нуклеотидов, белков, компонентов мембран, как правило, связаны с высокой пролиферативной активностью [13; 14].

Известно, что изменения состояния ключевых ферментов катаболизма пуриновых нуклеотидов – аденозиндезаминазы (АДА) и ксантиноксидазы (КО), является характерной чертой быстрорастущих тканей [15], при этом в ходе КО реакции происходит генерация супероксид-анион радикала ($O_2^{\cdot -}$) – стимулятора перекисного окисления липидов, белков и нуклеотидов, в то же время мочевая кислота, как продукт данной реакции, является сильнейшим антиоксидантом [16]. Данный двойственный эффект может играть важную роль в патогенезе опухолевого роста при РЖ. Аденозин – субстрат АДА, вызывает фрагментацию ядра и конденсацию хроматина, таким образом, участвуя в апоптозе [17], а так же является мощнейшим регулятором оксигенации тканей [18]. Соответственно, изменения компонентов СРО могут быть обусловлены как репарационными процессами, так и быть ключевым этапом в развитии онкологической патологии [19].

Интересна связь между изменениями в опухоли, и изменениями в других тканях, органах и системах организма, так как это отражает и уровень прогрессии опухоли, степень её влияния на организм, и позволяет оценить динамику её развития, выраженность ответа на терапию, в том числе с применением про- или антиоксидантов. Следовательно, исследование данных показателей СРО, позволит расширить и возможно обнаружить новые представления о патогенетических механизмах опухолевого роста при РЖ.

Степень разработанности темы. Несмотря на то, что по отдельности изменение активностей ферментативного звена АОЗ, пуринового обмена и ОМБ признаны показателями ОС при различных патологиях, а так же считаются факторами провоцирующими старение и канцерогенез, однако комплексное изучение этих показателей для оценки состояния ОС у больных РЖ нами было изучено впервые. Данное исследование позволит расширить имеющиеся, и возможно обнаружить новые, представления о патогенетических механизмах опухолевого роста при РЖ.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Работа является фрагментом НИР кафедры биохимии ДонНМУ им. М. Горького «Метаболизм экзогенных и эндогенных предшественников ДНК, особенности их распределения в тканях и клетках крови в патогенезе различных типов пролиферации» (№ госрегистрации 0108U001351, шифр работы УН 08.01.05), а так же фрагментом НИР кафедры биологической химии, патологической физиологии и Центральной научно-исследовательской лаборатории ДонНМУ им. М. Горького «Клинические, метаболический, молекулярно-генетические особенности при злокачественных новообразованиях» (№ госрегистрации 15/15, шифр работы УН 16.01.15).

Цель исследования: установить особенности взаимодействия компонентов системы свободно-радикального окисления в патогенезе злокачественной трансформации.

Для достижения цели поставлены **следующие задачи:**

1. Выявить особенности катаболизма пуриновых нуклеотидов, связанные со злокачественной трансформацией, для оценки прооксидантного статуса в плазме крови, эритроцитах и в гомогенатах тканей (опухоли и нетрансформированной смежной).
2. Изучить особенности изменения ферментативной АОЗ, связанные со злокачественной трансформацией, в плазме крови, эритроцитах и в гомогенатах тканей (опухоли и нетрансформированной смежной).
3. Выявить изменения продуктов СРО, связанные со злокачественной трансформацией, в плазме крови, эритроцитах и гомогенатах тканей (опухоли и нетрансформированной смежной).
4. Изучить влияние старения на ключевые ферменты системы генерации АФК и АОЗ, а так же на изменение продуктов СРО в плазме крови, эритроцитах и в гомогенатах тканей (опухоли и нетрансформированной смежной).
5. Установить патогенетические механизмы изменения ферментов системы генерации АФК и АОЗ, а так же продуктов СРО при опухолевой прогрессии в плазме крови, эритроцитах и в гомогенатах тканей (опухоли и нетрансформированной смежной).

Объект исследования: состояние компонентов системы свободно-радикального окисления в тканях, в клетках и плазме крови больных с опухолями желудка.

Предмет исследования: патофизиологические и биохимические показатели, которые отражают выраженность изменения СРО в плазме крови, эритроцитах и гомогенатах тканей (опухоли и нетрансформированной смежной) в зависимости от стадии рака и возраста больных РЖ.

Научная новизна. Впервые изучен кооперативный эффект изменения исследуемых показателей СРО, ферментативных систем генерации АФК и систем их нейтрализации в плазме, клетках крови (эритроцитах) и гомогенате тканей в корреляции с тяжестью течения рака желудка. Расширены теоретические представления о связи метаболических изменений в опухолевой ткани и в крови больных РЖ. Определено влияние старения на показатели СРО, катаболизм

пуриновых нуклеотидов и ферментов АОЗ в норме и при РЖ. Разработан алгоритм оценки активности прооксидантных и антиоксидантных показателей для контроля интенсивности метаболических нарушений при РЖ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Определение уровня 2,4-динитрофенилгидразонов и ферментов катаболизма пуринов в плазме крови и эритроцитах может быть использовано как ранний и стабильный показатель патологического старения вызванного оксидативным стрессом, выступать как показатель стадийности РЖ, а также может быть использовано в качестве контроля лечения и проведения антиоксидантной/прооксидантной и химиотерапии. Повышение скорости катаболизма пуриновых нуклеотидов и дисрегуляция ферментативного звена АОЗ, выступает как одно из ключевых патогенетических звеньев прогрессии опухолевого роста.

Изменение активностей ферментов катаболизма пуринов в плазме крови отражают состояние обмена в тканях. Контроль и мониторинг за изменением активностей ферментов пуринового обмена и первой линии АОЗ в плазме крови и эритроцитах, может расцениваться не только как показатель стимуляции СРО, выражая степень интенсивности ОС приводя к патологическому старению, но и использоваться в качестве диагностики заболеваний ассоциированных со старением, в частности РЖ.

Методология и методы исследования: биохимические (определение активностей ферментов - АДА, КО, супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГПО), а так же концентрации нитратов/нитритов (NO_x), кетондинитрофенилгидразонов (КДНФГ) и альдегиддинитрофенилгидразонов (АДНФГ) нейтрального и основного характера). Статистический анализ полученных результатов проведен с использованием лицензионного пакета прикладных программ Statistica-10.0 (StatSoft).

Положения, выносимые на защиту

1. Трансформация пуринового обмена носит системный характер, катаболизм пуринов усиливается и в опухолевых узлах, и в смежной ткани, а так же однонаправлен при старении и опухолевой прогрессии.

2. Повышение активности АДА и КО в плазме может выступать не только маркером целостности клеточных мембран опухолевой ткани, а так же отражать рост трансформированной ткани и ее метастазирование, но и являться показателем патологического старения, общепризнанного фактора риска развития злокачественных новообразований.

3. Дисбаланс ферментативного звена АОЗ, а именно ингибирование ГПО и активация СОД - компенсаторный механизм опухолевого роста, активируемый в условиях ОС.

4. Злокачественная трансформация в слизистой желудка сопровождается закономерными и взаимосвязанными изменениями в состоянии системы СРО. Причем, взаимосвязанные изменения всех изученных компонентов системы СРО регистрируются уже на самых начальных стадиях заболевания, играя патогенетическую роль в возникновении и прогрессии опухолевого роста.

5. При конструировании терапевтических технологий, предполагающих модулирование состояния системы СРО, необходимо учитывать не только гистогенез (морфологические особенности опухоли), но и возраст пациентов, и стадию опухолевого процесса.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов проведенных исследований подтверждается наличием первичной научной документации:

1. Первичными материалами о использованных в работе материалов и методов; результаты, проведенных исследований (регистрационные журналы, таблицы, протоколы обработки результатов исследования и др.).

2. Первичные документы по статистической обработке в виде сводных таблиц с отражением всех исследованных параметров, с указанием высчитываемых параметров и анализом результатов на бумажных носителях и CD-диске. Исследования выполнены на аппаратуре, которая прошла государственный метрологический контроль и имеет высокую достоверность.

Результаты получены с помощью методик, которые являются общепринятыми. Достоверность основных положений и выводов обусловлено

высоким научным и методическим уровнем проведенных исследований и подтверждена статистической обработкой данных.

Апробация результатов. Материалы диссертации были представлены на XI Российском онкологическом конгрессе (Москва, Россия, 2007); V Пленуму наукового товариства патофізіологів України присвячений 110-річчю з дня народження М.М. Горьва (Луганськ, 2010); X Украинском биохимическом съезде (Одесса, 2010); XVIII межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2012); VIII Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные направления биохимии человека» (Санкт-Петербург, 2015); XVII Международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований» (Москва, 2015); I Международной научной конференции «Донецкие чтения 2016. Образование, наука и вызовы современности» (Донецк, 2016); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Научные основы создания и реализации современных технологий здоровьесбережения» (Ростов-на-Дону, 2016); Международной научной конференции студентов и молодых ученых «Донецкие чтения 2017: Русский мир как цивилизационная основа научно-образовательного и культурного развития Донбасса» (Донецк, 2017); XXIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии - 2017» (Санкт-Петербург, 2017).

Внедрение в практику результатов исследования. Основные результаты работы внедрены в учебный процесс в виде методических разработок, для проведения практических и семинарских занятий по теме «Перекисное окисление липидов и антиоксиданты» на кафедре биологической химии, Донецкого национального медицинского университета им. М.Горького. Так же включены в спецкурс «Биохимия прооксидантной и антиоксидантной систем» для студентов ФИПО, и являются частью научно-исследовательской работы кафедры биологической химии, патофизиологии и Центральной научно-исследовательской лаборатории ДонНМУ им. М.Горького.

РАЗДЕЛ 1. КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПРИ СТАРЕНИИ ОРГАНИЗМА И ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Одна из центральных проблем современной биологии - проблема дифференцировки, старения, гибели и замены клеток. Эта проблема непосредственно связана с изучением онтогенеза целого организма и является важнейшим направлением современной биологии старения [20]. В последнее время ученые разных специальностей приходят к выводу, что в основе многих патологических процессов в организме, приводящих к различным заболеваниям и преждевременному старению, лежит одно и то же явление. Это повреждение клеточных оболочек и других структур внутриклетки свободными радикалами (СР) кислорода. Известно, что возрастные изменения в любом органе являются результатом внутренних процессов в нем и влияний со стороны других органов. По мере старения организма, количество СР возрастает, и риск различных возрастных болезней, в том числе онкологических, увеличивается. С возрастом заболеваемость раком резко возрастает, вероятнее всего, из-за снижения эффективности механизмов обновления клеток, нарушения метаболических процессов и регуляторных систем, а так же формирования ОС по мере старения человека. Следовательно, старение является одним из основополагающих факторов развития рака.

Вопрос об участии АФК в регуляции деления, дифференцировки, старения клеток и механизмах канцерогенеза уже давно дискутируется в литературе [21; 22]. Ранее исследователями обнаружено, что СР могут играть ключевую роль в онкогенезе и росте опухолей [23], стимулируя пролиферацию клеток и вызывают генетическую нестабильность, а их увеличение в раковых клетках часто рассматривается как неблагоприятное событие [24]. Исследования последних лет позволили установить, что стимулируемый опухолью онкогенный ген Ras способен индуцировать генерацию оксидантов, способствуя ОС в раковых клетках [25]. Интересно, что Ras может так же трансформировать определенные

клетки в онкогенные, за счет увеличения генерации АФК, а так же вызывать преждевременное старение в первичных клетках [26]. Другими авторами было обнаружено, что АФК способствуют трансформации протоонкогена Ras в онкоген и стимулируют инактивацию основного апоптогенного белка p53, тем самым замыкая порочный круг, опять же способствуя злокачественному перерождению клеток [27]. Эти наблюдения показывают, что увеличение АФК вызванное Ras, индуцирует клеточное старение и приводит к злокачественной трансформации. Так же было обнаружено, что одним из механизмов туморицидного действия фактора некроза опухоли (ФНО- α) считается нарушение функций митохондриальной цитохром с-оксидазы при старении и онкозаболеваниях, способствуя усиленному образованию АФК [28].

Одной из актуальных проблем здравоохранения является проблема повышения эффективности лечения злокачественных новообразований. Наряду с хирургическим методом активно используются химио- и лучевая терапия, а так же, до конца не изученным остается вопрос о применении антиоксидантов или прооксидантов в терапии онкологических больных. Однако, как известно, низкая радиочувствительность опухоли, ее химиорезистентность и до конца не изученные механизмы влияния про- и антиоксидантов на опухолевые клетки могут значительно ухудшить прогноз заболевания.

В диагностике и лечении рака существенный вклад вносит изучение биохимических и патохимических особенностей опухоли. Как известно при РЖ происходит нарушение кровотока в слизистой оболочке, приводя к гипоксическим явлениям различной выраженности, с последующим нарушением утилизации кислорода и усиленной генерацией СР. Такие особенности как активация гликолиза, усиление синтеза компонентов клеточных структур – нуклеотидов, белков, фосфолипидов, как правило, связаны с высокой пролиферативной активностью. Установлено, что для онкологических больных присущ целый ряд серии метаболических нарушений, тесно связанных между собой. При этом, изменения в нуклеотидном, углеводном, энергетическом

обменах и в АОЗ, могут быть обусловлены как репарационными процессами, так и быть этапом в развитии онкологической патологии.

Для биохимических методов диагностики наиболее доступным и значимым материалом является плазма крови. Ранее было предположено, что активность ферментов системы СРО в плазме, возможно, отражает их активность в тканях организма [29]. Но, уровень ферментативной активности в плазме, безусловно, составляют не только ферменты плазмы и вышедшие из ткани, но и ферменты форменных элементов крови, одними из которых выступают эритроциты, способные к относительно быстрому образованию. Следует отметить важную роль дисфункции эритроцитов в развитии гипоксии и усилении продукции АФК [30]. Характер и степень данного влияния представляет большой интерес, поскольку темп возрастных метаболических изменений в тканях, клетках и плазме крови может быть неодинаковым [31], что в свою очередь делает привлекательным изучение про- и антиоксидантных характеристик у больных РЖ. При этом, несмотря на множество работ, исследования источников образования АФК в раковых клетках, пути их регуляции, патофизиологические механизмы действия, последствия ОС и роль антиоксидантов в процессе патогенеза опухолевого роста все еще дискутируются в литературе [32].

1.1. Катаболизм пуриновых нуклеотидов, как один из основных путей генерации активных форм кислорода

О важности пуриновых нуклеотидов известно достаточно много: они оказывают выраженное влияние на проницаемость клеточных мембран, свертываемость крови, секрецию простагландинов, принимают участие в окислительно-восстановительных реакциях, входят в состав коферментов (НАД, НАДФ, ФАД), участвуют в синтезе нуклеиновых кислот, регуляции кровообращения, энергетических процессов, а так же принимают активное участие в поддержании соотношения ПОС и АОС в клетке [33; 34; 35].

В последние годы обмен нуклеотидов и СРО все чаще упоминаются вместе. Одна из причин этого - связь ферментов метаболизма нуклеотидов с образованием АФК. Несмотря на то, что основной системой генерации АФК в клетке считаются митохондрии, а их окислительное повреждение признается одним из ведущих факторов, приводящих к старению и ассоциированных с ним заболеваний, таких как злокачественные новообразования, сердечнососудистые заболевания, болезни иммунной системы, катаракта и ряд других [36; 37], все же, наряду с митохондриями, высокая продукция СР генерируется многими ферментативных и неферментативных реакциями с металлопротеинами, к одним из которых относятся ферменты пуринового обмена [38; 39]. Причем, в клетках лишенных митохондрий, распад пуриновых нуклеотидов считается одним из ключевых процессов нарабатывающих АФК [40; 41].

Интересно, что в современной литературе ферменты катаболизма пуринов рассматриваются еще как факторы ангиогенеза [42], и как факторы роста [43]. Уровень экспрессии ферментов пуринового обмена тесно коррелирует со степенью дифференцировки опухолей, стадией заболевания, возрастом больных и их выживаемостью [44].

К ферментам - регуляторам катаболизма пуриновых нуклеотидов относится АДА и КО, которые могут служить маркером дифференцировки клеток, клеточной пролиферации, а так же выступать ферментативными источниками образования АФК [45; 46; 47].

АДА относится к классу гидролаз, впервые описан Шмидтом в 1928 г, катализируя реакцию гидролитического дезаминирования аденозина (дезоксияденозина) с образованием инозина (дезоксиинозина). Фермент не дезаминирует производные аденозина и, таким образом, специфичен именно для данной реакции. Значительная часть фермента локализована в цитозоле, и только 2% от общей активности обнаруживается во фракции плазматических мембран эритроцитов и тромбоцитов в виде комплекса с гликопротеидами. В эритроцитах АДА локализована на поверхности мембран, 2/3 активных центров фермента направлены во внешнюю среду (экзофермент) [48]. Установлено, что

АДА может участвовать и во внеклеточном превращении аденозина в инозин. Была также обнаружена митохондриальная форма АДА в коре головного мозга крысы. В тканях АДА содержится в виде множественных форм, которые различаются по молекулярной массе, изоэлектрическим точкам и кинетическим свойствам [49].

Основной формой фермента, обнаруживаемой во многих тканях человека (желудок, селезенка, кишечник, тимус), а так же во всех форменных элементах крови является - АДА1 [50; 51]. Промежуточная форма фермента - АДА2, локализована в печени и селезенке человека. В плазме крови эта форма является также основным компонентом, однако клеточный источник ее не определен [52].

Уровень активности АДА определяет соотношение в клетке концентраций аденозина и инозина - при снижении активности АДА происходит накопление аденозина. Есть данные о том, что увеличение концентрации аденозина в клетке индуцирует апоптоз через активацию каспаз 3 и 4 [53]. Соответственно увеличение активности АДА в опухолевых клетках может быть механизмом ускользания от запрограммированной клеточной смерти, а отсутствие таковой в опухолях является характерной чертой атипизма злокачественного роста.

Особо выделяется роль аденозина в регуляции иммунных процессов. Его низкие концентрации в лимфоцитах тормозят созревание, пролиферацию и дифференциацию клеток, угнетают супрессорную функцию Т-лимфоцитов, а высокие концентрации подавляют активность естественных киллеров [54; 55]. Аденозин способствует синтезу АТФ, оказывает антиаритмическое и гипотензивное действие, регулирует сосудистый тонус, свертываемость крови, так же ему присущи антигипоксические и антиадренергические свойства [56; 57]. Известно о нейромедиаторной роли аденозина, его участии в стимуляции ФНО- α , в передаче внеклеточных сигналов в клетку [58; 59].

Есть работы показывающие, что гипоксическое состояние сопровождается увеличением активности АДА [60]. Существуют доказательства, что около 60 % солидных опухолей имеют гипоксические и/или аноксические участки, которые распределены по всему объему опухоли [61]. Показано, что при гипоксии

происходит стабилизация HIF-1 α , а данный фактор в свою очередь модулирует синтез ферментов метаболизма аденозина: увеличивает экспрессию 5-нуклеотидазы и подавляет образование аденозинкиназы. Таким образом, HIF-1 α регулирует концентрацию внутриклеточного и соответственно внеклеточного аденозина. При опухолевом росте высокие концентрации внеклеточного аденозина приводят к нарушению функциональной активности лимфоцитов [62]. Известно, что и опухолевые и Т-регуляторные (Т-супрессоры) клетки продуцируют аденозин во внеклеточную среду, где последний связывается с A2A-рецепторами противоопухолевых клеток (Т-киллеры), что приводит к увеличению в них циклического АМФ и снижению синтеза и секреции интерферона- γ [63]. Данные метаболические изменения приводят к нарушению иммунного ответа и опухолевой прогрессии, так называемой аденозинергической иммунодепрессии или парадоксу Хелстрема [64].

Примечательно, что кроме увеличения концентрации аденозина, HIF-1 α регулирует экспрессию ферментов гликолиза [65] и скорость неоваскуляризации. Интенсификация гликолиза сопровождается накоплением лактата и развитием ацидоза, что, за счет увеличения активности мембранного моноаминотранспортера [66], усиливает выход аденозина из клетки [64]. Так же известно, что высвобождение аденозина из клеток, в условиях гипоксии, стимулирует повышение уровня монооксида азота (NO) тем самым выступая в качестве вазодилататора [67]. Имеются работы, в которых показано, что аденозин регулирует содержание в клетках восстановленного глутатиона (GSH), Ca²⁺, кальмодулина [68; 69].

Установлено, что АДА является маркером ОС [70; 71], оказывая существенное влияние на производство АФК [41]. Показано, что клетки с высоким уровнем аденозина, в определенных условиях, являются более устойчивыми к окислительному действию АФК, способствуя усилению экспрессии ГПО, тем самым защищая клетку от ОС [72]. По мнению других авторов, цитопротекторный механизм защиты клеток аденозином от окислителей

осуществляется через новый механизм активации клеточных антиоксидантных ферментов, таких как СОД, каталаза и глутатионредуктаза [73].

Опухолевые клетки, как известно, производят АФК более быстрыми темпами, чем нетрансформированные клетки. По мнению некоторых авторов, повышенная продукция АФК вызывает ОС, за счет активации АДА, тем самым снижая количество аденозина, что приводит к подавлению АОЗ, способствуя усилению пролиферации клеток при онкопатологии [73]. Известно, что катаболизм пуринов в эритроците контролирует пул аденилатов в клетке. При наличии постоянного активного ресинтеза АТФ, адениловые нуклеотиды эритроцита не разрушаются АДА. При глубоком энергодефиците излишек АМФ устраняется путем разрушения аденина, аденозина или инозина [74]. Таким образом, изменения активности АДА является маркером гипоксии, признаком компенсаторного изменения скорости деградации аденилатов [75]. Так как, АДА регулирует энергетический статус в эритроците, снижение ее активности приводит к нарушению биоэнергетики в клетке, что так же может, служит в качестве одной из причин развития рака [76].

В эритроцитах с возрастом активность АДА снижается, причем у женщин позднее, чем у мужчин. При опухолях желудочно-кишечного тракта эритроцитарная АДА снижается, отражая тяжесть течения заболевания [77], в то же время в плазме крови АДА повышается [78]. Так же отмечается ее повышение и в опухолевых тканях [79]. Отмечается прогностическое значение АДА при опухолях других локализаций (яичников, мочевого пузыря, рака легких).

Интересным фактом является снижение активности АДА в эритроците и высвобождение ее в плазму, в условиях гипоксии и при нарушении целостности эритроцитарной мембраны [30]. Установлено, что накопление аденозина в эритроцитах приводит к их гемолизу, таким образом, АДА возможно контролирует целостность клеток крови [80]. В работах других авторов показано, одновременное увеличение активности АДА и КО, а так же уровня NO в условиях окислительного повреждения эритроцитов [81]. Однако основная роль АДА в образовании АФК заключается в том, что данный фермент принимает участие в

образовании гипоксантина (ксантина) – субстрата для фермента КО – который считается общепризнанным генератором $O_2^{\cdot -}$ и перекиси водорода (H_2O_2), катализируя заключительный этап пуринового распада, так же, по его активности можно судить об интенсивности и направленности метаболических процессов [82].

Одним из ведущих ферментативных источников образования АФК является КО, локализованный в цитоплазме клеток и на внешней поверхности плазмолеммы эндотелиоцитов [83]. Данный фермент был открыт независимо друг от друга украинским ученым Горбачевским и немецким - Шардингером. В нормальных условиях фермент находится преимущественно в ксантиндегидрогеназной (КДГ) форме и может обратимо или необратимо переходить в КО, в результате соответственно образования дисульфидных связей цистеиновых остатков Cys535 и Cys992, а так же с участием сульфгидрильных оксидаз [84], или ограниченного протеолиза [85] с вовлечением кальций зависимых протеаз.

Своеобразие действия этого фермента заключается в том, что он представляет собой как бы комплекс, функционирующий двояко: фермент может работать как оксидаза, и как дегидрогеназа. По соотношению активности КО и КДГ можно судить о напряженности оксидантных и антиоксидантных процессов. Основная физиологическая функция фермента - участие в катаболизме пуринов: при этом КДГ форма в качестве акцептора электронов использует главным образом НАД, КО - молекулярный кислород [86].

При тканевой гипоксии наблюдается быстрая (в течение нескольких минут) трансформация КДГ в КО за счет фосфорилирования, под действием р38 MAP киназ и казеин киназ 2. Так же в этот процесс могут вовлекаться АФК и Ca^{2+} [87]. Быстрый переход фермента в оксидазную форму наблюдается и при увеличении уровня кислых метаболитов, а так же при гомогенизации тканей, что существенно затрудняет определение истинного соотношения разных изоформ фермента *in vivo* [88].

Было показано, что фермент в значительных количествах локализован в головном мозге, печени, в сердечной мышце, скелетных мышцах, поджелудочной железе, тонком и толстом кишечнике. Две формы фермента также находятся в плаценте человека и ген, кодирующий их, локализован в 22 хромосоме (участок 2p23) и содержит 36 экзонов [89]. Транскрипция фермента существенно усиливается под действием цитокинов (интерферон γ , интерлейкин-1, интерлейкин-6, ФНО- α), гормонов (дексаметазон, кортизол, пролактин), липополисахарида, гипоксии. Установлено, что в условиях гипоксии активность фермента увеличивается в течение 24 ч [90], а при гипероксии активность фермента падает быстрее, чем скорость его синтеза *de novo* [91]. Предполагается, что уменьшение концентрации кислорода способствует фосфорилированию молекулы КО, в результате чего её ферментативная активность возрастает [92].

Данные о содержании КО в тканях и органах человека весьма разнообразны, однако наибольшее количество фермента обнаружено в гепатоцитах, эпителиальных и эндотелиальных клетках [93; 89]. В плазме крови в основном весь фермент находится в оксидазной форме в результате действия сывороточных протеаз [94]. Установлено, что в условиях гипоксии происходит истощение запасов АТФ приводя к изменению мембранного градиента Ca^{2+} . Повышение уровня Ca^{2+} активирует Ca^{2+} -зависимые протеазы, которые в свою очередь участвуют в превращают КДГ в КО стимулируя повышение продукции O_2^- [95].

В КО реакции выявлено также образование гидроксильного радикала ($\text{HO}^\bullet$), который, как считают авторы, возникает в результате дальнейшего восстановления H_2O_2 [96]. Считается, что генерация АФК КО необходима для метаболизма железа, регуляции тонуса сосудов, клеточной пролиферации [97]. Особое значение придается роли фермента в обеспечении врожденного иммунитета [85]. Показано, что O_2^- образующийся в КО реакции, ингибирует Ca^{2+} -АТФазу саркоплазматического ретикулума гладкомышечных клеток, угнетая тем самым транспорт Ca^{2+} , что приводит к повреждению сосудов при различных патологических ситуациях [98]. К тому же, O_2^- служит предшественником для

других форм АФК, обладающих более выраженным цитотоксическим действием, а так же выступает в качестве активаторов белков разобщителей окисления и фосфорилирования в процессе дыхания. Основная функция этих белков сводится к терморегуляции, однако они способны выступать в качестве регуляторов метаболического и энергетического баланса [99].

Так же имеются данные о возникновении возрастных патологий, в том числе нейродегенеративных заболеваний и рака, связанных с усиленной генерацией АФК за счет КО [100]. Установлено, что АФК генерируемые КО участвуют в активации HIF-1 α , что стимулирует индукцию различных генов, включая эритропоэтин, фактора роста эндотелия сосудов, а так же гликолитических ферментов [101]. Гиперэкспрессия HIF-1 α обнаруживается в преобладающем большинстве опухолей человека и коррелирует с накоплением мутантного белка p53 и клеточной пролиферацией [102]. Показано также, что повышенный уровень HIF-1 α в клеточных линиях рака головного мозга человека, коррелировал с увеличенным метастатическим потенциалом клеток [103].

Недавние исследования показали, что при длительной гипоксии, происходит повышение HIF-1 α и усиление активности КО, повышая уровень АФК, которые стимулируют увеличение уровня Ca²⁺-зависимых протеаз участвующих в активации кальпаинов, особенно кальпаина 1 [104]. Эти белки способствуют деградации HIF-2 α , регулирующего гены, кодирующие антиоксидантные ферменты, в частности СОД-2, а так же способствуют превращению КДГ в КО, тем самым усиливая производство АФК, [105]. Интересно отметить, что снижение экспрессии HIF-2 α при длительной гипоксии считающейся с повышением активности КО и снижением ключевых ферментов антиоксидантной линии защиты, вызывает длительный ОС [106].

Так же имеются убедительные доказательства в пользу того, что повреждение ДНК за счет АФК, генерируемыми КО, приводит к трансформации нормальной клетки в раковую [107]. В опытах на крысах было показано, что продукция АФК осуществляемая КО способна вызывать патологии, в результате которых животные погибали в течении 2 недель после инфицирования. При этом

введение аденозина (предшественника ксантина) снижало, а аллопуринол и СОД повышали выживаемость животных. Эти и ряд других данных позволили высказать предположение, что изменение активности КО играет важную роль в формировании опухолевой прогрессии [90].

Полученны данные, об ухудшении периферического кровообращения в более пожилом возрасте, и развития возрастных патологий за счет активации КО. Установленно, что КО при старении участвует в формировании сосудистого ОС, который приводит к снижению эндотелий зависимой дилатации, путем уменьшения NO [108]. АФК генерируемые КО участвуют в окислении липопротеинов низкой плотности и других белков, способствуя раннему риску развития атеросклероза, гипертонии, сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, диабета, а так же формированием микротромбозов [109].

Обнаружено, что во многих патофизиологических условиях способствующих нарушению естественной выработки NO, происходит усиленная генерация $O_2^{\cdot-}$ за счет КО. Есть данные о том, что NO регулирует экспрессию активности КО [110]. Обнаружено, что генерируемый КО супероксид подавляет активность NO-синтазы (NOS), а торможение активности КО, приводит к усилению производства NO [111]. В то же время недавно обнаружено, что при низком парциальном давлении кислорода КО может служить источником NO, синтезируя его из нитратов (NO_3^-) и нитритов (NO_2^-) (как органических, так и неорганических) и используя в качестве источника электронов ксантин или НАДН [112]. Поэтому некоторые исследователи считают фермент важным источником вазодилататора NO в ишемизированной ткани. Однако имеются данные, о влиянии КО на производство NO через стимуляцию эндотелиальной NOS, с последующим образованием высокореакционного пероксинитрита ($ONOO^-$), в чем вновь проявляется двойственность функции фермента [98]. Считается, что $ONOO^-$ является еще более сильным окислителем, способным окислять как NH- так и SH- группы белков, а так же признан одним из факторов вызывающих старение [113]. Такое окисление приводит к инактивации некоторых ферментов, одним из которых является СОД, а так же ГПО - участвующего в

обезвреживании пероксинитрита с образованием тиольных радикалов глутатиона ($GS^\bullet$), в результате чего последний из антиоксиданта превращается в прооксидант [114]. Что еще больше способствует повреждению эндотелиальных клеток и тканей при различных патофизиологических условиях [115].

Активность КО в тканях и плазме крови меняется в течение суток и подвержена влиянию многих факторов. Некоторые эндогенные и экзогенные вещества (производные фенолов, флавоноиды, соли меди, цинка, ртути, никеля, кобальта, вазоактивные интестинальные полипептиды) являются ингибиторами КО [116-118]. Мочевая кислота в физиологических концентрациях также частично ингибирует КО [119]. Данные об ингибиторах КО, помимо теоретического значения, имеют важное практическое значение для медицины, так как на основе химической структуры ингибиторов КО представляется возможность синтеза соединений близких по структуре естественным субстратам и ингибиторам КО. Таким образом, возникает интерес исследователей к разработке специфических ингибиторов КО и применение их при различных патологических состояниях, включая рак [120].

Существует значительный доказательства патогенетической роли КО в воспалительных заболеваниях желудка, кишечника и язвы двенадцатиперстной кишки [121]. Было установлено, что КО играет важную роль в развитии РЖ, а применение ингибиторов КО используется в качестве профилактики и лечения колоректального рака [122].

Недавно обнаружено, что КО так же участвует в окислении различных химиопрепаратов, переводя их в неактивное состояние и усиливая продукцию АФК. Поэтому в последнее время одновременно с химиотерапией интенсивно используют блокаторы КО, тем самым предотвращая избыток образования АФК. Так же установлено, что некоторые ингибиторы КО, например аллопуринол, способны оказывать двойной эффект, с одной стороны подавляют активность КО, тем самым снижая производство АФК, с другой, сами выступают в качестве ловушек для свободных радикалов, предотвращая окисление ДНК и белков [123]. Однако, так же существуют обратные данные применения химиопрепаратов для

усиления образования АФК с последующим истощением запаса АОЗ, тем самым усиливая цитотоксический эффект на раковые клетки. Например, одними из механизмов цитотоксического действия 6-тиогуанина при лечении опухолей различной локализации, является дисфункция митохондрий и образование активных форм кислорода с последующим формированием окислительно-индуцированных повреждений ДНК [124].

1.2. Роль ферментативного звена антиоксидантной защиты при старении и онкопатологии

В процессе эволюции в живых организмах выработались специализированные системы, называемые АОС, осуществляемые контроль над продукцией АФК и необходимые для предотвращения некомпенсированного развития СР реакций, чья согласованная работа держит под постоянным контролем, как образование, так и превращение АФК в клетках [125].

Ведущая роль в АОЗ отводится ферментативным ее представителям, таким как СОД и ГПО, представляющим первую линию защиты от АФК в клетке [126]. СОД - катализирует реакцию дисмутации $O_2^{\cdot -}$ с образованием кислорода и H_2O_2 , которая, по-видимому, представляет наиболее важный уровень защиты клеток, так или иначе находящихся в контакте с кислородом, при этом дальнейшая нейтрализация H_2O_2 до воды осуществляется ГПО - функцией, которой является не только разрушение H_2O_2 , но и инактивация других пероксидных радикалов.

Так как реакция дисмутации экзотермична, то катализирующая эту реакцию СОД не нуждается в кофакторах, что делает ее работу автономной, не зависящей от функционирования других клеточных структур. В то же время для работы ГПО необходим GSH, синтезируемые преимущественно в печени глутатионсинтетазой или восстанавливается в реакциях с глутатионредуктазой, что усложняет действие ГПО [127]. При этом уровень внутриклеточных ферментов АОС находится под генетическим контролем и регулируется различными факторами [128]. Многие

патологии человека, сопровождающиеся и, возможно, вызываемые увеличением продукции АФК, протекают на фоне генетически обусловленного ферментов АОЗ [7; 129].

В клетках эукариот известно несколько изоформ СОД, отличающихся строением активного центра, структурной организацией и другими свойствами [130]. Выявлены основные три изоформы фермента в зависимости от типа переходного металла-кофактора активного центра: цитозольная, медь-цинковая (Cu,Zn-СОД; СОД1) - самая распространенная форма; митохондриальная, марганцевая (Mn-СОД; СОД2) и экстрацеллюлярная, внеклеточная (Э-СОД; ВК-СОД; СОД3). Прокариоты и растительные объекты содержат в дополнение к ним еще и менее распространенные Fe-зависимую форму СОД (с железом) и недавно описанную Ni-СОД (с никелем) [131]. Регулирующее влияние на активность СОД оказывают глутатион, цистеин, другие SH-содержащие соединения, а также опосредованно ферменты GSH обмена [132].

У семейства ГПО так же известно несколько генов, кодирующих разные формы ГПО, отличающиеся по локализации в организме [129]. Структурно ферменты данного семейства представляют собой селено-содержащие тетрамерные гликопротеины. Существует несколько изоформ ГПО, которые кодируются разными генами, отличаются по локализации в клетке и субстратной специфичности: клеточная или цитозольная ГПО1 (является наиболее распространенной формой фермента, и обнаружена в цитоплазме практически всех тканей млекопитающих), желудочно-кишечная ГПО2 (у людей локализована главным образом в печени и толстом кишечнике), внеклеточная ГПО3 (в основном встречается в плазме крови), ГПО4 (имеет большое значение в метаболизме гидроперекисей фосфолипидов и экспрессируется практически во всех клетках млекопитающих на более низких уровнях), секреторная ГПО5 (не содержащая Se, локализованная в придатках яичников), ГПО6 (экзотическая форма встречающаяся в двух конфигурациях с Se и без) а так же не содержащая Se ГПО гидроперекисей фосфолипидов (ГПО7), обнаруженная в большинстве тканей и как предполагают некоторые авторы, играющая важную роль в развитии

злокачественных опухолей, при этом снижение ее активности, возможно, способствует трансформации клеток [127]. Предполагают, что основной функцией ГПО в плазме является защита липопротеидов от окислительной модификации.

Еще одним ферментом, разрушающим H_2O_2 является каталаза, однако фермент сосредоточен в микросомах, тогда как ГПО – в цитозоле и митохондриях, при этом сродство к H_2O_2 у ГПО выше, чем у каталазы, поэтому первая работает даже при низких концентрациях H_2O_2 , а в некоторых тканях каталаза почти отсутствует и ГПО играет главную роль в валовом метаболизме H_2O_2 [133]. Так же в отличие от каталазы, ГПО способна восстанавливать поврежденные окислителями клеточные структуры, эффективно взаимодействуя с гидроперекисями фосфотидилхолина, холестерина, эфира холестерина в мембранах и липопротеинах низкой плотности, а так же участвовать в нейтрализации $ONOO^-$ [134]. Таким образом, совместно с токоферолом ГПО практически полностью подавляет ПОЛ в биомембранах.

Однако первостепенную функцию в защите клеток от АФК выполняет СОД, стабилизируя клеточные мембраны, предотвращая процессы ПОЛ, причем снижая уровень $O_2^{\cdot-}$, СОД защищает другие ферменты АОЗ от инактивирующего действия $O_2^{\cdot-}$, тем самым оказывая ключевую роль в обрыве цепи СРО. Однако в определенных условиях СОД может взаимодействовать с H_2O_2 и выступать в качестве прооксиданта, инициируя образование радикалов – $O_2^{\cdot-}$ и $HO^{\cdot}$ [135]. Кроме того СОД так же может восстанавливать NO-радикалы которые связываясь с молекулярным кислородом способствуют образованию агрессивного $ONOO^-$, тогда как ГПО способна проявлять нитритредуктазную активность, восстанавливая $ONOO^-$ до NO_2^- , тем самым предотвращая реакции окисления [127.].

Установлено, что образующийся H_2O_2 в результате действия СОД, является более сильным окислителем, к тому же дающий начало активному $HO^{\cdot}$ и в условиях дефицита ГПО высокая активность СОД может служить причиной деструктивных процессов в клетке. При этом СОД считается достаточно

термостабильным белком, а так же остается активным в при изменении значений рН в широком диапазоне, тогда как закисление среды в эпителиальных клетках приводит к снижению активности ГПО, в результате чего усиливается цитотоксическое действие H_2O_2 на клетку [136].

В опытах на крысах установлено повышение активности СОД с возрастом, а активность ГПО находилась на одном уровне. При этом в условиях кратковременного ОС, усиление активности СОД наблюдалось лишь у молодых животных, однако при длительном ОС активность СОД увеличивалась во всех возрастных группах. При исследовании влияния ОС на активность ГПО, было обнаружено, повышение ГПО лишь у молодых животных, в условиях кратковременного ОС, и наблюдалась обратная динамика при длительном воздействии стресса - увеличение ГПО у взрослых животных, без изменения активности фермента у молодых. Следовательно, ферменты АОЗ чувствительны не только к возрастным изменениям в тканях, а так же и продолжительности стрессорного воздействия на организм [126]. Установлено, что повышение внутриклеточной концентрации $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , а так же NO-радикалов и NO_x участвуют в активации транскрипции генов СОД [137].

Литературные данные о возрастной динамике отдельных показателей АОС в организме человека довольно противоречивы, в одних работах обнаружено снижение ферментативного звена АОС плазмы крови с возрастом [138; 139], в других работах установлено повышение АОС в плазме крови, эритроцитах и гомогенатах тканей [140-142]. По мнению некоторых авторов, старение также сопровождается разнонаправленными изменениями активностей ферментов АОС, что позволяет поддерживать на новом функциональном уровне многие физиологические процессы [143; 144]. Изменение активностей ферментов АОЗ с возрастом в тканях так же имеет противоречивые сведения: в одних случаях сообщается об уменьшении активности ГПО с возрастом и это авторы рассматривают как причину накопления окислительных повреждений при старении [145], в других - об увеличении, тогда говорят о компенсаторном механизме, направленном против повышения генерации АФК [146]. Однако

большинство работ все же указывает на ослабление антиоксидантного потенциала тканей с возрастом [7]. Есть данные, свидетельствующие о том, что снижение уровня АОЗ может повышать продолжительность жизни [125], однако в других работах пациенты с дефицитом ферментативного звена АОЗ наоборот были склонны к преждевременному старению и канцерогенезу [147], а в некоторых исследованиях совсем не обнаружено взаимосвязи между СОД, ГПО и долголетием, при этом установлено, что мыши с дефицитом СОД-2, имеют более высокий уровень окислительного повреждения в тканях, но не являются короткоживущими [148], а избыточная экспрессия СОД-1 не увеличивает продолжительности жизни, а наоборот - оказывает противоположный эффект [149]. Авторами показано, что дисбаланс в системе СОД-ГПО, способствует повышению уровня H_2O_2 , вызывая старение, останавливая рост G1, что сопровождается увеличением регуляции опухолевого супрессора p53 и его транскрипционной мишени белка p21, при этом сверхэкспрессия p21 индуцирует повышение уровней АФК, способствуя старению клеток [150].

Изменения ферментативного звена АОЗ в зависимости от гендерного признака так же имеют противоречивые результаты. По данным некоторых авторов у особей женского пола активность ГПО и Мп-СОД в митохондриях печени более чем в два раза выше, чем у самцов того же возраста [143], в других же работах половые различия в активности АОС ферментов в эритроцитах и плазме крови 60-80 летних мужчин и женщин не были обнаружены [144].

Так как АФК помимо того, что оказывают окислительную функцию, выступают еще и в качестве вторичных мессенджеров, регулируя рост, пролиферацию, апоптоз и другие жизненно важные процессы для клетки, соответственно ферменты АОС используются не только для нейтрализации АФК, но и регуляции их уровня в клетке, что имеет важную роль при опухолевой прогрессии [150]. Известно, что биологический эффект H_2O_2 на ткани связан с концентрацией данного метаболита в клетке, так при низких концентрациях H_2O_2 стимулирует ангиогенез, пролиферацию и рост клеток, за счет изменения окислительно-восстановительного статуса с последующей активацией HIF-1 α и

ростовых факторов, при этом высокие концентрации оказывают противоположный эффект – повреждение эндотелиальных клеток, стимуляция апоптоза [151]. Однако установлено, что в опухолевых клетках с интенсификацией СРО и выраженным ОС происходит торможение апоптоза и стимуляция пролиферации опухолевых клеток [150]. При этом изменение редокс-статуса в опухоли имеет отношение к вторичной индукции экспрессии СОД, сопряженной с агрессивной канцерогенной трансформацией клеток [152].

Исследованию роли СОД и ГПО при опухолевом росте посвящено множество работ, однако все они имеют разнонаправленные результаты [153]. Так при карциноме надпочечников в опухолевых клетках установлено значительное повышение ГПО, что позволяет опухоли поддерживать низкий уровень липопероксидов, и соответственно, осуществлять высокую скорость размножения неопластических клеток. [154]. Увеличение активности ГПО обеспечивает надежную защиту опухолевых клеток от действия АФК образующихся в больших количествах под действием канцерогенов и тем самым обеспечивает выраженный канцерогенный эффект по отношению к развитию индуцированных опухолей, обеспечивая АОЗ опухолевых клеток, способствуя тем самым более интенсивному росту неоплазмы. [155; 156].

Встречаются работы, где показано, что при онкологических заболеваниях часто наблюдается накопление селена в опухоли и его снижение в сыворотки крови тем самым приводя к стимуляции клеточной ГПО [157]. В эритроцитах крови активность СОД у больных злокачественными новообразованиями значительно ниже группы контроля. Причем наиболее выраженное изменение в снижении активности СОД наблюдалось в зависимости от распространенности опухолевого процесса [158]. Хотя так же было обнаружено и увеличение активности СОД в эритроцитах онкобольных, что по мнению авторов косвенно указывает на усиление образования в эритроцитах O_2^- с последующей наработкой H_2O_2 [159]. При этом в условиях гипоксии, характерной для большинства видов рака, интенсификация процессов СРО сочетается со снижением активности АОЗ в эритроцитах, гомогенатах тканей и плазме крови, при одновременном усилении

ОМБ [160-162]. Обнаружено влияние старения на ферменты АОС у онкологических больных, а так же установлена положительная корреляция у СОД с развитием злокачественные опухоли молочной железы [163].

Было показано, что сверхэкспрессия СОД-2, индуцируемой избытком H_2O_2 в клетке, через Ras-МАР киназный путь повышает активность транскрипционных факторов экспрессии белков семейства металлопротеаз, которые могут связываться с клеточной мембраной или секретироваться в микроокружение опухоли, способствуя распаду внеклеточного матрикса и тем самым позволяя опухолевым клеткам вторгаться в микроокружение и метастазировать [120]. При этом повышение активности СОД-2 в опухоли увеличивает уровни мРНК металлопротеаз -2, -3, -7, -10, -9, и 11 тем самым способствуя повышению уровня АФК и метастатического потенциала клеток фибросаркомы, а так же приводя к хромосомной нестабильности. При этом ГПО подавляя уровень H_2O_2 , способствует инактивации металлопротеаз, снижая инвазивность опухоли [150].

Следовательно, в зависимости от направленности и интенсивности экспрессии ферментов АОЗ, уровни АФК действуют как ключевые медиаторы в трансформации клеток, вызывая остановку клеточного цикла, апоптоз и клеточное старение или же оказывают совсем противоположные эффекты [150].

1.3. Участие оксида азота и его метаболитов в регуляции окислительного статуса

NO - парамагнитный газ, молекулы которого имеют неспаренный электрон на внешней разрыхляющей π -орбитали. Впервые NO был получен более 300 лет назад (в 60-х годах XVII века) независимо двумя английскими учеными Бойлем и Куком. Физико-химические свойства NO во многом определяются уникальной способностью атомов азота окисляться и восстанавливаться в составе разных соединений. Наличие неспаренного электрона делает молекулы NO достаточно реакционными в отношении других радикалов и молекул, при этом NO легко

окисляется или восстанавливается [164]. Будучи липофильным соединением, имеющим неспаренный электрон, что превращает NO в высоко реактивный радикал, он свободно проникает через биологические мембраны и легко вступает в реакции с другими соединениями. NO является достаточно долгоживущей молекулой, среднее время жизни в биологических тканях и физиологическом растворе от 5 до 30 с [165]. Кроме того, NO образует комплексы с гемоглобином (Hb), формируя нитрозил-Hb, и вступает в реакции S-нитрозилирования с сывороточным альбумином и другими SH-содержащими молекулами, с образованием S-нитрозотиолов [166; 167] и таким образом может транспортироваться в организме, действуя не только как пара-, но и как эндокринный регулятор, благодаря чему, был назван молекулой года и заслужил название «гормон» [168]. Так как, тиоловые группы играют значительную роль в функционировании многих белков и ферментов, S-нитрозилирование белков один из главных процессов, за счет, которого NO может активировать или подавлять многие биохимические и физиологические процессы, тем самым контролировать жизнедеятельность клеток и тканей [169]. S-нитрозотиолы активируют транскрипцию ферментов АОЗ, стимулируют синтез стресс-белков, необходимых для поддержания интактности клеток и тканей в условиях стресса, ингибируют каспазы, белки инициаторы конечной стадии апоптоза, а так же способны активировать теломеразу, замедляя процессы старения. В плазме крови обнаруживаются нитрозотиолы цистеина, альбумина, а в клетках – нитрозотиолы GSH, цистеинилглицина, различных белков, включая очень важные для регуляции пролиферативной активности клеток и их апоптоза [168; 170].

В физиологических концентрациях NO обладает широким спектром биологического действия, выступая универсальным регулятором метаболических процессов в разных клетках и тканях организма человека и животных. Является важным нейромедиатором, участвующим в межклеточной сигнализации, центральной и периферической нервных систем, осуществляет релаксацию гладких мышц, предотвращает агрегацию тромбоцитов и адгезию нейтрофилов к эндотелию, регулирует пролиферацию лимфоцитов, работу желудочно-

кишечного тракта и мочеполовой системы, осуществление иммунитета, участвует в регуляции окислительного фосфорилирования и продукции АФК в митохондриях, регулирует внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} и активность ряда ферментов, а также потребления и транспорта кислорода, в тканях, выступает ингибитором радикалов от повреждающего действия на липиды и белки, тем самым оказывая антиоксидантную функцию в условиях ОС [171; 172].

В дополнение к его прямым биологическим эффектам, NO может взаимодействовать с АФК, такими как $\text{O}_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 для генерации $\text{NO}_2^{\cdot -}$, ONOO^- и других [173]. При этом ONOO^- способствует клеточной трансформации, оказывая мощное прооксидантное действие, участвуя в окислении киназ, белковых факторов транскрипции, регулируя клеточную трансдукцию [174]. Обнаружено, что механизмы образования и утилизации NO и H_2O_2 взаимосвязаны, поэтому метаболизм обоих АФК может происходить согласованно. К общим закономерностям биосинтеза и утилизации NO и H_2O_2 можно отнести такие как: активация Ca^{2+} -фосфатидилинозитидного обмена и усиление входа Ca^{2+} в клетку, приводящие к согласованной стимуляции биосинтеза NO и H_2O_2 ; взаиморегуляция и в некоторых случаях взаимостимуляция биосинтеза NO, H_2O_2 ; снижение продукции обоих АФК клеткой, происходящее цГМФ-зависимым путем по механизмам отрицательной регуляции в Ca^{2+} -фосфатидилинозитидной системе, а также перекрестным взаимоингибированием ключевых ферментов биосинтеза NO и H_2O_2 [175].

Установлено, что NO непрерывно продуцируется основным ферментативным путем в организме человека и животных из аминокислоты аргинина с помощью NOS-реакций и служит одним из универсальных регуляторов метаболизма. Было обнаружено три изоформы данного фермента. Две из которых постоянно присутствуют в клетках (конститутивные формы), полученные из эндотелиальных клеток - NOS3 эндотелиальная (eNOS) и нервной ткани - NOS1 нейрональная (nNOS), в то время как третья изоформа – NOS2 индуцибельная (iNOS), Ca^{2+} -независимая, выделенная из активированных

макрофагов, синтезируется под действием цитокинов и других биологических веществ, появляющихся в организме при патологиях, с участием иммунной системы [176]. При этом NO синтезируемый в больших количествах iNOS, обладает токсическими свойствами, что позволяет ему осуществлять в организме как защитные функции (убивать опухолевые и бактериальные клетки), так и участвовать в патологических процессах, индуцируя апоптоз [177]. Согласно некоторым данным, значительную часть продуктов NOS реакций, помимо NO, так же составляют NO_2^- и/или NO_3^- [178]. Тканевая гипоксия, с одной стороны, замедляет NOS-зависимый синтез NO из L-аргинина, так как кислород одно из реагирующих веществ в реакции NOS-зависимого синтеза NO. С другой стороны, имеются сведения о повышении ферментной активности NOS под влиянием гипоксии. Избыток кислорода (например при гипербарической оксигенации) уменьшает содержание NO во внутренней среде организма за счет окисления NO до NO_x [179].

Однако существуют данные о том, что определенное количество NO образуется во время экзогенного поступления органических нитрозосоединений, лекарственных средств (нитропруссид, нитроглицерин и др.). При этом нитраты/нитриты (NO_x) поступают в организм из экзогенных источников (пища, питьевая вода, оксиды азота воздуха), а также эндогенно образуются при не ферментативном или ферментативном окислении NO [180] или же в результате нитрификации аммонийного азота микроорганизмами кишечника. Установлено, что NO способен синтезироваться в организме за счет мощной нитрат/нитрит-редуктазной системы способной восстанавливать NO_x в NO, что указывает на наличие в организме цикла оксида азота. Одним из ключевых ферментов нитритредуцирующей системы является КО, обладающая структурным сходством с бактериальными нитрат/нитрит-редуктазами микрофлоры полости рта и желудочно-кишечного тракта, активность которых усиливается в условиях гипоксии, а так же при снижении активности NOS реакции [181]. Недавно установлено, что КО тканей млекопитающих способна восстанавливать NO_x в NO. Предполагается, что эта реакция осуществляется в молибденовом центре

фермента, нуждается в НАДН как доноре электронов и выполняет вазодилататорную роль при гипоксии, когда NOS не функционирует, а концентрация НАДН в тканях повышена [182]. Установлено, что NO_x , S-нитрозотиолы и нитрозамины, являясь метаболитами NO, выступают медиаторами его цитотоксических/цитопротекторных эффектов, а именно оказывая ингибирующее действие на митохондриальное дыхание, нарушая синтез белков и ДНК, оказывая повреждающее на них действие, способствуя генной мутации, потере биологических функций белков, некрозу и апоптозу [183].

Установлено, что регуляторные функции NO проявляются при его физиологических концентрациях, однако в условиях его гипер- или гипопродукции, он может участвовать не только в механизмах адаптации, но и неспецифического повреждения. Обнаружено, что при низких концентрациях NO защищает клетки от апоптоза, тогда как при его избытке происходит стимуляция запрограммированной гибели клеток [184]. Гиперпродукция NO является важнейшим звеном патогенеза различных заболеваний [185]. Чрезмерное накопление NO в организме играет ведущую роль в развитии ряда патологий приводя к трудно поправимым отрицательным последствиям. Оно приводит к угнетению пролиферации и увеличению частоты апоптоза лимфоцитов и макрофагов, а следовательно, развитию вторичных иммунодефицитов [186]. Например усиленный синтез NO в нейронах, вызванный ослаблением снижения этих клеток кислородом и питательными веществами при повреждении сосудов, NO может оказывать цитотоксическое действие и на соседние нейроны, что приводит к мозговому инсульту. Так же одним из нежелательных последствий накопления NO в организме является усиление эндогенного синтеза канцерогенных N-нитрозосоединений. При этом, как было сказано ранее, образованный под действием КО супероксид легко взаимодействует с NO с образованием ONOO^- , оказывая важную роль в патогенезе различных заболеваний, являясь медиаторами воспаления, модифицируя белки и повреждая нуклеиновые кислоты, а так же инициировать развитие канцерогенеза и препятствовать гибели раковых клеток по механизму апоптоза [113]. Кроме того,

сам NO является свободным радикалом, и при неблагоприятных условиях метаболизма способен вызвать нитрозилирующий стресс. Таким образом, NO может оказывать как положительное, т.е. регуляторное действие, так и отрицательное приводящее к различным возрастным патологиям, включая рак [187].

Было установлено повышение активности NOS при различных формах рака [188]. Опухолевая ткань способна контролировать уровень NO продуцируемый iNOS при помощи гена супрессора опухоли p53, проявляющего чувствительность по отношению к уровню NO, запуская механизм ингибирования iNOS по типу обратной связи, при избытке NO, тем самым защищая себя от его цитотоксического действия [189].

Эффекты NO в биологии опухоли достаточно широкие, однако некоторые исследования показали, что NO может оказывать двойной эффект при раке. При определенных концентрациях, он способствует росту опухоли и пролиферации, а так же модулирует различные связанные с раком процессы, в том числе ангиогенез, апоптоз, клеточный цикл, инвазию и метастазирование [187]. Было установлено, что при раке NO оказывает генотоксический механизм, который способствует образованию токсичных и мутагенных разновидностей ДНК, модифицируя ДНК, окисляя и дезаминируя нуклеиновые кислоты, а так же ингибирует репарационную систему контроля [190]. При этом NO способен оказывать антиапоптогенный эффект, вызывая мутаций в p53, которые могут способствовать потере его репрессорной деятельности и подавлять активность каспаз, тем самым блокируя апоптоз [191.]. Другие антиапоптотические эффекты NO направлены на увеличение экспрессии белка регулятора апоптоза Bcl-2, тем самым регулируя проницаемость митохондриальной мембраны, ингибируя высвобождения цитохрома-С, осуществляя связывания фактора, активирующего апоптоз [192], индукцию белков теплового шока, супрессию генерации церамидов и активацию циклооксигеназы-2 [193]. Установлено, что NO способствует усилению регуляции матриксных металлопротеиназ 2 и 9 играющих значительную роль в ремоделировании тканей, ангиогенезе, пролиферации,

миграции и дифференцировки клеток, при этом способствует подавлению тканевых ингибиторов металлопротеиназ 2 и 3, тем самым оказывая прямое влияние на рост и распространении опухоли [194].

Однако в других исследованиях был показан его противоопухолевый эффект [195], но из-за недостатка данных, пока он считается не до конца изученным, однако применение NO интенсивно исследуется в терапевтических целях в онкотерапии. Было показано применение NO в комбинации с другими цитотоксическими агентами при раке [196]. Установлено, что NO способен оказывать цитостатическое и цитотоксическое действие на опухолевые клетки, а применение препаратов доноров NO, было предложено для подавления метастазирования [169]. Обнаружено, что NO ингибирует эпителиально-мезенхимальный перехода и меняет как мезенхимальный фенотип, так и инвазивные свойства метастатических клеток предстательной железы [197]. Позже, другие авторы обнародовали предположение, что доноры NO не могут выступать потенциальными терапевтическими агентами в торможения ЭМП и метастазировании опухолевых клеток [198]. Было установлено, что в одних типах клеток и условиях NO способен ингибировать пролиферацию клеток, а в других, наоборот оказывать стимулирующее действие на пролиферативные процессы. Таким образом, влияние NO на клеточную пролиферацию наглядно демонстрирует эффект бимодальности: в некоторых случаях NO ингибирует клеточную пролиферацию и индуцирует старение, в других - наоборот оказывает обратный эффект [199]. Обнаружено, что при раке желудка NO ингибирует рост раковых клеток путем блокирования клеточного цикла в фазе G0/G1, однако оказывает активирующее действие на каскад семейства белков MAP-киназ, таким образом, принимая участие в других физиологических явлениях, таких как выживание и дифференцировка клеток [200]. В опухолевых клетках больных раком желудка было продемонстрировано, что угнетение синтеза NO у трансформированных клеточных линий, преимущественно подавляет рост раковых клеток путем индукции апоптоза и вызывает различные изменения, что может отражать потенциальные противовоспалительные эффекты [201].

Одновременно другие авторы, исследуя влияние NO на опухолевую прогрессию при аденокарциноме желудка предложили в качестве подавления опухолевого роста блокировать синтез NO, за счет ингибирования iNOS [202].

Несмотря на то, что противоопухолевая роль NO была рассмотрена в большинстве лабораторных экспериментов [203], все же эти выводы не до конца получили своего практического применения у больных раком. Было высказано предположение, что применение доноров NO, для увеличения его концентрации в других солидных опухолях не является достаточным, чтобы произвести апоптоз и другой противоопухолевый эффект [204] а, скорее всего, способствуют снижению ангиогенеза, гипоксии и распространения опухоли [205]. При этом другие авторы утверждают о рациональном использовании донаторов NO совместно с химиотерапией при лечении рака [187; 206].

Было установлено повышение уровня NO_x в сыворотке крови больных раком молочной железы, а так же в опухолевой ткани молочной железы по сравнению с доброкачественной и отдаленной нетрансформированной тканью [207]. Другими учеными было показано, что повышение уровня NO_x в опухолевой ткани коррелирует с плохой выживаемостью пациентов [208]. Важная роль NO_x в инициации и прогрессировании опухоли была обнаружена при раке желудка. Установлено, что NO генерируемый NOS способен также деаминировать ДНК, вызывать мутации генов-супрессоров опухолей, и, возможно, других онкогенов, таких как c-Met, иницируя генетические изменения желудочного клеток, приводящих к злокачественной опухоли желудка [190]. В желудочно-кишечном тракте было обнаружено присутствие источников NO всех трех форм NOS [209]. В опухолевой ткани было установлено наличие всех 3х изоформ NOS, однако наиболее высокая экспрессия наблюдалась для iNOS, которая отвечает за генерацию высокого уровня NO. Это имеет глубокие последствия для этиологии и злокачественной прогрессии первичного рака и метастазирования [210]. Это также указывает, на расширение сосудистой сети опухоли, способствуя поддержанию аномально высокого темпа роста, характерного для злокачественного заболевания. Установлено повышение уровня NO под

действием *H.pylori*, а так же увеличение экспрессии iNOS и eNOS при колоректальном раке [211] и повышение уровня NO при раке толстой кишки [175]. При язвенной болезни 12 перстной кишки было обнаружено повышение уровня NO, и снижение после терапии, что способствовало лучшему заживлению ран [212].

Таким образом, на сегодняшний день имеется достаточно большое количество сведений об источниках, путях поступления и преобразования оксида азота в биологических системах. Однако не все механизмы цикла оксида азота, его биологические эффекты, ингибирующее или стимулирующее действие на процесс рака и влияние на процессы старения, до сих пор остаются, изучены и осмыслены не в полной мере, что требует проведения дальнейших исследований в этой сфере [164]. Так как влияние NO на пролиферативную активность и опухолевую прогрессию изначально зависит не только от концентрации NO, а также от других важных факторов, таких как: способность клеток к воздействию NO, состоянию окислительно-восстановительного потенциала, конечной внутриклеточной концентрации NO, текущего состояния клеточного цикла, продолжительности воздействия в опухоли, типа рака и стадии, микросреды опухоли, возраста обследуемых [213]. Кроме того, исследования, изучающие влияние NO на опухолевую трансформацию клетки и метаболизм в ней показывают, что решающее значение имеет состояние окислительно-восстановительного баланса в опухоли. Что в свою очередь зависит от относительной численности окислителей, то есть содержания АФК и сокращением восстановительных агентов, особенно GSH звена защиты [214]. Это в свою очередь может значительно повлиять на цитопротекторные/цитотоксические эффекты NO [173].

1.4. Окислительная модификация белков, как маркер окислительного стресса

Биологического старения является фундаментальным процессом, который является основным фактор риска в отношении развития нейродегенеративных, сердечно-сосудистых заболеваний и рака. Поэтому, очевидно, что молекулярные механизмы старения являются основополагающими для понимания многих патологических процессов. В связи с этим, окисление и нитрование внутриклеточных белков, а так же образование белковых агрегатов были взяты за основу потери клеточной функции и снижения способности стареющих животных выдерживать физиологические стрессы [215]. Возрастные увеличение скорости генерации АФК, деградации клеточных структур и снижение механизмов клеточной регенерации способствует увеличению окислительной нагрузки на клетки, приводят к соответствующему увеличению концентраций окисленных белков с последующей их модификацией [216]. Накопление окисленных белков является отличительной чертой старения и ряда заболеваний ассоциированных со старением [217].

Белки могут улавливать до 75% СР соединений и являться высокоселективными маркерами окислительного повреждения в тканях [218; 219]. Имеются работы, подтверждающие, что при определенных патологических состояниях именно белки, за счет особенности своего строения, а не липиды и нуклеиновые кислоты, выступают как эффективные ловушки АФК, и их окислительная модификация рассматривается как один из ранних и надежных маркеров ОС [220; 221]. Таким образом, внутриклеточный уровень окисленного белка так же отражает баланс между скоростью окисления белка и скоростью его деградации. Этот баланс, с одной стороны, является комплексной функцией множества факторов, которые ведут к генерации АФК, поскольку любая форма АФК способна вызывать модификации белков. С другой стороны, функцией многочисленных условий, которые определяют концентрации и/или активности протеаз, расщепляющих окислено-модифицированные белки [216].

Еще в 80-х годах появились первые сообщения о роли ОМБ при различных физиологических нарушениях в тканях, с которыми связаны процессы старения организма [222]. Затем это нашло подтверждение в дальнейших многочисленных

исследованиях, в которых было показано, что продукты окисления белков при окислительных повреждениях в тканях появляются раньше, и они более стабильны по сравнению с перекисным окислением липидов [223; 224].

Определение продуктов ОМБ считается одним из ранних и надежных индикаторов поражений тканей при СР патологии, проявляющееся в повышении карбонильных производных белков, а именно уровня 2,4-динитрофенилгидразонов [224; 225]. Считается, что ОМБ играет ключевую роль в молекулярных механизмах ОС и может являться пусковым механизмом окислительной деструкции других молекул (липидов, нуклеиновых кислот) клетки. Помимо белковых остовов окислению подвергаются так же и аминокислоты боковых цепей. Особенно чувствительны к окислению, практически всеми формами АФК при старении и различных заболеваниях, цистеиновые и метиониновые остатки [226; 216].

Белки плазмы, подвергшиеся окислительной модификации, имеют довольно большой период полураспада, таким образом, повышение 2,4-динитрофенилгидразонов при ОМБ является наиболее перспективным маркером интенсивности СР процессов при старении, а так же сопутствующих этому процессу заболеваний [227], отражая соотношение между про- и антиоксидантными процессами при действии на организм экстремальных факторов физической, химической и биологической природы, а так же при развитии заболеваний различной этиологии, в том числе, и на их субклинической стадии [228]. При этом повышение уровня 2,4-динитрофенилгидразонов признано в качестве маркеров окислительного повреждения белков, интенсивности ОС и воспаления. Физиологически, продукты ОМБ формируются в течение всей жизни в небольших количествах, и увеличиваются с возрастом [229]. Значительно более высокие концентрации 2,4-динитрофенилгидразонов наблюдаются при многих злокачественных новообразованиях, что позволяет использовать их определение в качестве маркера для диагностики и мониторинга состояния ОС [230].

Известно, что внутриклеточный уровень окисленных белков способен отражать соотношение (баланс) между ПОС и АОС, скоростью окисления белков и скоростью их деградации. Эти соотношения являются функцией многочисленных факторов, в том числе генетических, экологических, диетических и т.д., которые способствуют генерации АФК, а так же определяют уровень и активность соответствующих протеаз [224]. Установлено, что в условиях стресса у пожилых особей происходит снижение активностей ферментов АОЗ, на фоне усиление ОМБ [231]. Возрастное накопление окисленных белков может отражать возрастное увеличение скорости генерации АФК, а так же снижение АОЗ, или потерю способности биологических систем разлагать окисленные белки [232]. Возрастной дефицит митохондриальных ферментов АОЗ способствует увеличению содержания 2,4-динитрофенилгидразонов в клетке, усиливая состояние ОС [233].

Так же показано, что процессы старения и канцерогенеза связаны с накоплением неактивных или менее активных форм многочисленных ферментов, под действием 2,4-динитрофенилгидразонов, за счет изменения их каталитической активности, термостабильности и протеолитической восприимчивости. В опытах на животных было обнаружено, что старые животные более восприимчивы к белковым модификациям при ОС, нежели молодые. Обнаружено возрастное увеличение содержания продуктов ОМБ в головном мозге человека, хрусталике глаза, гепатоцитах и эритроцитах [234]. Таким образом, ОМБ является клинически важным звеном в патогенезе заболевания, развивающихся на фоне различных нарушений при старении.

Окислительное повреждение белков играет важную роль в этиологии онкозаболеваний [234]. Повышенный окислительный статус наблюдается во многих типах раковых клеток, частично благодаря их высокой скорости обмена веществ. Многие опухолевые клетки обладают более сильными механизмами АОЗ, для подавления высокого уровня АФК, тем самым сохраняя свой окислительно-восстановительный статус, а так же угнетая апоптоз [235]. Известно, что способность белков к модификации, в свою очередь, зависит от

концентрации ферментативных и неферментативных антиоксидантов, при этом продукты ОМБ сами могут выступать в качестве регуляторов АОС.

Обнаружено, что ОМБ принимает участие в активации ряда генов, содержащих антиоксидант-респонсивные элементы. Например, продукты ОМБ способны стимулировать активацию Nrf2 (NF-E2-related factor2 - основной транскрипционный фактор, вовлеченный в регуляцию генов, содержащих антиоксидант-респонсивные элементы, активируется в ответ на окислительный стресс), активируя экспрессию генов, содержащих антиоксидант-респонсивные элементы, что в результате повышает АОЗ [236]. Таким образом, повышение уровня продуктов ОМБ, некоторые авторы рассматривают как защитный механизм при заболеваниях сопутствующих старению, а так же при раке [237; 238]. В опытах на лабораторных мышах было установлено, что нарушение функций Nrf2 приводит к подавлению экспрессии ферментов АОС в печени и кишечнике, таких как глутатионтрансфераза и ГПО. С другой стороны, особи с дефицитом Nrf2 при химически вызванном канцерогенезе оказались более чувствительны к токсичности, формированию ДНК аддуктов и развитию рака [239]. Установлено повышение продуктов ОМБ под воздействием высоких концентраций NO и H₂O₂ в слизистой оболочке кишечника [240]. При ишемии с последующей реперфузией, наблюдается усиление ОМБ, способствуя снижению активности СОД [241]. Так же обнаружено, что H₂O₂ и металлы с переменной валентностью выступают индукторами ОМБ [242].

Однако имеются данные, о том, что образование продуктов ОМБ может происходить и в отсутствие избыточной генерации АФК, снижения АОЗ и уменьшения протеазной активности. Причем этот путь модификации строго связан с продукцией гибридных белков, образующихся при нарушении трансляции, дефиците шаперонов, действии стресс-факторов, температуры и денатурирующих агентов. Поэтому стимуляция окисления данных белков с нарушенным фолдингом необходима для их деградации. По этому сценарию ОМБ можно рассматривать как один из способов контроля качества фолдинга белков [243].

Есть данные, что стимуляция ОМБ приводит к нарушению работы многих ключевых протеасом, таких как аннексин 1, выступающего промотором апоптоза и ингибитором клеточного роста, тем самым обеспечивая защиту опухолевым клеткам, их рост и выживание [244; 245].

Еще одним примером является влияние продуктов ОМБ на активацию NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) - универсального фактора транскрипции, контролирующего экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла. Так как одним из важных свойств NF- κ B является его способность защищать клетку от апоптоза, гены его субъединиц относят к протоонкогенам. В норме активность сигнального пути NF- κ B в клетке находится под строгим контролем, однако мутации различных генов могут стать причиной его конститутивной активации. Это имеет место при лимфомах разного происхождения, множественной миеломе и других видах рака [246]. При раке легких, на поздних стадиях было обнаружено повышение уровня продуктов ОМБ, что способствовало активации белков тиоредоксинов (TXN) [247]. TXN является мощным фактором выживания и роста клетки, участвуя в активации специфических транскрипционных факторов, таких как NF- κ B, p53, HIF- α , и других. Так же TXN принимает участие в защите клетки от ОС [248]. Его экспрессия возрастает в нескольких типах опухолей [249; 250], и это, как правило, связано с агрессивностью опухоли и ингибирование иммунной системы. TXN были также оценены в качестве биомаркера и терапевтической мишени при раке [251], известно, что повышение уровня TXN в ткани опухоли может оказывать потенциальное сопротивление химиотерапии [252]. Обнаружено, что у пациентов с опухолями повышение уровня TXN1 было связано со снижением частоты их выживаемости [253].

Было предложено, использовать определение различных показателей ОМБ в плазме крови, в качестве диагностики для более полноценной характеристики состояния ОС в организме больных раком [254]. Так же обнаружено, что помимо ОС в организме онкобольных возникает еще и карбонильный стресс за счет усиления процессов ОМБ [159]. Повышенная концентрация

2,4-динитрофенилгидразонов в плазме крови отражает не только степень ОС, но и указывает на дисфункцию белков, вызванную развитием опухоли. ОМБ не только изменяет аминокислотные остатки, но и нарушает третичную структуру белков и даже вызывает агрегацию и денатурацию, в результате чего снижается или исчезает их функциональная активность, что коррелирует с распространенностью опухолевого процесса [255].

Показано, что при различных видах рака в эритроцитах усиливаются реакции ОМБ с последующим повышением окисленных продуктов и усиление ОС [256], причем более выраженное накопление продуктов ОМБ наблюдалось в эритроцитах больных на более поздних стадиях рака [254].

Повышенные уровни продуктов ОМБ также были найдены у раковых больных, где они коррелировали с маркерами ОС. Обнаружена прямая корреляция между повышением уровня продуктов ОМБ в плазме крови и риском возникновения различных форм рака: положительная динамика наблюдалась при раке молочной железы, ротовой полости, раке легких, мозга, щитовидной железы, злокачественной опухоли мягких тканей конечностей и саркоме костей, однако для ни одно из исследований не было перспективным при лимфоме, раке мочевого пузыря и раке предстательной железы [257-265].

Есть работы, где установлено, что ОМБ играет важную роль в процессе инициации, прогрессировании и молекулярном механизме опухолей желудочно-кишечного тракта. Установлено повышение продуктов ОМБ в плазме крови при РЖ [266] и у больных раком кишечника [267], где обнаружено, что концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов в плазме крови варьировала в различных пределах в зависимости от диагноза, однако для всех случаев значения показателей были почти на 100% выше группы контроля. При этом наиболее высокие уровни показателей ОМБ были обнаружены у больных раком прямой кишки, сигмовидной и поперечно-ободочной. Так же во всех случаях отмечалась четкая зависимость между стадией развития опухоли и уровнем показателей ОМБ, что свидетельствует о значительной эндогенной интоксикации организма и формировании мембранной патологии у онкобольных [268]. В исследованиях

других авторов наибольший уровень 2,4-динитрофенилгидразонов был обнаружен в плазме крови у онкобольных с III стадией заболевания и коррелировал со снижением уровня альбуминов, повышением мочевины, креатинина и СР активностью плазмы крови [269].

В относительно недавних исследованиях было показано, что повышении 2,4-динитрофенилгидразонов в плазме крови является потенциальным биомаркером для оценки ОС при РЖ и раке кишечника [270; 271]. При этом усиление ОМБ в плазме крови больных РЖ способствовало снижению АОЗ и повышению уровня 7,8-дигидро-8-оксо-дезоксигуанозина, еще одного чувствительного биомаркера повреждения ДНК, играющего решающую роль в мутагенезе.

Таким образом, ОМБ может выступать как обоюдоострый меч: с одной стороны оказывая пагубные последствия для выживания клеток, способствуя усилению ОС, с другой стороны может играть защитную роль для ткани опухоли, оказывая стимулирующее действие на белки регуляторы [270].

РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты исследований. Характеристика групп больных

Настоящее исследование проведено в плазме крови, эритроцитах, гомогенате тканей (опухолевой ткани и нетрансформированной смежной ткани слизистой желудка). Под нетрансформированной смежной тканью понимали – ткань края резекции, отдаленную от опухоли (min 30 мм от опухолевого инфильтрата) и не имеющей гистологических и морфологических признаков злокачественной трансформации. Материал для исследования был взят после радикальной операции.

Было обследовано 35 больных РЖ: 28 мужчин и 7 женщин с различной стадией заболевания (I-IV стадия). Гистологической формой РЖ являлась аденокарцинома. Возраст всех обследуемых был от 40 до 79 лет (средний возраст у больных РЖ составил 60 лет).

Все больные РЖ были обследованы в условиях 2-го (общехирургического) отделений Донецкого областного клинического территориального медицинского объединения, а так же Донецкого областного противоопухолевого центра. Отбирались больные с верифицированным диагнозом на основании анамнестических данных, физикального обследования, результатов эзофагогастродуоденоскопии с взятием биопсии, рентгенологического исследования. Распределение по возрасту больных РЖ и статистическая обработка данных распределения на нормальность представлена на рисунке (Рисунок 2.1.1).

Разделив больных РЖ по половой принадлежности на 2 группы (первая состояла 28 мужчин, а вторая - из 7 женщин), и проведя статистический анализ сравнения исследуемых показателей СРО, а так же ключевых ферментов ПОС и АОС, достоверных отличий между исследуемыми показателями обнаружено не было, ни для одного из показателей. Поэтому для проведения дальнейшего

анализа и исследования мы не считаем целесообразным делить группы по гендерному признаку.

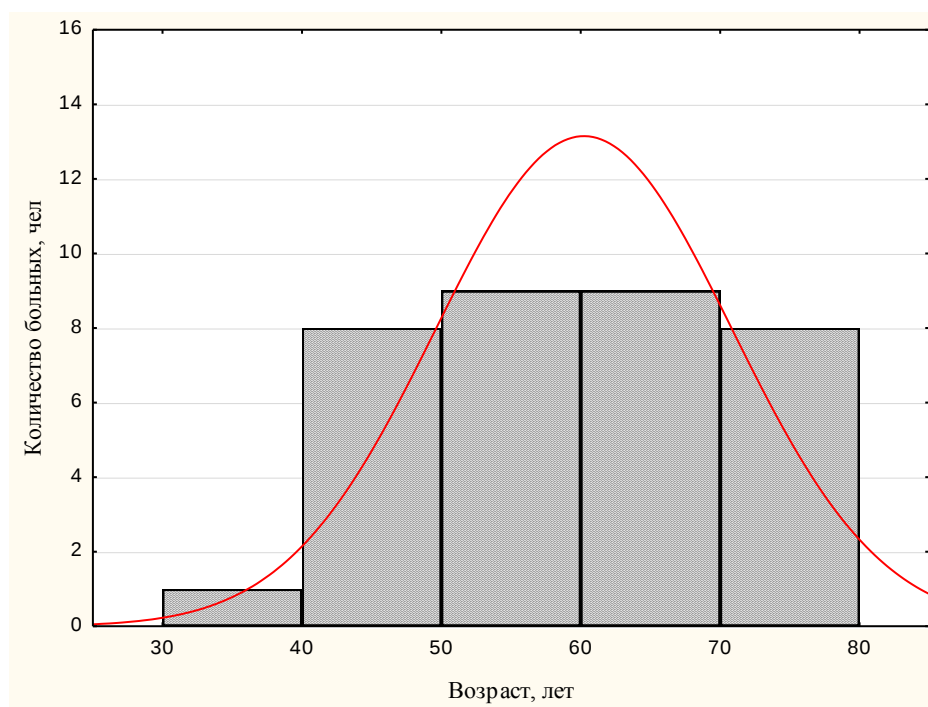


Рис. 2.1.1. Распределение больных РЖ по возрасту.

Группу контроля, для изученных показателей в плазме крови и эритроцитах, составили 80 здоровых добровольцев (52 мужчин и 28 женщин) в возрасте 40-79 лет (средний возраст 58 лет), не имеющие онкозаболеваний и тяжелых патологий желудочно-кишечного тракта, клиники кафедры общей хирургии №1 и 2-го общехирургического отделения Донецкого областного клинического территориального медицинского объединения, а так же хирургического отделения №1 КМУ «Клинической Рудничной больницы» города Макеевки. О состоянии здоровья испытуемых судили по анамнестическим данным, результатам предварительного медицинского осмотра и анализу историй болезней. Исключались из выборки так же те, кто имел в анамнезе инфаркты миокарда, инсульты и другие состояния декомпенсации физиологических систем.

Распределение по возрасту здоровых людей и статистическая обработка данных распределения на нормальность представлена на рисунке (Рисунок 2.1.2).

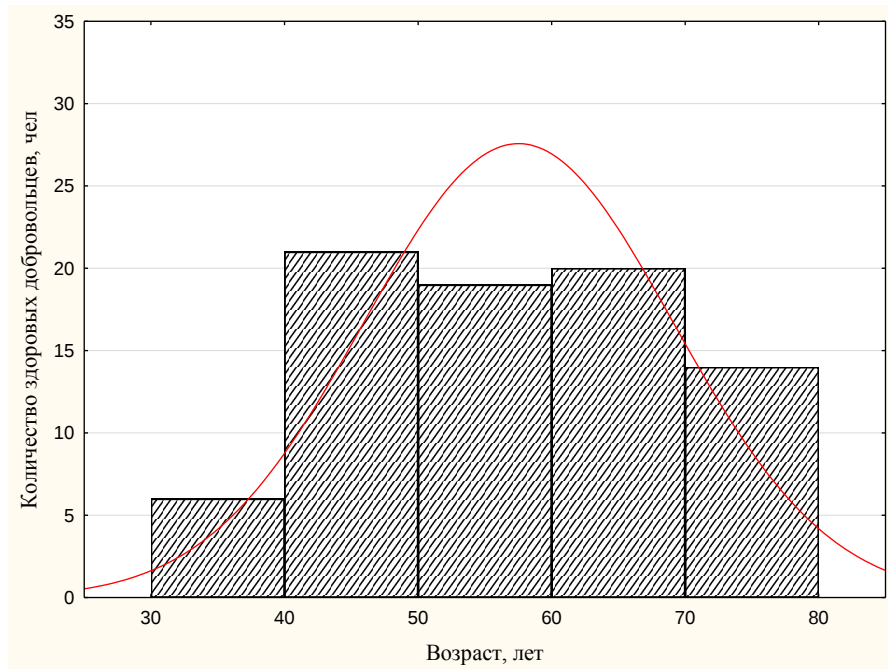


Рис. 2.1.2. Распределение группы контроля по возрасту

При проведении статистического анализа сравнения исследуемых показателей СРО, а так же ключевых ферментов ПОС и АОС, достоверных отличий по гендерному признаку, так же как и у онкобольных, нами обнаружено не было, ни для одного из показателей.

Изначально при формировании изучаемых групп (здоровых и больных РЖ) между пациентами был выбран возрастной интервал равный 10 годам. Таким образом, первую группу составили пациенты в возрасте 40-49 лет, вторую - 50-59 лет, третью - 60-69 лет и четвертую группу - 70-79 лет.

Проведя статистический анализ исследуемых показателей (в плазме крови, эритроцитах и гомогенате тканей – опухолевой и нетрансформированной слизистой) у больных РЖ в возрастных группах достоверных отличий между первой и второй группой установлено не было. Так же не обнаружено статистически значимых отличий между третьей и четвертой группами. Но при объединении 1 и 2 группы, а так же 3 и 4 группы, нами были установлены статистически значимые различия между исследуемыми показателями. Поэтому дальнейшее исследование у больных РЖ мы проводили в двух возрастных группах - 40-59 лет (1-я группа) и 60-79 лет (2-я группа). Следовательно, у

больных РЖ количество людей в 1-й группе составило 18 человек и во 2-й группе - 17 человек. Таким же образом было произведено разделение на группы и у здоровых добровольцев: 40-59 лет (1-я гр., 44 человека.) и 60-79 лет (2-я гр., 36 человек).

Для изучения показателей ПОС, АОС и СРО в зависимости от тяжести патологического процесса, все онкобольные были разделены на 2 группы с различной стадией рака: 1-я группа (с I-II стадией) у больных РЖ составили 16 человек, а 2-ю группу (с III-IV стадией) - 19 больных РЖ.

Все исследования проводились при согласии больных, отборы проб осуществлялись под непосредственным контролем лечащих врачей.

Объектами исследования были гомогенаты опухолевых и нетрансформированных тканей, гемолизат эритроцитов и плазма крови.

2.2. Методы биохимических исследований

Методика получение плазмы крови

Цельную кровь, набирают из локтевой вены в пробирку с 3,8% раствором цитрата натрия (соотношение кровь: цитрат равен 5:1), центрифугируют при 4000 об/мин. в течение 15 мин. Отбирают плазму. Микроскопически контролируют полноту осаждения клеток крови.

Методика получение гомогенатов тканей [272]

Образцы тканей массой 5 г тщательно промывали охлажденным физиологическим раствором, измельчали ножницами, гомогенизировали на льду в 0,25 М растворе сахарозы в 0,005 М трис-HCl-буфере (pH=8,1) и 0,15 М KCl в стеклянном гомогенизаторе. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 60 мин при 3000 об/мин (центрифуга ОПН-3, $g=1200$). К супернатанту добавляли раствор $(NH_4)_2SO_4$ до 40% насыщения, после чего центрифугировали в течение

60 мин при 3000 об/мин, к осадку добавляли 5 мМ трис-HCl буфер (pH=8,1), который содержал 0,001 М меркаптоэтанола.

Методика получения гемолиза эритроцитов [272; 273]

Цельную кровь 5 мл набирали из локтевой вены в пробирку, с 3,8% раствором цитрата натрия (соотношение кровь: цитрат равен 5:1), а затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин (центрифуга ОПН-3, $g=1200$). Отбирали надосадочную жидкость, эритроциты дважды отмывали физиологическим раствором: трижды 1,5 мл эритроцитов доводили до объема 4,5 мл физиологическим раствором и центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин (центрифуга ОПН-3, $g=1200$). Отмытые таким образом эритроциты гемолизировали дистиллированной водой в соотношении 1:150. В 1 мл такого гемолизата содержится 0,0066 млн. эритроцитов.

Пробы брали из плазмы крови, растворенного осадка тканевого гомогената, гемолизатов эритроцитов. В полученных пробах определяли исследуемые показатели.

Определение белка методом Лоури

Определение белка проводили в соответствии с методикой описанной Lowry O.H. [274]. Принцип метода: метод Lowry O.H. основан на измерении интенсивности окраски раствора, в котором осуществляется цветная реакция на белок (реакция Фолина) с тирозиновыми и цистеиновыми радикалами белковой молекулы, которая заключается в восстановлении фосфорно-молибденовой и фосфорно-вольфрамовой кислот (реактив Фолина-Чикольте) с образованием комплексного соединения синего цвета.

Реактивы:

1. 2% раствор карбоната натрия в 0,1 н. растворе гидроксида натрия.
2. 0,5% раствор медного купороса в 1% растворе тартрата калия или натрия.
3. Щелочной раствор меди: смешивают 50 мл реагента 1 и 1мл реагента 2 (годен в течение двух суток).

4. Реактив Фолина-Чикольте.

5. Физиологический раствор.

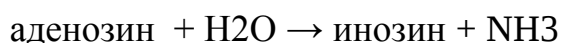
Ход работы:

В опытную пробирку наливали 0,98 мл физиологического раствора NaCl, 0,02 мл плазмы крови (разведенной в 10 раз) (гомогената тканей, гемолизита эритроцитов) и 2 мл раствора 3. Затем все перемешивали и инкубировали 10 минут в термостате при 37 °С. Параллельно готовили контрольную пробирку, которая содержала 1 мл физиологического раствора NaCl и 2 мл раствора 3. В обе пробирки после инкубации добавляли по 0,2 мл реактива Фолина-Чикольте, после чего перемешивали и инкубировали 30 минут при 37° С.

Все пробы тщательно перемешивают, избегая образования пены, а затем фотоэлектроколориметрируют при длине волны 670 нм в кювете толщиной 0,5 см. Содержание белка в пробе определяют по калибровочному графику.

Определение активности фермента метаболизма пуриновых нуклеотидов – аденозиндезаминазы (АДА) [275; 276; 277]

АДА (КФ 3.5.4.4) - ключевой катаболический фермент обмена аденозина (дезоксиаденозина), который катализирует его гидролитическое дезаминирование в инозин (дезоксиинозин) и аммиак.



Принцип метода: определение основано на изменении оптической плотности реакционной смеси при длине волны 265 нм, обусловленном накоплением продукта дезаминирования аденозина - инозина, которое регистрировали на спектрофотометре Specord-200 (водородная лампа).

Реактивы:

1) 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0;

2) $0,36 \times 10^{-4}$ М аденозина, растворенные в 0,1 М Na-фосфатном буфере.

Ход определения: инкубационная среда содержит следующие компоненты:

- | | |
|---|--------|
| 1. Аденозин, растворенный в Na-фосфатном буфере | 0,3 мл |
| 2. Na-фосфатный буфер | 2,7 мл |

Инкубационную среду прогревали в термостате, температура 37°. После чего добавляли плазму крови (гомогенат тканей, гемолизат эритроцитов, разведение в 10 раз или 50 - для эритроцитов) в количестве - 0,02 мл.

В кювету спектрофотометра (1 см) наливали инкубационную среду, состоящую из раствора аденозина и буфера, затем добавляли фермент. Измеряли исходную величину оптической плотности при длине волны 265 нм, используя раствор сравнений, который содержал аденозин, буфер и физиологический раствор NaCl. Затем инкубировали пробу при 37°C в течение 10 минут и измеряли второй раз оптическую плотность.

Активность АДА (в нмоль/(мин×мг)) рассчитывали по формуле:

$$A = \Delta D \times 109 / (C \times 1000 \times t \times E)$$

где ΔD – разница между оптической плотностью на 10 минуте измерения и на нулевой минуте измерения, при длине волны 265 нм;

C - концентрация белка, мг/мл (определяли методом Лоури, см. разд. 1.2.4), умножается на 1000 для перевода в мг/л;

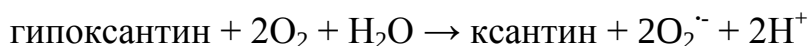
t - время инкубации (10 мин);

109 - коэффициент пересчета моль/(мин×мг) в нмоль/(мин×мг);

E - коэффициент молярной экстинкции (инозин = 12300 л/(моль×см)).

Методика определения активности ксантиноксидазы (КО) [278]

КО (КФ 1.17.3.2) - ключевой фермент катаболизма пуриновых нуклеотидов, катализирующий две последовательные и заключительные стадии: реакцию окисления гипоксантина в ксантин и далее в мочевую кислоту:



Принцип метода: определение активности КО основано, на способности фермента при преобразовании гипоксантина (ксантина) в мочевую кислоту генерировать $\text{O}_2^{\cdot-}$, о содержании которого можно судить по скорости восстановления нитросинего тетразолия в окрашенный продукт – формазан, имеющий максимум светопоглощения при длине волны 540 нм.

Реактивы:

1. 0,05 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,8 с 1 мМ ЭДТА: 6 г дигидрофосфата натрия (NaH_2PO_4) + 292 мг ЭДТА растворить в 500 мл дистиллированной воды и 0,1 М раствором гидроксида натрия (NaOH) довести рН до 7,8, после этого раствор разбавить водой до 1 л;

2. Субстратная смесь: 100 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера + 680 мкг (50 мкМ) гипоксантина + 460 мкг (15 мкМ) феназинметасульфата + 5,71 мг (420 мкМ) нитросинего тетразолия + 140 мг желатина. Субстратную смесь готовят перед исследованием, либо хранят в замороженном виде.

Ход определения: в кювету спектрофотометра (длина оптического пути 10 мм) наливают 3 мл субстратной смеси и прогревают в течение 5 минут при 37°C. Реакцию запускают добавлением 0,1 мл плазмы крови (гомогенат тканей, гемолизат эритроцитов, разведение в 10 раз или 50 - для эритроцитов). После чего регистрируют скорость роста оптической плотности пробы в течение 10 мин при длине волны 540 нм против инкубационной среды равного объема, куда вместо плазмы крови (гомогената тканей, гемолизата эритроцитов) добавляют дистиллированную воду.

Активность КО (в мкмоль/(мин×мг)) рассчитывали по формуле:

$$A = (\Delta E \times V_{p.c.} \times 106) \times r / (C \times V_{пр} \times 1 \times \varepsilon \times t)$$

где ΔE – разность экстинций проб до и после инкубации;

$V_{p.c.}$ – объем реакционной смеси (3,1 мл);

$V_{пр}$ – объем пробы (0,1 мл);

10^6 – коэффициент пересчета моль в мкмоль;

r – разведение (10 для плазмы крови, гомогената тканей и 50 – для гемолизата эритроцитов);

1 – длина оптического пути (1 см);

ε – молярный коэффициент светопоглощения формазана ($7200 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$)

t - время инкубации (10 мин);

C - концентрация белка, мг/мл (определяли методом Лоури, см. разд. 1.2.4).

Методика определения активности супероксиддисмутазы (СОД) [279]

Принцип метода: определение активности СОД (КФ 1.15.1.1) основан на способности фермента, тормозить автоокисление адреналина при рН 10,2. Экстинкция регистрируется при 480 нм. Ввиду нестабильности субстрата за 1 условную единицу активности фермента принимают такое количество СОД, которое необходимо для ингибирования начальной скорости автоокисления адреналина на 50 %.

Реактивы:

1. Этанол;
2. Хлороформ;
3. 5 мМ трис-буферный раствор, рН 7,4;
4. $2,25 \times 10^{-3}$ водный раствор адреналина, готовится в день опыта, перед постановкой реакции прогревают 1 час при 37°C;
5. 0,15 М раствор Na_2CO_3 , содержащий 3×10^{-4} М ЭДТА, рН 10,2;
6. 0,005 М раствор KH_2PO_4 (или K_2HPO_4) содержащий 1×10^{-5} М ЭДТА, рН 7,8.

Ход определения: для анализа отбирают 0,1 мл исследуемого материала (плазма крови, гемолизат эритроцитов, гомогенат тканей) и разводят 5 мМ трис-буферным раствором, рН 7,4 в соотношении 1:9. Из полученного гемолиза осаждают Нб путем добавления 0,25 мл этанола и 0,15 мл хлороформа. Смесь охлаждают до +4°C, затем тщательно перемешивают и центрифугируют при 3000 об./мин. в течение 15 мин. для удаления Нб и хлороформа. Прозрачный супернатант используют для определения активности СОД. Изменение активности СОД проводят в кювете вместимостью 3 мл на спектрофотометре при длине волны 480 нм.

Для измерения активности СОД, в кювету спектрофотометра вносят компоненты в следующей последовательности: 1) 1 мл 0,15 М раствор натрий-карбонатного буфера с добавлением 3×10^{-4} М ЭДТА, рН 10,2; 2) 0,5 мл супернатанта исследуемого материала (или воды, если измеряется контрольная

проба); 3) 0,7 мл 0,005 М раствор калий-фосфатного буфера с добавлением 1×10^{-5} М ЭДТА, pH 7,8; 4) 0,4 мл $2,25 \times 10^{-3}$ М водного раствора адреналина, pH 2,5.

Сначала записывают скорость свободного, не ингибированного автоокисления адреналина в адренохром (контрольная проба). Реакцию начинают добавлением адреналина и быстрым перемешиванием содержимого кюветы.

Затем определяют начальную скорость автоокисления адреналина в присутствии СОД исследуемых проб, при этом исследуемый супернатант плазмы крови (гемолизат, гомогенат) перед внесением в кювету необходимо разводить в 2,5 раза или 10 раз 0,005 М раствором калий-фосфатным буфером pH 7,8. Время реакции – 1 минута.

Активность СОД (в ед/мг белка) определяется по формуле:

$$(dEa/dE - 1) \times C / V \times a$$

dEa - скорость автоокисления контрольного раствора адреналина (контрольная проба);

dE - скорость окисления адреналина в присутствии СОД (опытная проба);

C - разведение ($N = 2,5$);

V - объем плазмы крови (гемолизата, гомогената) добавляемого в пробу;

a - объем плазмы в мл, или количество белка в пробе в мг (для гемолизата эритроцитов и гомогенатов тканей), определенное параллельно по методу Лоури, см. разд. 1.2.4).

Методика определения активности глутатионпероксидазы (ГПО) [280]

ГПО (КФ 1.11.1.9) катализирует реакции восстановления многочисленных субстратов (H_2O_2 , окисленных SH-групп белков) используя GSH.

Принцип метода: активность фермента оценивают по изменению содержания GSH до и после инкубации с модельным субстратом. Содержание GSH оценивают, определяя окрашенные в желтый цвет производные соединения GSH с ДТНБ (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота) - реактив Элмана).

Реактивы:

1. 0,1М трис-HCl буфер, pH 8,5 с 0,01% ЭДТА;

2. 20% раствор ТХУ;
3. 0,4% ДТНБ в метаноле, ex tempore;
4. Сложный буфер: 10 мл 0,1 М Трис-НСl буфер pH 8,5 с 0,01% ЭДТА + 7,8 мг азида натрия, и 10 мг GSH;
5. 0,14% гидроперекись третбутила (ГПТБ).

Ход определения: для каждой пробы берут 2 пробирки - опытную и контрольную. В обе пробирки добавляют по 0,73 мл сложного буфера и 0,2 мл материала исследуемой пробы, затем инкубируют 10 мин в термостате при 37°C.

Затем, в опытную пробирку добавляют 25 мкл 0,14% раствора ГПТБ и инкубируют 5 минут при 37°C. Реакцию останавливают добавлением 0,2 мл 20% раствора ТХУ. По 0,2 мл 20% раствора ТХУ также добавляют в контрольные пробирки, после чего также добавляют 25 мкл 0,14% ГПТБ.

Далее пробирки центрифугируют 7-10 мин при 1200 g. Отбирают по 0,1 мл супернатанта и переносят в пробирку, содержащую 2,8 мл 0,1 М трис-НСl буфера pH 8,5 и 25 мкл 0,4% ДТНБ в метаноле. Тщательно перемешивают и фотоколориметрируют исследовательскую пробу против контрольной при 412 нм.

Расчет активности осуществляют по формуле:

$$A = \Delta E \times V \times C \times 1000 / 13600 \times a \times t$$

13600 - коэффициент экстинкции для GS- ХДНБ (13600 М-1см-1)

A - активность фермента

ΔE - разница экстинкций между исследовательской и контрольной пробы;

V - объем реакционной смеси;

a - объем плазмы в мл или количество белка в пробе в мг (для гемолизата эритроцитов и гомогенатов тканей), определенное параллельно по методу Лоури, см. разд. 1.2.4).

t - время инкубации;

C - разведение материала пробы;

1000 - коэффициент пересчета активности ГПО в мкмоль;

Активность ГПО выражали в мкмоль/(мин×мл) (плазма крови) и мкмоль/(мин×мг) (гемолизат эритроцитов и гомогенат тканей).

Методика определения суммарного содержания нитратов/нитритов (NO_x) [281; 282]

Принцип метода: после добавления в разведенную плазму крови (гомогенат тканей, гемолизат эритроцитов) смеси сернистого магния с цинковой пылью происходит восстановление NO_3^- до NO_2^- . Реактив Грисса образует с NO_2^- окрашенный комплекс красно-розового цвета, содержание которого определяется фотометрически при длине волны 538 нм.

Реактивы:

1. Уксусная кислота (ледяная);
2. Сульфаниловая кислота;
3. Калий азотнокислый;
4. Цинковая пыль;
5. Марганец сернокислый.
6. N-нафтилэтилендиамин.

Приготовление рабочих растворов:

1. Реактив Грисса: перед проведением опыта смешивают в соотношении 1:1 растворы А и Б.

А) 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл 12 % растворе уксусной кислоты;

Б) 0,1 г N-нафтилэтилендиамина растворяют при нагревании в 20 мл дистиллированной воды, фильтруют и смешивают с 150 мл 12 % растворе уксусной кислоты.

2. Приготовление стандартного раствора нитрата калия (KNO_3):

Растворяют 1,630 г. KNO_3 , высушенного до постоянного веса при 105°C , в дистиллированной воде в мерной колбе объемом 1л и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. 1 мл этого раствора содержит 1 мг NO_3^- . Раствор можно хранить в холодильнике в течение 3 месяцев.

3. Приготовление рабочего раствора KNO_3 :

В мерную колбу объемом 100 мл переносят пипеткой 20 мл стандартного раствора KNO_3 и доводят объем раствора в колбе до метки дистиллированной

водой. 1 мл этого раствора содержит 0,2 мг NO_3^- . Раствор должен быть свежеприготовленным.

Ход определения: в пробирку наливают 1,5 мл предварительно разведенной, плазмы крови (гомогенат тканей, гемолизат эритроцитов) и добавляют 0,5 мл 10% уксусной кислоты, хорошо перемешивают и добавляют на кончике скальпеля (не более 30 мг) смесь цинковой пыли с сернокислым марганцем в соотношении 1:100. Встряхивают 30 секунд (до полного растворения смеси) и добавляют 0,25 мл реактива Грисса. Через 10 минут колориметрируют при длине волны 538 нм в кювете 10 мм против контрольной пробы (готовится параллельно с опытной пробой, но вместо всех компонентов исследуемый материал смешиваем с дистиллированной водой, что бы получился равный объем жидкости с опытной пробой).

Одновременно с проведением исследования, строится калибровочный график с использованием стандартного раствора KNO_3 . Для этого в 8 пробирок вносят рабочий раствор стандарта KNO_3 в количествах, указанных в таблице 1.

Таблица 1. Построение калибровочной кривой

№ пробирок	1	2	3	4	5	6	7	8
Количество раствора, мл	0,0	0,2	0,3	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0
Содержание NO_3^- , мг	0,00	0,04	0,06	0,10	0,20	0,30	0,40	0,60

Объем в пробирках доводят до 6 мл дистиллированной водой, добавляют в каждую пробирку по 2 мл 5% уксусной кислоты, хорошо перемешивают и добавляют на кончике скальпеля (не более 30 мг) смесь цинковой пыли с сернокислым марганцем в соотношении 1:100. Встряхивают 30 секунд (до полного растворения смеси) и добавляют 1 мл реактива Грисса. Далее проводят все операции как описано для исследовательских пробирок.

Определяют оптическую плотность раствора в пробирках, и строят калибровочную кривую.

Расчет содержания NO_x производится по формуле с учетом разведения:

$$X = C \times A \times 1,6$$

X - суммарное содержание NO_x , в мкмоль/л;

C - концентрация NO_2^- , найденная по калибровочной кривой, мкмоль/л;

A - разведение материала пробы;

1,6 - коэффициент пересчета NO_2^- в NO_3^- .

Методика определения окислительной модификации белков (ОМБ) по уровню карбонильных производных с использованием 2,4-динитрофенилгидразина [283; 284]

Принцип метода: основан на реакции взаимодействия карбонильных производных окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрировались спектрофотометрически.

Реактивы:

1. 20 % раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ);
2. 0,01 М раствор 2,4-ДНФГ в 2 М HCl;
3. Раствор этанол - этилацетат (1:1);
4. 8 М раствор мочевины;
5. Фосфатный буфер 0,066 М (pH 7,4) (для приготовления буфера использовались: KH_2PO_4 ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$).

Для анализа берут 0,05 мл исследуемого материала (плазма крови, гомогенат тканей, гемолизат эритроцитов), предварительно разбавленного физиологическим раствором (для эритроцитов – дистиллированная вода) в соотношении 1:10 и добавляют 0,95 мл 0,066 М фосфатного буфера (pH 7,4), после чего инкубируют 15 минут при 37°C. Затем пробирку помещают на водяную баню и добавляют 1 мл 0,01 М раствор 2,4-ДНФГ растворенного в 2 М HCl (при этом в контрольную пробу вместо 0,01 М раствора 2,4-ДНФГ добавляют

2 М НСl). С помощью 1 мл 20% раствора ТХУ производили осаждение белков и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После инкубации пробы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут. Далее полученный осадок промывают 2 раза смесью этанол - этилацетат (1:1). При этом происходит экстракция липидов и 2,4-ДНФГ, который не прореагировал с карбонильными группами окисленных белков. Полученный осадок подсушивали на воздухе, а затем растворяли в 3 мл 8 М раствора мочевины. Для лучшего растворения осадка добавляли одну каплю 2 М НСl. Полученные в результате ОМБ карбонильные производные взаимодействовали с 2,4-ДНФГ с образованием КДНФГ и АДНФГ нейтрального (нейтр) и основного (основ) характера, которые регистрировали спектрофотометрически при разных длинах волн против контроля: 356 нм - КДНФГ(нейтр), 370 нм - АДНФГ(основ), 430 нм - КДНФГ(основ) и 530 нм - АДНФГ(нейтр).

Концентрация метаболитов ОМБ рассчитывается по формуле:

$$A = (D \times 106) / (E \times C)$$

A - концентрация метаболитов ОМБ мкмоль/мг;

D - оптическая плотность 2,4-динитрофенилгидразонов;

E - коэффициент молярной экстинкции 2,4-динитрофенилгидразонов, равный $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$;

C - концентрация белка в мг/мл (определенная по методу Лоури, разд.);

106 - коэффициент пересчета в мкмоль/мг.

2.3. Методы статистической обработки полученных результатов

Статистический анализ результатов проведен с использованием лицензионного пакета прикладных программ Statistica-10.0 (StatSoft). При анализе данных клинических исследований для оценки генеральной совокупности используются выборочные характеристики. Для представления данных в работе использовались общепринятые характеристики: объем выборки, среднее значение

или медиана, стандартная ошибка, стандартное отклонение. Для проведения корректного статистического анализа полученных результатов использовались как параметрические (в случае, если данные подчиняются нормальному закону распределения), так и непараметрические критерии сравнения (в случае, если данные не подчиняются нормальному закону распределения). Для проверки распределения на нормальность использовался критерий W Шапиро-Уилка, что позволяет корректно проводить проверку и при небольших объемах выборки [285; 286].

При проверке статистических гипотез выбор адекватного критерия сравнения проводился в соответствии с рекомендациями GCP, ICH "Статистические принципы клинических испытаний", критические значения рассчитывались на уровне значимости $p < 0,05$ [287]. В работе проводилось сравнение средних значений двух выборок. Для сравнения независимых выборок, в случае нормального закона распределения использовался критерий Стьюдента, в случае отличного от нормального закона распределения использовался W-критерий Уилкоксона.

Данные в таблицах, в рисунках и по тексту представлены в виде средних значений (M) и их стандартных отклонений (σ). Различия между частотами регистрации клинических признаков заболевания считали достоверными при $p < 0,05$ (двусторонний критерий). Для оценки статистической связи между метрическими показателями использовали процедуру парного корреляционного анализа Пирсона; для сопоставления непараметрических показателей – корреляционный анализ Спирмена [288].

РАЗДЕЛ 3. ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ СВЯЗАННЫЕ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИЕЙ

Материалом для решения задач настоящего раздела послужили образцы крови и тканей 35 пациентов, прооперированных по поводу аденокарциномы (28 мужчин и 7 женщин) в возрасте от 40 до 79 лет ($X = 60 \pm 5$). В качестве дополнительного контроля использовали образцы крови 80 здоровых добровольцев (52 мужчин и 28 женщин) в возрасте от 40 до 79 лет ($X = 58 \pm 5$). Всего обработано 115 проб плазмы крови, 115 гемолизатов эритроцитов, а так же 70 гомогенатов тканей (опухолевых и нетрансформированных смежных).

Для оценки ПОС были изучены активности ключевых ферментов катаболизма пуриновых нуклеотидов - АДА и КО, показателями ферментативной АОС послужили активности ферментов первой ее линии защиты от АФК – СОД и ГПО, в качестве неферментативных показателей ПОС, а так же конечных продуктов СРО исследовали уровень NO_x - стабильных метаболитов NO и содержание КДНФГ и АДНФГ нейтрального и основного характера, что считается одним из наиболее ранних и стабильных показателей поражения различных тканей организма при свободно-радикальной ОМБ.

3.1. Исследование катаболизма пуриновых нуклеотидов, для оценки прооксидантного статуса в плазме крови, эритроцитах и в гомогенатах тканей

У больных РЖ в плазме крови установлено статистически значимое повышение активностей ферментов катаболизма пуринов – АДА и КО по сравнению со здоровыми добровольцами: активность АДА выше в 2,6 раза ($p < 0,001$), а активность КО в 1,7 раза ($p < 0,001$) относительно контрольной группы (Таблица 3.1.1). Проведя корреляционный анализ на выявление связи между

ферментами пуринового обмена (АДА/КО) в плазме крови, нами была установлена взаимосвязь, как у больных РЖ, так и в группе контроля. Коэффициент корреляции для АДА/КО у онкобольных $r=0,50$ ($p<0,05$) и у здоровых $r=0,40$ ($p<0,05$).

Таблица 3.1.1. Активность ферментов катаболизма пуриновых нуклеотидов в плазме крови и в эритроцитах у здоровых людей и больных РЖ ($M\pm\sigma$)

Активность ферментов	Контроль (n=80)	РЖ (n=35)
Плазма крови		
АДА (нмоль/мин*мг)	2,45±0,54	6,47±1,77*
КО (мкмоль/мин*мг)	0,344±0,142	0,568±0,121*
Эритроциты		
АДА (нмоль/мин*мг)	11,3±1,88	6,61±1,75*
КО (мкмоль/мин*мг)	5,82±0,99	9,09±1,93*

Примечание: * - активность ферментов достоверно отличается от контроля, ($p<0,001$).

В эритроцитах крови больных РЖ установлены разнонаправленные изменения активностей ферментов пуринового обмена – снижение активности АДА в 1,7 раза ($p<0,001$) по сравнению с контрольной группой и повышение активности КО в 1,6 раза ($p<0,001$) соответственно. И что интересно, взаимосвязи между АДА/КО в эритроцитах онкобольных не установлено, тогда как у здоровых $r=0,30$ ($p<0,05$).

Так как основным поставщиком субстрата – ксантина (гипоксантина) для КО в эритроците считается распад адениловых нуклеотидов [289], происходящий в основном за счет катаболизма аденозина - АДА, активность которой ниже у онкобольных, чем у здоровых, а значит у больных РЖ в эритроцитах повышение активности КО, возможно связано с усиленным окислением других соединений,

реагирующих с ферментом, а так поступлением ксантина (гипоксантина) из внеклеточных сред в эритроцит при канцерогенезе [290-292].

При этом снижение активности АДА в эритроцитах приводит к внеклеточному накоплению аденозина, что является одним из первых шагов в защитном ауто- и паракринном каскадном сигнале, направленном на ограничение повреждения клеток в ответ на неблагоприятные условия, включая гипоксию или ишемию, и в первую очередь для стимуляции выработки NO при гипоксии [293]. Эритроциты являются переносчиками аденозина в ткани, значит, снижение АДА в эритроците выступает как приспособительный механизм сохранения аденозина при канцерогенезе, когда ухудшается оксигенация тканей, тем самым, по-видимому, вызывая программу, которая сдвигает клеточный фенотип к увеличению внутриклеточного аденозина.

Сравнив исследуемые показатели ферментативного звена ПОС в гомогенатах тканей - опухолевой и нетрансформированной СОЖ, обнаружили, что активность АДА в ткани опухоли была выше в 1,9 раза ($p < 0,001$) относительно нетрансформированной ткани, а активность КО - в 3,1 раза ($p < 0,001$) соответственно (Рисунок 3.1.1).

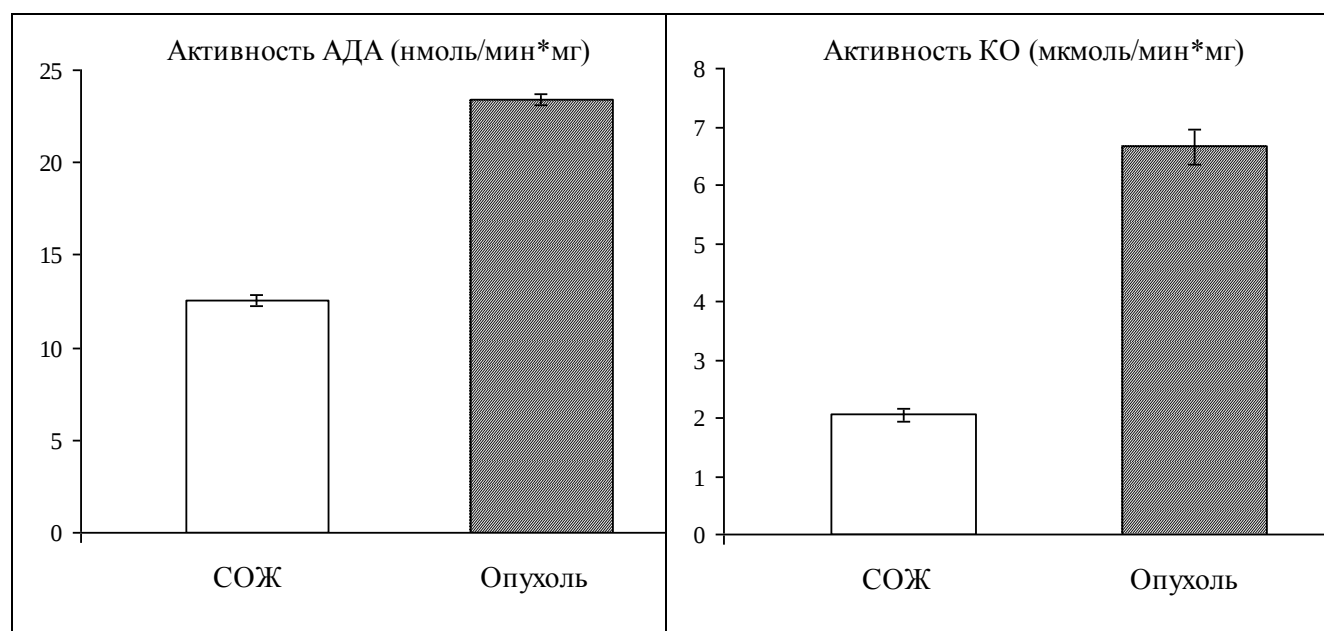


Рис. 3.1.1. Активность ферментов катаболизма пуриновых нуклеотидов в гомогенатах тканей больных РЖ, значения всех показателей достоверны при $p < 0,001$.

При проведении корреляционный анализа установили статистически значимые прямые взаимосвязи между АДА/КО в нетрансформированной ткани $r=0,41$ ($p<0,05$) и в ткани опухоли $r=0,50$ ($p<0,05$).

Существуют мнения, что изменения некоторых метаболитов в плазме крови, отражают их метаболизм в тканях [294], следовательно проведя корреляционный анализ на выявление взаимосвязи между ферментами пуринового обмена в плазме крови, эритроцитах и гомогенатах тканей (опухолевой и СОЖ) у больных РЖ установили связи между АДА в ткани опухоли и плазме крови $r=0,81$ ($p<0,001$), в ткани опухоли и эритроцитах $r=-0,67$ ($p<0,001$), ткани опухоли и СОЖ $r=0,69$, $p<0,001$, в плазме крови и эритроцитах $r=-0,70$ ($p<0,001$) (Рисунок 3.1.2). Для КО статистически значимых взаимосвязей не установлено.

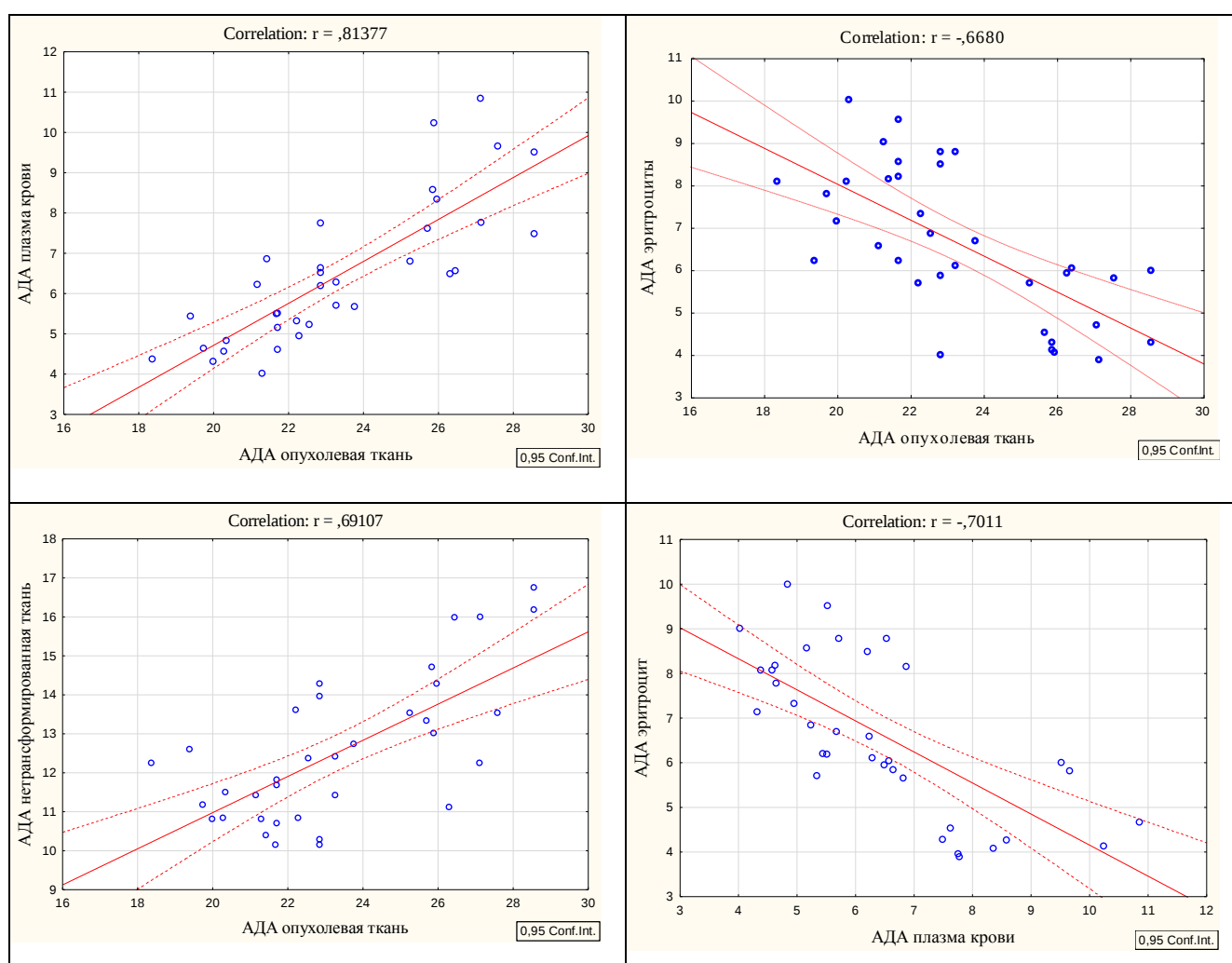


Рис. 3.1.2. Взаимозависимость активности АДА в ткани опухоли и плазме крови, в ткани опухоли и эритроцитах, ткани опухоли и нетрансформированной смежной, в плазме крови и эритроцитах у больных РЖ, значения всех коэффициентов корреляции статистически достоверны при $p < 0,001$.

Соответственно повышение активности АДА в плазме может выступать не только как маркер целостности клеточных мембран опухолевой ткани (тем более что в ткани опухоли АДА повышена по сравнению с нетрансформированными тканями), что согласуется с известными данными о повышении проницаемости клеточных мембран, причем в обе стороны, злокачественных клеток и выходу тканевых белков методом пиноцитоза, но и свидетельствует о системности процесса злокачественной трансформации.

3.2. Исследование антиоксидантной защиты в плазме крови, эритроцитах и в гомогенатах тканей

Изучив ферментативное звено АОЗ, установили, что в плазме крови больных РЖ активность СОД ниже в 1,4 раза ($p < 0,001$), по сравнению со здоровыми добровольцами, а ГПО в 1,2 раза выше ($p < 0,001$) соответственно (Таблица 3.2.1). При проведении корреляционного анализа на выявление связи между СОД/ГПО в плазме крови у больных РЖ такой взаимосвязи не установлено, тогда как у здоровых людей ферменты имеют прямую взаимосвязь $r = 0,69$ ($p < 0,001$).

В виду того, что активность СОД у онкобольных в плазме крови ниже, чем у людей не имеющих онкозаболеваний, соответственно у больных РЖ будет выше концентрация $O_2^{\cdot -}$, что подтверждают полученные нами данные о более высокой активности КО в плазме крови у онкобольных людей по сравнению со здоровыми добровольцами (см. подраздел 3.1), который используется для

образования ONOO^- , еще более сильного окислителя, в первую очередь приводя к окислительным модификациям плазменных протеинов [295].

Таблица 3.2.1. Активность ферментов АОЗ в плазме крови и в эритроцитах у здоровых людей и больных РЖ ($M \pm \sigma$)

Активность ферментов	Контроль (n=80)	РЖ (n=35)
Плазма крови		
СОД (ед/мг)	0,180±0,042	0,131±0,010*
ГПО (мкмоль/мин*мг)	6,76±0,66	7,81±0,71*
Эритроциты		
СОД (ед/мг)	8,57±1,48	8,94±2,82
ГПО (мкмоль/мин*мг)	404±50,4	209±45,2*

Примечание: * - активность ферментов достоверно отличается от контроля, ($p < 0,001$).

Механизм нейтрализации ONOO^- происходит частично за счет ГПО с использованием глутатиона, с последующим образованием GS^- , в результате чего тот из антиоксиданта становится прооксидантом [296; 114], еще больше усугубляя состояние ОС у онкобольных людей.

В эритроцитах крови больных РЖ активность СОД статистически значимо не отличалась от таковой в контрольной группе, тогда как ГПО была ниже в 1,9 раза ($p < 0,001$) соответственно. В эритроцитах, как и в плазме крови взаимосвязь между СОД/ГПО выявлена только у здоровых людей $r = 0,56$ ($p < 0,001$) (Рисунок 3.2.1).

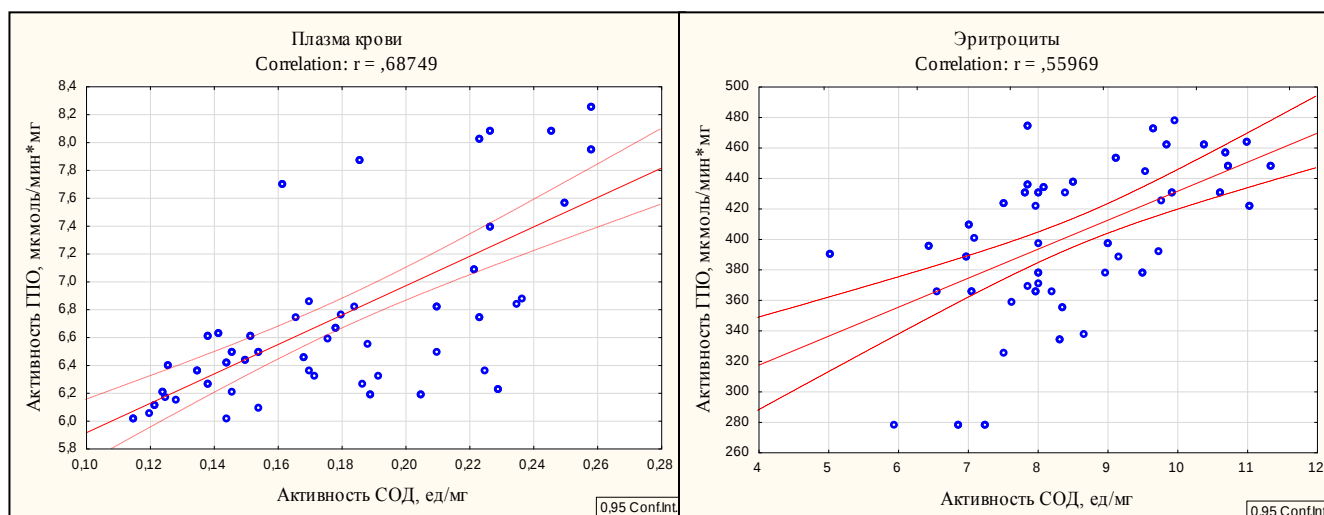


Рис. 3.2.1. Взаимозависимость активностей ферментов АОЗ (СОД и ГПО) в плазме крови и эритроцитах у здоровых людей, значения всех показателей достоверны при $p < 0,001$.

Проведя сравнение между нетрансформированной СОЖ и опухолевой тканью у больных РЖ, установили повышение СОД в 1,4 раза ($p < 0,001$) и снижение ГПО в 1,5 раза ($p < 0,001$) в опухолевой ткани относительно нетрансформированной (Рисунок 3.2.2).

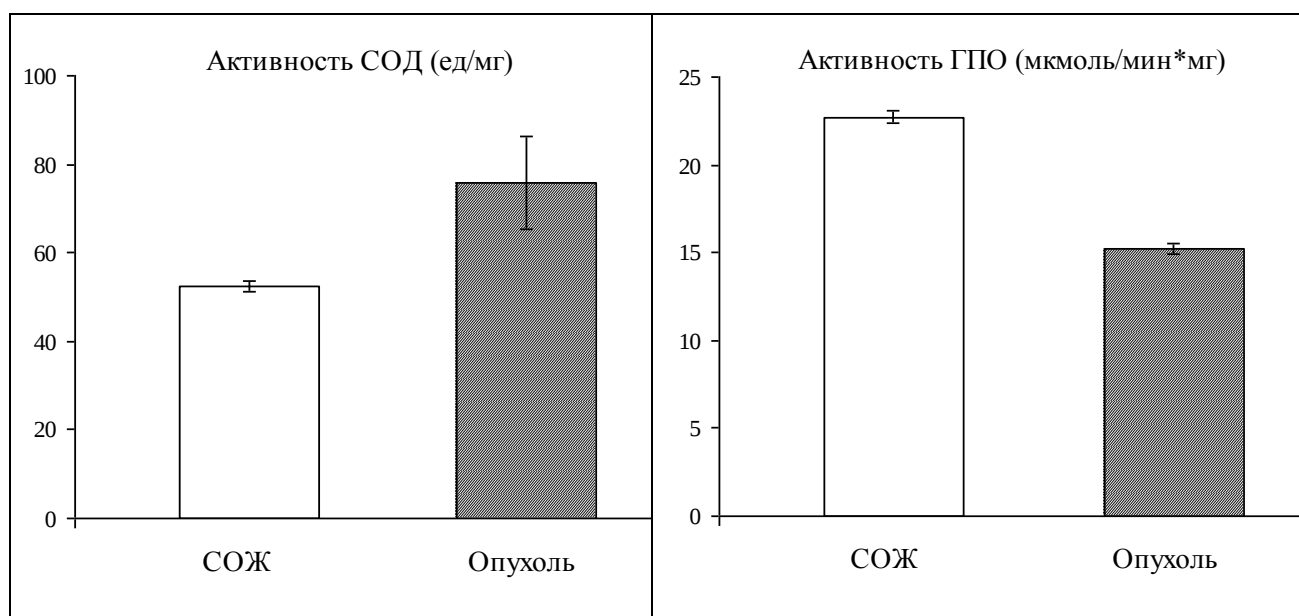


Рис. 3.2.2. Активность ферментов АОЗ в гомогенатах тканей больных РЖ, значения всех показателей достоверны при $p < 0,001$.

Так как СОД более устойчива к окислительному повреждению, в отличие от ГПО [297; 127], активность которой снижается в эритроцитах у онкобольных людей относительно здоровых, в виду того, что в эритроцитах больных РЖ происходит усиленная генерация $O_2^{\cdot -}$ за счет КО одновременно с повышением уровня NO с образованием $ONOO^-$ [298] - еще более агрессивного окислителя, способного необратимо повреждать мембрану эритроцитов, приводя к их деструкции [113; 299]. Соответственно, повышение активности СОД будет выступать в качестве поглотителя $O_2^{\cdot -}$ для нейтрализации образования $ONOO^-$ [300; 301]. Однако в виду снижения активности ГПО, не будет происходить нейтрализация H_2O_2 , который является ингибитором для СОД [127; 301]. Следовательно, СОД в эритроцитах онкобольных людей, возможно, контролирует содержание различных АФК в зависимости от их назначений и состояния ОС, выполняя не только защитную функцию, но и регуляторную, выступая ключевым звеном системы патогенетической регуляции клеточной концентрации $O_2^{\cdot -}$, нарабатываемого при канцерогенезе.

Следовательно, при РЖ акцент в антирадикальной защите смещен на СОД, а не на ГПО, причем дисрегуляция ферментативного звена АОЗ выступает как патогенетическое звено прогрессии опухолевого роста, приводя к накоплению H_2O_2 в опухолевой ткани. Причем проведя корреляционный анализа на выявление связи между ферментами АОЗ, установили тесную обратную взаимосвязь между СОД/ГПО только в опухолевой ткани $r=-0,89$ ($p<0,001$), в нетрансформированной ткани корреляции не выявлено.

Следовательно, у больных РЖ во всех изученных образцах, между ферментами первой линии АОЗ обнаружен дисбаланс в работе ключевых ее ферментов.

Исследовав связь между показателями АОС в плазме крови, эритроцитах и гомогенатах тканей (опухолевой и нетрансформированной) у больных РЖ обнаружены прямые взаимосвязи между СОД в ткани опухоли и эритроцитах $r=0,76$ ($p<0,001$), в ткани опухоли и нетрансформированной $r=0,41$ ($p<0,05$), а так же между ГПО в ткани опухоли и эритроцитах $r=0,70$ ($p<0,001$) и в ткани опухоли

и нетрансформированной $r=0,86$ ($p<0,001$), что свидетельствует о системном влиянии АОЗ у больных РЖ.

3.3. Исследование неферментативных показателей свободно-радикального окисления в плазме крови, эритроцитах и гомогенатах тканей

Исследовав неферментативные показатели СРО в плазме крови у больных РЖ установили достоверное повышение уровня NO_x в 2,1 раза ($p<0,001$) и содержания всех 2,4-динитрофенилгидразонов: КДНФГ(нейтр) в 2,1 раза, АДНФГ(нейтр) - в 2,4 раза, КДНФГ(основ) - в 2,9 раза и АДНФГ(основ) - в 2,1 раза ($p<0,001$ для всех), относительно здоровых добровольцев (Рисунок 3.3.1).

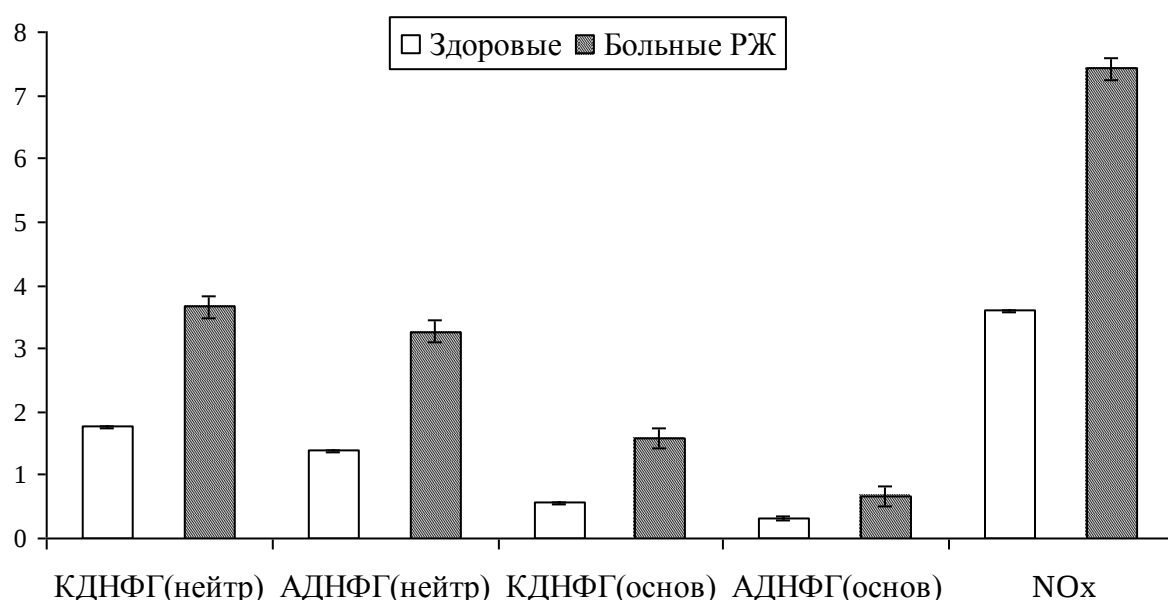


Рис. 3.3.1. Неферментативные показатели СРО в плазме крови здоровых добровольцев и больных РЖ, значения всех показателей достоверны при $p<0,001$.

Схожая динамика изменений показателей СРО обнаружена и в эритроцитах больных РЖ в сравнении со здоровыми людьми: содержание NO_x выше в 2,7 раза ($p<0,001$), а концентрация всех 2,4-динитрофенилгидразонов выше в 1,2 раза ($p<0,001$) соответственно (Рисунок 3.3.2).

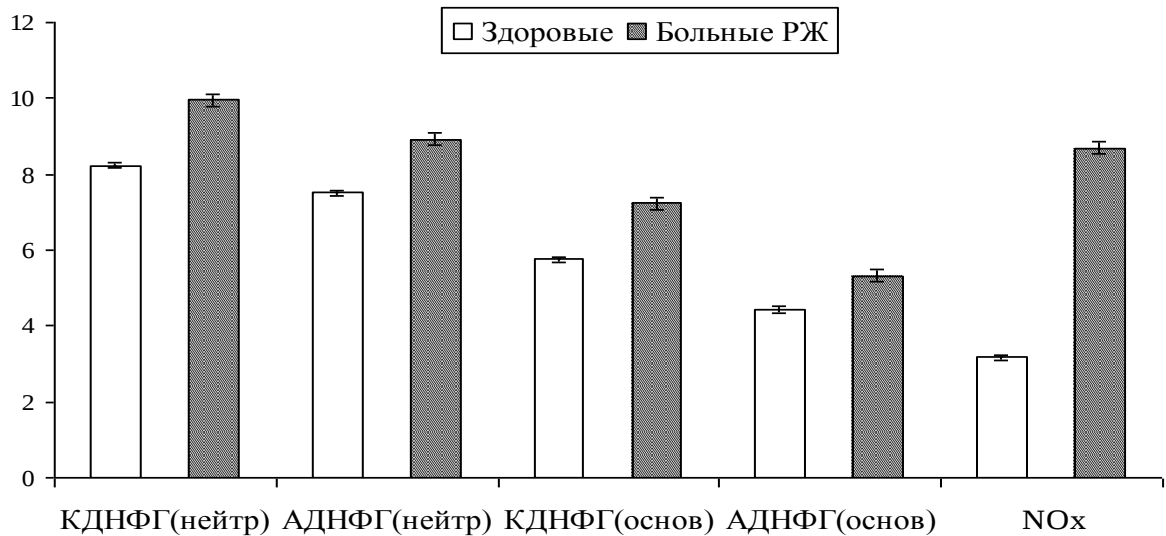


Рис. 3.3.2. Неферментативные показатели СРО в эритроцитах здоровых добровольцев и больных РЖ, значения всех показателей достоверны при $p < 0,001$.

Проведя сравнение между опухолевыми тканями и нетрансформированными смежными у больных РЖ, установили, что в опухолевых тканях концентрация NO_x выше в 1,7 раз ($p < 0,001$) и 2,4-динитрофенилгидразонов в 1,5 раз для КДНФГ(нейтр), в 1,3 раза для АДНФГ(нейтр), в 1,7 раз для КДНФГ(основ) и в 1,6 раз для АДНФГ(основ) ($p < 0,001$ для всех) по сравнению с тканями СОЖ (Рисунок 3.3.3).

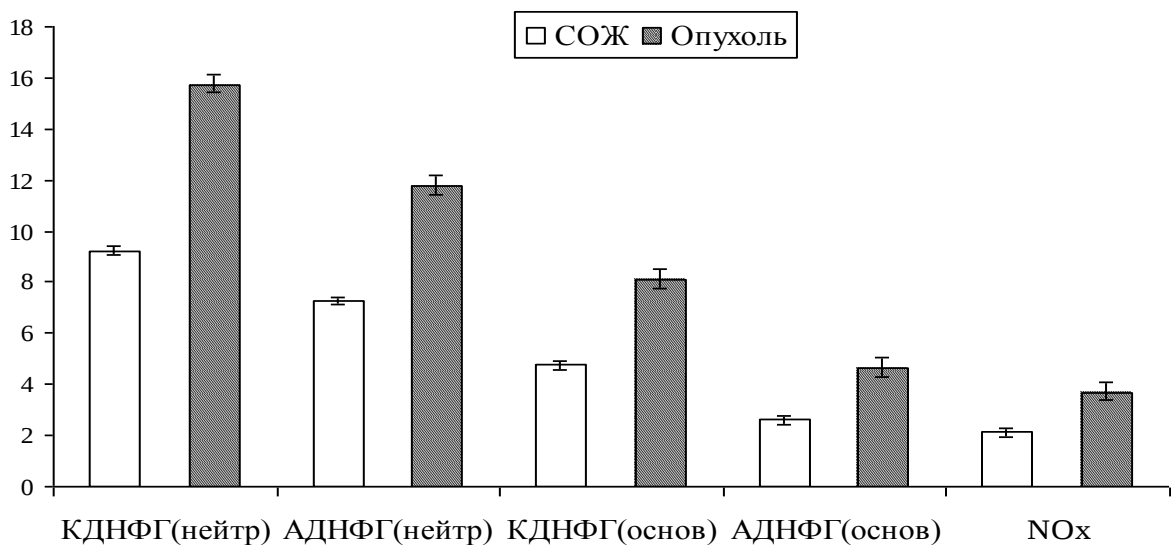


Рис. 3.3.3. Неферментативные показатели СРО в гомогенатах тканей у больных РЖ, значения всех показателей достоверны при $p < 0,001$.

Проведя корреляционный анализ на выявление взаимосвязи между ферментативными показателями СРО в плазме крови, эритроцитах и гомогенатах тканей (опухолевой и нетрансформированной) у больных РЖ, обнаружили следующие связи: между NO_x в ткани опухоли и эритроцитах $r=0,59$ ($p<0,001$), в ткани опухоли и нетрансформированной $r=0,60$ ($p<0,001$), а так же между продуктами ОМБ в плазме и эритроцитах, в ткани опухоли и эритроцитах, в ткани опухоли и нетрансформированной слизистой (Таблица 3.3.1).

Таблица 3.3.1. Взаимозависимость 2,4-динитрофенилгидразонов в плазме и эритроцитах, в ткани опухоли и эритроцитах, в ткани опухоли и нетрансформированной слизистой у больных РЖ.

	КДНФГ (нейтр)	АДНФГ (нейтр)	КДНФГ (основ)	АДНФГ (основ)
Плазма крови/эритроцит	$r=0,87$ ($p<0,001$)	$r=0,71$ ($p<0,05$)	$r=0,72$ ($p<0,05$)	$r=0,78$ ($p<0,001$)
Опухолевая ткань/эритроцит	$r=0,83$ ($p<0,001$)	$r=0,94$ ($p<0,001$)	$r=0,82$ ($p<0,001$)	$r=0,64$ ($p<0,05$)
Опухолевая ткань/слизистая	$r=0,86$ ($p<0,001$)	$r=0,59$ ($p<0,05$)	$r=0,56$ ($p<0,05$)	$r=0,43$ ($p<0,05$)

Интересно, что происхождение карбонильных производных белков (2,4-динитрофенилгидразонов) в плазме крови до конца остается не изученным, и не ясно, повышаются ли они за счет выхода из тканей, при их деструкции или же напрямую это связано с усиленным образованием АФК в плазме крови [302; 242]. Однако из полученных нами данных можно предположить, что существует взаимный обмен продуктами ОМБ между плазмой крови и эритроцитами, которые транспортируют различные низкомолекулярные соединения в ткани, что усиливается в условиях канцерогенеза. При этом, как было показано выше,

содержание 2,4-динитрофенилгидразонов повышается во всех изученных образцах при РЖ.

У больных РЖ обнаружена взаимосвязь между продуктами ОМБ (2,4-динитрофенилгидразонами) и ферментативным звеном ПОС (АДА и КО) в плазме крови и ткани опухоли (Таблица 3.3.2). И как видно из полученных результатов именно АДА имеет более высокую корреляцию с показателями СРО, как в плазме крови, так и в опухолевой ткани, по сравнению с КО - общепризнанным генератором АФК.

Таблица 3.3.2. Взаимозависимость 2,4-динитрофенилгидразонов с ферментами катаболизма пуриновых нуклеотидов в плазме крови и ткани опухоли у больных РЖ.

Показатели	КДНФГ (нейтр)	АДНФГ (нейтр)	КДНФГ (основ)	АДНФГ (основ)	NO _x
АДА плазма крови	r=0,88 (p<0,001)	r=0,62 (p<0,05)	r=0,62 (p<0,05)	r=0,67 (p<0,05)	-
АДА эритроциты	r=-0,70 (p<0,001)	r=-0,65 (p<0,001)	r=-0,88 (p<0,001)	r=-0,69 (p<0,05)	r=-0,78 (p<0,001)
АДА ткань опухоли	r=0,86 (p<0,001)	r=0,86 (p<0,001)	r=0,85 (p<0,001)	r=0,64 (p<0,05)	r=0,68 (p<0,001)
КО плазма крови	r=0,82 (p<0,001)	r=0,54 (p<0,05)	r=0,61 (p<0,05)	r=0,73 (p<0,05)	-
КО ткань опухоли	r=0,58 (p<0,05)	r=0,58 (p<0,05)	r=0,54 (p<0,05)	r=0,43 (p<0,05)	r=0,45 (p<0,05)

Хотелось бы отметить, что обнаруженная нами тесная обратная взаимосвязь между активностью АДА и уровнем NO_x в эритроцитах больных РЖ свидетельствует в пользу имеющихся представлений о регуляции экспрессии АДА в эритроцитах под действием NO_x [303].

Таким образом, у больных РЖ включается патофизиологический механизм регуляции показателей системы СРО, тесно взаимосвязанными между собой, стимулируемые АФК. В тканях опухоли активность КО выше в 3,1 раза (см. подраздел 3.1), соответственно повышается уровень $O_2^{\cdot -}$ или же уровень NO_x , концентрация которого в опухоли выше в 1,7 раза. Однако обнаруженное нами повышение активности СОД в 1,4 раза (см. подраздел 3.2), отражает рост уровня $O_2^{\cdot -}$ с последующей наработкой H_2O_2 , которая не будет должным образом утилизироваться в виду снижения активности ГПО (в 1,5 раза), способствуя окислению белков в тканях с последующей их модификацией, что отражает повышение уровня 2,4-динитрофенилгидразонов (в 1,3-1,7 раз). Такой механизм приведет к стимуляции активности КО и АДА (активность которой повышается в 1,9 раз), причем так как фермент имеет две изоформы АДА1, которая в нормальных условиях является преобладающей формой фермента [51], и АДА2 - активность которой возрастает при патологических состояниях [49; 50], скорее всего нами обнаружено повышение ее второй изоформы (АДА2), тем самым замыкая порочный круг.

В эритроцитах активность КО повышается в 1,6 раза способствуя производству $O_2^{\cdot -}$ или NO_x , однако в виду того, что активность СОД в эритроцитах не изменяется, можно предположить, что фермент нарабатывает все же больше NO_x , концентрация которых повышается в 2,7 раза, что по данным литературы приводит к стимуляции активности АДА2 и снижению АДА1, способствуя как бы переключению активности с АДА1 на АДА2 [303], но так как в красных клетках крови присутствует только одна изоформа фермента - АДА1 [304; 305; 48], общая активность фермента будет снижаться, что и было нами установлено.

Такой патофизиологический механизм в свою очередь приводит к снижению скорости утилизации аденозина, приводя к повышению его концентрации в клетке, что согласуется с известными данными [306; 307]. Аденозин способствует повышению уровня GSH, оказывающего ингибирующее действие на АДА [72; 293], при этом сам, подвергаясь окислению, а так как в

эритроцитах онкобольных подавляется скорость пентозо-фосфатного пути (ПФП), за счет снижения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [308], наблюдается нехватка GSH и как нами обнаружено, снижение активности ГПО (в 1,9 раза). При этом в эритроцитах больных РЖ повышается уровень 2,3-бифосфоглицерата стимулируемый в условиях гипоксии, который так же оказывает ингибирующее действие на АДА [132; 152].

Таким образом, у больных РЖ наблюдается системное повышение не ферментативных показателей СРО, которые еще больше стимулируют ферментативное звено ПОС усиливая состояние ОС, тем самым замыкая порочный круг опухолевой прогрессии. Данный факт, в совокупности с представленными ранее данными о наличии взаимозависимостей между активностями АДА в тканях, в плазме и в клетках крови (см. подраздел 3.1), вероятно, отражает системный характер перестройки обмена пуриновых нуклеотидов в организме больных РЖ стимулируемый под действием ОС. Следовательно, на основании полученных результатов можно предположить, что АФК, могут быть факторами, стимулирующим активность АДА и КО при патологии, в отличие от большинства ферментов, которые обычно подвергаются ингибированию в условиях ОС.

Материалы данного раздела нашли отражение в следующих публикациях диссертанта:

1. Зуйков, С.О. Дослідження окисної модифікації білків при раку шлунка / С.О. Зуйков, О.П. Шатова, В.С. Колесніков, З.М. Скоробогатова // Медична хімія. – 2006. - Т. 8. - Вип. 4. - С. 138. (Автором проведены биохимические исследования).
2. Скоробогатова, З.М. Зв'язок ступеня окислювальної модифікації метал залежних білків-ферментів та їх активності в нормі та при пухлинному рості / З.М. Скоробогатова, М.А. Матвиенко, С.А. Зуйков, Ю.Д. Турсунова, О.М. Бакурова // VI читання ім. В.В. Підвисоцького, присвяч. до 150-річчя з дня народження: Бюлетень матеріалів наукової конференції (31 травня 2007). –

Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2007. - С. 35-36. (Автором лично проведены биохимические исследования, подготовлены рекомендации).

3. Бакурова, О.М. Зміни активності ферментів обміну нуклеотидів у пацієнтів із виразковою хворобою та раком шлунка / О.М. Бакурова, С.О. Зуйков, Я.Г. Жебеленко // Науковий вісник ужгородського університету. -2008. - Вип. 34. - С. 3-5. (Автором проведены биохимические исследования и статистический анализ).

4. Жебеленко, Я.Г. Активність ферментів антиоксидантної системи еритроцитів у хворих на виразкову хворобу шлунка / Я.Г. Жебеленко, А.М. Вятюха, С.О. Зуйков // Медична хімія. – 2009. – Т. 3. – С. 158-159. (Автором проведено исследование биохимических показателей, статистическая обработка полученных результатов).

5. Борзенко, Б.Г. Особенности системы антирадикальной защиты и углеводный обмен эритроцитов у больных язвенной болезнью / Б.Г. Борзенко, Е.М. Бакурова, Я.Г. Жебеленко, С.А. Зуйков, К.А. Миронова // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2010. - Т. 5. - № 3. - С. 186-189. (Автором выполнен эксперимент, проведен статистический анализ).

6. Зуйков, С.А. Кооперативний вплив на інтенсивність проліферації слизової оболонки шлунка ферментів нуклеотидного обміну / С.А. Зуйков // Актуальні проблеми клінічної, експериментальної, профілактичної медицини, стоматології та фармації: матеріали 72-ої міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених: тези доповідей. - Донецьк, - 2010. - С. 22. (Автором выполнен эксперимент, проведен статистический анализ).

7. Зуйков, С.А. Особенности взаимосвязи прооксидантной и антиоксидантных систем при раке желудка / С.А. Зуйков, Я.Г. Жебеленко, Б.Г. Борзенко // Питання експериментальної та клінічної медицини: зб. статей. - Донецьк: ТОВ «Каштан», 2010. - Т.2. - Вип. 14. – С. 335-339. (Автором лично проведено исследование активностей ферментов, статистическая обработка полученных результатов, написание статьи).

8. Zebelenko, Y.G. An important erythrocytes metabolic disorders in gastrointestinal cancer patients / Y.G. Zebelenko, S.O. Zuikov, K.O. Mironova, E.M.

Bakurova, B.G. Borzenko // Abstracts of the 45th Meeting of the Polish Biochemical Society, Wista, Poland, september 20th - 23rd 2010. - 2010. - Vol. 57 (4). - P. 95. (Автором проведены биохимические исследования).

9. Бакурова О.М. Чи є дисметаболичні процеси в еритроцитах одним з факторів патогенезу виразки та раку шлунка / О.М. Бакурова, К.О. Миронова, С.О. Зуйков, Я.Г. Жебеленко, Б.Г. Борзенко // Питання експериментальної та клінічної медицини: зб. статей. - Донецьк: ТОВ «Каштан», 2011. - Т. 1. - Вип. 15. – С. 342-345. (Автором проведены биохимические исследования)

10. Бакурова, О.М. Зміни активності аденозиндезамінази при підвищеному онкоризику та карциномах різної локалізації / О.М. Бакурова, О.Ю. Попович, К.О. Миронова, Р.В. Іщенко, Я.Г. Жебеленко, С.О. Зуйков, Б.Г. Борзенко // Науковий вісник Ужгородського університету, серія «Медицина»: зб. наук. праць. – Ужгород: Вид-во Ужгородського Нац. ун-ту, 2011. - Вип. 3(42). – С. 6-8. (Автором лично проведено исследование активностей ферментов, статистическая обработка полученных результатов).

11. Зуйков, С.А. Исследование антиоксидантного статуса в эритроцитах при раке желудка / С.А. Зуйков, К.А. Миронова, Н.А. Колесникова, Л.Р. Абдуллина // Актуальні проблеми теоретичної, клінічної, профілактичної медицини, стоматології та фармації: матеріали 74-го міжнародного медичного конгресу молодих учених: тези доповідей. – Донецьк, 2012. – С. 30. (Автором выполнен эксперимент).

12. Зуйков, С.А. Исследование активности ксантиноксидазы и супероксиддисмутазы при раке желудка / С.А. Зуйков, Я.Г. Жебеленко, Р.Б. Кондратюк // Актуальные проблемы патофизиологии: материалы XVIII межгородской конференции молодых ученых. СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2012. - С. 60-61. (Автором лично проведено исследование активностей ферментов, статистическая обработка полученных результатов, написание работы).

13. Колесникова, Н.А. Исследование обмена пуриновых нуклеотидов и показателей прооксидантного статуса у больных раком желудка / Н.А. Колесникова, С.А. Зуйков // Материалы 40-й конференции молодых ученых и 64-

й студенческой научной конференции (с международным участием): вестник СГМА (специальный выпуск). – Смоленск: Изд-во Смоленской гос. мед. акад, 2012. - С. 102-103. (Автором проведена статистическая обработка полученных результатов).

14. Зуйков, С.А. Изменение соотношения прооксидантной и антиоксидантной систем при опухолях желудка / С.А. Зуйков // Питання експериментальної та клінічної медицини: зб. статей. - Донецьк: ТОВ «Каштан», 2012. - Т. 1. - Вип. 16. – С. 255-260. (Автором лично проведено исследование активностей ферментов, статистическая обработка полученных результатов, написание статьи).

15. Жебеленко, Я.Г. Взаимосвязь углеводного обмена и системы антиоксидантной защиты эритроцитов при язвенной болезни и раке желудка / Я.Г. Жебеленко, Е.М. Бакурова, К.О. Миронова, С.А. Зуйков, Ю.Д. Турсунова, О.А. Верхова, Б.Г. Борзенко// Актуальные проблемы транспортной медицины. - 2012. - № 2 (28). - С. 70-72. (Автором проведены экспериментальные исследования и статистический анализ).

16. Бакурова, Е.М. Некоторые патохимические механизмы развития гемической гипоксии у больных раком желудка / Е.М. Бакурова, К.А. Миронова, С.А. Зуйков, О.А. Верхова // Таврический медико-биологический вестник: наук.-практ. журн. – 2012. - Т. 15. - №3. - Ч. 2 (59). – С. 31-33. (Автором выполнен эксперимент).

17. Зуйков, С.А. Взаимосвязь обмена нуклеотидов с дисбалансом прооксидантной и антиоксидантной системами при раке желудка / С.А. Зуйков, Е.М. Бакурова // Український науково-медичний молодіжний журнал (спеціальний випуск). - 2013. - №4 (74). - С. 50. (Автором лично проведено исследование биохимических показателей, статистическая обработка полученных результатов, написание статьи).

18. Зуйков, С.А. Определение показателей прооксидантной и антиоксидантной систем в эритроцитах у больных раком кишечника / С.А. Зуйков, О.П. Шатова, Я.Г. Жебеленко // Биология: от молекулы до биосферы: материалы VIII Международной научной конференции молодых ученых. – Харьков. - 2013. - С.

16-17. (Автором лично проведено исследование биохимических показателей, статистическая обработка полученных результатов, написание статьи).

19. Зуйков, С.А. Исследование соотношения прооксидантной и антиоксидантной систем при опухолях кишечника / С.А. Зуйков, Б.Г. Борзенко, О.В. Зуйкова // Сибирский онкологический журнал. - 2014. - № 2 (62). - С. 24-27. (Автором выполнен эксперимент, проведен статистический анализ, написана статья).

20. Зуйков, С.А. Взаимосвязь обмена нуклеотидов с прооксидантной и антиоксидантной системами эритроцитов у больных раком желудка / С.А. Зуйков, Я.Г. Жебеленко, О.П. Шатова, Б.Г. Борзенко // Ukr. Biochem. J. - 2014. - Vol. 86. - № 5 (2). - Р. 73-74. (Автором выполнен эксперимент, проведен статистический анализ, написана статья).

21. Зуйков, С.А. Исследование обмена нуклеотидов и его взаимосвязи с прооксидантной и антиоксидантной системами у больных с опухолями желудочно-кишечного тракта / С.А. Зуйков, О.В. Зуйкова, А.Ю. Азархов, Б.Г. Борзенко // Современные направления биохимии человека: материалы VIII Всероссийской научной конференции с международным участием. - СПб: Типография «Флай принт», 2015. - С. 16-17.

22. Зуйков, С.А. Изучение свободно-радикального окисления у больных раком желудка / С.А. Зуйков, И.В. Филиппаки // VII международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения-2017». - Санкт-Петербург. – 2017. - С. 258.

23. Зуйков, С.А. Особенности катаболизма нуклеотидов связанные со злокачественной трансформацией / С.А. Зуйков // Донецкие чтения 2017: Русский мир как цивилизационная основа научно-образовательного и культурного развития Донбасса: Материалы Международной научной конференции студентов и молодых ученых. – Донецк. – 2017. – Т. 2. - С. 291-292.

РАЗДЕЛ 4. ВЛИЯНИЕ СТАРЕНИЯ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Несмотря на то, что РЖ встречается в любом возрасте, однако все же резкий подъем заболеваемости отмечается после 40 лет, а пик приходится на период от 60 до 75 лет. Руководствуясь рекомендациям европейского регионального бюро ВОЗ для исследования влияние возраста на показатели системы СРО все обследуемые (больные РЖ и здоровые добровольцы) нами были разделены на 2 возрастные группы - 40-59 лет (1-я группа) – средний возраст и 60-79 лет (2-я группа) – пожилой возраст.

Однако, изначально при формировании изучаемых групп (здоровых добровольцев и больных РЖ) между пациентами нами был выбран возрастной интервал равный 10 годам. Таким образом, первую группу составили пациенты в возрасте 40-49 лет, вторую - 50-59 лет, третью - 60-69 лет и четвертую группу - 70-79 лет.

Проведя статистический анализ исследуемых показателей (в плазме крови, эритроцитах и гомогенатах тканей – опухолевой и нетрансформированной слизистой) у больных РЖ в возрастных группах достоверных отличий между первой и второй группой установлено не было. Так же не обнаружено статистически значимых отличий между третьей и четвертой группами. Но при объединении 1 и 2 группы, а так же 3 и 4 группы, нами были установлены статистически значимые различия между исследуемыми показателями. Поэтому дальнейшее исследование у больных РЖ мы проводили в двух возрастных группах - 40-59 лет (1-я группа) и 60-79 лет (2-я группа). Следовательно, у больных РЖ количество людей в 1-й группе составило 18 человек и во 2-й группе - 17 человек. Таким же образом было произведено деление на группы и у здоровых добровольцев: 40-59 лет (1-я гр., 44 человека.) и 60-79 лет (2-я гр., 36 человек).

Материалом для исследования послужила плазма крови (115 проб), гемолизат эритроцитов (115 проб) и гомогенаты опухолевых и нетрансформированных тканей (70 образцов).

4.1. Изменение компонентов системы свободно-радикального окисления в зависимости от возраста в плазме крови

Исследовав влияние возраста на ферментативные и не ферментативные показатели СРО у здоровых людей было установлено статистически значимое повышение активности АДА (при $p=0,0002$) с возрастом, в группе 60-79 лет активность фермента была на 20% выше чем в группе 40-59 лет (Таблица 4.1.1). Так же обнаружено, достоверное увеличение активности КО в плазме крови с возрастом, во 2-й группе активность данного фермента была на 31% выше по отношению к 1-й группе (при $p=0,0003$). Следовательно при старении увеличивается катаболизм пуриновых нуклеотидов, который считается одним из основных метаболических процессов нарабатывающих АФК [40; 41], а значит происходит усиление ферментативного звена ПОС плазмы крови. Похожие результаты были получены и другими авторами [33].

Таблица 4.1.1. Показатели ПОС, АОС и СРО в плазме крови здоровых людей в зависимости от возраста ($M \pm \sigma$)

Показатели	1-я группа (n=44)	2-я группа (n=36)
АДА (нмоль/мин*мг)	2,20±0,41	2,75±0,54*
КО (мкмоль/мин*мг)	0,286±0,120	0,414±0,136*
СОД (ед/мг)	0,212±0,029	0,141±0,016*
ГПО (мкмоль/мин*мг)	7,10±0,71	6,36±0,21*
NO _x (мкмоль/л)	3,35±0,09	3,89±1,54

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p < 0,001$.

Исследовав уровень NO_x в плазме крови здоровых людей, достоверных отличий с возрастом для данного показателя установлено не было, хотя и прослеживается динамика повышения данных метаболитов при старении (в группе 60-79 лет концентрация NO_x была выше, чем в группе 40-59 лет). По литературным данным имеются разнонаправленные сведения об изменении уровня NO_x в плазме крови при старении. Одни авторы описывают возрастное снижение NO_x , за счет подавления активности eNOS с возрастом, что позволило считать дефицит NO одним из физиологических механизмов старения [178] или же снижение уровня NO_x в системном кровотоке связано со значительным их внутриклеточным повышением в виду определенных условий, в частности снижения оксигенации тканей при старении [151]. В других работах наоборот описано повышение NO_x в плазме, связанное с возрастным усилением активности iNOS [309], а так же избыточного накопления NO_x , вследствие малоподвижного образа жизни и развития широкого спектра возрастных патологий [310]. При этом, полученные нами результаты сочетаются с работами других авторов, указывая на строгий контроль диеты исследуемых пациентов и соответственно влияние большого количества факторов на динамику изменения уровня NO_x в плазме крови [311].

Исследуя показатели СРО белков, нами было обнаружено достоверное повышение уровня продуктов ОМБ с возрастом. Во 2-й группе концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов была в среднем примерно на 13% выше, чем в 1-й возрастной группе (Рисунок 4.1.1). При этом статистически значимо отличались КДНФГ(нейтр) при $p=0,026$, АДНФГ(нейтр) при $p=0,0004$ и КДНФГ(основ) при $p=0,0006$, для АДНФГ(основ) достоверных отличий нами обнаружено не было.

Установленное повышение уровня метаболитов ОМБ с возрастом, согласуется с данными литературы об увеличении концентрации окисленных и модифицированных белков при старении [216; 217]. Причем повышение карбонильных производных белков, то есть уровня 2,4-динитрофенилгидразонов, считается одним из ранних и надежных индикаторов интенсивности

свободнорадикальных процессов при старении и заболеваниях сопутствующих этому процессу [224-227], являясь пусковым механизмом окислительной деструкции других молекул (липидов, нуклеиновых кислот) клетки, оказывая ключевую роль, в молекулярных механизмах развития ОС.

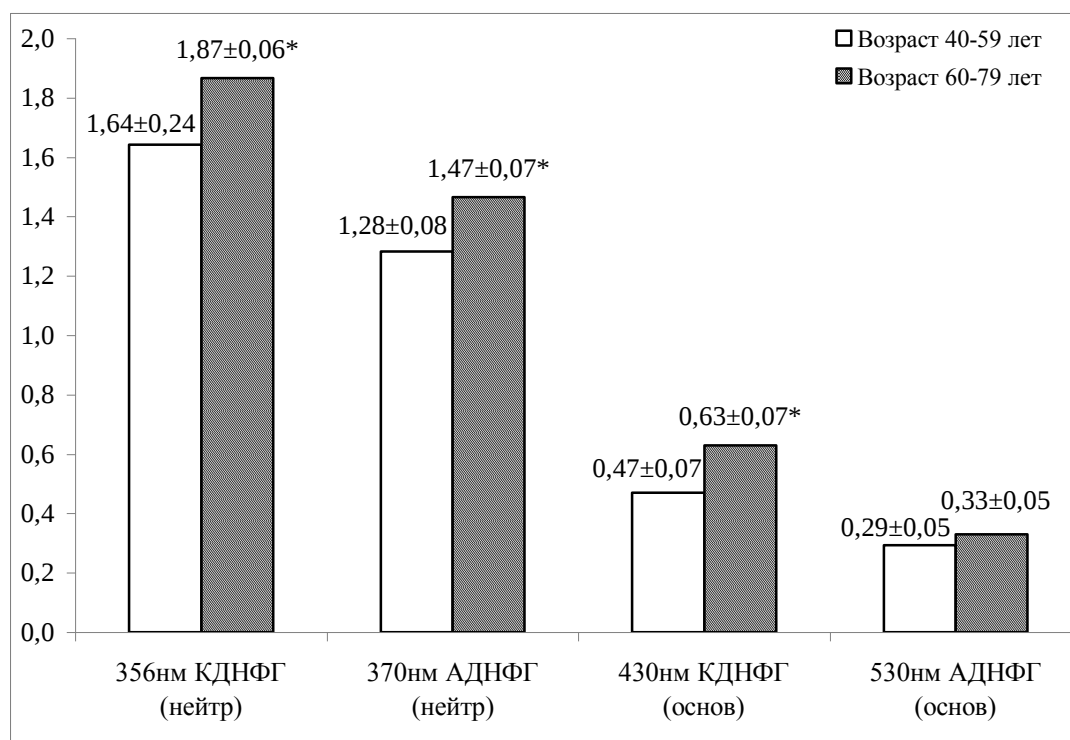


Рис. 4.1.1. Уровень продуктов ОМБ в плазме крови в зависимости от возраста ($M \pm \sigma$). По оси Y - концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов в плазме крови в мкмоль/мг, по оси X - длины волн при которых регистрировались продукты ОМБ.

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p < 0,001$.

Исследовав ферментативное звено АОС в плазме крови, было установлено снижение всех исследуемых показателей с возрастом. Обнаружено снижение активности СОД после 59 лет - во 2-й группе она была достоверно ниже, чем в 1-й группе (при $p = 0,0001$). Несмотря на то, что есть работы, где описано незначительное изменение активности СОД с возрастом и даже повышение при старении, на фоне интенсификации процессов СРО, с последующим увеличением уровня H_2O_2 в плазме крови [312], нами было обнаружено достоверное снижение

активности СОД в плазме крови при старении, что подтверждает большинство имеющихся в мировой литературе данных об ослаблении первой линии ферментативной защиты от АФК в пожилом возрасте [313].

Аналогичное изменение - снижение активности в плазме крови с возрастом, было установлено и для ГПО, в группе 60-79 лет активность фермента была статистически значимо ниже по сравнению с группой 40-59 лет (при $p=0,0001$). Обнаруженное снижение активности ГПО в плазме крови при старении, сочетается с повышением прооксидантного статуса плазмы крови, а значит, приводит к развитию ОС у пожилых людей. Полученные данные согласуются с работами других авторов о постепенном снижении глутатионового звена АОЗ плазмы крови [127; 314].

При исследовании показателей ПОС, АОС и СРО в плазме крови, нами были установлены статистически значимые отличия в повышении активностей АДА, КО и уровня ОМБ с возрастом, а так же снижение активностей СОД и ГПО. Следовательно, достоверно от возраста зависят активности ферментов: АДА, КО, СОД и ГПО, а так же концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов в плазме крови.

При проведении корреляционного анализа между исследуемыми показателями в плазме крови и возрастом здоровых пациентов установили прямые взаимосвязи для АДА ($r=0,43$, $p<0,001$), КО ($r=0,49$, $p<0,001$) и уровнем 2,4-динитрофенилгидразонов (КДНФГ(нейтр) $r=0,59$, $p<0,05$, АДНФГ(нейтр) $r=0,80$, $p<0,001$, КДНФГ(основ) $r=0,79$, $p<0,001$), однако для ферментативных показателей ПОС они имели слабую степень взаимосвязи, тогда как для не ферментативных представителей (АДНФГ(нейтр), КДНФГ(основ)) она оказалась высокой. По данным литературы имеются сведения о том, что АДНФГ преобладают на ранних стадиях ОС и расцениваются как первичные маркеры, а на поздних - КДНФГ - вторичные маркеры ОС [315; 316]. Из полученных нами результатов следует, что с возрастом в плазме крови здоровых людей повышается уровень как первичных, так и вторичных маркеров ОС. Также следует отметить, что преобладание альдегидных форм при старении может свидетельствовать о наличии процесса фрагментации белков с образованием

низкомолекулярных фрагментов, а кетонные формы расцениваются как показатели агрегации белков [242]. Интересно, что происхождение карбонильных производных белков в плазме крови до конца не известно, и не ясно, повышаются ли они с возрастом за счет выхода из мышечной или других тканей, при их деструкции [302]. Однако все же считают, что окисленные белки подвергаются деградации в тканях и остаются там до полной гибели клетки, а значит маловероятно, что они могут быть экспортированы в плазму [317], следовательно, повышение уровня ОМБ напрямую связано с усиленным образованием АФК в плазме крови.

При этом нами установлена обратная корреляция, с высокой степенью взаимосвязи, между ферментативными представителями АОС - СОД ($r=-0,85$, $p<0,001$), ГПО ($r=-0,77$, $p<0,001$) и возрастом здоровых добровольцев (Рисунок 4.1.2), что снова-таки подтверждает теорию затухания ферментативного звена АОЗ плазмы крови при старении [125].

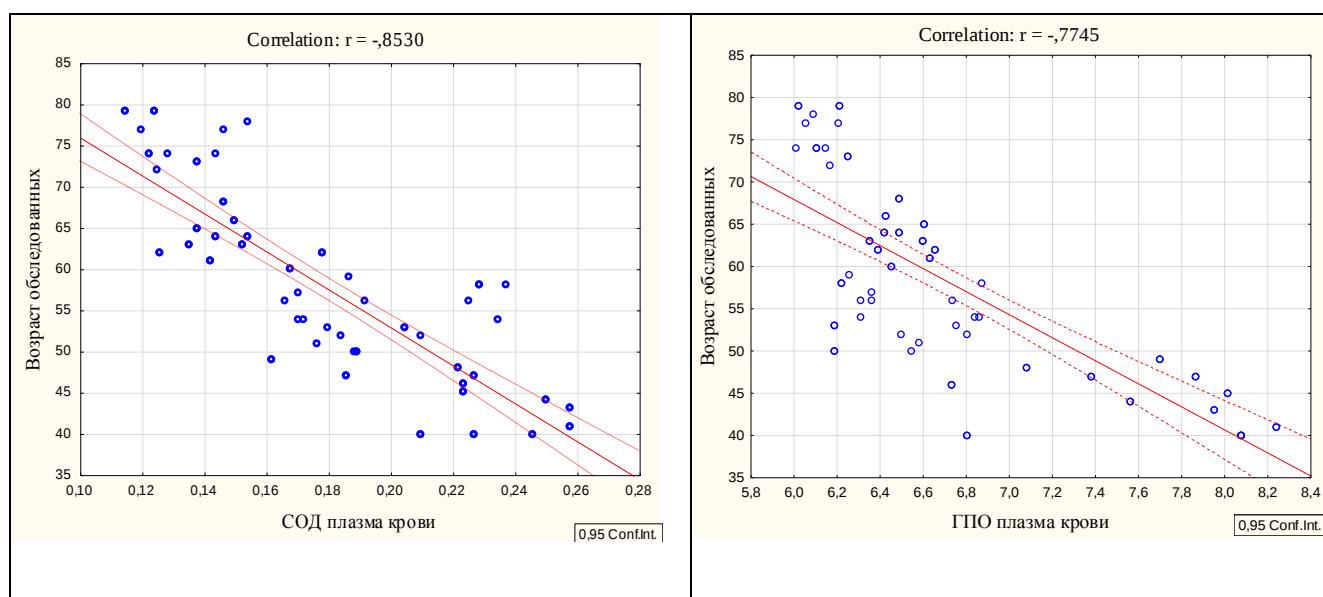


Рис. 4.1.2. Взаимосвязь активностей ферментов АОЗ (СОД и ГПО) в плазме крови здоровых людей с возрастом, значения всех коэффициентов корреляции статистически достоверны при $p<0,001$.

При проведении сравнительного анализа между исследуемыми показателями в плазме крови здоровых людей разного возраста, нами была

установлена статистически значимая прямая положительная взаимосвязь у СОД/ГПО в двух возрастных группах ($r=0,47$, $p<0,05$ и $r=0,65$, $p<0,001$ соответственно). Так же в группе здоровых людей более пожилого возраста (60-79 лет) выявлена обратная связь между КО/ГПО ($r=-0,45$, $p<0,05$), следовательно, у более пожилых людей наблюдается взаимосвязь между ферментативными показателями обмена ПОС и АОС. При этом взаимосвязей между другими показателями для данных возрастных групп установлено не было.

Полученные нами данные позволяют предположить, что ускорение пуринового обмена после 60 лет, способствуют усиленной наработке АФК в плазме крови, которые по механизму обратной связи, еще больше стимулируют данный метаболизм и подавляют ферментативное звено системы АОЗ. Установленное повышение продуктов ОМБ в плазме крови с возрастом, так же может быть одной из причин угнетения ферментативного звена АОС [317], способствуя окислению тиоловых белков и ферментов плазмы крови, еще больше повышая продукцию СР, приводя к окислению альбуминов и других транспортных белков плазмы.

Таким образом, при старении в плазме крови происходит нарушение баланса между прооксидантами и антиоксидантами, взаимосвязанными между собой, с преобладанием первых, что в свою очередь стимулирует развитие ОС у пожилых людей, приводя к окислению белковых молекул плазмы крови с последующим нарушением их физиологических функций, еще больше угнетая ферментативное звено АОС плазмы крови. Следовательно, полученные нами результаты, еще раз доказывают имеющиеся представления о постепенном снижении антиоксидантного потенциала плазмы крови у пожилых людей [70; 318].

Исследуя группу больных РЖ, было установлено статистически значимое повышение активности АДА (при $p=0,0001$) с возрастом, в группе 60-79 лет активность фермента была на 31% выше чем в группе 40-59 лет (Таблица 4.1.2).

Так же обнаружено, достоверное увеличение активности КО в плазме крови с возрастом, во второй группе активность данного фермента была на 14% выше по отношению к первой группе (при $p=0,039$).

Следовательно, при старении у больных РЖ в плазме крови наблюдается усиление катаболизма пуриновых нуклеотидов. К тому же, ранее авторы пришли к выводу, что плазменная АДА представляет собой белок с гибкими конформационными изменениями, на которые особое влияние способен оказывать ОС, приводя к повышению его деятельности [319].

Таблица 4.1.2. Показатели ПОС, АОС и СРО в плазме крови больных РЖ в зависимости от возраста ($M \pm \sigma$)

Показатели	1-я возрастная группа (n=18)	2-я возрастная группа (n=17)
АДА (нмоль/мин*мг)	5,33 $\pm$ 0,89	7,67 $\pm$ 1,67*
КО (мкмоль/мин*мг)	0,527 $\pm$ 0,091	0,611 $\pm$ 0,136**
СОД (ед/мг)	0,138 $\pm$ 0,006	0,124 $\pm$ 0,011*
ГПО (мкмоль/мин*мг)	8,24 $\pm$ 0,55	7,35 $\pm$ 0,56*
NOx (мкмоль/л)	8,43 $\pm$ 2,60	6,34 $\pm$ 1,89**

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p<0,001$; ** - значения показателя достоверны при $p<0,05$.

Проведя корреляционный анализ между исследуемыми показателями в плазме крови и возрастом больных РЖ, установили статистически значимые прямые взаимосвязи у АДА $r=0,62$ ($p<0,001$) и КО $r=0,51$ ($p<0,05$). А так как повышение активностей АДА и КО в плазме крови считается маркерами воспаления и ОС [41; 70; 71; 129], что присуще для данного типа патологий, можно судить об усиленном вкладе катаболизма пуринов в формирование прооксидантного статуса плазмы у больных РЖ при старении.

При сравнении здоровых людей и больных РЖ плазме крови была выявлена интересная динамика возрастных изменений активностей ферментов катаболизма

пуринов. В группе здоровых добровольцев установлен, возрастной рост активностей АДА на 20% и КО на 30%, тогда как у больных РЖ - АДА повышается на 31% и КО на 14%.

Соответственно как у онкобольных, так и у здоровых людей при старении происходит повышение скорости катаболизма пуриновых нуклеотидов. Однако возрастной темп роста активности АДА в плазме крови у больных РЖ имеет более выраженную динамику изменения, по сравнению с людьми, не имеющими онкозаболеваний, в то время как интенсивность роста КО у больных РЖ ниже.

В то же время, сравнив активности ферментов пуринового обмена в плазме крови у онкобольных и здоровых людей разного возраста, установили, что в 1-й возрастной группе активность АДА у больных РЖ выше в 2,4 раза ($p < 0,001$), а КО в 1,8 раз ($p < 0,001$), по сравнению с людьми, не имеющими онкозаболеваний. При этом во 2-й возрастной группе у больных РЖ активность АДА была в 2,8 раза выше относительно группы здоровых добровольцев ($p < 0,001$), а КО в 1,5 раза ($p < 0,001$) соответственно.

Изменение активностей ключевых ферментов катаболизма пуринов, может быть вызвано различными причинами, однако существует предположение об участии иммунной системы в развитии нарушений пуринового метаболизма, так как иммунные нарушения и изменения биохимических процессов при старении и патологических состояниях неразрывно связаны [320]. Разнообразные интерлейкины способствуют развитию воспалительной реакции с привлечением полиморфноядерных нейтрофилов и высвобождением большого количества лизосомальных и других ферментов, которые оказывают повреждающее действие на структурные компоненты соединительной ткани [85]. Метаболические нарушения, ведущие к повреждению мембран макрофагов, эритроцитов, лейкоцитов и других клеточных структур, способствуют выходу в экстрацеллюлярное пространство многих биологически активных веществ, в том числе и ферментов. Наличие антигенных свойств у ферментов обеспечивает ответную реакцию при их выходе из клетки, а воздействие различных факторов воспаления усиливает антигенные свойства энзимов вследствие возможного

окисления их функциональных групп, а так же за счет аденозинергической иммунодепрессии или парадокса Хелстрема [62].

Таким образом, повышение активностей АДА и КО в плазме крови могут расцениваться как маркеры не только физиологического, но и патологического старения, а контроль и мониторинг их изменений в плазме крови, может быть использован для диагностики заболеваний ассоциированных со старением, в частности РЖ.

Исследовав ферментативное звено АОС в плазме крови у больных РЖ, было установлено статистически значимое снижение всех исследуемых показателей с возрастом примерно на 10% (Таблица 4.1.2). Так активность СОД у больных во 2-й возрастной группе была достоверно ниже, чем в 1-й (при $p=0,0034$), при этом активность ГПО так же была ниже в группе 60-79 лет (при $p=0,0034$) относительно группы 40-59 лет.

Проведя корреляционный анализ между ферментативными показателями АОС в плазме крови и возрастом больных РЖ, обнаружены статистически значимые обратные взаимосвязи для СОД $r=-0,42$ ($p<0,05$) и ГПО $r=-0,58$ ($p<0,001$).

Литературные данные о возрастной динамике отдельных показателей АОС и СР процессов в плазме крови онкологических больных довольно противоречивы и разносторонни [150; 321]. Следовательно, на возрастные изменения активностей ферментативных представителей АОЗ в плазме крови особое влияние оказывают патоморфологические и биохимические клеточные преобразования зависящие от степени развития опухоли.

При сравнении работы АОЗ у здоровых людей и больных РЖ в плазме крови выявлена интересная динамика возрастных изменений ферментативных представителей АОС в норме и при онкопатологии. В группе здоровых добровольцев установлено, что активность СОД в плазме крови при старении снижается на 33% ($p<0,001$), а ГПО на 10% ($p<0,001$), тогда как при РЖ - СОД и ГПО снижаются на 10% ($p<0,05$).

Следовательно, если угнетение ферментативного звена АОЗ плазмы крови с возрастом у людей, не имеющих онкозаболеваний, происходит более выражено, то у больных РЖ она имеет менее интенсивную динамику, а значит, у больных РЖ старение оказывает свой особенный механизм на регуляцию ферментов АОС характерный для канцерогенеза.

Интерес вызывает факт, что при сравнении активностей ферментов АОС в плазме крови у больных РЖ и здоровых людей различного возраста, обнаружено, что в группе онкологических больных в возрасте 40-59 лет, активность СОД ниже в 1,4 раза ($p < 0,05$) и в группе 60-79 лет ниже в 1,2 раза ($p < 0,05$), а ГПО выше в 1,2 раза ($p < 0,05$) во всех изученных группах, по сравнению со здоровыми людьми. Следовательно, если сопоставить динамику изменения ферментативных активностей АОЗ, между больными РЖ и здоровыми людьми, обнаружен дисбаланс в работе ферментативного звена АОС, у онкобольных пациентов по сравнению с людьми не имеющими онкопатологий.

По мнению авторов [322], высокая активность ГПО в плазме крови онкобольных по сравнению со здоровыми людьми, может быть связана с ферментативной активностью АДА, расщепляющей аденозин, который в определенных условиях может ингибировать ГПО. В результате проведенного корреляционного анализа нами была установлена прямая взаимосвязь между АДА/ГПО ($r = 0,54$, $p < 0,05$ у здоровых и $r = 0,56$, $p < 0,05$ у больных РЖ) в возрасте 40-59 лет, при этом у здоровых людей более пожилого возраста такой взаимосвязи не обнаружено, а у больных РЖ она была более статистически значимой ($r = 0,70$, $p < 0,001$).

Возможно, еще одной из причин более высокой активности ГПО у онкобольных людей по сравнению со здоровыми может быть тот факт, что в отличие от других ферментов АОЗ, например каталазы, ГПО способна взаимодействовать не только с H_2O_2 , концентрация которого повышается при раке [323], но так же и с множеством окисленных и модифицированных соединений [324]. Причем, если специфичность к H_2O_2 фермент проявляет независимо от концентрации данного вещества, то с другими соединениями - только при их

высоких концентрациях в плазме, а так как при раке усиливается распад тканевых структур [19], следовательно, в плазме увеличивается содержание данных метаболитов, для нейтрализации которых будет использоваться ГПО.

В виду того, что активность СОД у онкобольных в плазме крови ниже, чем у людей не имеющих онкозаболеваний, соответственно у больных РЖ будет выше концентрация $O_2^{\cdot-}$, что подтверждают полученные нами данные о более высокой активности КО в плазме крови у онкобольных людей по сравнению с условно-здоровыми, который используется для образования $ONOO^-$, еще более сильного окислителя, в первую очередь приводя к окислительным модификациям плазменных протеинов [295]. Механизм нейтрализации $ONOO^-$ происходит частично за счет ГПО с использованием глутатиона, с последующим образованием $GS^{\cdot-}$, в результате чего тот из антиоксиданта становится прооксидантом [296; 114], еще больше усугубляя состояние ОС у онкобольных людей.

Нами проведен корреляционный анализ в результате которого выявлена прямая взаимосвязь в плазме крови между КО/ГПО у больных РЖ ($r=0,47$, $p<0,05$) в возрасте 40-59 лет. При этом у больных РЖ в возрасте 60-79 лет такой связи не обнаружено. Следовательно, нами выявлено специфическое влияние возраста на взаимосвязи между ферментами катаболизма пуринов и АОЗ в плазме крови больных РЖ.

Исследовав показатели СРО в плазме крови больных РЖ было установлено достоверное снижение уровня NO_x (при $p=0,01$) с возрастом. При исследовании изменений уровня продуктов ОМБ с возрастом в плазме крови у больных РЖ обнаружена интересная закономерность - одни из производных 2,4-динитрофенилгидразонов имели тенденцию к повышению с возрастом, другие наоборот снижались (Рисунок 4.1.3). Однако статистически значимых возрастных изменений концентрации 2,4-динитрофенилгидразонов в плазме крови больных РЖ обнаружено не было ни для одного из метаболитов ОМБ.

При проведении корреляционного анализа между неферментативными показателями ПОС в плазме крови и возрастом у больных РЖ, установлена всего

одна слабая отрицательная связь для NO_x ($r=-0,34$, $p<0,05$). При этом для плазменных продуктов ОМБ взаимосвязи с возрастом не обнаружено.

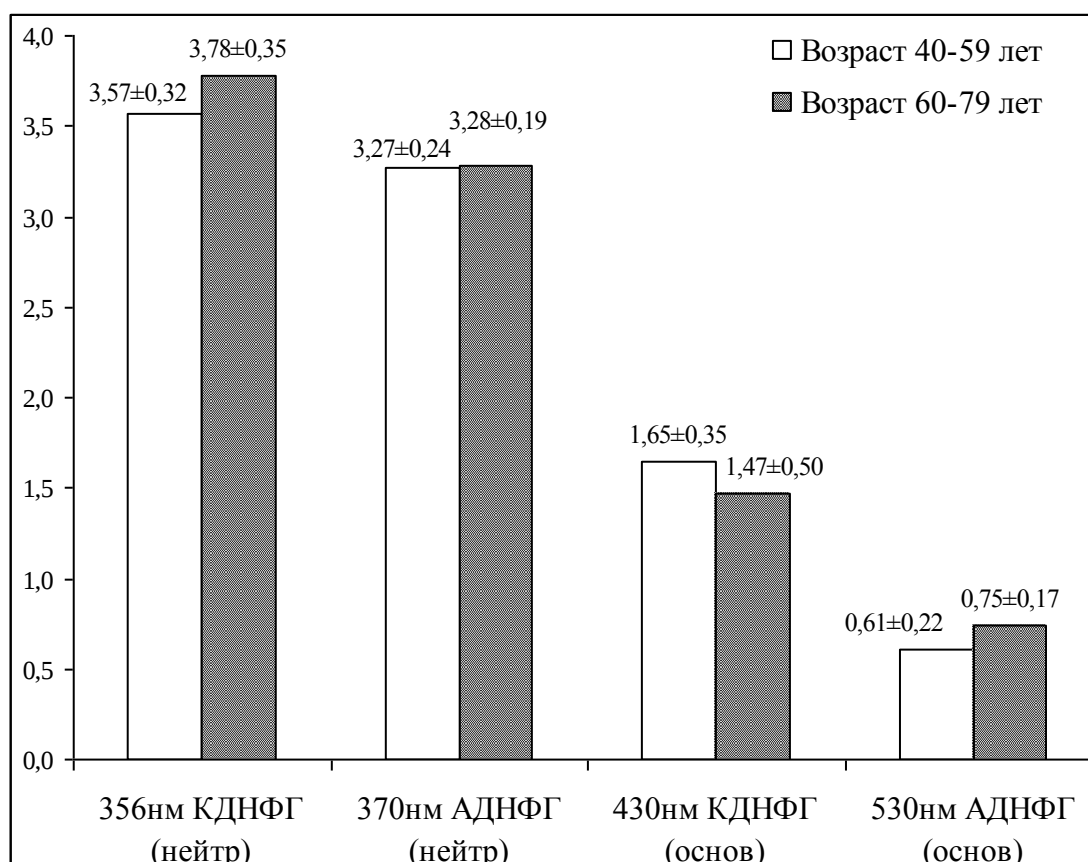


Рис. 4.1.3. Уровень продуктов ОМБ у больных РЖ в плазме крови в зависимости от возраста ($M \pm \sigma$). По оси Y - концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов в плазме крови в мкмоль/мг, по оси X - длины волн при которых регистрировались продукты ОМБ.

Авторами доказано, что в условиях гипоксии, характерной для РЖ, высвобождаемый из клеток аденозин повышает уровень NO, через стимуляцию специфических систем его синтеза [67]. Одной из таких систем является нитрат(нитрит)-редуктазная, восстанавливающая NO_x в NO, с участием КО, активность которой усиливается в условиях гипоксии, а так же при снижении NOS реакции [180; 181]. Возможно, обнаруженное нами возрастное снижение NO_x в плазме крови у больных РЖ и повышение активности КО будут свидетельствовать в пользу данной теории, однако при проведении

корреляционного анализа у больных РЖ, взаимосвязи между этими показателями в плазме крови установлено не было. Так же можно предположить, что возрастное снижение концентрации NO_x в плазме крови у больных РЖ связано с усиленным их транспортом в клетки и ткани, где они необходимы для последующей опухолевой прогрессии, в частности регуляции ангиогенеза и сосудистых функций [183]. Считается, что плазменные АФК являются ключевыми составляющими, которые индуцируют апоптоз, что будет носить неблагоприятный эффект для опухоли [163], следовательно организм опухоленосителей способен активировать механизмы направленные на снижение подобных эффектов.

Сравнив, содержание NO_x в плазме крови у онкобольных и здоровых людей разного возраста, обнаружено, что у больных РЖ в возрасте 40-59 лет уровень NO_x в 2,5 ($p < 0,001$) раза выше по сравнению с людьми не имеющими онкопатологий, как и содержание 2,4-динитрофенилгидразонов: КДНФГ(нейтр) в 2,2 раза, АДНФГ(нейтр) в 2,6 раза, КДНФГ(основ) в 3,5 раза и АДНФГ(основ) в 2,1 раза ($p < 0,001$ для всех).

Проведя аналогичное сравнение у людей в возрасте 60-79 лет, уровень NO_x в плазме крови больных РЖ был выше в 1,6 раза ($p < 0,05$) у больных РЖ относительно группы здоровых людей, а показатели ОМБ в 2 раза для КДНФГ(нейтр), в 2,2 раза для АДНФГ(нейтр), в 2,3 раза для КДНФГ(основ) и в 2,5 раз для АДНФГ(основ) соответственно ($p < 0,001$ для всех).

Таким образом, содержание NO_x в плазме крови у людей не имеющих онкопатологий при старении не изменяется, тогда как у больных РЖ уровень NO_x с возрастом снижается. Однако показатели ОМБ у здоровых людей при старении повышаются, а у больных РЖ достоверно не отличаются. При этом содержание NO_x и 2,4-динитрофенилгидразонов в плазме крови у онкобольных людей выше, чем у здоровых добровольцев, и информативней это видно в группе возрастом 40-59 лет, что возможно связано с более интенсивными изменениями метаболизма у людей данной возрастной группы.

Несмотря на то, что состояние ОС присуще большинству возрастных патологий, а так же в большинстве случаев является неотъемлемой частью нормального физиологического старения организма [129], что подтверждают описанные нами ранее результаты, все же, есть ряд заболеваний ассоциированных со старением, при которых показатель ОС имеет более выраженное значение, к которым можно отнести РЖ.

Однако если старение у людей, не имеющих онкопатологий, оказывает ключевое влияние на формирование ОС, способствуя значительному ухудшению состояния белковых систем плазмы крови, с последующим развитием деструктивных процессов, то у онкобольных людей старение, по-видимому, может служить приспособительным механизмом, характерным для канцерогенеза.

При проведении сравнительного анализа исследуемых показателей в плазме крови онкобольных людей, с учетом возрастного параметра, помимо вышеописанных результатов, были обнаружены еще некоторые взаимосвязи между показателями ПОС, АОС и СРО. В результате чего, установили, что у больных РЖ плазме крови от возраста зависят соотношения между АДА/ NO_x ($r=0,49$, $p<0,05$), АДА/ГПО ($r=0,54$, $p<0,05$), КО/ГПО ($r=0,47$, $p<0,05$), СОД/ГПО ($r=-0,64$, $p<0,05$), однако по силе все они имеют среднюю степень взаимосвязи и характерны лишь для больных возрастом 40-59 лет. При этом обнаруженные взаимосвязи, с высокой степенью корреляции, между АДА/ОМБ ($r=0,98$, $p<0,001$ для КДНФГ(нейтр), $r=0,78$, $p<0,05$ для АДНФГ(нейтр), $r=0,96$, $p<0,001$ для КДНФГ(основ) и $r=0,88$, $p<0,05$ для АДНФГ(основ) характерны для группы больных возрастом 40-59 лет и $r=0,95$, $p<0,05$ для КДНФГ(нейтр), $r=0,88$, $p<0,05$ для АДНФГ(нейтр), $r=0,88$, $p<0,05$ для КДНФГ(основ) характерны для группы больных возрастом 60-79 лет) и КО/ОМБ ($r=0,78$, $p<0,05$ для КДНФГ(нейтр), $r=0,81$, $p<0,05$ для КДНФГ(основ), для АДНФГ(нейтр) характерны для группы больных возрастом 40-59 лет и $r=0,86$, $p<0,05$ для КДНФГ(нейтр), $r=0,88$, $p<0,05$ для КДНФГ(основ) характерны для группы больных возрастом 60-79 лет) от возраста не зависят и имеют однонаправленные изменения, тогда как взаимосвязи между АДА/СОД ($r=-0,83$, $p<0,001$ для группы 40-59 лет и $r=0,81$, $p<0,001$ для

группы 60-79 лет), СОД/ОМБ ($r=-0,94$, $p<0,001$ для КДНФГ(нейтр), $r=-0,70$, $p<0,05$ для АДНФГ(нейтр), $r=-0,96$, $p<0,001$ для КДНФГ(основ) и $r=-0,85$, $p<0,05$ для АДНФГ(основ) для группы 40-59 лет и $r=0,92$, $p<0,05$ для КДНФГ(нейтр) для группы 60-79 лет) и ГПО/ОМБ ($r=0,86$, $p<0,05$ для КДНФГ(нейтр), $r=0,82$, $p<0,05$ для АДНФГ(нейтр), $r=0,79$, $p<0,05$ для КДНФГ(основ) и $r=0,89$, $p<0,05$ для АДНФГ(основ) для группы возрастом 40-59 лет и $r=-0,92$, $p<0,05$ АДНФГ(нейтр) для группы 60-79 лет), типичные двум возрастным группам, носят разнонаправленный характер, при этом имеют высокую степень взаимосвязи между собой.

Следовательно, для каждой возрастной группы имеются свои специфические особенности влияния одних показателей на другие, при этом выявленные взаимосвязи у больных РЖ между АДА/ОМБ, КО/ОМБ и ГПО/ОМБ в плазме крови от возраста не зависят и имеют однотипные изменения.

Таким образом, для каждой возрастной группы онкобольных людей имеются свои специфические особенности влияния одних показателей на другие, на изменение которых, помимо возраста, особое влияние оказывает опухолевый процесс.

4.2. Изменение компонентов системы свободно-радикального окисления в зависимости от возраста в эритроцитах

Установлено, что с возрастом у здоровых людей в эритроцитах происходит достоверное снижение активности АДА (при $p=0,0001$), в группе 60-79 лет активность фермента была на 22% ниже чем в группе 40-59 лет (Таблица 4.2.1). Схожая тенденция метаболизма, а именно снижение активности в эритроцитах с возрастом, было установлено и для КО, однако статистически значимых отличий с возрастом для данного фермента обнаружено не было.

Известно, что одним из субстратов для АДА является аденозин, который выступает модулятором иммунной системы, подавляя воспаление путем

снижения биосинтеза цитокинов, регулируя функции нейтрофилов, так же повышает доступность питательных веществ, снижает потребление энергии и окислительный статус клеток [325]. Известно, что в норме аденозин содержится в низких концентрациях во внеклеточном пространстве, но при воспалении и в условиях стресса его концентрация растет. Эритроциты осуществляют транспорт пуриновых нуклеозидов и оснований, причем для аденозина и инозина проницаемость мембран эритроцитов повышена [326]. Есть сведения о положительной линейной корреляции между содержанием аденозина в эритроцитах и плазме крови здоровых людей [327]. Однако в присутствии аденозина заметно снижается энергетический заряд эритроцитов [328; 329], следовательно, снижение активности АДА эритроцитов при старении организма, может служить основанием для дестабилизации энергетического обмена в этих клетках [272]. При этом количество АТФ в клетке регулирует множество факторов, одним из которых выступает АДА. По данным литературы известно, что повышение ее активности может способствовать снижению АТФ в эритроците, что нарушает работу АТФ-синтаз, повышая уровень катионов в клетке (Na^+), приводя к деформируемости эритроцита и его гемолизу [330]. Таким образом, установленное возрастное снижение активности фермента распада пуринов, возможно, является приспособительным механизмом, сохраняя клеточный уровень аденозина для нужд организма при старении, в частности как регулятора оксигенации [331], однако накопление аденозина в эритроцитах, который, по мнению некоторых авторов [307], вовлечен в патогенез многих воспалительных процессов, будет способствовать дисфункции этих клеток, с последующим их разрушением.

Так как АДА регулирует пул аденозина в эритроцитах, тем самым контролируя целостность клеток крови, снижение ее активности с возрастом, все же будет носить отрицательный характер на функциональную активность эритроцитов, способствуя нарушению их структуры, деформируемости, нарушению транспортной функции приводя к развитию микроциркуляторных нарушений и гипоксии [80], которые являются важными факторами патогенеза

онкозаболеваний. Причем, продукт аденозиндезаминазной реакции - инозин в эритроцитах используется для нейтрализации токсических веществ [332], а значит, снижение активности АДА приводит к повышению токсичных метаболитов в эритроците с возрастом. Похожие данные были получены другими авторами [308].

Таблица 4.2.1. Показатели ПОС, АОС и СРО в эритроцитах здоровых людей в зависимости от возраста ($M \pm \sigma$)

Показатели	1-я группа (n=44)	2-я группа (n=36)
АДА (нмоль/мин*мг)	12,5±1,50	9,81±1,12*
КО (мкмоль/мин*мг)	5,80±0,97	5,83±1,03
СОД (ед/мг)	9,44±1,19	7,49±1,04*
ГПО (мкмоль/мин*мг)	429±37,3	374±48,2*
НОх (мкмоль/л)	2,84±1,07	3,57±1,09**

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p < 0,001$; ** - значения показателя достоверны при $p < 0,05$

С другой стороны, АДА вносит существенный вклад в систему генерации АФК, в основном за счет того, что является одним из основных поставщиков гипоксантина (ксантина) - субстрата для КО который нарабатывает O_2^- и H_2O_2 [82]. Следовательно, обнаруженное нами снижение активности АДА в эритроците при старении организма, способствует замедлению скорости наработки АФК в ксантиноксидазной реакции в виду недостатка субстрата, что подтверждают полученные нами результаты о том, что активность КО в эритроците при старении организма не изменяется. Так же эритроциты в отличие от других клеток и тканей не содержат фермент гуаназу, в результате ГМФ в них распадается только до гуанина [330], а значит, путь образования ксантина в этих клетках происходит только из адениловых нуклеотидов [289]. Что так же подтверждают сведения о том, что адениловые нуклеотиды составляют 70-80% от

всех свободных эритроцитарных нуклеотидов, и их предшественниками в красных клетках крови являются аденин и аденозин, транспорт которых через мембраны эритроцитов происходит за счет облегченной диффузии [326].

Таким образом, в эритроцитах здоровых людей при старении катаболизм пуринов не будет оказывать существенного влияния на производство АФК в данных клетках, однако изменение активности АДА играет ключевую роль в регуляции соотношения концентрации аденозина и инозина, а так же уровня АТФ в эритроците и его функциональной активности.

Изучив изменение показателей СРО в эритроцитах при старении, нами было установлено достоверное повышение уровня NO_x во 2-й возрастной группе, относительно 1-й ($p=0,003$), а так как NO_x в нормальных условиях считаются продуктами метаболизма NO в клетках, можно судить и о повышении уровня NO в эритроцитах при старении [333]. Известно, что NO участвует в регуляции трансмембранного транспорта ионов в эритроците, стимулируя работу Na^+/K^+ -АТФазы, Ca^{2+} -АТФазы (поддержание мембранного потенциала), тем самым регулируя деформируемость эритроцита и его целостность, следовательно повышение его уровня, можно рассматривать как положительный эффект при старении у здоровых людей [333]. Однако одной из основных нитрит-редуктазных систем в эритроците выступает Hb, восстанавливающий NO_x в NO с образованием MetHb и АФК, при этом NO образует стабильные комплексы с Hb, что в свою очередь будет способствовать повышению прооксидантного статуса клетки при старении, а так же нарушению транспортной функции эритроцитов, тем самым внося существенный вклад в развитие гемической и тканевой гипоксии с возрастом [151]. Сходные данные были получены ранее другими авторами. [334; 335].

Ранее авторами выявлена интересная связь между NO, аденозином и активностью КО: установлено, что выход аденозина из клетки в условиях гипоксии стимулирует повышение уровня NO, тем самым выступая в качестве вазодилататора, что согласуется с нашими данными о возрастном снижении АДА и повышении NO_x в эритроците. В свою очередь, повышение уровня NO может

приводить к торможению активности КО [111], при этом КО - единственный метаболический источник мочевой кислоты, проявляющей сильные антиоксидантные свойства, поэтому повышение или снижение активности КО при различных состояниях может играть двойственную роль [336; 337]. Проведя корреляционный анализ в эритроцитах здоровых людей, нами были выявлены слабые отрицательные связи между АДА/ NO_x ($r=-0,45$, $p<0,05$ только для 1-й возрастной группы) и АДА/КО ($r=-0,36$, $p<0,05$ для 1-й возрастной группы и $r=-0,41$, $p<0,05$ для 2-й возрастной группы), что нашло подтверждение в описанных ранее результатах.

При этом нами так же установлено достоверное повышение всех продуктов ОМБ в эритроцитах при старении: КДНФГ(нейтр) при $p=0,004$, АДНФГ(нейтр) при $p=0,022$, КДНФГ(основ) при $p=0,030$ и АДНФГ(основ) при $p=0,0001$ (Рисунок 4.2.1).

В свою очередь стимуляция ОМБ в эритроцитах способствует образованию белковых агрегатов за счёт межмолекулярных связей (дисульфидных), в частности в молекуле Нб, а так же фрагментацией белков с распадом на низкомолекулярные компоненты, в связи с чем, они становятся более подверженными протеолизу и конформационным изменениям [338]. Следовательно, можно предположить, что усиление процессов ОМБ в эритроците сопровождается изменениями интенсивности обменных процессов организма, способствуя развитию ОС в эритроцитах при старении организма.

Проанализировав работу АОС, было обнаружено статистически значимое снижение всех исследуемых ферментативных активностей в эритроцитах после 59 лет. Установлено достоверное снижение активности СОД с возрастом (при $p=0,0001$). В группе 60-79 лет активность фермента на 21% была ниже по сравнению с группой 40-59 лет. При этом активность ГПО имела такую же тенденцию к изменению с возрастом. Во 2-й группе активность данного фермента была достоверно ниже, чем в 1-й возрастной группе (при $p=0,0001$), что указывает на ослабление ферментативной линии АОЗ эритроцитов при старении.

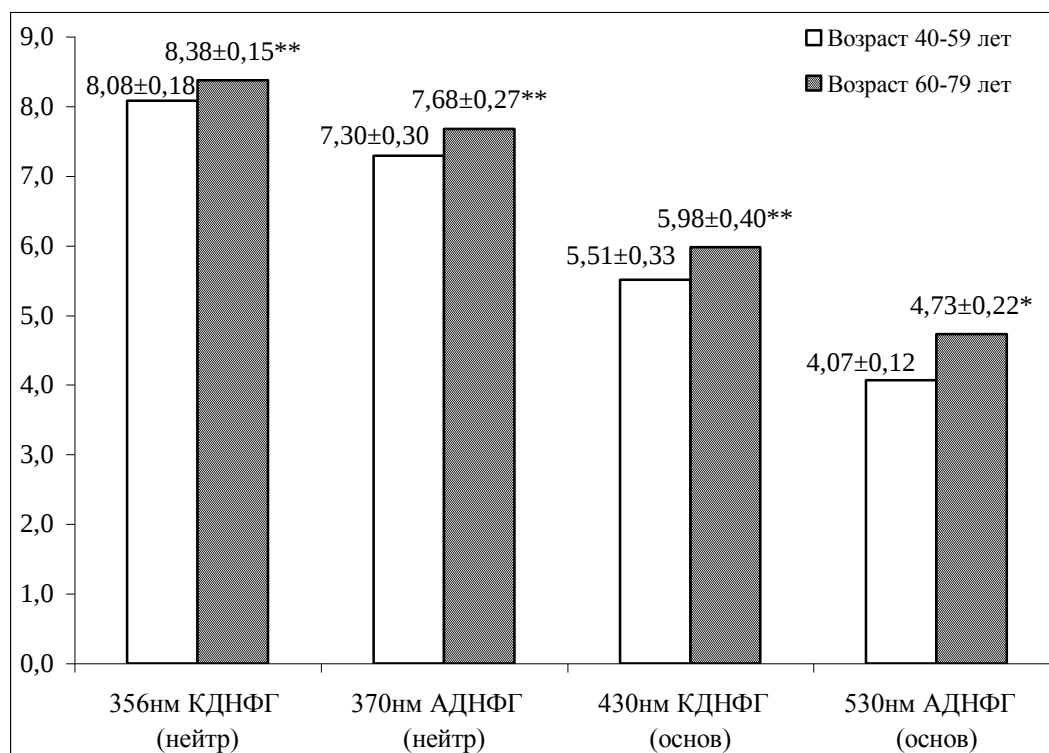


Рис. 4.2.1. Уровень продуктов ОМБ в эритроцитах в зависимости от возраста ($M \pm \sigma$). По оси Y - концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов в эритроцитах в мкмоль/мг, по оси X - длины волн при которых регистрировались продукты ОМБ.

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p < 0,001$; ** - значения показателя достоверны при $p < 0,05$.

Одновременное снижение активностей СОД и ГПО приводит к увеличению продукции O_2^- в эритроците, способствуя усилению ПОЛ в мембранах и снижению функциональной активности мембранных белков и ферментов. Нарушение контроля над процессами свободнорадикального окисления ведёт к усиленной деградации мембран эритроцитов, повышению их проницаемости и снижению транспортной функции Hb [339]. Как известно, с возрастом отмечается снижение способности эритроцитов сохранять ионный гомеостаз цитоплазмы: в эритроцитах пожилых людей наблюдается повышение уровня Na^+ и, как следствие, - некоторое набухание клетки, которое также уменьшает способность эритроцитов к динамическим деформациям [308; 340].

Известно, что эритроциты особенно уязвимы к ОС из-за постоянного воздействия не только эндогенно-генерируемых АФК, но и экзогенных АФК, таких как H_2O_2 и NO , поступающих из плазмы крови, что в свою очередь еще больше подавляет ферментативное звено АОС, особенно глутатионовую линию защиты [341]. Так как одними из основных генераторов $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 в плазме крови считаются ферменты распада пуринов, при проведении нами корреляционного анализа между активностями ферментов пуринового катаболизма в плазме крови и ферментативными представителями АОС в эритроцитах, обнаружена слабая связь у АДА/СОД ($r=-0,37$, $p<0,05$), КО/СОД ($r=-0,37$, $p<0,05$) и КО/ГПО ($r=-0,38$, $p<0,05$), что указывает на косвенное влияние внеклеточных ПОС на АОС эритроцита. Так же снижение активности ГПО с возрастом может быть связано с нарушением транспорта Se из плазмы крови в эритроциты для включения в ГПО, которое происходит при старении организма или на фоне развития возрастных патологий [342].

В других работах установлено, что повышение уровня NOx приводит к избыточному образованию MetHb, для нейтрализации которого используется НАДН, в результате происходит увеличение скорости гликолитического пути и снижение скорости пентозо-фосфатного пути, а значит и снижение уровня НАДФН, следовательно, угнетается работа ГПО, т.к. не происходит восстановление окисленного глутатиона глутатионредуктазой [341] или же вследствие нитрозилирования глутатиона под действием NOx [343], что получило подтверждение в наших результатах о возрастном снижении активности ГПО и повышение уровня NOx в эритроцитах. Так же доказательством этому послужил проведенный нами корреляционный анализ, где обнаружена обратная отрицательная связь между NOx /ГПО ($r=-0,36$, $p<0,05$) - для 1-й возрастной группы и $r=-0,39$, $p<0,05$ для 2-й возрастной группы здоровых людей.

Еще одним интересным фактом является снижение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у более пожилых людей, что способствует угнетению АОС клетки за счет снижения активности ГПО, вследствие уменьшения концентрации восстановленного глутатиона, из-за недостатка НАДФН, приводя к окислению

тиоловых групп белков, ослаблению антиоксидантного статуса эритроцитов и изменению их метаболизма [344].

Нами установлено, что повышение внеклеточных уровней продуктов ОМБ в плазме крови, так же способно оказывать подавляющее действие на ферментативное звено АОС, причем это еще более выражено происходит при старении. Установлена обратная взаимосвязь между продуктами ОМБ в плазме крови и активностью эритроцитарной СОД: в 1-й возрастной группе корреляция составила - для КДНФГ(нейтр) $r=-0,42$, $p<0,05$, АДНФГ(нейтр) $r=-0,52$, $p<0,05$, КДНФГ(основ) $r=-0,69$, $p<0,05$ и АДНФГ(основ) не установлено, а во 2-й возрастной группе - для КДНФГ(нейтр) $r=-0,72$, $p<0,05$, АДНФГ(нейтр) $r=-0,56$, $p<0,05$, КДНФГ(основ) $r=-0,61$, $p<0,05$ и АДНФГ(основ) так же не установлено.

Следовательно, ферментативное звено АОС эритроцита испытывает постоянное напряжение, не только в виду окислителей эндогенной природы, но так же и за счет внеклеточных представителей, что усугубляется при старении организма.

В виду нарушения работы ГПО ослабевает способность эритроцитов нейтрализовать H_2O_2 , которая выступает ингибитором для СОД и каталазы. Снижение ключевых ферментов АОЗ способствует накоплению $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 , которые подвергаются реакции Фентона с образованием еще более сильных окислителей, способствуя стимуляции ПОЛ и ОМБ, вызывая снижение клеточного транспорта, энергетического метаболизма [41], приводя к дисфункции эритроцитов, снижению их выживаемости, тем самым оказывая существенный вклад в развитие ишемической болезни сердца, онкозаболеваний и других возрастных патологий [345].

Проведя корреляционный анализ изменений показателей в эритроцитах в зависимости от возраста, нами еще раз продемонстрировано влияние старения на ферментативные системы АОЗ, а так же на ферментативное и не ферментативное звено ПОС: обнаружены обратные, отрицательные взаимосвязи у АДА ($r=-0,81$, $p<0,001$), СОД ($r=-0,67$, $p<0,001$) и ГПО ($r=-0,66$ ($p<0,001$)) с возрастом, тогда как уровень NOx и концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов в эритроцитах прямо и

достоверно коррелируют с возрастом: для NOx $r=0,33$, $p<0,05$, для КДНФГ(нейтр) $r=0,52$, $p<0,05$, АДНФГ(нейтр) $r=0,66$, $p<0,05$, КДНФГ(основ) $r=0,58$, $p<0,05$ и АДНФГ(основ) $r=0,80$, $p<0,001$. Хотелось бы отметить, что АДА и АДНФГ(основ) имеют высокую степень взаимосвязи с возрастом.

Проведя сравнительный анализ на выявление связи между показателями ПОС и АОС в эритроцитах при старении организма, нами установлена статистически значимая прямая взаимосвязь между АДА/СОД в двух возрастных группах ($r=0,35$, $p<0,05$ и $r=0,44$, $p<0,05$ соответственно), однако по силе она оказалась слабой как в 1-й, так и во 2-й группе, а значит возраст ни оказывает влияние на связь между этими показателями в эритроцитах.

Так же в эритроцитах здоровых людей возрастом от 40-59 лет нами выявлены слабые взаимосвязи: прямая для СОД/ГПО ($r=0,47$, $p<0,05$) и обратная у NOx/ГПО ($r=-0,36$, $p<0,05$), которые после 60 лет не наблюдаются. Следовательно, при старении организма происходит потеря связи между этими показателями и возникает дисбаланс между первой и второй линией АОЗ.

Есть мнения, о том, что некоторые из показателей ПОС и АОС в плазме крови и клетках могут быть взаимосвязаны между собой [342; 345]. На основании вышесказанного, нами было проведено сравнение между однотипными исследуемыми показателями в плазме крови и в эритроцитах в двух возрастных группах (т.е. соотношение плазма/эритроцит).

При сравнительном анализе изменения активности АДА в плазме крови и эритроцитах здоровых людей в 2-х возрастных группах, обнаружена слабая взаимосвязь только для людей в возрасте 40-59 лет ($r=-0,40$, $p<0,05$), а значит после 60 лет данная связь между ферментами пропадает. Следует обратить внимание, что в плазме крови активность АДА с возрастом повышается, в то время как в эритроците она достоверно снижается после 59 лет, при этом в группе 40-59 лет активность АДА в эритроците в 5,5 раза выше, чем в плазме, а в группе 60-79 лет в 3,5 раза. Следовательно, имеет свои особенности возрастная динамика изменения активности этого фермента.

Похожая динамика изменения наблюдалась и для КО: в группе 40-59 лет активность КО в эритроците в 20 раз была выше, чем в плазме крови, а в группе 60-79 лет в 13,5 раза, при этом в плазме крови активность фермента с возрастом повышается, а в эритроцитах достоверно не изменяется. Взаимосвязь между активностью КО в плазме и эритроцитах обнаружена только после 60 лет ($r=-0,42$, $p<0,05$), значит преобладает только в более пожилом возрасте.

Для уровня NO_x достоверных отличий в плазме крови и эритроцитах, как и взаимосвязей, установлено не было ни в 1-й возрастной группе, так ни во 2-й, причем концентрация NO_x в плазме крови и эритроцитах была практически одинаковая.

При сравнительном анализе изменения активности СОД в плазме крови и эритроцитах, установлено, что в группе 40-59 лет активность СОД в эритроците в 56 раз выше, чем в плазме крови, а в группе 60-79 лет в 51 раз. При этом как в плазме крови, так и в эритроцитах происходит снижение активности фермента с возрастом. Однако при проведении корреляционного анализа взаимосвязи между плазменной активностью СОД и эритроцитарной нами обнаружено не было.

Так же установлено, что активность ГПО в эритроците в 60 раз выше, чем в плазме крови, как в группе 40-59 лет, так и в группе 60-79 лет (т.е. независимо от возраста). При этом в плазме крови и эритроцитах активность фермента с возрастом снижается. Так же обнаружено что активность фермента в плазме крови прямо коррелирует с его эритроцитарной активностью в двух возрастных группах, хотя и слабо: $r=0,41$, $p<0,05$ для 1-й возрастной группы и $r=0,46$, $p<0,05$ - для 2-й.

В группе 40-59 лет уровень продуктов ОМБ в эритроцитах выше, чем в плазме крови, так содержание КДНФГ (нейтр) в 5 раз, АДНФГ (нейтр) в 5,7 раз, КДНФГ (основ) в 11,7 раз и АДНФГ (основ) в 14,1 раза выше. В группе 60-79 лет содержание показателей ОМБ так же было выше в эритроцитах по сравнению с плазмой крови: КДНФГ (нейтр) в 4,5 раза, АДНФГ (нейтр) в 5,2 раза, КДНФГ (основ) в 9,5 раза и АДНФГ (основ) в 14 раз выше. Однако проведя статистический анализ сравнения метаболитов ОМБ в плазме крови и в

эритроцитах, нами не было обнаружено взаимосвязей ни для одного из продуктов, как в группе возрастом 40-59 лет, так и для группы 60-79 лет, что снова доказывает утверждение о внутриклеточном и внеклеточном происхождении карбонильных производных белков [302].

Таким образом, нарушение работы АОС в эритроцитах имеет возрастные особенности, влияющие на жизнеспособность красной клетки крови и её функциональную полноценность. В эритроцитах людей более пожилого возраста, наблюдаются перестройки системы антирадикальной защиты, особенно глутатионового звена, тесно связанные с изменениями в пуриновом обмене, действующие друг на друга по принципу обратной связи. В свою очередь повышение уровня NO_x и 2,4-динитрофенилгидразонов с возрастом при одновременном снижении ферментов АОЗ, является показателем усиления прооксидантного статуса эритроцитов, способствуя дисбалансу в АОС, снижению биоэнергетики, усилению ПОЛ и ОМБ с последующим окислением Нб и разрушением клеточных мембран, что приводит к нарушению транспорта кислорода в ткани, возникновению тканевой и гемической гипоксии, и как следствие - развитию патологических состояний при старении [69].

При определении активностей ключевых ферментов распада пуриновых нуклеотидов в эритроцитах у больных РЖ было установлено достоверное снижение активности АДА (при $p=0,047$), в группе 60-79 лет активность фермента была ниже, относительно группы 40-59 лет. При этом обнаружено, что активность КО с возрастом растет (Таблица 4.2.2). Во 2-й возрастной группе активность данного фермента была достоверно выше, чем в 1-й группе (при $p=0,0001$).

Снижение активности АДА в эритроцитах крови согласуется с известными данными об увеличении уровня аденозина [346], за счет снижения эритроцитарных активностей ферментов его катаболизма, в условиях гипоксии, характерной для РЖ [347] или же выходом этих ферментов из клетки в плазму [30] за счет мембранной дисфункции эритроцитов [307]. Помимо того, что аденозин оказывает вазодилатирующее свойство, является регулятором клеточного уровня глутатиона, Ca^{2+} , кальмодулина и других не менее важных

соединений [69] для эритроцитов, что носит приспособительный характер для клеток опухоленосителей, но при этом, избыточное накопление аденозина у больных РЖ [307] через стимуляцию аденозиновых рецепторов $A2\alpha$ приводит к экспрессии фермента НАДФН-оксидазы [348] который генерирует $O_2^{\cdot -}$, тем самым способствуя повышению уровня АФК в клетке с последующим формированием ОС [349]. Доказательством этого факта является обнаруженное нами возрастное повышение активности КО, тем самым отражая усиление прооксидантного статуса клетки за счет ферментативных систем.

Таблица 4.2.2. Показатели обмена ПОС, АОС и СРО в эритроцитах больных РЖ в зависимости от возраста ($M \pm \sigma$)

Показатели	1-я возрастная группа (n=18)	2-я возрастная группа (n=17)
АДА (нмоль/мин*мг)	7,18±1,28	6,01±2,01**
КО (мкмоль/мин*мг)	7,75±0,78	10,5±1,76*
СОД (ед/мг)	9,87±3,33	7,95±1,76**
ГПО (мкмоль/мин*мг)	231±46,1	186±30,7**
NO _x (мкмоль/л)	8,14±2,49	9,26±3,75

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p < 0,001$; ** - значения показателя достоверны при $p < 0,05$.

Проведя корреляционный анализ изменений показателей в эритроцитах в зависимости от возраста больных РЖ установили, что АДА имеет обратную взаимосвязь с возрастом ($r = -0,42$, $p < 0,05$), тогда как КО прямо коррелирует с возрастом ($r = 0,50$, $p < 0,05$), но сила, как мы видим, связь между этими ферментами и возрастом оказалась слабой.

Следовательно, в эритроцитах больных РЖ наблюдается дисбаланс в работе ферментов катаболизма пуринов и что самое интересное в виду того, что основным поставщиком субстрата – ксантина (гипоксантина) для КО в эритроците считается распад адениловых нуклеотидов [289], происходящий в

основном за счет катаболизма аденозина - АДА, активность которой снижается с возрастом, соответственно у онкобольных людей в эритроцитах повышение активности КО, возможно связано с усиленным окислением других соединений, реагирующих с ферментом [291; 292] или же иными источниками образования ксантина (гипоксантина), а так же усиленным поступлением этих субстратов из внеклеточных сред в эритроцит при канцерогенезе [290].

Однако проведя корреляционный анализ на выявление связи между АДА/КО в эритроцитах больных РЖ, получили интересный результат – у больных в возрасте 40-59 лет взаимосвязи не установлено, тогда как у онкобольных, возрастом 60-79 лет, обнаружена обратная, сильная взаимосвязь между ферментами ($r=-0,79$, $p<0,001$). При этом в описанных нами ранее результатах такая же связь была обнаружена и у здоровых людей, но по силе она была слабой и наблюдалась в 2-х возрастных группах.

Сравнив динамику возрастных изменений ферментов ПОС в эритроцитах у онкобольных людей и условно-здоровых, было установлено, что у людей, не имеющих онкопатологий активность АДА при старении снижается на 22% и активность КО достоверно не изменяется, тогда как у больных РЖ - активность АДА снижается на 16%, активность КО повышается на 26%.

Отсюда мы наблюдаем, что на изменение активности АДА в эритроцитах возраст у здоровых и онкобольных людей имеет практически одинаковое влияние, тогда как активность КО при старении изменяется только у онкологических больных, значит, определение ее активности может быть использована как маркер патологического старения.

Сравнив активности ферментов катаболизма пуринов в эритроцитах у онкобольных людей и здоровых добровольцев в зависимости от возраста получили следующие результаты: у больных РЖ возрастом 40-59 лет активность АДА в 1,7 раза ниже ($p<0,001$), КО в 1,3 раза выше ($p<0,001$) относительно здоровых людей, а в группе возрастом 60-79 лет активность АДА ниже в 1,6 раз ($p<0,001$) и КО выше в 1,8 раза ($p<0,001$) соответственно.

Соответственно активность АДА в эритроцитах у людей, имеющих онкозаболевания значительно ниже, чем у условно-здоровых, при этом разница между активностями зависит от возраста исследуемых пациентов. В тоже время активность КО в эритроцитах у больных РЖ выше относительно людей, не имеющих рака и это разница так же зависит от возраста.

Так как снижение активности АДА в эритроците приводит к внеклеточному накоплению аденозина [327], что является одним из первых шагов в защитном ауто- и паракринном каскадном сигнале, направленном на ограничение повреждения клеток в ответ на неблагоприятные условия, включая гипоксию или ишемию [293], и в первую очередь для стимуляции выработки NO при гипоксии. Эритроциты являются переносчиками аденозина в ткани, значит, снижение АДА в эритроците выступает как приспособительный механизм сохранения аденозина при старении организма, когда ухудшается оксигенация тканей, тем самым, по-видимому, вызывая программу, которая сдвигает клеточный фенотип к увеличению внутриклеточного аденозина [293].

Следовательно, снижение активности АДА, наблюдаемое под влиянием старения и опухолевого процесса, способствует активации приспособительного механизма защиты клеток крови, направленного на поддержание жизнеспособности опухоли. Однако повышение активности КО, в свою очередь, будет способствовать усилению прооксидантного статуса клетки, с более выраженными ее патологическими изменениями еще больше приводя к озлокачествлению.

Таким образом, исследование изменения активности АДА в эритроцитах при старении может расцениваться как маркер физиологического и патологического старения и использоваться для диагностики РЖ с учетом возраста пациентов. В то же время, изменение активности КО в эритроцитах с возрастом, можно расценивать исключительно как маркер патологического старения, присущий больным РЖ.

Исследовав возрастные изменения уровня NO_x в эритроцитах больных РЖ, установлено, что у больных РЖ содержанием этих метаболитов с возрастом достоверно не изменяется (Таблица 4.2.2).

Сравнив интенсивность возрастных изменений уровня NO_x у больных РЖ и у здоровых добровольцев, установили, что у людей, не имеющих онкологических заболеваний, содержание NO_x в эритроцитах повышается на 20%, тогда как у больных РЖ, как было сказано выше, не изменяется.

Отдельно хотелось бы отметить тот факт, что содержание NO_x в эритроцитах у онкобольных людей значительно выше, чем у людей не имеющих онкозаболеваний. Так у больных РЖ концентрация NO_x в 1-й возрастной группе выше в 2,9 раза (при $p < 0,001$), а во 2-й группе – в 2,6 раза (при $p < 0,001$) относительно группы здоровых людей.

Известно, что в условиях гипоксии усиливается диффузия NO_x из плазмы крови в эритроциты [333], следовательно, концентрация данных метаболитов в клетке будет повышаться, однако в зависимости от типа патологического процесса эритроциты по-разному проявляют свою сорбционную способность [350]. Сравнив динамику изменений NO_x в плазме крови и эритроцитах при старении организма, обнаружен интересный результат. У больных РЖ с возрастом в плазме крови уровень NO_x снижается, а в эритроцитах достоверно не изменяется. Авторами продемонстрировано, что повышение уровня NO_x в эритроцитах связано с их поступлением из внеклеточных сред [341]. На основании этого предположения, мы провели корреляционный анализ на выявлении связи между содержанием NO_x в плазме крови и эритроцитах у больных РЖ с учетом возрастных критериев. Действительно такая взаимосвязь была установлена но только у больных РЖ возрастом 40-59 лет ($r = -0,51$, $p < 0,05$).

Однако мы все же предполагаем, что возрастные изменения содержания NO_x в эритроцитах в большей степени зависят от метаболизма этих молекул в клетке. Возможно, такой результат связан с повышением концентрации аденозина стимулирующего нитрат(нитрит)-редуктазную систему эритроцитов [112], активность которой усиливается в условиях гипоксии, характерной для РЖ [351],

однако почему не происходит изменений концентрации NO_x в эритроцитах у больных РЖ с возрастом, остается пока не совсем понятно. В литературе есть сведения, об одновременном повышении активности КО и уровня NO_x на фоне развития ОС в эритроцитах при старении и канцерогенезе [264].

Исследовав изменения активностей ферментативного звена АОС в эритроцитах с возрастом у больных РЖ установлено достоверное снижение активности СОД (при $p=0,043$) и ГПО (при $p=0,0017$) (Таблица 4.2.1). Проведя корреляционный анализ между исследуемыми показателями АОЗ эритроцитов крови и возрастом больных РЖ, установлена взаимосвязь с возрастом только для ГПО $r=-0,48$ ($p<0,05$) у больных РЖ.

В литературе так же имеются разнообразные сведения о возрастном изменении ферментов АОЗ, причем наиболее выраженные изменения СОД и ГПО в эритроцитах онкобольных наблюдались в зависимости от локализации и распространенности опухолевого процесса [125; 142; 146; 308; 352]. Известно, что чем больше образуется O_2^- в клетке, тем сильнее происходит стимуляция СОД для его нейтрализации [125; 126; 137]. При старении повышается содержание АФК в эритроцитах у онкобольных людей, соответственно увеличивается содержание окисленных соединений, при чем в эритроцитах усиливается образование лактата [4; 62; 347], следовательно происходит изменение кислотности среды. Закисление среды в клетках приводит к снижению активности ГПО, в результате чего усиливается цитотоксическое действие H_2O_2 на клетку [127; 132], а так же подавляется активность СОД [162; 301; 353; 354].

Сравнив динамику возрастных изменений СОД и ГПО в эритроцитах у здоровых людей, больных РЖ, обнаружили, что у больных РЖ при старении организма в эритроцитах происходит достоверное снижение активности СОД и ГПО на 19% ($p<0,05$), тогда как у здоровых добровольцев при старении активность СОД снижается на 21% ($p<0,001$) и ГПО на 13% ($p<0,001$). Проведя корреляционный анализ между исследуемыми показателями АОЗ эритроцитов крови и возрастом больных РЖ, установлена взаимосвязь с возрастом только для ГПО $r=-0,48$ ($p<0,05$) у больных РЖ.

Важно отметить, что активность СОД в эритроцитах у больных РЖ достоверно не отличается от здоровых добровольцев, независимо от возрастных групп, тогда как активность ГПО у больных РЖ в 1-й возрастной группе в 1,9 раза ($p < 0,001$) и во 2-й группе - в 2 раза ($p < 0,001$) ниже, относительно людей, не имеющих онкопатологий.

Следовательно, у онкобольных людей по сравнению со здоровыми старение оказывает различное влияние на динамику изменения ферментативных систем АОЗ. Так изменение активности СОД в эритроцитах у больных РЖ происходит менее активно или же совсем не поддается влиянию возраста, а активность ГПО наоборот подвергается более сильному влиянию старения у онкологических больных, по сравнению со здоровыми людьми.

Ввиду того, что СОД более устойчива к окислительному повреждению в отличие от ГПО [127; 297], активность которой снижается в эритроцитах при старении организма, как у онкобольных, так и у здоровых людей, есть данные о повышении активности СОД под действием NO [300; 355]. Так как в эритроцитах больных РЖ происходит усиленная генерация $O_2^{\cdot -}$ за счет КО одновременно с повышением уровня NO, о чем свидетельствует возрастной рост концентрации NO_x , которые способны достаточно быстро реагировать между собой [298] с образованием $ONOO^-$ - еще более агрессивного окислителя, способного необратимо повреждать мембрану эритроцитов, приводя к их деструкции [113; 299]. Соответственно, повышение активности СОД будет выступать в качестве поглотителя $O_2^{\cdot -}$ для нейтрализации образования $ONOO^-$ [300; 301]. Однако ввиду снижения активности ГПО, не будет происходить нейтрализация H_2O_2 , который является ингибитором для СОД [127; 301]. Следовательно, СОД в эритроцитах онкобольных людей, возможно, контролирует содержание различных АФК в зависимости от их назначений и состояния ОС, выполняя не только защитную функцию, но и регуляторную, выступая ключевым звеном системы регуляции клеточной концентрации $O_2^{\cdot -}$, нарабатываемого в зависимости от типа канцерогенеза.

И действительно, проведя корреляционный анализ на выявления связи между активностью ферментов АОС и содержанием NO_x в эритроцитах, с учетом возраста, у больных РЖ была обнаружена прямая положительная взаимосвязь между $\text{NO}_x/\text{СОД}$ ($r=0,57$, $p<0,05$ для 1-й возрастной группы и $r=0,49$, $p<0,05$ для 2-й возрастной группы), что подтвердило описанное ранее. При этом нами так же обнаружена отрицательная обратная связь между $\text{NO}_x/\text{ГПО}$ ($r=-0,68$, $p<0,05$ для 1-й возрастной группы и $r=-0,64$, $p<0,05$ для 2-й возрастной группы), тем самым демонстрируя ингибирующее действие NO на активность ГПО [127; 356; 357, 358].

Исследовав влияние возраста на изменение уровня 2,4-динитрофенилгидразонов в эритроцитах онкобольных пациентов, было установлено, что у больных РЖ содержание продуктов ОМБ при старении достоверно не изменяется (Рисунок 4.2.2), хотя и прослеживается динамика роста изучаемых метаболитов.

Сравнив интенсивность возрастных изменений содержание 2,4-динитрофенилгидразонов у здоровых людей и больных РЖ, обнаружили, что у здоровых добровольцев уровень 2,4-динитрофенилгидразонов повышается на 4% ($p<0,05$) для КДНФГ(нейтр), на 5% ($p<0,001$) для АДНФГ(нейтр), на 8% ($p<0,05$) для КДНФГ(основ) и на 13% ($p<0,001$) для АДНФГ(основ), а у больных РЖ - КДНФГ(нейтр) на 16%, АДНФГ(нейтр) на 11%, КДНФГ(основ) на 19% и АДНФГ(основ) на 16% ($p<0,001$ для всех) соответственно. Получили ожидаемый результат, у больных РЖ в эритроцитах при старении стимуляция ОМБ происходит интенсивней.

Проведя сравнение между концентрацией продуктов ОМБ в эритроцитах у здоровых людей и больных РЖ, установили, что у больных РЖ содержание всех 2,4-динитрофенилгидразонов выше в 1,2 раза ($p<0,001$), как в 1-й, так и во 2-й возрастной группе, относительно группы здоровых добровольцев.

Полученные данные еще раз указывают на то, что у больных РЖ в эритроцитах крови более высокое содержание продуктов ОМБ по сравнению со

здоровыми людьми, хотя и имеет менее выраженную динамику возрастных изменений по сравнению со здоровыми людьми.

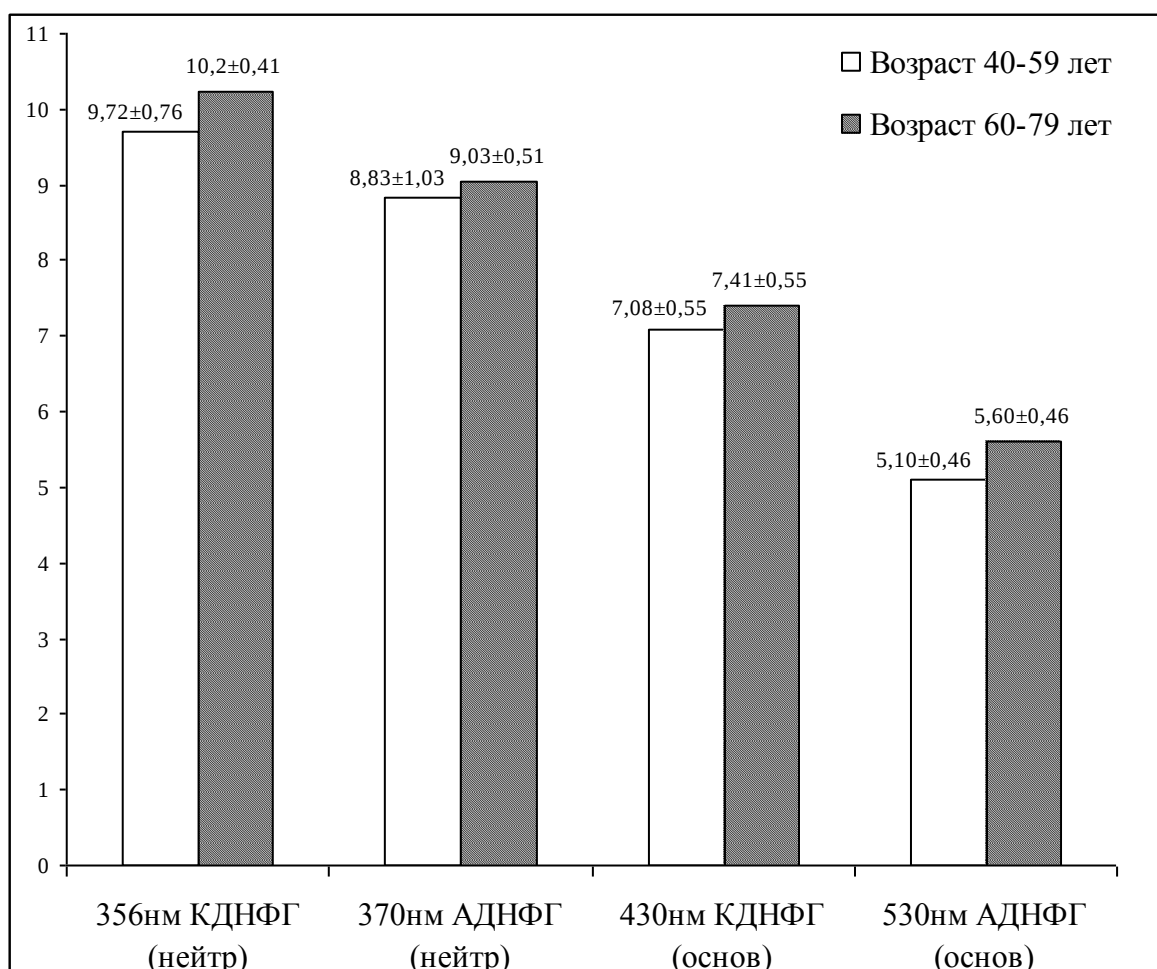


Рис. 4.2.2. Уровень продуктов ОМБ у больных РЖ в эритроцитах в зависимости от возраста ($M \pm \sigma$). По оси Y - концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов в эритроцитах в мкмоль/мг, по оси X - длины волн при которых регистрировались продукты ОМБ.

Проведя корреляционный анализ на выявление связи между 2,4-динитрофенилгидразонами и ферментами АОС с учетом возраста, у больных РЖ возрастом 40-59 лет, нами были обнаружены обратные сильные взаимосвязи между ОМБ/ГПО ($r = -0,73$, $p < 0,05$ для КДНФГ(нейтр), $r = -0,86$, $p < 0,05$ для АДНФГ(нейтр), $r = -0,73$, $p < 0,05$ для АДНФГ(основ)), что еще раз доказывает

снижение второй линии ферментативной защиты эритроцита от АФК при старении на фоне усиления прооксидантного статуса клетки.

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что у больных РЖ при старении в эритроцитах происходит снижение работы ферментативного звена АОС и усиление ПОС, что проявляется повышением активности КО и снижением активностей СОД и ГПО с возрастом. Обнаруженное снижение активности АДА в эритроцитах сочетается с гипоксией, характерной для РЖ, сохраняя внеклеточный уровень аденозина, тем самым выступая как приспособительный механизм защиты клеток крови, активирующийся в условиях гипоксии.

При этом у больных РЖ установлено снижение всех исследуемых показателей АОС с возрастом, в нашем случае - СОД и ГПО. У больных РЖ в эритроцитах происходит повышение показателей ферментативного звена ПОС, на фоне снижения АОЗ.

В результате дальнейшего корреляционного анализа обнаружены взаимосвязи и между другими показателями ПОС, АОС и СРО с учетом возраста, помимо вышесказанных. Установлено, что в эритроцитах больных РЖ от возраста зависят соотношения между АДА/ГПО ($r=0,71$, $p<0,05$) и ГПО/ОМБ ($r=-0,73$, $p<0,05$ для КДНФГ(нейтр), $r=-0,86$, $p<0,05$ для АДНФГ(нейтр), $r=-0,73$, $p<0,05$ для АДНФГ (основ)) с высокой степенью взаимосвязи, характерные для больных возрастом 40-59 лет, в то время как у больных в возрасте 60-79 лет наблюдаются соотношения между: АДА/КО ($r=-0,78$, $p<0,001$), КО/ОМБ ($r=-0,82$, $p<0,05$ для КДНФГ(нейтр), $r=-0,86$, $p<0,05$ для АДНФГ (основ), для КДНФГ(основ)), NOx/ОМБ ($r=0,87$, $p<0,05$ для КДНФГ(нейтр), $r=0,82$, $p<0,05$ для АДНФГ(нейтр), $r=0,81$, $p<0,001$ для КДНФГ(основ)) - тесно связанные между собой, а так же КО/СОД ($r=-0,69$, $p<0,05$), КО/ГПО ($r=0,57$, $p<0,05$), имеющие среднюю степень взаимосвязи. Одновременно в двух возрастных группах у больных РЖ в эритроцитах обнаружены взаимосвязи между АДА/NOx ($r=-0,67$, $p<0,05$ для группы в возрасте 40-59 лет и $r=-0,76$, $p<0,001$ для группы в возрасте 60-79 лет), СОД/ГПО ($r=-0,65$, $p<0,05$ для группы в возрасте 40-59 лет и $r=-0,62$, $p<0,05$ для группы в возрасте 60-79 лет), ГПО/NOx ($r=-0,63$, $p<0,05$ для группы в возрасте 40-

59 лет и $r=-0,55$, $p<0,05$ для группы в возрасте 60-79 лет) - имеющие среднюю степень взаимосвязи в двух возрастных группах, а так же корреляции с высокой степенью взаимосвязи в двух возрастных группах между АДА/СОД ($r=-0,77$, $p<0,001$ для группы в возрасте 40-59 лет и $r=-0,89$, $p<0,001$ для группы в возрасте 60-79 лет), АДА/ОМБ ($r=-0,78$, $p<0,05$ для КДНФГ(нейтр), $r=-0,83$, $p<0,05$ для АДНФГ(нейтр), $r=-0,92$, $p<0,001$ для КДНФГ(основ) и $r=-0,91$, $p<0,05$ для АДНФГ(основ) для группы в возрасте 40-59 лет и ($r=-0,77$, $p<0,05$ для КДНФГ(нейтр), $r=-0,94$, $p<0,05$ для КДНФГ(основ) для группы в возрасте 60-79 лет), СОД/NOx ($r=0,73$, $p<0,05$ для группы в возрасте 40-59 лет и $r=0,82$, $p<0,001$ для группы в возрасте 60-79 лет), СОД/ОМБ ($r=0,88$, $p<0,05$ для КДНФГ(нейтр), $r=0,92$, $p<0,05$ для АДНФГ(нейтр), $r=0,93$, $p<0,001$ для КДНФГ(основ) и $r=0,94$, $p<0,001$ для АДНФГ(основ) для группы в возрасте 40-59 лет и $r=0,96$, $p<0,05$ для КДНФГ(нейтр), $r=0,80$, $p<0,05$ для АДНФГ(нейтр), $r=0,77$, $p<0,001$ для КДНФГ(основ) и $r=0,82$, $p<0,001$ для АДНФГ(основ) для группы в возрасте 60-79 лет), следовательно, связи между этими показателями от возраста не зависят.

Таким образом, возрастные изменения показателей обмена ПОС, АОС и СРО в эритроцитах онкобольных пациентов, имеют более выраженный и разнонаправленный характер, по сравнению со здоровыми людьми. Больным РЖ присуще состояние ОС в эритроцитах, которое имеет более выраженный характер и усиливается при старении. У больных РЖ в эритроцитах при старении организма наблюдается дисбаланс в работе ферментов катаболизма пуринов, при этом повышение активности КО в эритроцитах может выступать как маркер патологического старения характерный для РЖ. Так же обнаружены взаимосвязи между ферментами катаболизма пуриновых нуклеотидов, АОЗ и показателями СРО, которые способны оказывать друг на друга регуляторное действие, находящимися под влиянием возраста и канцерогенеза. При всем при этом определение отдельных из исследуемых показателей обмена ПОС, АОС и СРО могут выступать не только как показатели оксидативного статуса клеток с последующим развитием ОС, биомаркерами физиологического и некоторые - патологического старения, но так же быть важным критерием для диагностики

заболеваний ассоциированных со старением, в частности РЖ. На основании вышесказанного мы предлагаем осуществлять контроль и мониторинг их изменений в плазме крови и эритроцитах в качестве диагностики возрастных изменений способствующих развитию патологических состояний.

4.3. Изменение компонентов системы свободно-радикального окисления в зависимости от возраста в гомогенатах тканей

При определении исследуемых показателей у больных РЖ в ткани СОЖ было обнаружено повышение активностей ферментов обмена пуринов с возрастом: так активности АДА и КО в группе 60-79 лет были выше, чем в группе 40-59 лет. Однако статистически значимых отличий в изменении активностей этих ферментов с возрастом не установлено (Таблица 4.3.1).

При определении исследуемых показателей у больных РЖ в ткани опухоли было установлено повышение активности АДА с возрастом, в группе 60-79 лет активность фермента была достоверно выше, чем в группе 40-59 лет ($p=0,0034$). Так же установлено, возрастное повышение активности КО в ткани опухоли больных РЖ, однако достоверных отличий между 1-й и 2-й возрастной группой обнаружено не было.

Исследуя ферментативное звено АОС в ткани СОЖ, было установлено повышение активности СОД после 59 лет, во 2-й группе активность данного фермента была выше, чем в 1-й, но достоверных отличий нами не обнаружено. При этом установлено достоверное снижение активности ГПО во 2-й группе относительно 1-й (при $p=0,005$).

В опухолевой ткани у больных РЖ, так же было установлено повышение активности СОД после 59 лет, во 2-й группе активность данного фермента была выше, чем в 1-й, но достоверных отличий в изменении активности данного фермента нами не обнаружено. При этом установлено статистически значимое снижение активности ГПО у больных РЖ в ткани опухоли с возрастом, так во 2-й

группе активность фермента была достоверно ниже, чем в 1-й группе (при $p=0,0012$).

Таблица 4.3.1. Показатели ПОС, АОС и СРО в гомогенатах тканей больных РЖ в зависимости от возраста ($M \pm \sigma$)

Показатели	СОЖ		Опухоль	
	1-я возрастная группа (n=18)	2-я возрастная группа (n=17)	1-я возрастная группа (n=18)	2-я возрастная группа (n=17)
АДА (нмоль/мин*мг)	12,1 $\pm$ 1,42	12,9 $\pm$ 2,19	22,1 $\pm$ 2,30	24,7 $\pm$ 2,61 [#]
КО (мкмоль/мин*мг)	1,99 $\pm$ 0,63	2,12 $\pm$ 0,70	6,55 $\pm$ 1,97	6,77 $\pm$ 1,61
СОД (ед/мг)	50,8 $\pm$ 3,71	54,3 $\pm$ 8,43	66,0 $\pm$ 56,5	86,1 $\pm$ 68,1
ГПО (мкмоль/мин*мг)	23,7 $\pm$ 2,20	21,7 $\pm$ 1,87*	16,1 $\pm$ 1,37	14,3 $\pm$ 1,68 [#]
NO _x (мкмоль/л)	2,01 $\pm$ 0,34	2,29 $\pm$ 0,20*	3,43 $\pm$ 0,67	3,95 $\pm$ 0,83 [#]

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p<0,05$ для ткани СОЖ; # - значения показателя достоверны при $p<0,05$ для ткани опухоли

Значит можно предположить, что в нетрансформированных и опухолевых тканях у больных РЖ происходит накопление H_2O_2 с возрастом вследствие нарушения его утилизации ГПО.

Исследуя не ферментативные показатели СРО в ткани СОЖ у больных РЖ, нами было установлено достоверное повышение уровня NO_x у более пожилых пациентов, во 2-й возрастной группе уровень NO_x был на 12% выше, чем в 1-й группе (при $p=0,007$). В ткани опухоли, нами так же установлено достоверное

повышение уровня NO_x у более пожилых пациентов, во 2-й возрастной группе уровень NO_x был на 13% выше, чем в 1-й ($p=0,00021$).

Так же у больных РЖ было обнаружено повышение уровня продуктов ОМБ с возрастом в ткани СОЖ и опухолевой. Так в ткани СОЖ в группе 60-79 лет концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов была выше, чем в группе 40-59 лет, при этом статистически значимо отличались лишь КДНФГ(нейтр) при $p=0,039$ (Рисунок 4.3.1), тогда как в гомогенатах опухолевых тканей достоверно повышались КДНФГ(нейтр) при $p=0,0009$, АДНФГ(нейтр) при $p=0,0003$, КДНФГ(основ) при $p=0,0001$ (Рисунок 4.3.2).

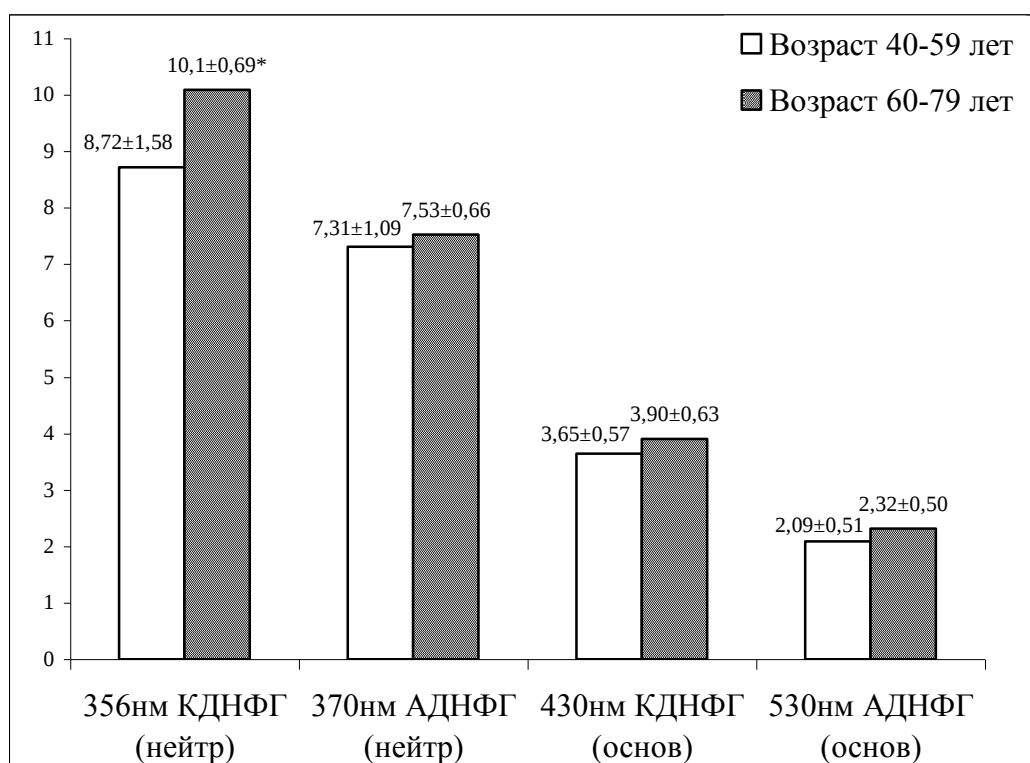


Рис. 4.3.1. Уровень продуктов ОМБ в ткани СОЖ в зависимости от возраста ($M \pm \sigma$). По оси Y - концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов в СОЖ в мкмоль/мг, по оси X - длины волн при которых регистрировались продукты ОМБ.

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p < 0,05$.

Проведя корреляционный анализ изменений показателей в гомогенатах тканей СОЖ в зависимости от возраста у больных РЖ установлена прямая

взаимосвязь между уровнем NO_x и возрастом $r=0,52$ ($p<0,05$), а так же обратно пропорциональные взаимосвязь между активностью ГПО и возрастом больных РЖ $r=-0,43$ ($p<0,05$).

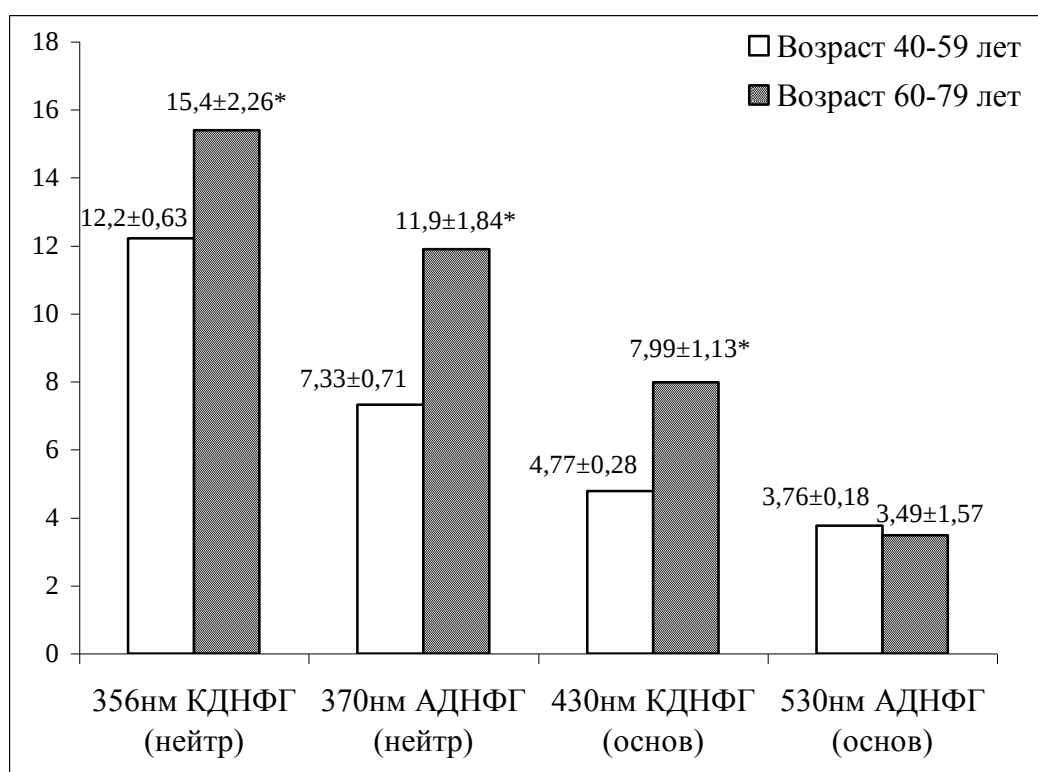


Рис.4.3.2. Уровень продуктов ОМБ в опухолевых тканях больных РЖ в зависимости от возраста ($M\pm\sigma$). По оси Y - концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов в опухолевых тканях в мкмоль/мг, по оси X - длины волн при которых регистрировались продукты ОМБ.

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p<0,001$.

При проведении статистического анализа между исследуемыми показателями в гомогенатах опухолевых тканей и возрастом больных РЖ установили прямые положительные взаимосвязи между активностью АДА $r=0,42$ ($p<0,05$), уровнем NO_x $r=0,45$ ($p<0,05$) и содержанием продуктов ОМБ: КДНФГ(нейтр) $r=0,78$ ($p<0,001$), АДНФГ(нейтр) $r=0,81$ ($p<0,001$), КДНФГ(основ) $r=0,82$ ($p<0,001$), при этом отрицательно коррелирует с возрастом активность ГПО $r=-0,60$ ($p<0,001$) в опухолевых тканях больных РЖ.

Определив исследуемые показатели ПОС, АОС и СРО в гомогенатах тканей (СОЖ и опухолевой) у больных РЖ нами было проведено сравнение между изменением данных показателей в ткани СОЖ и опухолевой в зависимости от возраста. Установлено, что активность АДА в ткани СОЖ с возрастом повышается на 6%, но при этом статистически значимых отличий не обнаружено, в то время как в опухолевой ткани активность фермента достоверно выше на 11%. При сравнении активностей фермента в опухолевой ткани относительно ткани СОЖ в группе больных РЖ в возрасте 40-59 лет обнаружено, что в ткани опухоли активность АДА выше в 1,8 раза, относительно СОЖ, а у более пожилых больных РЖ (2-я возрастная группа) - в 1,9 раза ($p < 0,001$ для двух возрастных групп). Так же установлено, что в ткани СОЖ при старении активность КО достоверно не изменяется, хотя и повышается на 6%, а в ткани опухоли это изменение еще менее выражено (повышается всего на 3%). Однако сравнив показатели активности КО в ткани опухоли и СОЖ установлено, что в опухолевой ткани активность КО в 3,3 раза выше, чем в ткани СОЖ для более молодых больных РЖ (1-я возрастная группа), а в группе пожилых пациентов (2-я возрастная группа) она выше в 3,2 раза (Рисунок 4.3.3).

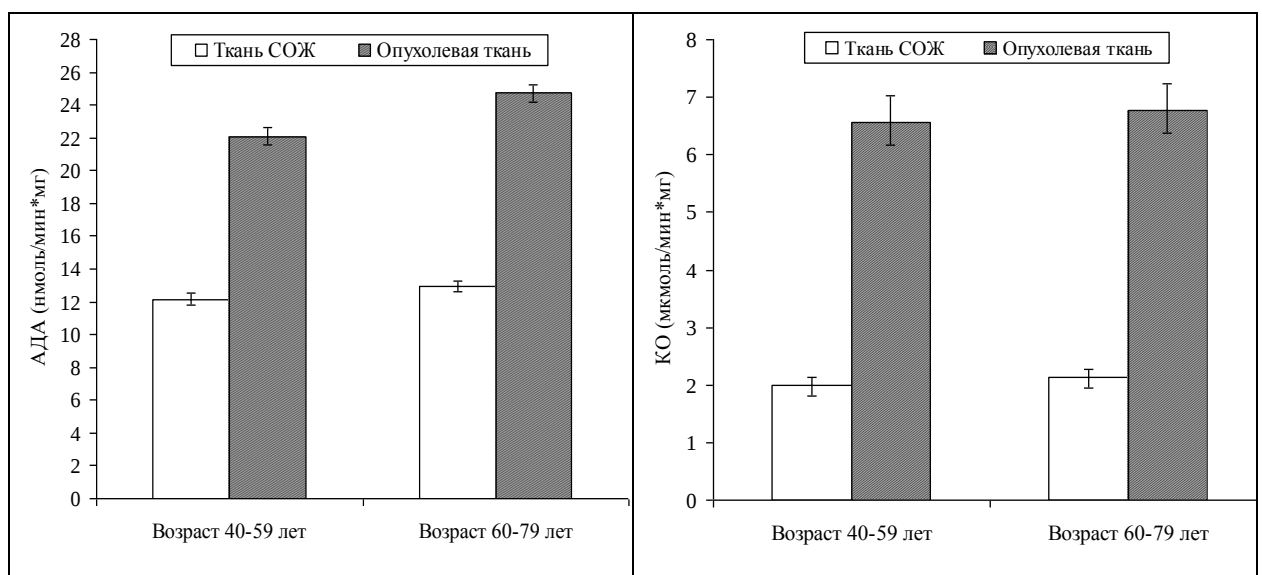


Рис. 4.3.3. Изменение активностей ферментов катаболизма пуриновых нуклеотидов в гомогенатах тканей больных РЖ в зависимости от возраста, значения всех показателей достоверны при $p < 0,001$.

Оценив работу ферментативного звена АОЗ в ткани СОЖ, было установлено, что с возрастом активность СОД повышается на 6%, однако статистически значимых отличий нами установлено не было. Так же не установлено достоверных изменений активности фермента с возрастом в опухолевой ткани, несмотря на то, что активность СОД во 2-й возрастной группе была выше на 23% относительно 1-й возрастной группы. Сравнив изменение активности СОД в опухолевой ткани и в ткани СОЖ у больных РЖ в 2-х возрастных группах, достоверных отличий в изменении активности фермента установлено не было, ни для одной из групп. При этом активность СОД в возрастной группе 40-59 лет была в 1,3 раза выше в ткани опухоли относительно СОЖ, а в группе 60-79 лет - в 1,6 раза (Рисунок 4.3.4).

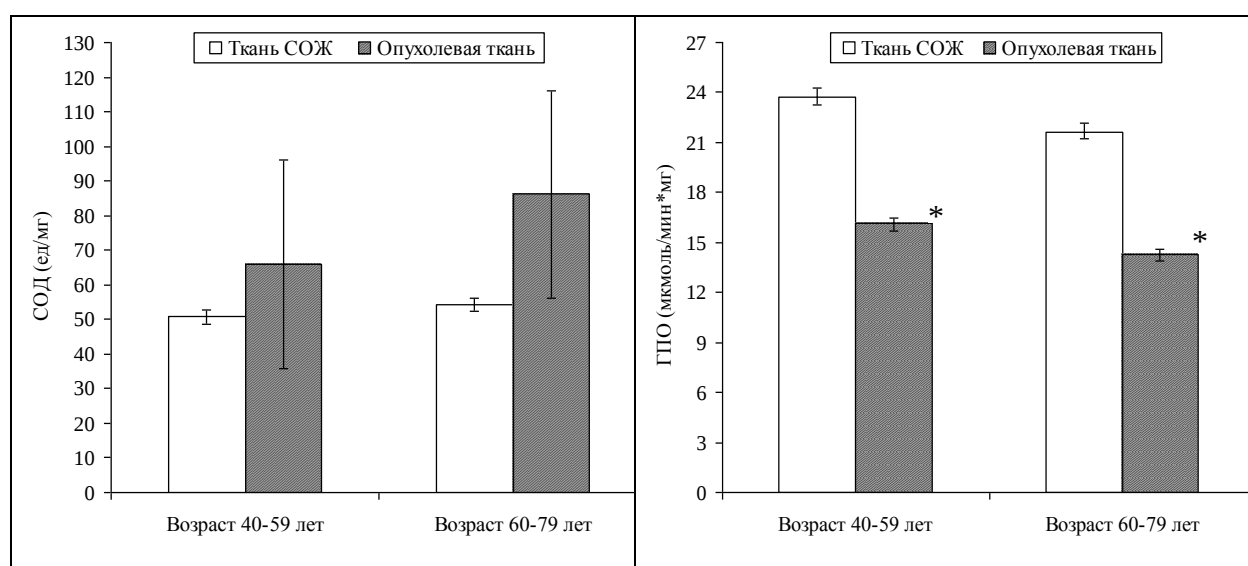


Рис. 4.3.4. Изменение активностей ферментов АОЗ в гомогенатах тканей больных РЖ в зависимости от возраста.

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p < 0,001$.

Нами установлено достоверное снижение активности ГПО с возрастом в ткани СОЖ: во 2-й группе активность фермента была ниже на 8% по сравнению с 1-й возрастной группой. При этом в ткани опухоли активность ГПО так же достоверно снижалась с возрастом, однако в возрастной группе 60-79 лет активность фермента была на 11% ниже, чем в группе 40-59 лет. Сравнив,

активности ГПО в ткани опухоли и в ткани СОЖ нами обнаружено, что независимо от возраста, активность фермента в 1,5 раза ниже в ткани опухоли, чем в СОЖ.

Проанализировав возрастную динамику изменений содержания уровня NO_x , было установлено статистически значимое повышение метаболитов NO с возрастом, как в ткани опухоли, так и в СОЖ. Однако в ткани СОЖ содержание NO_x с возрастом повышалось на 12%, а в ткани опухоли – на 13%. При сравнении содержания NO_x между тканью СОЖ и опухолевой установлено, что в последней уровень NO_x в 1,7 раза выше, чем в СОЖ, при чем как в 1-й возрастной группе, так и во 2-й группе.

Так же установлено повышение продуктов ОМБ с возрастом как в ткани СОЖ, так и в ткани опухоли. В ткани СОЖ содержание КДНФГ(нейтр) повышалось на 14%, АДНФГ(нейтр) на 3 %, КДНФГ(основ) на 6%, АДНФГ(основ) на 10%, однако достоверно изменялись лишь КДНФГ(нейтр), а в опухолевой ткани концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов изменялась следующим образом: КДНФГ(нейтр) повышались на 21%, АДНФГ(нейтр) на 38%, КДНФГ(основ) на 40%, АДНФГ(основ) на 7%, при этом достоверно отличались все показатели, за исключением АДНФГ(основ).

Проведя сравнение концентрации 2,4-динитрофенилгидразонов между тканями СОЖ и опухолевыми, обнаружено, что в ткани опухоли содержание продуктов ОМБ выше, чем в ткани СОЖ: так в возрастной группе 40-59 лет концентрация КДНФГ(нейтр) была выше в 1,4 раза, КДНФГ(основ) - в 1,3 раза, АДНФГ(основ) - в 1,8 раза, а для АДНФГ(нейтр) изменений не обнаружено, при этом в возрастной группе 60-79 лет концентрация КДНФГ(нейтр) повышалась в 1,5 раза, АДНФГ(нейтр) - в 1,6 раза, КДНФГ(основ) - в 2 раза и лишь уровень АДНФГ(основ) не изменялся (Рисунок 4.3.5).

Таким образом, трансформация пуринового обмена носит системный характер и однонаправлена при старении и опухолевой прогрессии, дисрегуляция ферментативного звена АОЗ способствует нарушению механизма стресс-ответ,

что в свою очередь приводит к избыточному накоплению продуктов СРО и способствует интенсификации состояния ОС.

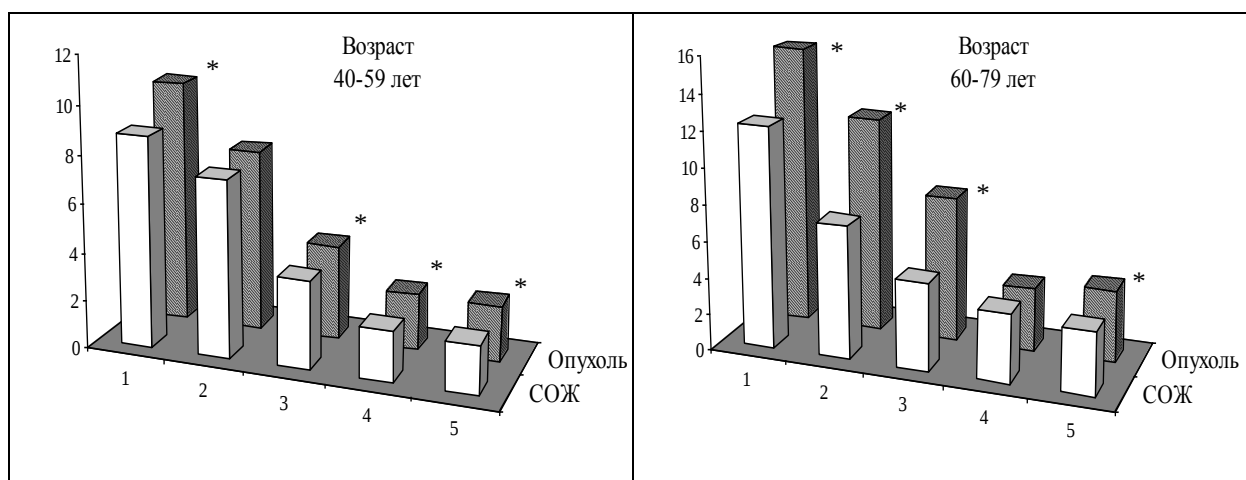


Рис. 4.3.5. Изменение уровня не ферментативных показателей СРО в гомогенатах тканей больных РЖ в зависимости от возраста. По оси X – концентрация метаболитов СРО: 1 - КДНФГ(нейтр), 2 - АДНФГ(нейтр), 3 - КДНФГ(основ), 4 - АДНФГ(основ), 5 - NO_x

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p < 0,05$.

Контроль и мониторинг за изменением активностей ферментов пуринового обмена и первой линии АОЗ в плазме крови и эритроцитах, может расцениваться не только как показатель стимуляции СРО, выражая степень интенсивности ОС приводя к патологическому старению, но и использоваться в качестве диагностики заболеваний ассоциированных со старением, в частности РЖ.

Материалы данного раздела нашли отражение в следующих публикациях диссертанта:

1. Бакурова О.М. Чи є дисметаболичні процеси в еритроцитах одним з факторів патогенезу виразки та раку шлунка / О.М. Бакурова, К.О. Миронова, С.О. Зуйков, Я.Г. Жебеленко, Б.Г. Борзенко // Питання експериментальної та клінічної медицини: зб. статей. - Донецьк: ТОВ «Каштан», 2011. - Т. 1. - Вип. 15. – С. 342-345. (Автором проведены биохимические исследования и статистический анализ).

2. Zuikov, S.A. Correlation of nucleotides and carbohydrates metabolism with prooxidant and antioxidant systems of erythrocytes depending on age in patients with colorectal cancer / S.A. Zuikov, B.G. Borzenko, O.P. Shatova, E.M. Bakurova, G.E. Polunin // *Experimental Oncology*. - 2014. - Vol. 36. - № 2. - P. 117–120. (Автором проведено исследование биохимических показателей, статистическая обработка полученных результатов, написана статья).
3. Зуйков, С.А. Исследование обмена нуклеотидов и его взаимосвязи с прооксидантной и антиоксидантной системами у людей различного возраста / С.А. Зуйков // *Успехи геронтологии*. - 2014. - Т. 27. - № 3. - С. 463–467.
4. Zuikov, S.A. Study on nucleotide exchange and its interrelationship with prooxidant and antioxidant systems in humans of different ages / S.A. Zuikov // *Advances in Gerontology*. – 2015. – Vol. 5. - № 1. – P. 22-26.
5. Zuikov, S.A. Study of nucleotide metabolism and its interrelation with prooxidant and antioxidant systems in people of different ages / S.A. Zuikov // *Advances in Gerontology*. – 2015. – Vol. 5. - № 2. – P. 84-88.
6. Зуйков, С.А. Геронтологические особенности изменения прооксидантной и антиоксидантной систем у здоровых и онкобольных людей / С.А. Зуйков // *Химические проблемы современности: сборник тезисов докладов научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием*. - Донецк: ДонНУ, 2015. - С. 51-53.
7. Зуйков, С.А. Возрастные особенности обмена пуриновых нуклеотидов, прооксидантной и антиоксидантной систем у больных колоректальным раком / С.А. Зуйков, О.П. Шатова, И.И. Зинкович, Б.Г. Борзенко // *Развитие науки в XXI веке: сборник статей XV международной заочной научно-практической конференции*. - Харьков: научно-информационный центр «Знание», 2016. – Ч. 1. - С. 45-50. (Автором выполнен эксперимент, проведен статистический анализ, написана статья).
8. Зуйков, С.А. Возрастные особенности метаболизма пуриновых нуклеотидов, прооксидантной и антиоксидантной систем у больных раком желудка / С.А. Зуйков, Е.В. Хомутов, О.П. Шатова // *Актуальные вопросы*

биологической физики и химии. БФФХ-2016: материалы XI международной научно-технической конференции. - Севастополь: Севастопольский государственный университет, 2016. - Т. 2 - С. 110-113. (Автором выполнен эксперимент, проведен статистический анализ, написана статья).

9. Зуйков, С.А. Исследование влияния возраста на состояние прооксидантной и антиоксидантной систем плазмы крови у онкологических больных / С.А. Зуйков, Е.В. Хомутов, Ю.Д. Турсунова, И.И. Зинкович // Научные основы создания и реализации современных технологий здоровьесбережения: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Прага. - 2016. - С. 131-135. (Автором проведено исследование биохимических показателей, статистическая обработка полученных результатов, написана статья).

10. Зуйков, С.А. Изучение влияния возраста на характер взаимосвязей между показателями обмена пуриновых нуклеотидов, прооксидантов и антиоксидантов / С.А. Зуйков, О.П. Шатова, Б.Г. Борзенко // Донецкие чтения 2016. Образование, наука и вызовы современности: материалы I Международной научной конференции. – Ростов-на-Дону. – 2016. - Т. 2. - С. 338-343. (Автором проведено исследование биохимических показателей, статистическая обработка полученных результатов, написана статья).

11. Зуйков, С.А. Изменения окислительного метаболизма плазмы крови у онкологических больных / С.А. Зуйков, И.В. Филиппаки // Акт. вопр. реабилитол. и педагогики: сборн. науч. тр. – Донецк. – 2017. - Т. 3. Вып. 1(4). – С. 112-117. (Автором проведено исследование биохимических показателей, статистическая обработка полученных результатов, написана статья).

12. Зуйков, С.А. Влияние старения на окислительный потенциал плазмы крови у онкологических больных / С.А. Зуйков, И.И. Зинкович // Новообразование. – 2017. – Т. 9. - № 2 (17). - С. 177-180. - Doi: 10.26435/neoplasm.v9i3.225. (Автором лично проведено исследование биохимических показателей, статистическая обработка полученных результатов, написание статьи).

РАЗДЕЛ 5. ВЛИЯНИЕ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ СВОБОДНО- РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Целью настоящего раздела являлось изучение взаимосвязей между ферментами системы генерации АФК и АОЗ, а так же продуктами СРО и выявление патогенетических механизмов их взаимодействия при опухолевой прогрессии в плазме крови, эритроцитах и в гомогенатах тканей (опухоли и нетрансформированной смежной).

Для изучения показателей ПОС, АОС и СРО в зависимости от тяжести патологического процесса, все больные РЖ были разделены на 2 группы с различной стадией рака: 1-я группа (с I-II стадией) - составили 16 человек, а 2-ю группу (с III-IV стадией) - 19 больных РЖ.

Все исследования проводились при согласии больных, отборы проб осуществлялись под непосредственным контролем лечащих врачей.

5.1. Изменение компонентов системы свободно-радикального окисления в зависимости от стадии рака в плазме крови

Исследуя группу больных РЖ, было установлено статистически значимое повышение активностей ключевых ферментов распада пуринов - АДА (при $p=0,0004$) и КО (при $p=0,022$) в зависимости от стадии рака, так в группе с III-IV стадией активность АДА была на 30% выше чем в группе с I-II стадией РЖ, а активность КО выше на 15% относительно 1-й группы (Таблица 5.1.1). Следовательно, можно предположить, что чем тяжелее стадия рака, тем выше уровень прооксидантов плазмы крови.

Соответственно повышение активности АДА в плазме может выступать как маркер целостности клеточных мембран опухолевой ткани, тем более что в ткани опухоли АДА повышена по сравнению с нетрансформированными тканями (см.

подраздел 3.1), что согласуется с известными данными о повышении проницаемости клеточных мембран, причем в обе стороны, злокачественных клеток и выходе тканевых белков методом пиноцитоза.

Таблица 5.1.1. Показатели обмена ПОС, АОС и СРО в плазме крови больных РЖ в зависимости стадии рака ($M \pm \sigma$)

Показатели	1-я гр. I-II стадия РЖ (n=16)	2-я гр. III-IV стадия РЖ (n=19)
АДА (нмоль/мин*мг)	5,25±0,86	7,49±1,69*
КО (мкмоль/мин*мг)	0,517±0,067	0,610±0,141**
СОД (ед/мг)	0,131±0,015	0,132±0,007
ГПО (мкмоль/мин*мг)	7,49±0,45	8,08±0,79**
NO _x (мкмоль/л)	6,55±1,86	8,14±2,75

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p < 0,001$; ** - значения показателя достоверны при $p < 0,05$.

Исследовав ферментативное звено АОС в плазме крови у больных РЖ, было установлено статистически значимое повышение активности ГПО (при $p = 0,013$) во 2-й группе относительно 1-й группы, однако разница составила всего 7%. При этом активность СОД в плазме крови достоверно не изменялась. Следовательно, тяжесть патологического процесса влияет лишь на изменение ферментативной активности ГПО.

Измерив, уровень NO_x в плазме крови было обнаружено, что в группе больных с III-IV стадией РЖ содержание метаболитов NO было выше, чем в группе с I-II стадией, однако статистически значимых изменений нами установлено не было.

Нами установлено влияние тяжести патологического процесса на изменение содержания продуктов ОМБ в плазме крови больных РЖ. Обнаружено достоверное повышение всех метаболитов ОМБ во 2-й группе относительно 1-й (Рисунок 5.1.1), при этом содержание КДНФГ(нейтр) было выше на 15% (при

$p=0,0003$), АДНФГ(нейтр) на 10% (при $p=0,0007$), КДНФГ(основ) на 36% (при $p=0,0001$) и АДНФГ(основ) на 39% (при $p=0,0003$).

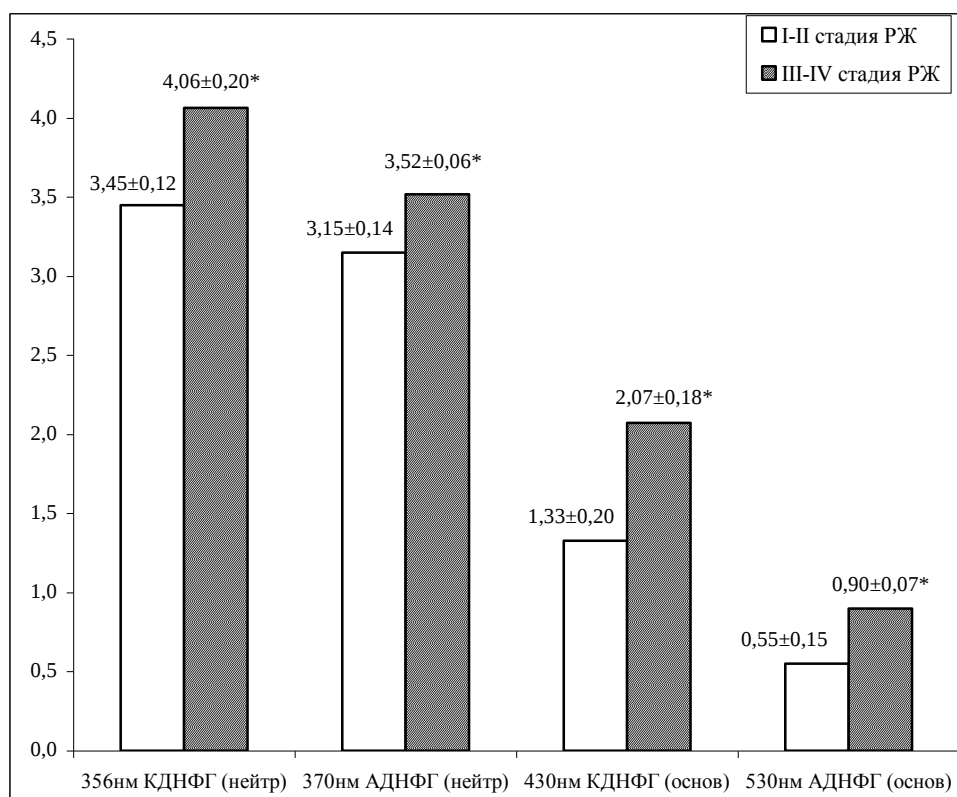


Рис. 5.1.1. Уровень продуктов ОМБ у больных РЖ в плазме крови в зависимости от стадии рака ($M \pm \sigma$). По оси Y - концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов в плазме крови в мкмоль/мг, по оси X - длины волн при которых регистрировались продукты ОМБ;

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p < 0,001$.

Следовательно, у больных РЖ в плазме крови в зависимости от стадии рака, происходит повышение активностей ферментов пуринового обмена, усиливая пул прооксидантов плазмы крови, тем самым способствуя повышенному образованию окислительных метаболитов, что так же сочетается с увеличением содержания продуктов ОМБ в плазме крови. Одновременно происходит повышение активности ГПО, свидетельствую в пользу усиления ферментативного звена АОЗ плазмы, однако, в результате полученных данных мы видим, что активность ферментативного звена первой линии АОЗ – СОД не изменяется в зависимости от

стадии рака. Так же установлено, что тяжесть патологического процесса не оказывает никакого влияния на содержание NO_x в плазме крови больных РЖ.

При проведении сравнительного анализа исследуемых показателей в плазме крови больных РЖ с I-II стадией, нами установлены статистически значимые прямые корреляции между СОД/ГПО ($r=0,84$, $p<0,001$) и ГПО/ NO_x ($r=0,55$, $p<0,05$), а так же обратные взаимосвязи между АДА/СОД ($r=-0,88$, $p<0,001$), АДА/ГПО ($r=-0,72$, $p<0,05$), СОД/ОМБ ($r=-0,83$, $p<0,05$ для КДНФГ(нейтр), для АДНФГ(нейтр) не обнаружено, $r=-0,70$, $p<0,05$ для КДНФГ(основ) и $r=-0,64$, $p<0,05$ для АДНФГ(основ)). При проведении аналогичного анализа в группе больных РЖ с III-IV стадией обнаружены только обратные корреляции между АДА/ГПО ($r=-0,73$, $p<0,001$) и КО/ NO_x ($r=-0,58$, $p<0,05$). Следовательно, в плазме крови больных РЖ от стадийности РЖ зависят соотношения между СОД/ГПО (высокая степень взаимосвязи), ГПО/ NO_x (средняя степень взаимосвязи), АДА/СОД (высокая степень взаимосвязи) СОД/ОМБ (средняя степень взаимосвязи) и характерны они для ранней стадии РЖ. На поздней стадии РЖ КО/ NO_x (средняя степень взаимосвязи). При этом обнаруженная связь между АДА/ГПО от стадийности рака не зависит (высокая степень взаимосвязи).

Хотелось бы обратить внимание, что у больных РЖ с I-II стадией рака между ферментами АОЗ и АДА в плазме крови установлена тесная отрицательная взаимосвязь: СОД/АДА $r=-0,88$ ($p<0,001$) и ГПО/АДА $r=-0,72$ ($p<0,001$), соответственно АДА способствует снижению ферментативного звена АОЗ на начальных этапах опухолевого роста.

Таким образом, у больных РЖ в плазме крови с повышением стадийности процесса, происходит стимуляция активностей ферментов пуринового обмена, усиливая пул прооксидантов плазмы крови, тем самым угнетая работу АОС и способствуя повышенному образованию окислительных метаболитов, что сочетается с увеличением содержания продуктов ОМБ в плазме крови. Хотя можно предположить, что как раз за счет таких патофизиологических механизмов, которые характерны больным на поздних стадиях рака и происходит рост опухоли.

5.2. Изменение компонентов системы свободно-радикального окисления в зависимости от стадии рака в эритроцитах

При определении исследуемых показателей в эритроцитах у больных РЖ было установлено достоверное снижение активности АДА (при $p=0,0001$) в зависимости от тяжести патологического процесса. В группе больных с I-II стадией РЖ активность фермента была на 35% выше, чем у больных с III-IV стадией (Таблица 5.2.1). Обнаруженное снижение активности АДА в эритроцитах сочетается с гипоксией, характерной для РЖ, сохраняя внеклеточный уровень аденозина, тем самым выступая как приспособительный механизм защиты клеток крови онкобольных, активирующийся в условиях гипоксии.

Таблица 5.2.1. Показатели ПОС, АОС и СРО в эритроцитах больных РЖ в зависимости от стадии рака ($M \pm \sigma$)

Показатели	1-я гр. I-II стадия РЖ (n=16)	2-я гр. III-IV стадия РЖ (n=19)
АДА (нмоль/мин*мг)	8,17±1,01	5,30±1,00*
КО (мкмоль/мин*мг)	9,40±2,57	8,82±1,16
СОД (ед/мг)	6,42±0,72	11,1±2,07*
ГПО (мкмоль/мин*мг)	239±38,6	184±33,9*
NO _x (мкмоль/л)	6,10±0,96	10,9±2,69*

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p<0,001$.

Так же установлено снижение активности КО во 2-й группе больных РЖ относительно 1-й группы, однако статистически значимых результатов нами обнаружено не было.

В эритроцитах крови больных РЖ обнаружено достоверное повышение активности СОД (при $p=0,0001$) во 2-й группе больных относительно 1-й, так у

больных РЖ с III-IV стадией активность СОД была на 42% выше, чем у больных с I-II стадией.

При этом исследовав активность второго фермента АОС – ГПО, установлено достоверное снижение ферментативной активности во 2-й группе относительно 1-й (при $p=0,0008$). В группе больных с I-II стадией РЖ активность фермента была на 44% выше, чем у больных с III-IV стадией.

Следовательно, чем тяжелее стадия РЖ, тем выше активность СОД и ниже активность ГПО, а значит, в эритроцитах крови больных РЖ наблюдаются неоднозначные изменения активностей ферментов АОС.

Исследуя показатели не ферментативного звена ПОС в эритроцитах больных РЖ, нами установлено достоверное повышение уровня NO_x (при $p=0,00001$) в группе больных РЖ с III-IV стадией относительно группы больных с I-II стадией. При этом содержание NO_x у больных с более поздней стадией рака было на 94% выше, чем у больных на ранних стадиях.

Одновременно нами установлено достоверное повышение всех метаболитов ОМБ во 2-й группе относительно 1-й (Рисунок 5.2.1), при этом содержание КДНФГ(нейтр) было выше на 10% (при $p=0,0003$), АДНФГ(нейтр) на 14% (при $p=0,0004$), КДНФГ(основ) на 14% (при $p=0,0005$) и АДНФГ(основ) на 22% (при $p=0,0001$).

Таким образом, мы видим, что чем выше стадия рака, тем ниже активность АДА и ГПО, но выше активность СОД, а так же содержание NO_x и 2,4-динитрофенилгидразонов в эритроцитах крови больных РЖ. Так же установлено, что тяжесть патологического процесса не влияет на активность КО при РЖ.

Проведя корреляционный анализ изменений показателей в эритроцитах в зависимости от стадии рака у больных РЖ, были обнаружены статистически значимые, прямые связи у СОД $r=0,83$ ($p<0,001$), NO_x $r=0,76$ ($p<0,001$) и уровнем 2,4-динитрофенилгидразонов: КДНФГ(нейтр) $r=0,79$ ($p<0,001$), АДНФГ(нейтр) $r=0,84$ ($p<0,001$), КДНФГ(основ) $r=0,84$ ($p<0,001$) и АДНФГ $r=0,82$ ($p<0,001$), а так же обратная связь у АДА $r=-0,83$ ($p<0,001$) и ГПО $r=-0,62$ ($p<0,001$).

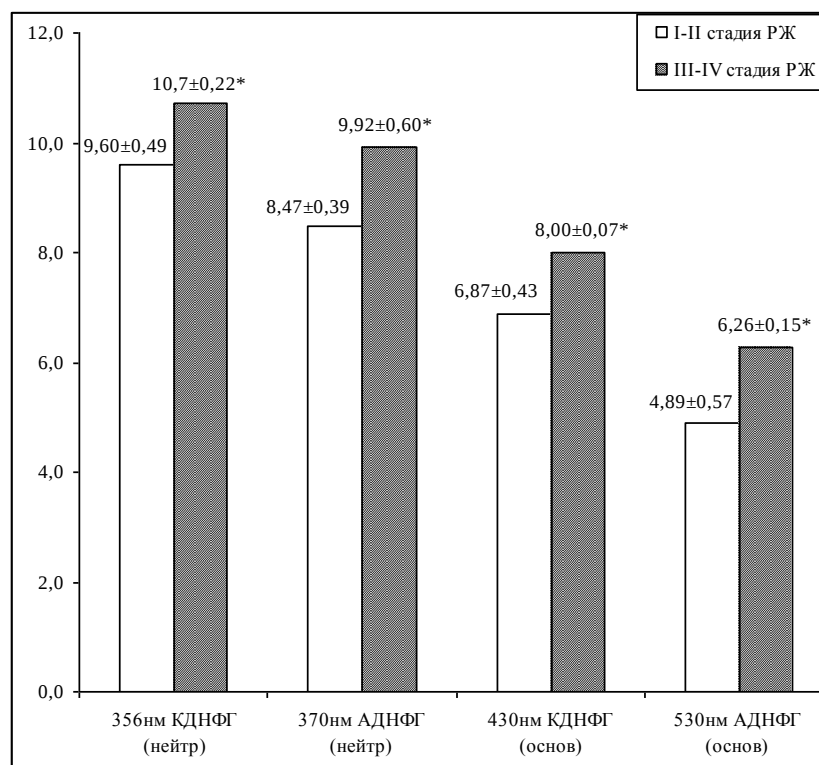


Рис. 5.2.1. Уровень продуктов ОМБ у больных РЖ в плазме крови в зависимости от стадии рака ($M \pm \sigma$). По оси Y - концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов в эритроцитах в мкмоль/мг, по оси X - длины волн при которых регистрировались продукты ОМБ;

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p < 0,001$.

5.3. Изменение компонентов системы свободно-радикального окисления в зависимости от стадии рака в гомогенатах тканей

При определении исследуемых показателей в гомогенатах неизмененных тканей у больных РЖ было установлено статистически значимое повышение активности АДА (при $p = 0,0001$) в ткани СОЖ у больных с III-IV стадией по сравнению с группой больных имеющих I-II стадию РЖ, при этом разница между активностями фермента составила 20% (Таблица 5.3.1).

Исследуя изменение активности КО установлено, что активность фермента выше во 2-й группе больных РЖ относительно 1-й группы, но достоверных отличий нами установлено не было.

Так же нами не было обнаружено достоверных отличий для СОД между 1-й и 2-й группами больных РЖ, хотя активность фермента имела тенденцию к повышению в зависимости от тяжести патологического процесса.

Таблица 5.3.1. Показатели ПОС, АОС и СРО в гомогенатах тканей больных РЖ в зависимости от стадии рака ($M \pm \sigma$)

Показатели	СОЖ		Опухоль	
	1-я гр. I-II стадия РЖ (n=16)	2-я гр. III-IV стадия РЖ (n=19)	1-я гр. I-II стадия РЖ (n=16)	2-я гр. III-IV стадия РЖ (n=19)
АДА (нмоль/мин*мг)	11,0 $\pm$ 0,62	13,8 $\pm$ 1,54*	21,3 $\pm$ 1,29	25,1 $\pm$ 2,43 [#]
КО (мкмоль/мин*мг)	1,82 $\pm$ 0,55	2,25 $\pm$ 0,70	5,66 $\pm$ 1,35	7,50 $\pm$ 1,68 ^{##}
СОД (ед/мг)	50,2 $\pm$ 5,67	54,4 $\pm$ 6,85	9,67 $\pm$ 2,61	131 $\pm$ 13,5 [#]
ГПО (мкмоль/мин*мг)	24,8 $\pm$ 1,52	21,0 $\pm$ 1,03*	16,9 $\pm$ 0,76	13,9 $\pm$ 1,05 [#]
NO _x (мкмоль/л)	1,94 $\pm$ 0,30	2,32 $\pm$ 0,19*	3,12 $\pm$ 0,21	4,16 $\pm$ 0,79 [#]

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p < 0,001$ для ткани СОЖ; # - значения показателя достоверны при $p < 0,001$ для ткани опухоли; ##- значения показателя достоверны при $p < 0,05$ для ткани опухоли

При этом нами установлено, что активность ГПО в ткани СОЖ была достоверно ниже у больных с III-IV стадией относительно больных с I-II стадией (при $p = 0,0001$) и это отличие составило 15%.

Исследовав содержание NO_x в ткани СОЖ, было установлено достоверное повышение уровня NO_x во 2-й группе больных РЖ по сравнению с 1-й (при $p=0,0005$). При этом содержание метаболитов NO у больных с III-IV стадией было на 16% выше по сравнению с группой больных имеющих I-II стадию РЖ.

У больных РЖ нами было обнаружено повышение уровня продуктов ОМБ в ткани СОЖ в зависимости от тяжести патологического процесса (Рисунок 5.3.1). При этом содержание КДНФГ(нейтр) было выше на 21% (при $p=0,0006$), АДНФГ(нейтр) на 15% (при $p=0,0015$), КДНФГ(основ) на 19% (при $p=0,0017$) и АДНФГ(основ) на 28% (при $p=0,0005$).

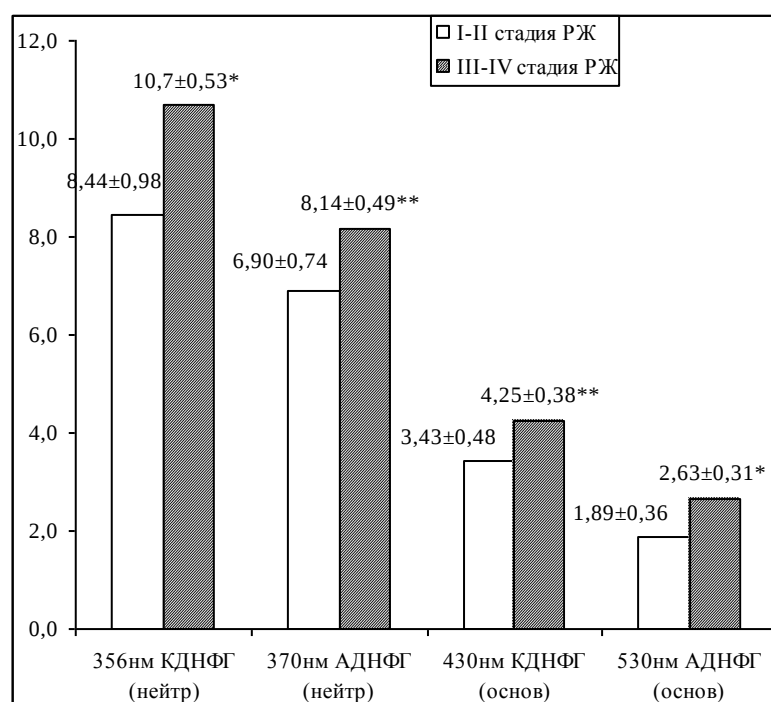


Рис. 5.3.1. Уровень продуктов ОМБ в СОЖ в зависимости от стадии рака ($M \pm \sigma$). По оси Y - концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов в СОЖ в мкмоль/мг, по оси X - длины волн при которых регистрировались продукты ОМБ.

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p < 0,001$; ** - значения показателя достоверны при $p < 0,05$.

Следовательно, чем выше стадия рака, тем выше активность АДА в нетрансформированной ткани, при этом активность КО не зависит от стадии рака.

Активность ГПО в нетрансформированной ткани снижается в зависимости от тяжести патологического процесса. При этом установлено, что уровень NO_x выше у больных с более поздними стадиями у больных РЖ.

Так же установлено, что чем выше стадия рака, тем выше содержание продуктов ОМБ в нетрансформированной ткани.

Измерив активности ферментов ПОС и АОС, а также показатели СРО в гомогенатах опухолевой ткани у больных РЖ в зависимости от стадии рака, было установлено достоверное повышение активности АДА (при $p=0,0003$) в зависимости от тяжести патологического процесса. В группе больных РЖ с III-IV стадией активность фермента была на 15% выше по сравнению с больными, имеющими I-II стадию (Таблица 5.3.1).

Активность КО так же была достоверно выше (при $p=0,0013$) в группе больных РЖ на более поздних стадиях. Так в группе с III-IV стадией активность КО на 25% была выше, чем в группе больных с I-II стадией РЖ.

Так же установлено достоверное повышение активности СОД (при $p=0,00001$) в ткани опухоли у больных РЖ, в зависимости от стадийности онкозаболевания. При этом активность фермента во 2-й группе была в 13,5 раз выше, относительно 1-й группы больных РЖ.

Одновременно в группе больных с I-II стадией РЖ установлено, что активность ГПО на 18% выше, чем в группе больных с III-IV стадией. Таким образом, нами обнаружено достоверное снижение активности ГПО (при $p=0,0001$) в зависимости от тяжести патологического процесса.

Исследовав показатели СРО в опухолевой ткани, установлено достоверное повышение уровня NO_x (при $p=0,00013$) у больных РЖ с III-IV стадией, относительно группы больных с I-II стадией рака, с разницей в 25%.

Так же нами обнаружено влияние тяжести патологического процесса на содержание 2,4-динитрофенилгидразонов в ткани опухоли (Рисунок 5.3.2). Установлено, что у больных с III-IV стадией рака содержание продуктов ОМБ достоверно выше, чем в группе больных с I-II стадией РЖ: КДФНГ(нейтр) на 28%

(при $p=0,0001$), АДНФГ(нейтр) на 37% (при $p=0,0008$), КДНФГ(основ) на 38% (при $p=0,0004$) и АДНФГ(основ) на 36% (при $p=0,0013$).

Таким образом, повышение активности АДА и КО в опухолевой ткани зависят от степени тяжести онкопатологии. Установлено, что чем выше стадия рака, тем выше активность СОД в опухолевой ткани. При этом динамика повышения активности фермента у больных РЖ очень сильно выражена - в 13,5 раз. Так же установлено, что чем выше стадийность РЖ, тем ниже активность ГПО в ткани опухоли. Содержание показателей СРО в опухолевой ткани повышается в зависимости от зависимости от стадии рака.

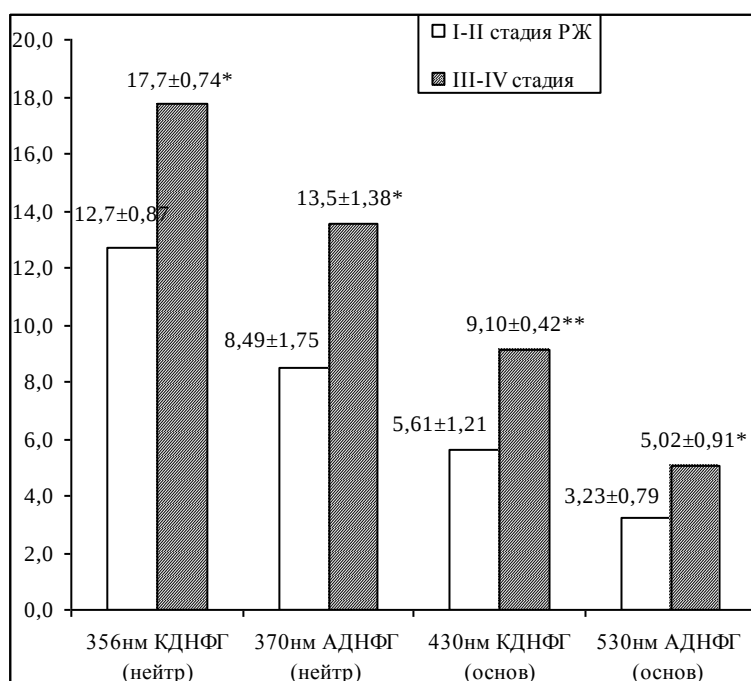


Рис. 5.3.2. Уровень продуктов ОМБ в опухолевых тканях больных РЖ в зависимости от стадии рака ($M \pm \sigma$). По оси Y - концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов в опухолевых тканях в $\mu\text{моль/мг}$, по оси X - длины волн при которых регистрировались продукты ОМБ.

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p < 0,001$; ** - значения показателя достоверны при $p < 0,05$.

Определив исследуемые показатели обмена ПОС, АОС и СРО в гомогенатах тканей (СОЖ и опухолевой) у больных РЖ нами было проведено сравнение между изменением данных показателей в ткани СОЖ и опухолевой в зависимости от стадии рака. Установлено, что у больных РЖ с I-II стадией активность АДА в 1,9 раза выше в ткани опухоли (при $p=0,0001$) относительно ткани СОЖ, а в группе с III-IV стадией РЖ активность фермента была выше в 1,8 раза (при $p=0,0001$). При этом как установлено нами активность АДА в ткани СОЖ в зависимости от стадии рака повышалась на 20% ($p<0,001$), тогда как в ткани опухоли – на 15% ($p<0,001$).

Сравнив активности КО в ткани опухоли СОЖ в группе больных с I-II стадией нами обнаружено повышение активности КО в 3,1 раза в опухолевой ткани относительно ткани СОЖ (при $p=0,00001$). Проведя сравнение в группе больных с III-IV стадией РЖ, так же активность КО так же оказалась выше в ткани опухоли, но уже в 3,3 раза (при $p=0,0001$). Ранее установлено, что в ткани СОЖ активность КО хоть и повышалась на 20% в зависимости от тяжести рака, но недостоверно, а в опухолевой ткани активность фермента достоверно увеличивалась на 25% ($p<0,05$) (Рисунок 5.3.3).

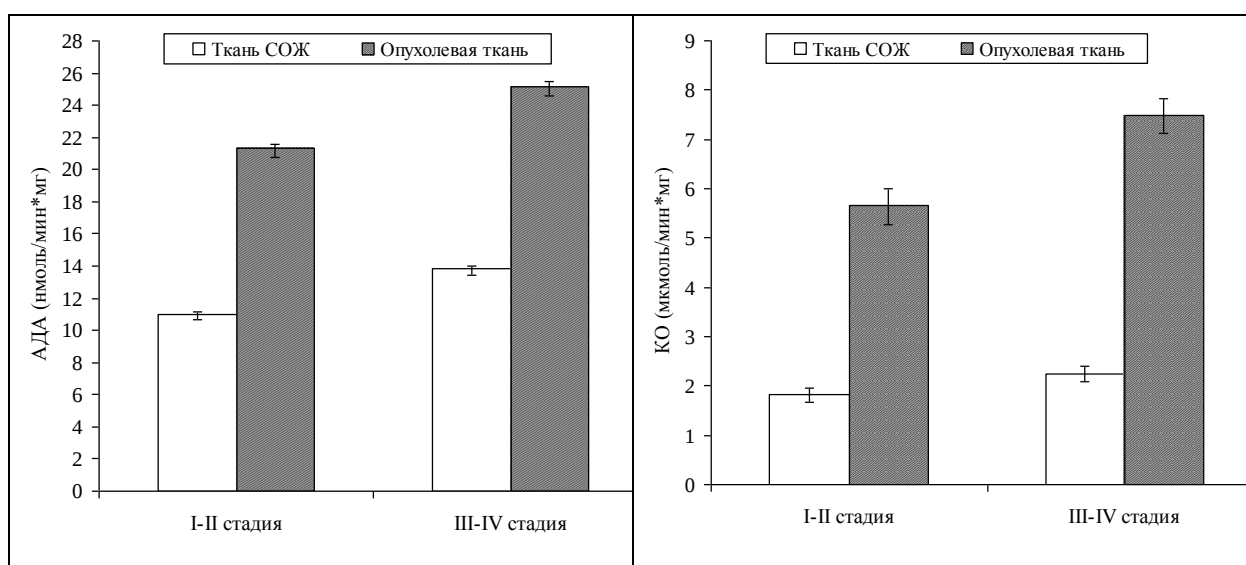


Рис. 5.3.3. Изменение активностей ферментов катаболизма пуриновых нуклеотидов в гомогенатах тканей больных РЖ в зависимости от стадии рака, значения всех показателей достоверны при $p<0,001$.

При сравнении показателей ферментативного звена АОС установлено, что у больных РЖ с I-II стадией активность СОД в опухолевой ткани была ниже в 5,2 раза по сравнению с СОЖ (при $p=0,0001$), в то время как у больных с III-IV стадией рака, активность фермента оказалась выше в ткани опухоли в 2,4 раза, относительно ткани СОЖ (при $p=0,0001$). При этом в ткани СОЖ не установлено изменения активности СОД в зависимости от стадийности РЖ, тогда как в опухолевой ткани активность фермента достоверно повышается в зависимости от тяжести патологического процесса, увеличиваясь в 13,5 раза ($p<0,001$).

Проведя сравнение активностей ГПО между опухолевой тканью и СОЖ, установлено снижение ферментативной активности в опухолевой ткани (при $p=0,0001$) в 1,5 раза относительно ткани СОЖ как у больных РЖ с I-II стадией, так и в группе больных с III-IV стадией онкозаболевания (Рисунок 5.3.4). При исследовании влияния тяжести патологического процесса на изменение активности ГПО установлено достоверное снижение ферментативной активности в 1,2 раза в опухолевой ткани и ткани СОЖ ($p<0,001$).

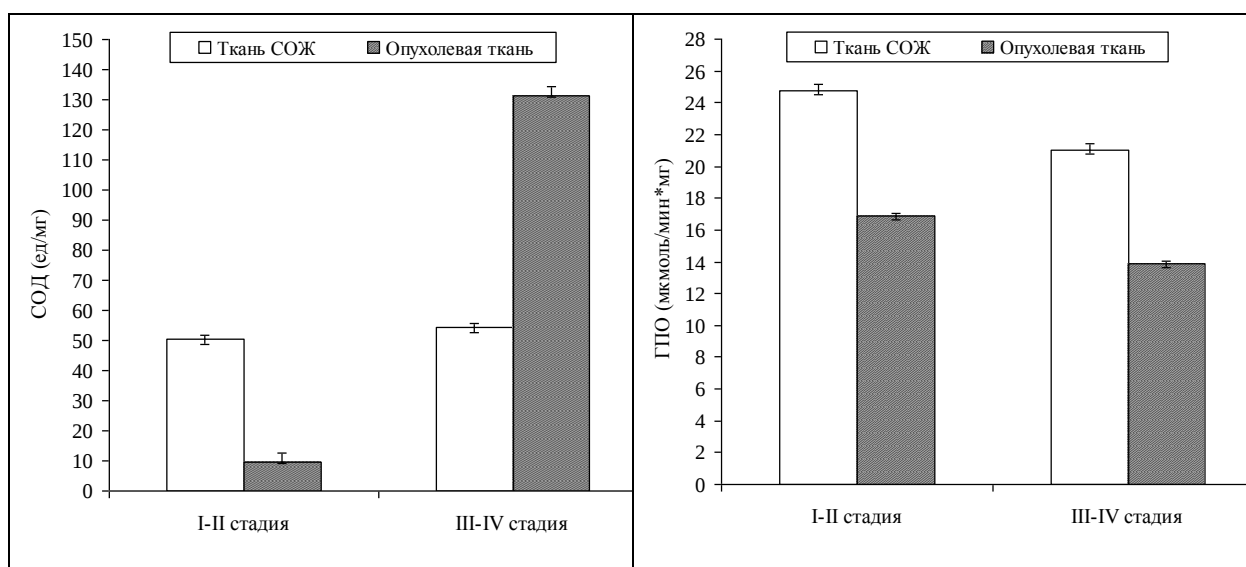


Рис. 5.3.4. Изменение активностей ферментов АОЗ в гомогенатах тканей больных РЖ в зависимости от стадии рака, значения всех показателей достоверны при $p<0,001$.

При сравнении содержания уровня NO_x и концентрации 2,4-динитрофенилгидразонов между тканями СОЖ и опухолевыми, установлено, что в опухолевых тканях уровень NO_x в 1,6 раза выше у больных РЖ с I-II стадией, тогда как у больных с III-IV стадией содержание NO_x в ткани опухоли было выше в 1,8 раза относительно СОЖ. При этом содержание продуктов ОМБ так же выше в опухолевых тканях, относительно СОЖ: у больных с I-II стадией КДНФГ(нейтр) были выше в 1,5 раза, АДНФГ(нейтр) в 1,2 раза, КДНФГ(основ) в 1,6 раза и АДНФГ(основ) - в 1,7 раза и у больных с III-IV стадией - КДНФГ(нейтр) в 1,7 раза, АДНФГ(нейтр) в 1,7 раза, КДНФГ(основ) в 2,1 раза и АДНФГ(основ) - в 1,9 раза (Рисунок 5.3.5).

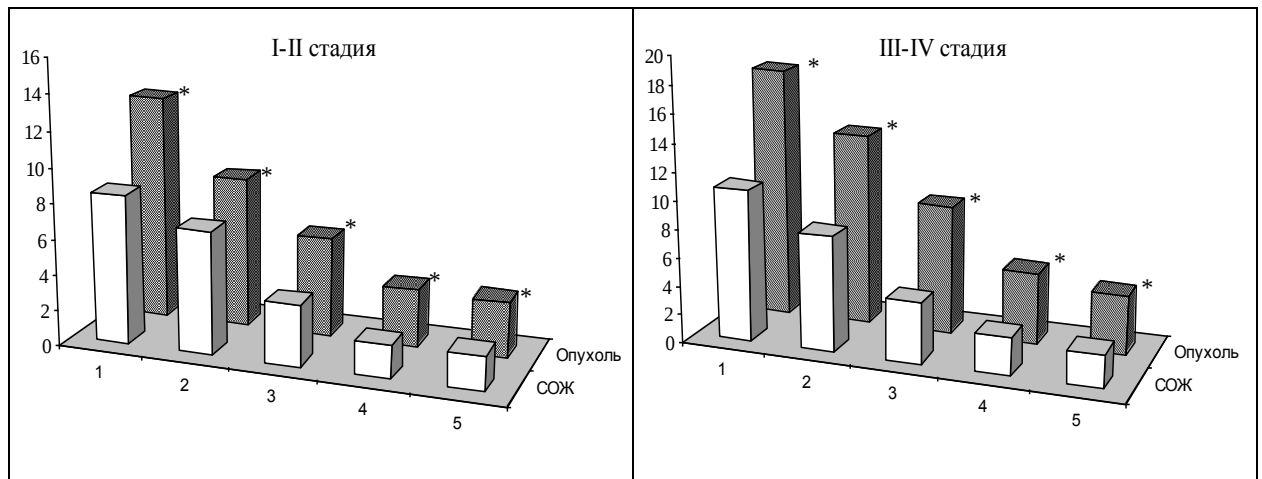


Рис. 5.3.5. Изменение уровня не ферментативных показателей СРО в гомогенатах тканей больных РЖ в зависимости от стадии рака. По оси X – концентрация метаболитов СРО: 1 - КДНФГ(нейтр), 2 - АДНФГ(нейтр), 3 - КДНФГ(основ), 4 - АДНФГ(основ), 5 - NO_x

Примечание: * - значения показателя достоверны при $p < 0,001$.

Проанализировав динамику изменений содержания уровня NO_x в тканях в зависимости от стадийности РЖ, было установлено, что в ткани СОЖ содержание NO_x повышалось на 17% ($p < 0,001$), а в опухолевой ткани – на 25% ($p < 0,001$). При этом содержание КДНФГ(нейтр) повышалось на 21% ($p < 0,001$), АДНФГ(нейтр) на 15% ($p < 0,05$), КДНФГ(основ) на 19% ($p < 0,05$) и АДНФГ(основ) на 28%

($p < 0,001$) соответственно, а в опухолевой ткани концентрация 2,4-динитрофенилгидразонов изменялась следующим образом: КДНФГ(нейтр) повышались на 28% ($p < 0,001$), АДНФГ(нейтр) на 37% ($p < 0,001$), КДНФГ(основ) на 38% ($p < 0,001$) и АДНФГ(основ) на 36% ($p < 0,05$).

Не вызывает сомнений, что у обследованного контингента больных не только клиническая картина (наличие метастазов, интоксикация) но и метаболические пути имеют свои особенности. Причем, и это тоже не вызывает сомнений, именно последние – индивидуальные особенности механизмов метаболизма не просто отражают, а, скорее всего, детерминируют особенности клинического течения.

Уровень активности ферментов нуклеотидного обмена увеличивается при опухолевой прогрессии. Примечательно, что катаболизм пуриновых нуклеотидов усиливается и в нетрансформированных, и в опухолевых тканях у больных РЖ. Следовательно, можно предположить, что как раз таки за счет увеличения активностей АДА и КО, а также нарушения в работе АОЗ происходит стимуляция роста опухолевых клеток, что в свою очередь проявляется усилением тяжести онкозаболевания.

В наших исследованиях обнаружено, что активность ферментов ПОС и АОС также как и показатели СРО статистически значимо связаны с опухолевым ростом. Причем, выраженность и направленность показанных изменений метаболизма ферментов АОС зависят от тяжести патологического процесса – ранняя или поздняя стадия рака. Соответственно, изученные показатели в плазме крови (АДА, КО, СОД, ГПО, NOx, 2,4-динитрофенилгидразоны) могут быть использованы как критерии опухолевого роста.

Материалы данного раздела нашли отражение в следующих публикациях диссертанта:

1. Борзенко, Б.Г. Патохимические процессы эритроцитов и дисметаболические сдвиги в слизистой желудка при язвенной болезни / Б.Г. Борзенко, С.А. Зуйков, А.М. Дудин, Е.В. Богатырева, К.А. Миронова, Т.А. Журавель // Укр. біохім. журн.

– 2010. – Т. 82. - № 4 (додаток 2). – С. 48. (Автором проведены биохимические исследования и статистический анализ).

2. Зуйков, С.А. Исследование активности ксантиноксидазы и супероксиддисмутазы при раке желудка / С.А. Зуйков, Я.Г. Жебеленко, Р.Б. Кондратюк // Актуальные проблемы патофизиологии: материалы XVIII межгородской конференции молодых ученых. СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2012. - С. 60-61. (Автором лично проведено исследование биохимических показателей, статистическая обработка полученных результатов, написана статья).

3. Зуйков, С.А. Изменение соотношения прооксидантной и антиоксидантной систем при опухолях желудка / С.А. Зуйков // Питання експериментальної та клінічної медицини: зб. статей. - Донецьк: ТОВ «Каштан», 2012. - Т. 1. - Вип. 16. – С. 255-260.

4. Бакурова, Е.М. Некоторые патохимические механизмы развития гемической гипоксии у больных раком желудка / Е.М. Бакурова, К.А. Миронова, С.А. Зуйков, О.А. Верхова // Таврический медико-биологический вестник: наук.-практ. журн. – 2012. - Т. 15. - №3. - Ч. 2 (59). – С. 31-33. (Автором выполнен эксперимент).

5. Зуйков, С.А. Взаимосвязь обмена нуклеотидов с прооксидантной и антиоксидантной системами эритроцитов у больных раком желудка / С.А. Зуйков, Я.Г. Жебеленко, О.П. Шатова, Б.Г. Борзенко // Ukr. Biochem. J. - 2014. - Vol. 86. - № 5 (2). - Р. 73-74. (Автором лично проведено исследование биохимических показателей, статистическая обработка полученных результатов, написана статья).

6. Зуйков, С.А. Исследование метаболизма пуриновых нуклеотидов, прооксидантной и антиоксидантной систем у больных раком желудка / С.А. Зуйков, О.П. Шатова, Е.В. Хомутов, Д.С. Каплун // Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). - 2015. - № 8 (17). - С. 139-142. (Автором лично проведено исследование биохимических показателей, статистическая обработка полученных результатов, написана статья).

7. Зуйков, С.А. Исследование взаимосвязи показателей обмена пуринов, прооксидантной и антиоксидантной системы у больных с опухолями желудочно-

кишечного тракта при различных стадиях заболевания / С.А. Зуйков, Я.Г. Жебеленко // Развитие науки в XXI веке: сборник статей XI международной заочной научно-практической конференции. – Харьков: Изд-во Научно-информационный центр «Знание», 2016. – Ч. 1. - С. 29-34. (Автором лично проведено исследование биохимических показателей, статистическая обработка полученных результатов, написание статьи).

8. Зуйков, С.А. Изучение обмена нуклеотидов и свободно-радикального окисления у онкологических больных / С.А. Зуйков // Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии – 2017: сборник тезисов XXIII всероссийской конференции молодых учёных с международным участием. - Санкт-Петербург. – 2017. - С. 86-88.

9. Зуйков, С.А. Изучение свободно-радикального окисления у онкологических больных / С.А. Зуйков // Новообразование. – 2017. – Т. 9. - № 2 (17). - С. 181-185. - Doi: 10.26435/neoplasms.v9i3.217.

АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

В наших исследованиях обнаружено, что активность ферментов ПОС и АОС также как и показатели СРО статистически значимо связаны с опухолевым ростом. Причем, выраженность и направленность показанных изменений метаболизма ферментов АОС зависят от тяжести патологического процесса – ранняя или поздняя стадия рака.

При изучении особенностей взаимодействия компонентов системы СРО в патогенезе злокачественной трансформации у больных РЖ в плазме крови установлено повышение активностей ферментов катаболизма пуриновых нуклеотидов, которые могут выступать как маркер целостности клеточных мембран опухолевой ткани (тем более что в ткани опухоли пуриновый обмен повышен по сравнению с нетрансформированными тканями), что согласуется с известными данными о повышении проницаемости клеточных мембран, причем в обе стороны, злокачественных клеток и выходу тканевых белков методом пиноцитоза. При этом катаболизм пуринов усиливается и в опухолевых узлах, и в смежных тканях, как при старении организма, так и при опухолевой прогрессии.

Наличие взаимозависимостей между активностями АДА в тканях, в плазме и в клетках крови, вероятно, отражает системный характер перестройки обмена пуриновых нуклеотидов в организме больных РЖ.

Так же установлено повышение активностей АДА и КО при старении в плазме крови, как у больных РЖ, так и у здоровых, но динамика роста этих показателей у онкобольных намного интенсивней по сравнению со здоровыми добровольцами. При этом сравнив активности ферментов пуринового обмена у здоровых людей и онкологических больных, обнаружили, что активность АДА и КО у больных РЖ в двух возрастных группах выше, примерно в 2,5 раза, относительно группы контроля.

В эритроцитах крови больных РЖ установлены разнонаправленные изменения активностей ферментов пуринового обмена – снижение активности

АДА и повышение активности КО. Возможно снижение активности АДА в эритроцитах приводит к внеклеточному накоплению аденозина, что является одним из первых шагов в защитном ауто- и паракринном каскадном сигнале, направленном на ограничение повреждения клеток в ответ на неблагоприятные условия, включая гипоксию или ишемию, и в первую очередь для стимуляции выработки NO при гипоксии [293]. Эритроциты являются переносчиками аденозина в ткани, значит, снижение АДА в эритроците выступает как приспособительный механизм сохранения аденозина при канцерогенезе, когда ухудшается оксигенация тканей, тем самым, по-видимому, вызывая программу, которая сдвигает клеточный фенотип к увеличению внутриклеточного аденозина.

В любом случае, обнаруженные различия активностей АДА и КО имеющие тесные корреляционные связи, как при старении, так и при опухолевой прогрессии говорит о системности процесса злокачественной трансформации. Следовательно, повышение активности АДА и КО в плазме может выступать не только маркером целостности клеточных мембран опухолевой ткани, а так же отражать рост трансформированной ткани и ее метастазирование, но и являться показателем патологического старения, общепризнанного фактора риска развития злокачественных новообразований.

Обнаруженные, возрастные изменения показателей обмена ПОС и АОС в эритроцитах онкобольных пациентов, имеют более выраженный и разнонаправленный характер, по сравнению со здоровыми людьми, при этом старение способствует дисбалансу в системе АОЗ и метаболизме пуринов, оказывая влияние на жизнеспособность красных клеток крови и их функциональную полноценность, возможно приводя к снижению биоэнергетики, нарушению проницаемости клеточных мембран, окислению Hb, снижению транспорта кислорода в ткани, возникновению тканевой и гемической гипоксии.

Дисбаланс ферментативного звена АОЗ, а именно снижение активности ГПО и активация СОД, у больных РЖ, скорее всего, выступает как компенсаторный механизм опухолевого роста, активируемый в условиях ОС.

Установлено повышение уровня 2,4-динитрофенилгидразонов во всех изученных образцах у больных РЖ при старении и опухолевой прогрессии. Интересно, что происхождение карбонильных производных белков (2,4-динитрофенилгидразонов) в плазме крови до конца остается не изученным, и не ясно, повышаются ли они за счет выхода из тканей, при их деструкции или же напрямую это связано с усиленным образованием АФК в плазме крови [242; 359]. Однако из полученных нами тесных взаимосвязей между уровнем 2,4-динитрофенилгидразонов в плазме крови, эритроцитах и гомогенатах опухолевых тканей, можно предположить, что существует взаимный обмен продуктами ОМБ, между этими биологическими объектами, причем эритроциты, которые транспортируют различные низкомолекулярные соединения в ткани, скорее всего и выступают связывающим звеном между плазмой и тканями, что усиливается в условиях канцерогенеза.

Так же, повышение уровня 2,4-динитрофенилгидразонов считается одним из ранних и надежных индикаторов интенсивности свободно-радикальных процессов при старении и сопутствующих заболеваниях [224; 225; 227], являясь пусковым механизмом окислительной деструкции других молекул (липидов, нуклеиновых кислот) клетки, оказывая ключевую роль, в молекулярных механизмах развития ОС.

Установлено, что ферменты ПОС и АОС также как и не ферментативные показатели СРО имеют тесную связь с опухолевым ростом, при этом ферменты СРО играют патогенетическую роль в возникновении и прогрессии опухолевого роста, причем выраженность и направленность показанных изменений метаболизма ферментов АОС зависят от тяжести патологического процесса – ранняя или поздняя стадия рака.

Выявлены патофизиологические механизмы взаимосвязи между ферментативными показателями ПОС и АОС, а так же не ферментативными представителями СРО у больных РЖ можно описать в виде схемы (Рисунок 1).

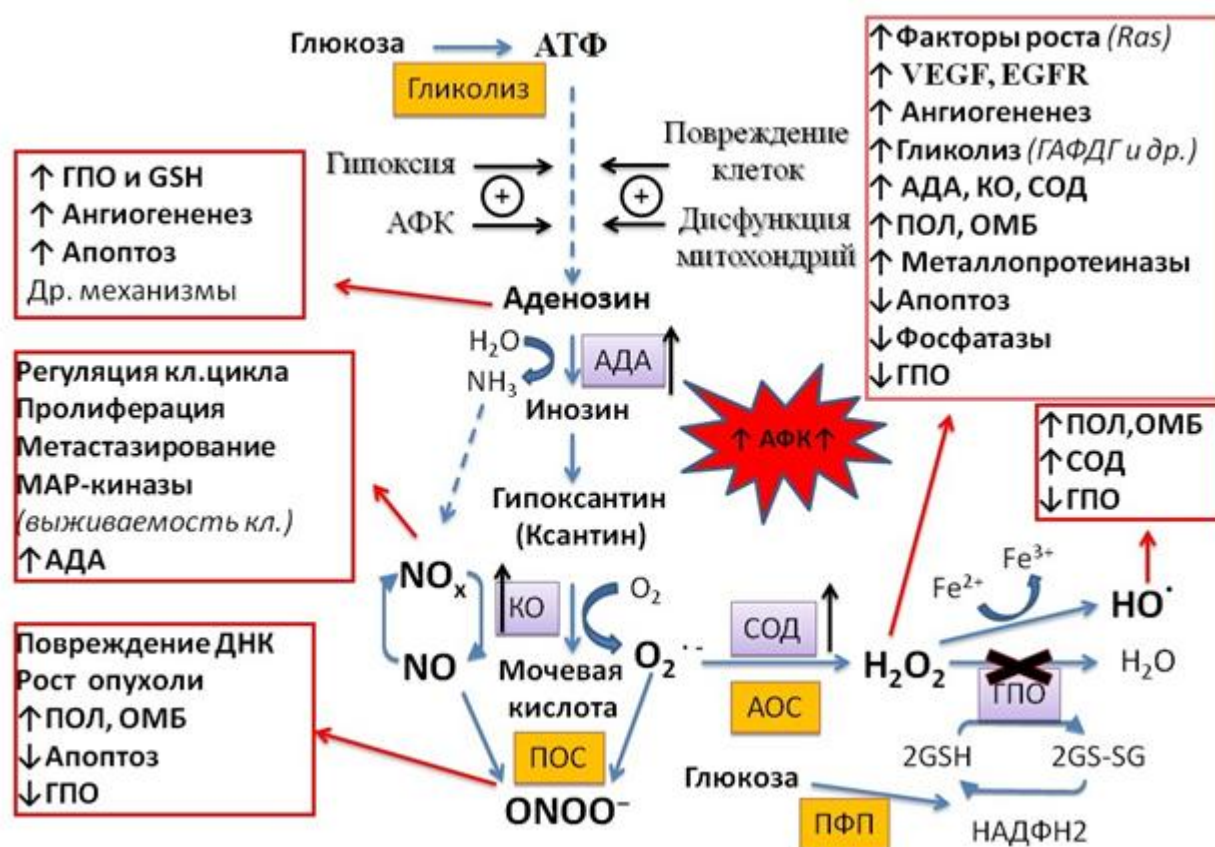


Рис. 1. Патофизиологические механизмы СРО при РЖ

Известно, что в опухолевых клетках происходит интенсификация гликолитического окисления глюкозы, с последующим повышением скорости катаболизма пуриновых нуклеотидов, стимулируемая под действием различных факторов, с последующим накоплением аденозина [272; 306; 329]. В виду того, что аденозин является регуляторной молекулой и в зависимости от условий стимулирующих повышение этой молекулы в клетке, по разному может оказывать свои биологические эффекты, одним из которых является стимуляция ангиогенеза для роста опухоли. Однако аденозин еще и выступает стимулятором экспрессии апоптогенных белков, белков АОС и низкомолекулярных антиоксидантов, что в свою очередь будет препятствовать росту опухоли и ее метастазированию. Следовательно, в опухоли работает тонкий механизм регуляции уровня аденозина, за счет стимуляции ферментов катаболизма этой молекулы (АДА и КО) с последующим включением ферментативного звена АОС в данную регуляцию.

Обнаруженное нами повышение активности АДА и КО приводит к увеличению уровня $O_2^{\cdot-}$, избыток которого, в ткани опухоли, в свою очередь приводит к ингибированию различных белков: регуляторного фермента гликолиза - глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФДГ), а так же Ca^{2+} -АТФ-азы, и при этом повышает активность протеолитических ферментов и апоптогенных белков. Соответственно в опухоли, одновременно срабатывает компенсаторный механизм защиты от $O_2^{\cdot-}$, который проявляется в увеличении активности СОД, что хорошо видно у больных на поздних стадиях РЖ, с последующей наработкой H_2O_2 , которая не будет должным образом утилизироваться в виду снижения активности ГПО, способствуя окислению белков в тканях с последующей их модификацией, что отражает повышение уровня 2,4-динитрофенилгидразонов. Такой механизм приведет к стимуляции активности КО и АДА, причем так как фермент имеет две изоформы АДА1, которая в нормальных условиях является преобладающей формой фермента [51], и АДА2 - активность которой возрастает при патологических состояниях [49; 50], скорее всего нами обнаружено повышение ее второй изоформы (АДА2), тем самым замыкая порочный круг опухолевой прогрессии.

Следовательно, снижение активности ГПО и высокая активность СОД может приводить к накоплению H_2O_2 , способствуя выживаемости опухоли. Известно, что опухолевые клетки обладают способностью адаптироваться к экстремальным воздействиям H_2O_2 , которые в обычных условиях вызывают гибель клеток, а в опухолевой ткани за счет H_2O_2 происходит стимуляция экспрессии факторов роста, гликолитических ферментов, ангиогенеза (VEGF, EGFR), метастазирования, а так же снижение апоптогенных факторов и фосфатаз, при этом изменение редокс-статуса в опухоли за счет H_2O_2 , приводит ко вторичной индукции СОД, сопряженной с агрессивной канцерогенной трансформацией клеток, еще больше нарабатывая регуляторную молекулу с последующим образованием АФК [150; 152].

В эритроцитах больных РЖ так же установлено повышение активности КО способствуя производству $O_2^{\cdot-}$, однако в виду того, что активность СОД в

эритроцитах не изменяется, можно предположить, что фермент в красных клетках крови проявляет нитрит-редуктазную активность [112] нарабатывая NO_x , концентрация которых повышается почти в 3 раза, что по данным литературы приводит к стимуляции активности АДА2 и снижению АДА1, способствуя как бы переключению активности с АДА1 на АДА2 [303], но так как в красных клетках крови присутствует только одна изоформа фермента - АДА1 [304; 305; 48], общая активность фермента будет снижаться, что и было нами установлено. При этом накопление NO_x так же будет способствовать повышению условий для выживаемости опухолевых клеток, еще больше способствуя их озлокачествлению [127; 132; 152].

Такой патофизиологический механизм в свою очередь приводит к снижению скорости утилизации аденозина, приводя к повышению его концентрации в красной клетке, что согласуется с известными данными [306--Миронова]. Аденозин способствует повышению уровня GSH, оказывающего ингибирующее действие на АДА [72; 293], при этом сам, подвергаясь окислению за счет АФК, а так как в эритроцитах онкобольных подавляется скорость ПФП, что проявляется снижением активности его ключевого фермента – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [308], наблюдается нехватка GSH и как нами обнаружено, снижение активности ГПО. При этом в эритроцитах больных РЖ повышается уровень 2,3-бифосфоглицерата стимулируемый в условиях гипоксии, который так же оказывает ингибирующее действие на АДА [132; 152].

Таким образом, у больных РЖ наблюдается системное повышение не ферментативных показателей СРО, которые еще больше стимулируют ферментативное звено ПОС усиливая состояние ОС, тем самым замыкая порочный круг опухолевой прогрессии. Данный факт, в совокупности с представленными ранее данными о наличии взаимозависимостей между активностями АДА в тканях, в плазме и в клетках крови, вероятно, отражает системный характер перестройки обмена пуриновых нуклеотидов в организме больных РЖ стимулируемый под действием ОС. Следовательно, на основании полученных результатов можно предположить, что АФК, могут быть факторами,

стимулирующим активность АДА и КО при патологии, в отличие от большинства ферментов, которые обычно подвергаются ингибированию в условиях ОС. Обнаруженный дисбаланс в ферментативном звене АОЗ носит компенсаторный механизм, активируемый в условиях ОС, способствуя выживаемости опухоли и ее метастазированию. Следовательно, у больных РЖ включаются патофизиологические механизмы регуляции показателей системы СРО, тесно взаимосвязанные между собой, активируемые под действием ОС.

ВЫВОДЫ

В диссертации изложены клинико-экспериментальные и теоретические обоснования связи активностей ферментов ПОС и АОС, также не ферментативных показателей СРО с опухолевым ростом. Причем, выраженность и направленность показанных изменений метаболизма ферментов АОС зависят от тяжести патологического процесса – ранняя или поздняя стадия рака. Установлено влияние старения на ключевые ферменты системы генерации АФК и АОЗ, а так же на изменение продуктов СРО в плазме крови, эритроцитах и в гомогенатах тканей (опухоли и нетрансформированной смежной). Обнаружены новые патогенетические механизмы изменения ферментов системы генерации АФК и АОЗ, а так же продуктов СРО при опухолевой прогрессии.

1. Установлено, что активность АДА в плазме крови больных РЖ в 2,6 раза выше в сравнении со здоровыми добровольцами, в 1,9 раза выше в ткани опухоли по сравнению с нетрансформированными смежными тканями, тогда как в эритроцитах отмечается снижение активности данного фермента в 1,7 раза. Активность КО увеличивается во всех изученных образцах: в плазме крови у больных РЖ в 1,7 раза, в эритроцитах в 1,6 раза, а в гомогенатах опухолевых тканей в 3,1 раза.

2. Обнаружены разнонаправленные изменения активностей ферментативного звена антиоксидантной защиты у больных РЖ: активность СОД в плазме крови ниже в 1,4 раза, по сравнению со здоровыми добровольцами, в эритроцитах достоверно не отличается, а в гомогенатах опухолевых тканей выше в 1,4 раза с нетрансформированными тканями. Активность ГПО в плазме крови выше в 1,2 раза, а в эритроцитах и в ткани опухоли ниже в 1,9 и в 1,5 раз соответственно.

3. Выявлено, что уровень NO_x выше у больных РЖ относительно здоровых людей, в 2,1 для плазмы крови и в 2,7 раза для эритроцитов, а так же в 1,7 раза выше в ткани опухоли по сравнению с нетрансформированными смежными тканями. Уровень 2,4-динитрофенилгидразонов, причем как

основного, так и нейтрального характера, у больных РЖ повышен во всех исследуемых образцах: в плазме крови в 2,1-2,9 раза (в зависимости от вида 2,4-динитрофенилгидразонов), в эритроцитах в 2,1 раза для всех показателей и в опухолевых тканях в 1,3-1,7 раз относительно нетрансформированных тканей.

4. Установлено, что при старении организма, у больных РЖ происходит повышение АДА в плазме крови на 31% и на 11% в опухолевой ткани, а в эритроцитах активность фермента снижается на 16%, при этом в нетрансформированных тканях достоверно не изменяется. Активность КО повышается на 14% в плазме крови и на 26% в эритроцитах, тогда как в опухолевых и нетрансформированных тканях достоверно не изменяется. Активность СОД с возрастом в плазме и эритроцитах снижается на 10% и 19% соответственно, а в опухолевых и нетрансформированных тканях достоверно не изменяется. Активность ГПО при старении снижается во всех изученных образцах: в плазме на 10%, в эритроцитах на 19%, в нетрансформированной ткани на 8% и на 11% в опухолевой ткани.

5. Обнаружено повышение активности АДА в плазме крови, в нетрансформированной и опухолевой ткани на 30%, 20% и 15% в зависимости от тяжести патологического процесса, а в эритроцитах активность фермента снижается на 35%. Активность КО увеличивается в плазме и в ткани опухоли на 15% и 24% соответственно, а в эритроцитах и нетрансформированной ткани достоверно не изменяется. Активность СОД снижается в плазме крови на 8%, а в эритроцитах увеличивается на 42% и опухолевой ткани увеличивается в 13,5 раз, при этом в нетрансформированной ткани не изменяется. Активность ГПО увеличивается на 7% в плазме крови и эритроцитах, а в нетрансформированных и опухолевых тканях снижается на 15% и 18%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В виду того, что трансформация пуринового обмена носит системный характер (катаболизм пуринов усиливается в опухолевых узлах, в смежной ткани и в плазме крови), а так же однонаправлен при старении и опухолевой прогрессии, следовательно, повышение активностей АДА и КО в плазме может отражать рост трансформированной ткани и ее метастазирование, а так же являться показателем патологического старения, общепризнанного фактора риска развития злокачественных новообразований. Соответственно, изученные показатели системы СРО в плазме крови и эритроцитах (АДА, КО, СОД, ГПО, NO_x , 2,4-динитрофенилгидразоны) могут быть использованы как критерии опухолевого роста и патологического старения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Bcl-2 - белковые факторы, регуляторы апоптоза

Ca^{2+} – ионы кальция

EGFR – эпидермальный фактор роста

$\text{GS}\cdot$ - тиольный радикал глутатиона

GSH – глутатион восстановленный

GS-SG – глутатион окисленный

H_2O_2 – перекись водорода

Hb - гемоглобин

HIF-1 α – гипоксия-индуцибельный фактор-1 α

$\text{HO}\cdot$ – гидроксильный радикал

NF-kB – белковые факторы, регуляторы транскрипции

Nrf2 - транскрипционный фактор регуляции генов

NO – монооксид азота

NO_x – суммарная концентрация $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$

NO_2^- – нитриты

NO_3^- – нитраты

NOS – синтаза оксида азота

NOS1 – нейрональная синтаза оксида азота (nNOS)

NOS2 – индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS)

NOS3 – эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS)

$\text{O}_2\cdot^-$ – супероксид-анион радикал

ONOO $^-$ - пероксинитрит

p21 - белки ингибиторы циклин-зависимой протеинкиназы (белки с М 21 кДа)

p38 MAP – митоген-активированные протеинкиназы (белки с М 38 кДа)

p53 – апоптогенный белок (протоонкоген с М 53 кДа)

Ras – семейство белков (протоонкогенные малые G-белки)

TXN - белки семейства тиоредоксинов

VEGF - фактора роста эндотелия сосудов

АДА – аденозиндезаминаза
АДНФГ – альдегиддинитрофенилгидразоны
АМФ – аденозинмонофосфат
АОЗ – антиоксидантная защита
АОС – антиоксидантная система
АТФ – аденозинтрифосфорная кислота
АФК – активные формы кислорода
ГПО – глутатионпероксидаза
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
КДГ – ксантиндегидрогеназа
КДНФГ – кетондинитрофенилгидразоны
КО – ксантиноксидаза
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
НАД – никотинамидадениндинуклеотид окисленный
НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
НАДФ – никотинамидадениндинуклеотид фосфат окисленный
НАДФН – никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный
ОМБ – окислительная модификация белков
ОС – окислительный стресс
ПОС – прооксидантная система
ПОЛ – перекисное окисление липидов
РЖ – рак желудка
СОД – супероксиддисмутаза
СОЖ – слизистая оболочка желудка
СР – свободные радикалы
СРО – свободно-радикальное окисление
ФАД – флавинадениндинуклеотид окисленный
ФНО- α – фактор некроза опухоли (альфа)
цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванилов, А.К. Заболеваемость злокачественными новообразованиями в мире, РФ и отдельных её регионах (обзор литературы) / А.К. Иванилов // Молодой ученый. - 2014. - № 2. - С. 337-339.
2. Рыбалкина, Д.Х. Обзор современных эпидемиологических аспектов по онкопатологии / Д.Х. Рыбалкина, Н.К. Дюсембаева, А.Е. Шпаков [и др.] // Гигиена труда и медицинская экология. - 2015. - № 4. - Т. 49. - С. 31-48.
3. Каприн, А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. - М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. - 250 с.
4. Полунин, Г.Е. Энергетический статус эритроцитов у больных с неспецифическим язвенным колитом и раком толстой кишки на фоне терапии лактатом натрия / Г.Е. Полунин, И.Е. Седаков, И.И. Зинкович [и др.] // Таврический медико-биологический вестник. - 2012. - Т. 15. - № 3. - Ч. 2. - С. 200-202.
5. Pourahmad, J. Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development and Treatment / J. Pourahmad, A. Salimi, E. Seydi // Free Radicals and Diseases. - 2016. - (<https://www.intechopen.com/books/free-radicals-and-diseases/role-of-oxygen-free-radicals-in-cancer-development-and-treatment>).
6. Goldsmith, T.C. Evolution of aging theories: Why modern programmed aging concepts are transforming medical research / T.C. Goldsmith // Biochemistry (Moscow). - 2016. - Vol. 81. - № 12. - P. 1406-1412. - Doi: 10.1134/S0006297916120026.
7. Fransen, M. Aging, age-related diseases and peroxisomes / M. Fransen, M. Nordgren, B. Wang [et al.] // Subcell. Biochem. - 2013. - Vol. 69. - P. 45-65. - Doi: 10.1007/978-94-007-6889-5_3.
8. Phan, L.M. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies / L.M. Phan, S.C. Yeung, M.H. Lee

// Cancer Biol. Med. - 2014. - Vol. 11. - № 1. - P. 1-19. - Doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.001.

9. He, Y.C. Apoptotic death of cancer stem cells for cancer therapy / Y.C. He, F.L. Zhou, Y. Shen [et al.] // Int. J. Mol. Sci. - 2014. - Vol. 15. - № 5. - P. 8335-8351. - Doi: 10.3390/ijms15058335.

10. Li, T. Gastric cancer cell proliferation and survival is enabled by a cyclophilin B/STAT3/microRNA-520d-5p signaling feedback loop / T. Li, H. Guo, X. Zhao [et al.] // Cancer Res. - 2017. - Vol. 77. - № 5. - Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0357. - (<http://cancerres.aacrjournals.org/content/77/5/1227>).

11. Vermorken, A.J.M. Obesity and colorectal cancer risk: the role of oxidative stress / A.J.M. Vermorken, J. Zhu, E. Andres // Gut. - 2014. - Vol. 63. - № 3. - P. 529-530. - Doi: 10.1136/gutjnl-2013-304701.

12. Дзасохов, А.С. Патогенетические аспекты опухолевого роста в свете тканевой теории канцерогенеза (краткий литературный обзор) / А.С. Дзасохов // ВНМТ. - 2012. - Т. 19. - № 1. - С. 179-181.

13. Белковец, А.В. Рак желудка: современные молекулярно-генетические данные (обзор литературы) / А.В. Белковец, О.В. Решетников, С.А. Курилович, В.Н. Максимов // Сибирский онкологический журнал. - 2014. - Т. 62. - № 2. - С. 56-64.

14. Borzenko, B.G. Role of Thymidine Phosphorylase/Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor in Health and Cancer Growth / B.G. Borzenko, E.M. Bakurova, K.A. Mironova, A.Yu. Azarhov // J. J. Enzyme. - 2015. - Vol. 1. - № 2. - (<http://enzymology.jacobspublishers.com/index.php/j-j-enzymol-enzy-eng-1-1-008>).

15. Battelli, M.G. Xanthine oxidoreductase in cancer: more than a differentiation marker / M.G. Battelli, L. Polito, M. Bortolotti, A. Bolognesi // Cancer Med. - 2016. - Vol. 5. - № 3. - P. 546-557. - Doi: 10.1002/cam4.601.

16. Ramirez-Exposito, M.J. Circulating oxidative stress parameters in pre- and post-menopausal healthy women and in women suffering from breast cancer treated or not with neoadjuvant chemotherapy / M.J. Ramirez-Exposito, E. Sanchez-Lopez, C. Cueto-

- Urena [et al.] // *Exp. Gerontol.* - 2014. - Vol. 58. - P. 34-42. - Doi: 10.1016/j.exger.2014.07.006.
17. Wu, L. Apoptosis induced by adenosine involves endoplasmic reticulum stress in EC109 cells / L. Wu, B. Wei, Y. Guo, [et al.] // *International Journal of Molecular Medicine.* - 2012. - Vol. 30. - № 4. - P. 797-804. - Doi: 10.3892/ijmm.2012.1085.
 18. Hatfield, S.M. Oxygenation to improve cancer vaccines, adoptive cell transfer and blockade of immunological negative regulators / S.M. Hatfield, M. Sitkovsky // *Oncoimmunology.* - 2015. - Vol. 4. - № 12. - (<http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2015.1052934>).
 19. Srivastava, K.C. Evaluation of oxidant-antioxidant status in tissue samples in oral cancer: A case control study / K.C. Srivastava, R.D. Austin, D. Shrivastava // *Dent. Res. J.* - 2016. - Vol. 13. - № 2. - P. 181-187.
 20. Rauchova, H. Hypoxia-induced lipid peroxidation in the brain during postnatal ontogenesis / H. Rauchova, M. Vokurkova, J. Koudelova // *Physiol. Res.* - 2012. - Vol. 61. - № 1. - P. 89-101.
 21. Гусев, В.А. Современные концепции свободнорадикальной теории старения / В.А. Гусев, Л.Ф. Панченко // *Нейрохимия.* - 1997. - Т. 14. - Ч. 1. - С. 14-29.
 22. Oberley, L.W. Cell differentiation, aging and cancer. The possible role of superoxide and superoxide dismutase / L.W. Oberley, T.D. Oberley, C.R. Buettner // *Med. Hypotheses.* - 1980. - Vol. 6. - P. 249-268.
 23. Эмануэль, Н.М. Лейкоз у мышей и особенности его развития при воздействии ингибиторов цепных окислительных процессов / Н.М. Эмануэль, Л.П. Липчина // *Докл. АН СССР.* - 1958. - Т. 121. - С. 141-144.
 24. Trachootham, D. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate / D. Trachootham, Y. Zhou, H. Zhang [et al.] // *Cancer Cell.* - 2006. - Vol. 10. - № 3. - P. 241-52.
 25. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Droge // *Physiological Reviews.* - 2002. - Vol. 82. - № 1. - P. 47-95.

26. Braig, M. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development / M. Braig, S. Lee, C. Loddenkemper [et al.] // *Nature*. - 2005. - Vol. 436. - № 7051. - P. 660-665.
27. Lu, W. Models of reactive oxygen species in cancer / W. Lu, M. Ogasawara, A.P. Huang // *Drug Discov. Today Dis. Models*. - 2007. - Vol. 4. - № 2. - P. 67-73. - Doi: 10.1016/j.ddmod.2007.10.005.
28. Mitoma, H. Mechanisms for cytotoxic effects of anti-tumor necrosis factor agents on transmembrane tumor necrosis factor alpha-expressing cells: comparison among infliximab, etanercept, and adalimumab / H. Mitoma, T. Horiuchi, H. Tsukamoto [et al.] // *Arthritis Rheum*. - 2008. - Vol. 58. - № 5. - P. 1248-1257. - Doi: 10.1002/art.23447.
29. Khan, N. Abrogation of potassium bromate-induced renal oxidative stress and subsequent cell proliferation response by soy isoflavones in Wistar rats / N. Khan, S. Sultana // *Toxicology*. - 2004. - Vol. 201. - № 1. - P. 173-184. - Doi: 10.1016/j.tox.2004.04.012.
30. Tofovic, S.P. Adenosine deaminase-adenosine pathway in hemolysis-associated pulmonary hypertension / S.P. Tofovic, E.K. Jackson, O. Rafikova // *Med.Hypotheses*. - 2009. - Vol. 72. - № 6. - P. 713-719. - Doi: 10.1016/j.mehy.2008.12.043.
31. Бакурова, О.М. Зміни активності аденозіндезамінази при підвищеному онкоризику та карциномах різної локалізації / О.М. Бакурова, О.Ю. Попович, К.О. Миронова [и др.] // *Науковий вісник Ужгородського університету, серія «Медицина»*. - 2011. - Т. 42. - Вып. 3. - С. 19-23. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/UNUMED_2011_3_4.
32. Akan, Z. Antioxidants may protect cancer cells from apoptosis signals and enhance cell viability / Z. Akan, A.I. Garip // *Asian Pac. J. Cancer Prev*. - 2013. - Vol. 14. - № 8. - P. 4611-4614.
33. Mahajan, M. Oxidative stress and its relationship with adenosine deaminase activity in various stages of breast cancer / M. Mahajan, N. Tiwari, R. Sharma, S. Kaur, N. Singh // *Indian J.Clin.Biochem*. - 2013. - Vol. 28. - № 1. - P. 51-54.

34. Aggarwal, S. Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling / S. Aggarwal, C.M. Gross, S. Sharma, J.R. Fineman, SM. Black // *Compr. Physiol.* - 2013. - Vol. 3. - № 3. - P. 1011-1034.
35. Xu, C. Superoxide generated by pyrogallol reduces highly water-soluble tetrazolium salt to produce a soluble formazan: a simple assay for measuring superoxide anion radical scavenging activities of biological and abiological samples / C. Xu, S. Liu, Z. Liu [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* - 2013. - Vol. 793. - P. 53-60. - Doi: 10.1016/j.aca.2013.07.027.
36. Wang, C.H. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging / C.H. Wang, S.B. Wu, Y.T. Wu, Y.H. Wei // *Exp. Biol Med.* - 2013. - Vol. 238. - № 5. - P. 450-460. - Doi: 10.1177/1535370213493069.
37. Dai, D.F. Mitochondria and cardiovascular aging / D.F. Dai, P.S. Rabinovitch, Z. Ungvari // *Circ. Res.* - 2012. - Vol. 110. - № 8. - P. 1109-1124. - Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.246140.
38. Griffiths, H.R. Redox regulation of protein damage in plasma / H.R. Griffiths, I.H. Dias, R.S. Willetts, A. Devitt // *Redox. Biol.* - 2014. - Vol. 2. - P. 430-435. - Doi: 10.1016/j.redox.2014.01.010.
39. Ilatovskaya, D.V. ROS production as a common mechanism of ENaC regulation by EGF, insulin, and IGF-1/ D.V. Ilatovskaya, T.S. Pavlov, V. Levchenko, A. Staruschenko // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* - 2013. - Vol. 304. - № 1. - P. 102-111. - Doi: 10.1152/ajpcell.00231.2012.
40. Boban, M. Circulating purine compounds, uric acid, and xanthine oxidase/dehydrogenase relationship in essential hypertension and end stage renal disease / M. Boban, G Kocic, S. Radenkovic [et al.] // *Ren. Fail.* - 2014. - Vol. 36. - № 4. - P. 613-618. - Doi: 10.3109/0886022X.2014.882240.
41. Erkilic, K. Adenosine deaminase enzyme activity is increased and negatively correlates with catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in patients with Behcet's disease: original contributions/clinical and laboratory investigations / K.

- Erkilic, C. Evereklioglu, M. Cekmen [et al.] // *Mediators Inflamm.* - 2003. - Vol. 12. - № 2. - P. 107-116.
42. Miszczak-Zaborska, E. Influence of the thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) on tumor angiogenesis. Catalytic activity of enzyme inhibitors / E. Miszczak-Zaborska, M. Smolarek, J. Bartkowiak // *Postepy Biochem.* - 2010. - Vol. 56. - № 1. - P. 61-66.
43. Zavialov, A.V. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity / A.V. Zavialov, A. Engstrom // *Biochem. J.* - 2005. - Vol. 391. - № 1. - P. 51-57.
44. Aghaei, M. Adenosine deaminase activity in the serum and malignant tumors of breast cancer: the assessment of isoenzyme ADA1 and ADA2 activities / M. Aghaei, F. Karami-Tehrani, S. Salami, M. Atri // *Clin. Biochem.* - 2005. - Vol. 38. - № 10. - P. 887-891.
45. Aydin, M. Direct and indirect effects of kisspeptin on liver oxidant and antioxidant systems in young male rats / M. Aydin, S. Oktar, Z. Yonden [et al.] // *Cell Biochem. Funct.* - 2010. - Vol. 28. - № 4. - P. 293-299. - Doi: 10.1002/cbf.1656.
46. Ozyurt, B. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury in rats / B. Ozyurt, M. Iraz, K. Koca [et al.] // *Mol. Cell Biochem.* - 2006. - Vol. 292. - № 1-2. - P. 197-203.
47. Hille, R. Molybdenum enzymes in higher organisms / R. Hille, T. Nishino, F. Bittner // *Coord. Chem. Rev.* - 2011. - Vol. 255. - P. 1179-1205. - Doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.034.
48. Sun, M. Sp1 is involved in 8-chloro-adenosine-upregulated death receptor 5 expression in human hepatoma cells / M. Sun, J. Zhang, S. Liu [et al.] // *Oncol. Rep.* - 2008. - Vol. 19. - № 1. - P. 177-185.
49. Rodrigues L.F.S. Multiple Iso-Forms of caprine adenosine deaminase / L.F.S. Rodrigues, G.H. Freire // *Israel Veterinary Medical Association.* - 2000. - Vol. 55. - № 4. - P. 433-444.
50. Алинежад, С.М. Активность аденозиндезаминазы в сыворотке и клетках крови больных туберкулезным плевритом / С.М. Алинежад, Г.Л. Гуревич, Ф.И.

Захаревский [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2008. - № 1. - С. 20-23.

51. Hönig, M. Patients with adenosine deaminase deficiency surviving after hematopoietic stem cell transplantation are at high risk of CNS complications / M. Hönig, M. Albert, A. Schulz [et al.] // *Blood*. - 2007. - Vol. 109. - № 8. - P. 3595-3602.

52. Iwaki-Egawa, S. Human plasma adenosinedeaminase 2 is secreted by activated monocytes / S. Iwaki-Egawa, T. Yamamoto, Y. Watanabe // *Biol. Chem.* - 2006. - Vol. 387. - № 3. - P. 319-321.

53. Yaguchi, T. Caspase-4 activation in association with decreased adenosine deaminase activity may be a factor for gastric ulcer / T. Yaguchi, M. Saito, Y. Yasuda, T. Nishizaki // *Digestion*. - 2010. - Vol. 81. - № 1. - P. 62-67.

54. Xiong, Y. Suppression of T-cell activation in vitro and in vivo by cordycepin from *Cordyceps militaris* / Y. Xiong, S. Zhang, L. Xu J. [et al.] // *Surg. Res.* - 2013. - Vol. 185. - № 2. - P. 912-922. - Doi: 10.1016/j.jss.2013.06.057.

55. Cekic, C. Extracellular adenosine regulates naive T cell development and peripheral maintenance / C. Cekic, D. Sag, Y.J. Day, J. Linden // *J. Exp. Med.* - 2013. - Vol. 210. - № 12. - P. 2693-2706. - Doi: 10.1084/jem.20130249.

56. Kawabe, J.I. Role of the Vasa Vasorum and Vascular Resident Stem Cells in Atherosclerosis / J.I. Kawabe, N. Hasebe // *Biomed. Res. Int.* - 2014. - (<http://doi.org/10.1155/2014/701571>).

57. Ndisang, J.F. Oxidative stress and inflammation in obesity, diabetes, hypertension, and related cardiometabolic complications / J.F. Ndisang, A. Vannacci, S. Rastogi // *Oxid. Med. Cell Longev.* - 2014. - (<http://doi.org/10.1155/2014/506948>).

58. Liu, Y. Anti-apoptotic effect of the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 in human breast cancer cells / Y. Liu, F. Sato, T. Kawamoto [et al.] // *Genes Cells*. - 2010. - Vol. 15. - № 4. - P. 315-325. - Doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01381.x.

59. Lo, S.Z. TNF-alpha renders macrophages resistant to a range of cancer chemotherapeutic agents through NF-kappaB-mediated antagonism of apoptosis

- signalling / S.Z. Lo, J.H. Steer, D.A. Joyce // *Cancer Lett.* - 2011. - Vol. 307. - № 1. - P. 80-92. - Doi: 10.1016/j.canlet.2011.03.020.
60. Pimentel, V.C. Adenosine deaminase activity, lipid peroxidation and astrocyte responses in the cerebral cortex of rats after neonatal hypoxia ischemia / V.C. Pimentel, L.P. Belle, F.V. Pinheiro [et al.] // *Int. J. Dev. Neurosci.* - 2009. - Vol. 27. - № 8. - P. 857-862.
61. Осинский, С. Микрофизиология опухолей / С. Осинский, П. Ваупель. - К.: Наукова думка, 2009. - 253 с.
62. Шатова, О.П. Роль лактата в аденозинергической иммуносупрессии / О.П. Шатова // *Питання експериментальної та клінічної медицини.* - 2013. - Т. 2. - Вип. 17. - С. 153-159.
63. Nowak, M. The A2aR adenosine receptor controls cytokine production in iNKT cells / M. Nowak, L. Lynch, S. Yue [et al.] // *Eur. J. Immunol.* - 2010. - Vol. 40. - № 3. - P. 682-687.
64. Sitkovsky, M.V. Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia / M.V. Sitkovsky, J. Kjaergaard, D. Lukashev, A. Ohta // *Clin. Cancer Res.* - 2008. - Vol. 14. - № 19. - P. 5947-5952. - Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0229.
65. Kojima, H. Differentiation stage-specific requirement in hypoxia-inducible factor-1alpha-regulated glycolytic pathway during murine B cell development in bone marrow / H. Kojima, A. Kobayashi, D. Sakurai [et al.] // *J. Immunol.* - 2010. - Vol. 184. - № 1. - P. 154-163. - Doi: 10.4049/jimmunol.0800167.
66. Zhou, M. Adenosine Transport by Plasma Membrane Monoamine Transporter (PMAT): Re-investigation and Comparison with Organic Cations / M. Zhou, H. Duan, K. Engel [et al.] // *Drug Metab. Dispos.* - 2010. - Vol. 38. - № 10. - P. 1798-1805. - Doi:10.1124/dmd.110.032987.
67. Ralevic, V. Hypoxic vasodilatation: is an adenosine-prostaglandins-NO signalling cascade involved? / V. Ralevic // *J. Physiol.* - 2002. - Vol. 544. - Pt. 1. - (<http://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.028902>).

68. Zipprich, A. Nitric oxide is a mediator of the adenosine-induced vasodilatation of the hepatic artery in CCl₄-cirrhotic rats / A. Zipprich, C. Ripoll, M.R. Loureiro-Silva, R.J. Groszmann // *Z. Gastroenterol.* - 2007. - Vol. 30. - № 7. - P. 988-994. - Doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02278.x.
69. Чеснокова, Н.П. Возможности эффективного использования антиоксидантов и антигипоксантов в экспериментальной и клинической медицине / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова, Г.А. Афанасьева // *Успехи современного естествознания.* - 2006. - № 8. - С. 18-25.
70. Gul, I. Oxidative stress and antioxidant defense in plasma after repeated bouts of supramaximal exercise: the effect of coenzyme Q10 / I. Gul, H. Gokbel, M. Belviranli [et al.] // *J. Sports Med. Phys. Fitness.* - 2011. - Vol. 51. - № 2. - P. 305-312.
71. Zhou, F.L. Involvement of oxidative stress in the relapse of acute myeloid leukemia / F.L. Zhou, W.G. Zhang, Y.C. Wei [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 2010. - Vol. 285. - № 20. - P. 15010-15015. - Doi: 10.1074/jbc.M110.103713.
72. Zhang, Y. Adenosine-dependent induction of glutathione peroxidase 1 in human primary endothelial cells and protection against oxidative stress / Y. Zhang, D.E. Handy, J. Loscalzo // *Circ. Res.* - 2005. - Vol. 96. - № 8. - P. 831-837.
73. Maggirwar, S.B. Adenosine acts as an endogenous activator of the cellular antioxidant defense system / S.B. Maggirwar, D.N. Dhanraj, S.M. Somani, V. Ramkumar // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1994. - Vol. 201. - № 2. - P. 508-515.
74. Фартушняк, Л.В. Морфофункціональні зміни еритроцитів при виразковій хворобі у хворих різного віку в динаміці лікування: автореф. дис... канд. мед. наук / Л.В. Фартушняк. - Буковинська держ. мед. академія. - Ів-Фр., 2000. - 20 с.
75. Атуллаханов, Ф.И. Влияние гликолиза на метаболизм аденилатов в эритроцитах человека / Ф.И. Атуллаханов, В.М. Витвицкий, А.М. Жаботинский [и др.] // *Биохимия.* - 1984. - Т. 49. - Вып. 1. - С. 104-110.
76. Gonzalez, M.J. The bio-energetic theory of carcinogenesis / M.J. Gonzalez, J.R. Miranda Massari, J. Duconge [et al.] // *Med. Hypotheses.* - 2012. - Vol. 79. - № 4. - P. 433-439. - Doi: 10.1016/j.mehy.2012.06.015.

77. Zebelenko, Y.G. An important erythrocytes metabolic disorders in gastrointestinal cancer patients / Y.G. Zebelenko, S.O. Zuikov, K.O. Mironova [et al.] // Abstracts of the 45th Meeting of the Polish Biochemical Society, Wista, Poland, september 20th - 23rd 2010. - 2010. - Vol. 57. - № 4. - P. 95.
78. Saghiri, R. Serum adenosine deaminase activity in patients with systemic lupus erythematosus: a study based on ADA1 and ADA2 isoenzymes pattern / Saghiri R, Ghashghai N, Movaseghi S [et al.] // Rheumatol. Int. - 2012. - Vol. 32. - № 6. - P. 1633-1638.
79. Борзенко, Б.Г. Возможность использования биохимических исследований при формировании групп повышенного онкологического риска / Б.Г. Борзенко, Е.М. Бакурова, А.М. Белозерцев [и др.] // Новообразования. - 2007. - № 2. - С. 60-66.
80. Zhang, Y. Detrimental effects of adenosine signaling in sickle cell disease / Y. Zhang, Y. Dai, J. Wen [et al.] // Nat. Med. - 2011. - Vol. 17. - № 1. - P. 79-86. - Doi: 10.1038/nm.2280.
81. Yilmaz, H.R. Protective role of caffeic acid phenethyl ester and erdosteine on activities of purine-catabolizing enzymes and level of nitric oxide in red blood cells of isoniazid-administered rats / H.R. Yilmaz, E. Uz, O. Gökalp [et al.] // Toxicol. Ind. Health. - 2008. - Vol. 24. - № 8. - P. 519-524. - Doi: 10.1177/0748233708098128.
82. Paravicini, T.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities / T.M. Paravicini, R.M. Touyz // Diabetes Care. - 2008. - Vol. 31. - № 2. - P. 170-180. - Doi: 10.2337/dc08-s247.
83. Kalra, S. Application of HPLC to study the kinetics of a branched bi-enzyme system consisting of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and xanthine oxidase an important biochemical system to evaluate the efficiency of the anticancer drug 6-mercaptopurine in ALL cell line / S. Kalra, M.K. Paul, H. Balaram, A.K. Mukhopadhyay // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. - 2007. - Vol. 850. - № 1-2. - P. 7-14. - Doi: 10.1016/j.jchromb.2006.10.012.
84. Nishino, T. Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of a non-

convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant / T. Nishino, K. Okamoto, Y. Kawaguchi [et al.] // J. Biol. Chem. - 2005. - Vol. 280. - № 26. - P. 24888-24894.

85. Vorbach, C. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system / C. Vorbach, R. Harrison, M.R. Capecchi // Trends Immunol. - 2003. - Vol. 24. - № 9. - P. 512-517.

86. Nishino, T. Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase / T. Nishino, K. Okamoto, B.T. Eger, E.F. Pai // FEBS J. - 2008. - Vol. 275. - № 13. - P. 3278-3289. - Doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06489.x.

87. McNally, J.S. Regulation of xanthine oxidoreductase protein expression by hydrogen peroxide and calcium / J.S. McNally, A. Saxena, H. Cai [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. - 2005. - Vol. 25. - P. 1623-1628.

88. Boldyrev, A. Carnosine and Oxidative Stress in Cells and Tissues / A. Boldyrev. - Nova Publishers, 2007. - 297 p.

89. Ichida, K. Mutations associated with functional disorder of xanthine oxidoreductase and hereditary xanthinuria in humans / K. Ichida, Y. Amaya, K. Okamoto, T. Nishino // Int. J. Mol. Sci. - 2012. - Vol. 13. - № 11. - P. 15475-15495. - Doi: 10.3390/ijms131115475.

90. Griguer, C.E. Xanthine oxidase-dependent regulation of hypoxia-inducible factor in cancer cells / C.E. Griguer, C.R. Oliva, E.E. Kelley [et al.] // Cancer Res. - 2006. - Vol. 66. - № 4. - P. 2257-2263.

91. Oberbach, A. Sleeve gastrectomy reduces xanthine oxidase and uric acid in a rat model of morbid obesity / A. Oberbach, J. Neuhaus, N. Schlichting [et al.] // Surg. Obes. Relat. Dis. - 2013. - Vol. 10. - № 4. - P. 684-690. - Doi: 10.1016/j.soard.2013.12.010.

92. Seymour, K.J. Stress activation of mammary epithelial cell xanthine oxidoreductase is mediated by p38 MAPK and CCAAT/enhancer-binding protein-beta / K.J. Seymour, L.E. Roberts, M.A. Fini [et al.] // J. Biol. Chem. - 2006. - Vol. 281. - № 13. - P. 8545-8558.

93. Ardan, T. Comparative histochemical and immunohistochemical study on xanthine oxidoreductase/xanthine oxidase in mammalian corneal epithelium / T. Ardan, J. Kovaceva, J. Cejková // *Acta Histochem.* - 2004. - Vol. 106. - № 1. - P. 69-75. - Doi:10.1016/j.acthis.2003.08.001.
94. Harrison, R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? / R. Harrison // *Free Radic. Biol. Med.* - 2002. - Vol. 33. - № 6. - P. 774-797. - Doi:10.1016/S0891-5849(02)00956-5.
95. Raghuvanshi, R. Xanthine oxidase as a marker of myocardial infarction / R. Raghuvanshi, A. Kaul, P. Bhakuni [et al.] // *Indian J. Clin. Biochem.* - 2007. - Vol. 22. - № 2. - P. 90-92. - Doi: 10.1007/BF02913321.
96. Metz, S. A combined QM/MM study on the reductive half-reaction of xanthine oxidase: substrate orientation and mechanism / S. Metz, W.A. Thiel // *J. Am. Chem. Soc.* - 2009. - Vol. 131. - № 41. - P. 14885-14902. - Doi: 10.1021/ja9045394.
97. Hartney, T. Xanthine oxidase-derived ROS upregulate Egr-1 via ERK1/2 in PA smooth muscle cells; model to test impact of extracellular ROS in chronic hypoxia / T. Hartney, R. Birari, S. Venkataraman [et al.] // *PLoS One.* - 2011. - Vol. 6. - № 11. - (<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0027531>).
98. Ungvári, Z. Role of oxidative-nitrosative stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure / Z. Ungvári, S.A. Gupte, F.A. Recchia [et al.] // *Curr. Vas. Pharmacol.* - 2005. - Vol. 3. - P. 221-229.
99. Brand, M.D. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins / M.D. Brand, C. Affourtit, T.C. Esteves [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* - 2004. - Vol. 37. - № 6. - P. 755-767.
100. Cui, H. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging / H. Cui, Y. Kong, H. Zhang // *J. Signal Transduct.* - 2012. - (<http://doi.org/10.1155/2012/646354>).
101. Shi, D.Y. The role of cellular oxidative stress in regulating glycolysis energy metabolism in hepatoma cells / D.Y. Shi, F.Z. Xie, C. Zhai [et al.] // *Mol. Cancer.* - 2009. - Vol. 8. - № 32. - (<http://doi.org/10.1186/1476-4598-8-32>).

102. Cowen, R.L. Gene therapy approaches to enhance bioreductive drug treatment / R.L. Cowen, E.J. Garside, B. Fitzpatrick [et al.] // Br. J. Radiol. - 2008. - Vol. 8. - № 1. - P. 45-56. - Doi: 10.1259/bjr/55070206.
103. Clambey, E.T. Hypoxia-inducible factor-1 α -dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa / E.T. Clambey, E.N. McNamee, J.A. Westrich [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2012. - Vol. 109. - № 41. - P. 2784-2793. - Doi: 10.1073/pnas.1202366109.
104. Nanduri, J. Intermittent hypoxia degrades HIF-2 α via calpains resulting in oxidative stress: implications for recurrent apnea-induced morbidities / J. Nanduri, N. Wang, G. Yuan [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2009. - Vol. 106. - № 4. - P. 1199-1204. - Doi: 10.1073/pnas.0811018106.
105. Nanduri, J. Xanthine oxidase mediates hypoxia-inducible factor-2 α degradation by intermittent hypoxia / J. Nanduri, D.R. Vaddi, S.A. Khan [et al.] // PLoS One. - 2013. - Vol. 8. - № 10. - (<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0075838>).
106. Yuan, G. Mutual antagonism between hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α regulates oxygen sensing and cardio-respiratory homeostasis / G. Yuan, Y.J. Peng, V.D. Reddy [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2013. - Vol. 110. - № 19. - P. 1788-1796. - Doi: 10.1073/pnas.1305961110.
107. Маеда, Х. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке (обзор) / Х. Маеда, Т. Акаике // Биохимия. - 1998. - Т. 3. - Вып. 7. - С. 1007-1019.
108. Eskurza, I. Xanthine oxidase does not contribute to impaired peripheral conduit artery endothelium-dependent dilatation with ageing / I. Eskurza, Z.D. Kahn, D.R. // Seals J Physiol. - 2006. - Vol. 571. - № 3. - P. 661-668.
109. Takano, Y. Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase / Y. Takano, K. Hase-Aoki, H. Horiuchi [et al.] // Life Sci. - 2005. - Vol. 76. - № 16. - P. 1835-1847.
110. Kinugawa, S. A defect of neuronal nitric oxide synthase increases xanthine oxidase-derived superoxide anion and attenuates the control of myocardial oxygen

consumption by nitric oxide derived from endothelial nitric oxide synthase / S. Kinugawa, H. Huang, Z. Wang [et al.] // *Circ Res.* - 2005. - Vol. 96. - P. 355-362.

111. Khan, S.A. Neuronal nitric oxide synthase negatively regulates xanthine oxidoreductase inhibition of cardiac excitation-contraction coupling / S.A. Khan, K. Lee, K.M. Minhas [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2004. - Vol. 101. - № 45. - P. 15944-15948.

112. Fini, M.A. Hypertension, nitrate-nitrite, and xanthine oxidoreductase catalyzed nitric oxide generation: pros and cons / M.A. Fini, R.J. Johnson, K.R. Stenmark, R.M. Wright // *Hypertension.* - 2013. - Vol. 62. - № 3. - (<http://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01826>).

113. Kamat, J.P. Peroxynitrite: a potent oxidizing and nitrating agent / J.P. Kamat // *Indian J. Exp. Biol.* - 2006. - Vol. 44. - № 6. - P. 436-447.

114. Yun, J.W. A novel upregulation of glutathione peroxidase 1 by knockout of liver regenerating protein Reg3beta aggravates acetaminophen-induced hepatic protein nitration / J.W. Yun, K. Lum, X.G. Lei // *Free Radic. Biol. Med.* - 2013. - Vol. 65. - P. 291-300. - Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.034.

115. Hofstetter, D. Hydrogen Exchange Equilibria in Glutathione Radicals: Rate Constants / D. Hofstetter, T. Nauser, W.H. Koppenol // *Chem Res Toxicol.* - 2010. - Vol. 23. - № 10. - P. 1596-1600. - Doi: 10.1021/tx100185k.

116. You, Z.L. Schiff base transition metal complexes as novel inhibitors of xanthine oxidase / Z.L. You, D.H. Shi, C. Xu [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* - 2008. - Vol. 43. - № 4. - P. 862-871.

117. Huang, X.F. Synthesis of resveratrol analogues, and evaluation of their cytotoxic and xanthine oxidase inhibitory activities / X.F. Huang, H.Q. Li, L. Shi [et al.] // *Chem. Biodivers.* - 2008. - Vol. 5. - № 4. - P. 636-642. - Doi: 10.1002/cbdv.200890059.

118. Khosravan, R. The effect of age and gender on pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of febuxostat, a novel nonpurine selective inhibitor of xanthine oxidase / R. Khosravan, M.J. Kukulka, J.T. Wu [et al.] // *J. Clin. Pharmacol.* - 2008. - Vol. 48. - № 9. - P. 1014-1024. - Doi: 10.1177/0091270008322035.

119. Muraoka, S. Inhibition of xanthine oxidase by phytic acid and its antioxidative action / S. Muraoka, T. Miura // *Life Sciences*. - 2004. - Vol. 74. - № 13. - P. 1691-1700.
120. Artacho-Cordón, F. Matrix metalloproteinases: Potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy / F. Artacho-Cordón, S. Ríos-Arrabal, P.C. Lara [et al.] // *Surgical oncology*. - 2012. - Vol. 21. - № 3. - P. 143-151. - Doi: 10.1016/j.suronc.2012.06.001.
121. Pacher, P. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol / P. Pacher, A. Nivorozhkin, C. Szabó // *Pharmacol. Rev.* - 2006. - Vol. 58. - № 1. - P. 87-114.
122. Hashimoto, T. Y-700, a novel inhibitor of xanthine oxidase, suppresses the development of colon aberrant crypt foci and cell proliferation in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice / T. Hashimoto, A. Fukunari, I. Yamada [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* - 2005. - Vol. 69. - № 1. - P. 209-211.
123. Zhang, F. 6-thioguanine induces mitochondrial dysfunction and oxidative DNA damage in acute lymphoblastic leukemia cells / F. Zhang, L. Fu, Y. Wang // *Mol. Cell Proteomics*. - 2013. - Vol. 12. - № 12. - P. 3803-3811. - Doi: 10.1074/mcp.M113.029595.
124. Brem, R. Oxidation-mediated DNA cross-linking contributes to the toxicity of 6-thioguanine in human cells / R. Brem, P. Karran // *Cancer Res.* - 2012. - Vol. 72. - № 18. - P. 4787-4795. - Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1278.
125. Анисимов, В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: в 2-х т. 2-е изд., перераб. и доп. / В.Н. Анисимов. - СПб.: Наука, 2008. - Т. 1. - 481 с.
126. Волкова, Ю.В. Активность ферментов первой линии антиоксидантной защиты в печени крыс пубертатного возраста при стрессе / Ю.В. Волкова, Л.Л. Сухова, В.В. Давыдов, А.В. Голобородько // *Биомедицинская химия*. - 2012. - Т. 58. - Вып. 5. - С. 573-578.
127. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова [и др.] - М.: Фирма «Слово», 2006. - 556 с.

128. Пашковский, П.П. Микро РНК и регуляция экспрессии генов Cu/Zn-СОД в растении *Thellungiella salsuginea* при действии различных концентраций меди / П.П. Пашковский, Н.Л. Радюкина // Вестник Томского государственного университета. - 2011. - Т. 15. - № 3. - С. 147-151.
129. Medeiros, M.S. Iron and Oxidative Stress in Parkinson's Disease: An Observational Study of Injury Biomarkers / M.S. Medeiros, A. Schumacher-Schuh, A.M. Cardoso [et al.] // PLoS ONE. - Vol. 11. - № 1. - (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146129>).
130. Allen, S. Cu(I) affinities of the domain 1 and 3 sites in the human metallochaperone for Cu,Zn-superoxide dismutase / S. Allen, A. Badarau, C. Dennison // Biochemistry. - 2012. - Vol. 51. - № 7. - P. 1439-1448. - Doi: 10.1021/bi201370r.
131. Reuter, S. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? / S. Reuter, S.C. Gupta, M.M. Chaturvedi, B.B. Aggarwal // Free Radic. Biol. Med. - 2010. - Vol. 49. - № 11. - P. 1603-1616. - Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
132. Зенков, Н.К. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Лайкин, Е.Б. Меньшикова. - М.: Наука «Интерпериодика», 2001. - 340 с.
133. Зубакова, С.М. Возможності застосування інфрачервоного излучения і його комплексу з іншими фізичними чинниками як стрес-стимулюючий вплив / С.М. Зубакова, Н.І. Варакина, О.І. Ніколенко // Лазерна медицина. - 1999. - Т. 3. - № 3-4. - С. 56-60.
134. Turkozkan, N. The effects of peroxynitrite on erythrocytes / N. Turkozkan, A. Unlu, A. Ertabak [et al.] // Clin. Chem. Lab. Med. - 2001. - Vol. 39. - № 12. - P. 1263-1266.
135. Современные проблемы биохимии. Методы исследований: учеб. пособие / Е.В. Барковский [и др.]; под ред. проф. А.А. Чиркина. - Минск: Выш. шк., 2013. - 491 с.
136. Chávez, M.D. Impact of superoxide dismutase on nitric oxide and peroxynitrite levels in the microcirculation - a computational model / M.D. Chávez, N. Lakshmanan, M. Kavdia // Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. - 2007. - P.1022-1026.

137. Васильева, С.В. Активация SoxRS-регулона в *Escherichia coli* оксидом азота и его физиологическими донорами / С. В. Васильева, М.В. Ступакова, И.И. Лобышева [и др.] // Биохимия. - 2001. - Т. 66. - № 9. - С. 1209-1214.
138. Височин, М.В. Стан систем перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту у хворих з пептичною виразкою дванадцятипалої кишки у поєднанні з хронічним обструктивним захворюванням легень / М.В. Височин, Л.М. Іванова // Сучасна гастроентерологія. - 2009. - № 2. - Вип.46. - С. 38-41.
139. Genkinger, J.M. C47T polymorphism in manganese superoxide dismutase (MnSOD), antioxidant intake and survival / J.M. Genkinger, E.A. Platz, S.C. Hoffman [et al.] // Mech. Ageing. Dev. - 2006. - Vol. 127. - № 4. - P. 371-377.
140. Генинг, Т.П. Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в системе «сыворотка крови - эритроцит» при острой циркуляторной гипоксии / Т.П. Генинг, Д.А. Ксейко // Успехи современного естествознания. - 2004. - № 4. - С. 17-20.
141. Овсепян, Л.М. Исследование перекисного окисления белков и липидов при острой гипоксии / Л.М. Овсепян, Г.В. Захарян, Г.С. Казарян // Биологический журнал Армении. - 2010. - Т. 62. - Вип. 3. - С. 42-45.
142. Тарасевич, И.С. Активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и уровень глутатиона восстановленного в печени, мозге и эритроцитах крыс в возрастном аспекте / И.С. Тарасевич, О.Н. Ринейская // Труды молодых ученых 2011: сб. науч. работ. - Минск, 2011. - С. 167-171.
143. Мажитова, М.В. Возрастные и половые особенности антиоксидантной защиты и свободнорадикальных процессов в мозгу белых крыс / М.В. Мажитова, Н.Н. Тризно, Д.Л. Тёплый // Успехи геронтол. - 2010. - Т. 23. - № 3. - С. 396-400.
144. Мажитова, М.В. Возрастные и половые особенности свободнорадикальных процессов и антиоксидантной защиты плазмы крови белых крыс / М.В. Мажитова, Д.Л. Тёплый // Естественные науки. - 2010. - Т. 30. - № 1. - С.79-85.

145. Andziak, B. High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat / B. Andziak, T.P. O'Connor, W. Qi [et al.] // *Aging Cell*. - 2006. - Vol. 5. - № 6. - P. 463-471.
146. Разыграев, А.В. Активность глутатионпероксидазы в ткани шишковидной железы крыс и ее изменение при старении / А.В. Разыграев // *Успехи геронтол.* - 2010. - Т. 23. - № 3. - С. 392-395.
147. Jihenel, H. Cadmium retention increase: a probable key mechanism of the protective effect of zinc on cadmium-induced toxicity in the kidney / H. Jihenel, H. Fatima, A. Nouha [et al.] // *Toxicol. Lett.* - 2010. - Vol. 196. - № 2. - P. 104-109. - Doi: 10.1016/j.toxlet.2010.04.006.
148. Van Remmen, H. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging / H. Van Remmen, Y. Ikeno, M. Hamilton [et al.] // *Physiol. Genomics*. - 2003. - Vol. 16. - № 1. - P. 29-37.
149. Huang, T.T. Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice / T.T. Huang, E.J. Carlson, A.M. Gillespie, C.J. Epstein // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* - 2000. - Vol. 55. - P. 85-89.
150. Rios-Arrabal, S. Involvement of free radicals in breast cancer / S. Rios-Arrabal, F. Artacho-Cordón, J. León [et al.] // *SpringerPlus*. - 2013. - (<http://doi.org/10.1186/2193-1801-2-404>).
151. Totzeck, M. Crosstalk between nitrite, myoglobin and reactive oxygen species to regulate vasodilation under hypoxia / M. Totzeck, U.B. Hendgen-Cotta, M. Kelm, T. Rassaf // *PLoS One*. - 2014. - Vol. 9. - № 8. - (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105951>).
152. Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клиничко-биохимические аспекты: монография / Е.Е. Дубинина. - Санкт-Петербург: изд-во «Мед. Пресса», 2006. - 397 с.

153. Ahmadi, A. Oxidative stress and cancer; the role of hesperidin, a citrus natural bioflavonoid, as a cancer chemoprotective agent / A. Ahmadi, A. Shadboorestan // *Nutr. Cancer*. - 2016. - Vol. 68. - № 1. - P. 29-39. - Doi: 10.1080/01635581.2015.1078822.
154. Бабенко, Г.А. Влияние различного содержания селена в пище на рост трансплантированных и химически индуцированных опухолей / Г.А. Бабенко, И.П. Погрибный // *Вопросы питания*. - 1986.- № 1. - С. 65-70.
155. Ames, B.N. Prevention of mutation, cancer, and other age-associated diseases by optimizing micronutrient intake / B.N. Ames // *J. Nucleic Acids*. – 2010. - P. 1-11. - Doi: 10.4061/2010/725071.
156. Эмануэль, Н.М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов: [монография] / Н.М. Эмануэль; Акад. наук СССР, Ин-т хим. физики. - М.: Наука, 1977. - 416 с.
157. Combs, G.F. The Role of Selenium Nutrition / G.F. Combs, S.B. Combs // *New York*. - 1986. - P. 179-199.
158. Oxidative Stress in Cancer Biology and Therapy. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice / D.R. Spitz [et al.]. - Springer Science + Business Media, LLC, 2012. - 462 p.
159. Горошинская, И.А. 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. - Ч. 58. - С. 45-49.
160. Абрамченко, В.В. Антиоксиданты и антигипоксанта в акушерстве. Окислительный стресс в акушерстве и его терапия антиоксидантами и антигипоксантами / В.В. Абрамченко. - СПб: ДЕАН, 2001. - 400 с.
161. Хавинсон, В.Х. Свободнорадикальное окисление и стресс / В.Х. Хавинсон [и др.]. - СПб: Наука. - 2003. - 327 с.
162. Вечканов, Е.М. Интенсивность протекания свободно-радикальных процессов и состояния антиоксидантных и прооксидантных систем плазмы крови *rattus norvegicus* при коррекции электроимпульсным воздействием модельной

- острой гипоксии / Е.М. Вечканов, И.А. Сорокина, И.А. Алилуев [и др.] // *Фундаментальные исследования*. - 2012. - № 8. - Ч. 1. - С. 54-59.
163. Joh, H.M. Effect of additive oxygen gas on cellular response of lung cancer cells induced by atmospheric pressure helium plasma jet / H.M. Joh, J.Y. Choi, S.J. Kim [et al.] // *Sci. Rep.* - 2014. - Vol. 4. - (<http://dx.Doi.org/10.1038/srep06638>).
164. Singh, S. Mini review nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies / S. Singh, A.K. Gupta // *Cancer Chemother. Pharmacol.* - 2011. - Vol. 67. - № 6. - P. 1211-1224. - Doi: 10.1007/s00280-011-1654-4.
165. Zhou, L. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications / L. Zhou, D.Y. Zhu // *Nitric Oxide*. - 2009. - Vol. 20. - № 4. - P. 223-230. - Doi: 10.1016/j.niox.2009.03.001.
166. Ulker, S. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activity / S. Ulker, P.P. McKeown, U. Bayraktutan // *Hypertension*. - 2003. - Vol. 41. - № 3. - P. 534-539.
167. Tsai, A.L. A "sliding scale rule" for selectivity among NO, CO, and O₂ by heme protein sensors / A.L. Tsai, V. Berka, E. Martin, J.S. Olson // *Biochemistry*. - 2012. - Vol. 51. - № 1. - P. 172-186. - Doi: 10.1021/bi2015629.
168. Ванин, А.Ф. Оксид азота - регулятор клеточного метаболизма / А.Ф. Ванин // *Соросовский образовательный журнал*. - 2001. - № 11. - С.7-12.
169. Aranda, E. Nitric oxide and cancer: the emerging role of S nitrosylation / E. Aranda, C. López-Pedrerá, J.R. De La Haba-Rodríguez, A. Rodríguez-Ariza // *Curr. Mol. Med.* - 2012. - Vol. 12. - P. 50-67.
170. Мартинович, Г.Г. Окислительно-восстановительные процессы в клетках / Г.Г. Мартинович, С.Н. Черенкевич. - Мн.: БГУ, 2008. - 159 с.
171. Hirahashi, M. Induced nitric oxide synthetase and peroxiredoxin expression in intramucosal poorly differentiated gastric cancer of young patients / M. Hirahashi, Y. Koga, R. Kumagai [et al.] // *Pathol. Int.* - 2014. - Vol. 64. - № 4. - P. 155-63. - Doi: 10.1111/pin.12152.

172. Hummel, S.G. Nitric oxide as a cellular antioxidant: a little goes a long way / S.G. Hummel, A.J. Fischer, S.M. Martin [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* - 2006. - Vol. 40. - № 3. - P. 501-506.
173. Mocellin, S. Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities / S. Mocellin, V. Bronte, D. Nitti / *Med. Res. Rev.* - 2007. - Vol. 27. - № 3. - P. 317-352.
174. Kundu, J.K. Emerging avenues linking inflammation and cancer / J.K. Kundu, Y.J. Surh / *Free Radic. Biol. Med.* - 2012. - Vol. 52. - № 9. - P. 2013-2037. - Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.035.
175. Feng, C. Mechanism of nitric oxide synthase regulation: electron transfer and interdomain interactions / C. Feng // *Coord. Chem. Rev.* - 2012. - Vol. 256. - № 3-4. - P. 393-411.
176. Кравченко, Н.А. Регуляция экспрессии эндотелиальной NO-синтазы и дисфункция сосудистого эндотелия при сердечно-сосудистой патологии / Н.А. Кравченко, Н.В. Ярмыш // *Цитология и генетика.* - 2008. - Т. 42. - № 4. - С. 69-79.
177. Рязанцева, Н.В. Роль индукции и ингибирования синтеза оксида азота в регуляции апоптоза нейтрофилов крови в условиях окислительного дисбаланса / Н.В. Рязанцева, Т.В. Жаворонок, Е.А. Степовая [и др.] // *Биомедицинская химия.* - 2010. - Т. 56. - Вып. 5. - С. 587-595.
178. Лапшина, Л.А. Значение определения нитритов-нитратов как маркеров дисфункции эндотелия при сердечно-сосудистой патологии / Л.А. Лапшина, П.Г. Кравчун, А.Ю. Титова, О.В. Глебова // *Укр. мед. часопис.* - 2009. - № 6. - С. 49-52.
179. Förstermann, U. Nitric oxide synthases: regulation and function / U. Förstermann, W.C. Sessa // *Eur. Heart J.* - 2012. - Vol. 33. - № 7. - P. 829-837. - Doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
180. Реутов, В.П. Цикл оксида азота как механизм стабилизации содержания NO и продуктов его превращения в организме млекопитающих / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, А.И. Гоженко [и др.] // *Актуальные проблемы транспортной медицины.* - 2008. - № 1. - Вып. 11. - С. 22-28.

181. Стасюк, О.А. Роль ізоформ NO-синтази у механізмах порушень вільнорадикальних процесів у слинних залозах щурів за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію / О.А. Стасюк, В.О. Костенко // Світ медицини та біології. - 2012. - Т. 8. - № 4. - С. 101-104.
182. Augusto, O. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology / O. Augusto, M.G. Bonini, A.M. Amanso [et al.] // Free Radic. Biol. Med. - 2002. - Vol. 32. - № 9. - P. 841-859.
183. Fukumura, D. The role of nitric oxide in tumour progression / D. Fukumura, S. Kashiwagi, R.K. Jain // Nat. Rev. Cancer. - 2006. - Vol. 6. - № 7. - P. 521-534.
184. Mori, M. Regulation of Nitric Oxide Synthesis and Apoptosis by Arginase and Arginine Recycling / M. Mori // J. Nutr. - 2007. - Vol. 137. - № 6. - P. 1616-1620.
185. Трещинская, М.А. Теоретические и практические аспекты применения L-аргинина с целью профилактики цереброваскулярной патологии / М.А. Трещинская // Укр. мед. часопис. - 2011. - № 5. - С. 97-109.
186. Бабушкина, А.В. Инфаркт миокарда: от фундаментальных исследований - к практическим достижениям / А.В. Бабушкина // Укр. мед. часопис. - 2009. - № 5. - С. 10-13.
187. Ying, L. An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer / L. Ying, L.J. Hofseth // Cancer Res. - 2007. - Vol. 67. - P. 1407-1410.
188. Taysi, S. MDA and nitric oxide in the plasma of patients with advanced laryngeal cancer / S. Taysi, C. Uslu, F. Akcay, M.Y. Sutbeyaz // Surg. Today. - 2003. - Vol. 33. - № 9. - P. 651-654.
189. Ambs, S. p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells / S. Ambs, W.G. Merriam, M.O. Ogunfusika [et al.] // Nat. Med. - 1998. - Vol. 12. - P. 1371-1376.
190. Choudhari, S.K. Nitric oxide and cancer: a review / S.K. Choudhari, M. Chaudhary, S. Bagde [et al.] // World J. Surg. Oncol. - 2013. - Vol. 11. - (<http://doi.org/10.1186/1477-7819-11-118>).

191. Yu, J. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells / J. Yu, L. Zhang, P.M. Hwang [et al.] // *Mol. Cell.* - 2001. - Vol. 7. - № 3. - P. 673-682.
192. Wei, Y. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy / Y. Wei, S. Pattingre, S. Sinha [et al.] // *Mol. Cell.* - 2008. - Vol. 30. - № 6. - P. 678-688. - Doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.001.
193. Choi, B.M. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator / B.M. Choi, H.O. Pae, S.I. Jang [et al.] // *J. Biochem. Mol. Biol.* - 2002. - Vol. 35. - P. 116-126.
194. Lala, P.K. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors / P.K. Lala, A. Orucevic // *Cancer Metastasis Rev.* - 1998. - Vol. 17. - P. 91-106.
195. Lechner, M. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin / M. Lechner, P. Lirk, J. Rieder // *Semin. Cancer Biol.* - 2005. - Vol. 15. - P. 277-289.
196. Shang, Z.J. Expression of endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma: its correlation with angiogenesis and disease progression / Z.J. Shang, J.R. Li // *J. Oral Pathol. Med.* - 2005. - Vol. 4. - P. 134-139.
197. Baritaki, S. Mechanisms of nitric oxide-mediated inhibition of EMT in cancer: inhibition of the metastasis-inducer Snail and induction of the metastasis-suppressor RKIP / S. Baritaki, S. Huerta-Yepez, A. Sahakyan [et al.] // *Cell Cycle.* - 2010. - Vol. 9. - P. 4931-4940.
198. Bonavida, B. Inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in cancer by nitric oxide: pivotal roles of nitrosylation of NF- κ B, YY1 and Snail / B. Bonavida // *For. Immunopathol. Dis. Therap.* - 2012. - Vol. 3. - № 2. - P. 125-133.
199. Sohn, J.J. Macrophages, nitric oxide and microRNAs are associated with DNA damage response pathway and senescence in inflammatory bowel disease / J.J. Sohn, A.J. Schetter, G.Y. Harris [et al.] // *PLoS ONE.* - 2012. - Vol. 7. - № 9. - (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044156>).

200. Sang, J. Nitric oxide inhibits gastric cancer cell growth through the modulation of the Akt pathway / J. Sang, C. Yongchang, T. Yan // *Mol. Med. Report.* - 2011. - Vol. 4. - P. 1163-1167. - Doi: 10.3892/mmr.2011.535.
201. Zamani, T.R.S. Rose Bengal suppresses gastric cancer cell proliferation via apoptosis and inhibits nitric oxide formation in macrophages / T.R.S. Zamani, S.H. Mousavi, N. Tabasi [et al.] // *J. Immunotoxicol.* - 2014. - Vol. 11. - № 4. - P. 367-375. - Doi: 10.3109/1547691X.2013.853715.
202. Karaday, N. Inducible nitric oxide synthase expression in gastric adenocarcinoma: impact on lymphangiogenesis and lymphatic metastasis / N. Karaday, N.O. Kandem, D. Yavuzer [et al.] // *Diagnostic Pathology.* - 2013. - Vol. 8. - № 151. - P. 1-12. - Doi: 10.1186/1746-1596-8-151.
203. Zhao, S.F. Nitric oxide induces oral squamous cell carcinoma cells apoptosis with p53 accumulation / S.F. Zhao, X.Y. Tong, F.D. Zhu // *Oral Oncol.* - 2005. - Vol. 41. - № 8. - P. 785-790.
204. Korde (Choudhari), S. Nitric oxide and oral cancer: A review / S. Korde (Choudhari), G. Sridharan, A. Gadbail, V. Poornima // *Oral Oncol.* - 2012. - Vol. 48. - P. 475-483.
205. Huerta, S. Nitric oxide donors: novel cancer therapeutics (Review) / S. Huerta, S. Chilka, B. Bonavida // *Int. J. Oncol.* - 2008. - Vol. 33. - P. 909-927.
206. Hirst, D.G. Nitrosative stress as a mediator of apoptosis: implications for cancer therapy / D.G. Hirst, T. Robson // *Curr. Pharm. Des.* - 2010. - Vol. 16. - № 1. - P. 45-55.
207. Nakamura, Y. NO in breast cancer: induction of vascular endothelial growth factor-C and correlation with metastasis and poor prognosis / Y. Nakamura, H. Yasuoka, M. Tsujimoto [et al.] // *Clin. Cancer Res.* - 2006. - Vol. 12. - № 4. - P. 1201-1207.
208. Switzer, C.H. Ets-1 is a transcriptional mediator of oncogenic nitric oxide signalling in estrogen receptor negative breast cancer / C.H. Switzer, R.Y.S. Cheng, L.A. Ridnour [et al.] // *Breast Cancer Res.* - 2012. - Vol. 14. - № 5. - (<http://doi.org/10.1186/bcr3319>).

209. Calatayud, S. Nitric oxide: relation to integrity, injury, and healing of the gastric mucosa / S. Calatayud, D. Barrachina, J.V. Esplugues // *Microsc. Res. Tech.* - 2001. - Vol. 53. - № 5. - P. 325-335.
210. Hirst, D. Nitric oxide in cancer therapeutics: interaction with cytotoxic chemotherapy / D. Hirst, T. Robson // *Curr. Pharm. Des.* - 2010. - Vol.16. - № 4. - P. 411-420.
211. Yagihashi, N. Increased in situ expression of nitric oxide synthase in human colorectal cancer / N. Yagihashi, H. Kasajima, S. Sugai [et al.] // *Virchows Arch.* - 2001. - Vol. 436. - № 2. - P. 109-114.
212. Takeuchi, K. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats / K. Takeuchi, R. Hatazawa, M. Tanigami [et al.] // *Life Sci.* - 2007. - Vol. 80. - № 4. - P. 329-336. - Doi: 10.1016/j.lfs.2006.09.016.
213. Ridnour, L.A. Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer / L.A. Ridnour, D.D. Thomas, C. Switzer // *Nitric Oxide.* - 2008. - Vol. 19. - № 2. - P. 73-76. - Doi: 10.1016/j.niox.2008.04.006.
214. Burke, A.J. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression / A.J. Burke, F.J. Sullivan, F.J. Giles, S.A. Glynn // *Carcinogenesis.* - 2013. - Vol. 34. - № 3. - P. 503-12. - Doi: 10.1093/carcin/bgt034.
215. Squier, T.C. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging / T.C. Squier // *Exp. Gerontol.* - 2001. - Vol. 36. - № 9. - P. 1539-1550.
216. Madian, A.G. Proteomic Identification of Carbonylated Proteins and Their Oxidation Sites / A.G. Madian, F.E. Regnier // *J. Proteome Res.* - 2010. - Vol. 9. - № 8. - P. 3766-3780. - Doi: 10.1021/pr1002609.
217. Costa, V. Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae* / V. Costa, A. Quintanilha, P. Moradas-Ferreira // *IUBMB Life.* - 2007. - Vol. 59. - № (4-5). - P. 293-298.
218. Yan, L.J. Analysis of oxidative modification of proteins / L.J. Yan // *Curr. Protoc. Protein Sci.* - 2009. - Vol. 14. - № 4. - (<http://doi.org/10.1002/0471140864.ps1404s56>).

219. Levine, R.L. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver [et al.] // *Methods Enzymol.* - 1990. - Vol. 186. - P. 464-478.
220. Caraceni, P. Proteins but not nucleic acids are molecular targets for the free radical attack during reoxygenation of rat hepatocytes / P. Caraceni, N. De Maria, H.S. Ryu [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* - 1997. - Vol. 23. - № 2. - P. 339-344.
221. Yan, L.J. Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: A review / L.J. Yan, M.J. Forster // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* - 2011. - Vol. 879. - № 17-18. - P. 1308-1315. - Doi: 10.1016/j.jchromb.2010.08.004.
222. Oliver, C.N. Age-related changes in oxidized proteins / C.N. Oliver, B.W. Ahn, E.J. Moerman // *J. Biol. Chem.* - 1987. - Vol. 262. - № 12. - P. 5488-5491.
223. Henvley, K. Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead / K. Henvley, R.A. Flnyd // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2002. - Vol. 397. - № 2. - P. 377-383.
224. Caia, Z. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health / Z. Caia, L.J. Yan // *J. Biochem. Pharmacol. Res.* - 2013. - Vol. 1. - № 1. - P. 15-26.
225. Муравлева, Л.Е. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л.Е. Муравлева // *Фундаментальные исследования.* - 2010. - № 1. - С. 74-78.
226. Wehr, N.B. Quantification of protein carbonylation / N.B. Wehr, R.L. Levine // *Methods Mol. Biol.* - 2013. - Vol. 965. - P. 265-281. - Doi: 10.1007/978-1-62703-239-1_18.
227. Dalle-Donne, I. Protein carbonylation in human diseases / I. Dalle-Donne, D. Giustarini, R. Colombo [et al.] // *Trends Mol. Med.* - 2003. - Vol. 9. - № 4. - P. 169-176.
228. Prokai, L. Mass spectrometry-based survey of age-associated protein carbonylation in rat brain mitochondria / L. Prokai, L.J. Yan, J.L. Vera-Serrano [et al.] // *J. Mass Spectrom.* - 2007. - Vol. 42. - № 12. - P. 1583-1589.

229. Piwowar, A. [Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property] / A. Piwowar // *Pol Merkur Lekarski*. - 2010. - Vol. 28. - № 164. - P. 166-169.
230. Kaushik, K. Correlation between Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) and Antioxidant status in Type 2 diabetics in Southern Asian Region / K. Kaushik, S. Satwika // *Sch. J. App. Med. Sci*. - 2014. - Vol. 2. - № 2. - P. 647-652.
231. Деев, Р.В. Взаимосвязи между активностью моноаминооксидаз и свободнорадикальным окислением в митохондриях головного мозга при стрессе / Р.В. Деев, А.И. Сеницкий, Д.А. Козочкин [и др.] // *Медицинский академический журнал*. - 2012. - Т. 12. - № 3. - С.70-72.
232. Stadtman, E.R. Protein oxidation and aging / E.R. Stadtman // *Free Radic. Res*. - 2006. - Vol. 40. - № 12. - P. 1250-1258.
233. O'Brien, K.M. Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese-(MnSOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage / K.M. O'Brien, R. Dirmeier, M. Engle, R.O. Poyton // *J. Biol. Chem*. - 2004. - Vol. 279. - № 50. - P. 51817-51827.
234. Berlett, B.S. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress / B.S. Berlett, E.R. Stadtman // *J. Biol. Chem*. - 1997. - Vol. 272. - № 33. - P. 20313-20316.
235. Wu, W.S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression / W.S. Wu // *Cancer Metastasis Rev*. - 2006. - Vol. 25. - № 4. - P. 695-705.
236. Walters, D.M. Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2 / D.M. Walters, H.Y. Cho, S.R. Kleeberger // *Antioxid. Redox. Signal*. - 2008. - Vol. 10. - № 2. - P. 321-332.
237. Baird, L. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway / L. Baird, A.T. Dinkova-Kostova // *Arch. Toxicol*. - 2011. - Vol. 85. - № 4. - P. 241-272. - Doi: 10.1007/s00204-011-0674-5.

238. Bell, K.F.S. Activation of Nrf2-Regulated Glutathione Pathway Genes by Ischemic Preconditioning / K.F.S. Bell, J.H. Fowler, B. Al-Mubarak [et al.] // *Oxid. Med. Cell Longev.* - 2011. - (<http://dx.doi.org/10.1155/2011/689524>).
239. Kensler, T.W. Nrf2: friend or foe for chemoprevention? / T.W. Kensler, N. Wakabayashi // *Carcinogenesis*. - 2010. - Vol. 31. - № 1. - P. 90-99. - Doi: 10.1093/carcin/bgp231.
240. Blackburn, A.C. Protein carbonyl formation on mucosal proteins in vitro and in dextran sulfate-induced colitis / A.C. Blackburn, W.F. Doe, G.D. Buffinton // *Free Radic. Biol. Med.* - 1999. - Vol. 27. - № (3-4). - P. 262-270.
241. Reinheckel, T. Adaptation of protein carbonyl detection to the requirements of proteome analysis demonstrated for hypoxia/reoxygenation in isolated rat liver mitochondria / T. Reinheckel, S. Körn, S. Möhring [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2000. - Vol. 376. - № 1. - P. 59-65.
242. Абаленихина, Ю.В. Окислительная модификация белков тимуса крыс под влиянием меди в ультрадисперсной форме / Ю.В. Абаленихина, М.А. Фомина, Г.И. Чурилов, Ю.Н. Иваницева // *Фундаментальные исследования*. - 2012. - № 11. - Ч. 6. - С. 1315-1319.
243. Nyström, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence / T. Nyström // *EMBO J.* - 2005. - Vol. 24. - № 7. - P. 1311-1317.
244. Cattaruzza, M. Protein Carbonylation and Decarboxylation / M. Cattaruzza, M. Hecker // *Circulation Research*. - 2008. - Vol. 102. - P. 273-285.
245. Smyth, T. Differential modulatory effects of annexin 1 on nitric oxide synthase induction by lipopolysaccharide in macrophages / T. Smyth, H.J. Harris, A. Brown [et al.] // *Immunology*. - 2006. - Vol. 117. - № 3. - P. 340-349.
246. Staudt, L.M. Oncogenic activation of NF-kappaB / L.M. Staudt // *Cold Spring. Harb. Perspect. Biol.* - 2010. - Vol. 2. - № 6. - (<http://doi.org/10.1101/cshperspect.a000109>).
247. Pastor, M.D. Identification of oxidative stress related proteins as biomarkers for lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease in bronchoalveolar lavage /

- M.D. Pastor, A. Nogal, S. Molina-Pinelo [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* - 2013. - Vol. 14. - № 2. - P. 3440-3455. - Doi: 10.3390/ijms14023440.
248. Lillig, C.H. Thioredoxin and related molecules - From biology to health and disease / C.H. Lillig, A. Holmgren // *Antioxid. Redox. Signal.* - 2007. - Vol. 9. - № 1. - P. 25-47.
249. Ceccarelli, J. The redox state of the lung cancer microenvironment depends on the levels of thioredoxin expressed by tumor cells and affects tumor progression and response to prooxidants / J. Ceccarelli, L. Delfino, E. Zappia [et al.] // *Int. J. Cancer.* - 2008. - Vol. 123. - № 8. - P. 1770-1778. - Doi: 10.1002/ijc.23709.
250. Chaiswing, L. Characterization of redox state of two human prostate carcinoma cell lines with different degrees of aggressiveness / L. Chaiswing, J.M. Bourdeau-Heller, W. Zhong, T.D. Oberley // *Free Radic. Biol. Med.* - 2007. - Vol. 43. - P. 202-215.
251. Iwasawa, S. Upregulation of thioredoxin reductase 1 in human oral squamous cell carcinoma / S. Iwasawa, Y. Yamano, Y. Takiguchi [et al.] // *Oncol. Rep.* - 2011. - Vol. 25. - № 3. - P. 637-644. - Doi: 10.3892/or.2010.1131.
252. Nguyen, P. Thioredoxin reductase as a novel molecular target for cancer therapy / P. Nguyen, R.T. Awwad, D.D. Smart [et al.] // *Cancer Lett.* - 2006. - Vol. 236. - P. 164-174.
253. Welsh, S.J. The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis / S.J. Welsh, W.T. Bellamy, M.M. Briehl, G. Powis // *Cancer Res.* - 2002. - Vol. 62. - P. 5089-5095.
254. Белоногов, Р.Н. 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. - Ч. 34. - С. 48-51.
255. Принькова, Т.Ю. Лабораторные показатели эндогенной интоксикации при раке тела матки и значение их определения для оценки стадии и степени дифференцировки опухоли / Т.Ю. Принькова, В.И. Прохорова, Е.А. Хотько [и др.] // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа.* - 2012. - № 4. - С. 79-87.

256. Ёлкина, Н.М. Окислительная модификация протеинов в эритроцитах больных эритроемией, апластической и железодефицитной анемией / Н.М. Ёлкина // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. - 2012. - Т. 25. - № 4. - С. 49-53.
257. Rossner, P. Plasma protein carbonyl levels and breast cancer risk / P. Rossner, M.D. Gammon, M.B. Terry [et al.] // J. Cell Mol. Med. - 2007. - Vol. 11. - № 5. - P. 1138-1148.
258. Chandran, V. Protein oxidation: A potential cause of hypoalbuminemia in oral cancer / V. Chandran, M. Anitha, S.S. Avinash [et al.] // Biomedical Research. - 2012. - Vol. 23. - № 2. - P. 227-230.
259. Pignatelli, B. Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients / B. Pignatelli, C.Q. Li, P. Boffetta [et al.] // Cancer Research. - 2001. - Vol. 61. - № 2. - P. 778-784.
260. Kumar, P. Plasma protein oxidation in patients with brain tumors / P. Kumar, U. Devi, S. Ali [et al.] // Neurol. Res. - 2009. - Vol. 31. - № 3. - P. 270-273. - Doi: 10.1179/174313209X382296.
261. Kosova, F. Advanced oxidation protein products, ferrous oxidation in xylenol orange, and malondialdehyde levels in thyroid cancer / F. Kosova, B. Cetin, M. Akinci [et al.] // Ann. Surg. Oncol. - 2007. - Vol. 14. - № 9. - P. 2616-2620.
262. Nathan, F.M. Oxidative stress and antioxidant status in primary bone and soft tissue sarcoma / F.M. Nathan, V.A. Singh, A. Dhanoa, U.D. Palanisamy // BMC Cancer. - 2011. - Vol. 11. - (<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-11-382>).
263. Morabito, F. 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. - P. 381-383.
264. Yilmaz, I.A. Relation between bladder cancer and protein oxidation / I.A. Yilmaz, T. Akçay, U. Cakatay [et al.] // Int. Urol. Nephrol. - 2003. - Vol. 35. - № 3. - P. 345-350.
265. Hoque, A. Serum oxidized protein and prostate cancer risk within the Prostate Cancer Prevention Trial / A. Hoque, C.B. Ambrosone, C. Till [et al.] // Cancer Prev.

- Res. (Phila). - 2010. - Vol. 3. - № 4. - P. 478-483. - Doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-09-0201.
266. Bancel, B. Differences in oxidative stress dependence between gastric adenocarcinoma subtypes / B. Bancel, J. Estève, J.C. Souquet [et al.] // World J. Gastroenterol. - 2006. - Vol. 12. - № 7. - P. 1005-1012. - Doi: 10.3748/wjg.v12.i7.1005.
267. Chang, D. Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients / D. Chang, F. Wang, Y.S. Zhao, H.Z. Pan // Biomed. Environ. Sci. - 2008. - Vol. 21. - № 4. - P. 286-289. - Doi: 10.1016/S0895-3988(08)60043-4.
268. Жуков, В. И. Исследование уровня эндогенной интоксикации организма больных колоректальным раком и его прогностическое значение для выделения групп риска / В. И. Жуков, С. В. Перепадя, О. В. Зайцева [и др.] // Патологія. - 2010. - Т. 7. - № 3. - С. 34-37.
269. Ерлыкина, Е.И. Интегральный анализ биохимических параметров плазмы крови как средство оптимизации диагностики злокачественных новообразований эпителиальных тканей / Е.И. Ерлыкина, Т.В. Копытова, А.В. Алясова [и др.] // СТМ. - 2013. - Т. 5. - № 3. - С. 51-56.
270. Ma, Y. Relation between gastric cancer and protein oxidation, DNA damage, and lipid peroxidation / Y. Ma, L. Zhang, S. Rong [et al.] // Oxid. Med. Cell Longev. - 2013. - (<http://dx.doi.org/10.1155/2013/543760>).
271. Di Giacomo, C. Nonproteic antioxidant status in plasma of subjects with colon cancer / C. Di Giacomo, R. Acquaviva, R. Lanteri [et al.] // Exp. Biol. Med. - 2003. - Vol. 228. - № 5. - P. 525-528.
272. Бакурова, О.М. Активність ферментів гліколізу та обміну нуклеотидів у пацієнтів різного віку з виразкою та раком шлунка : дис... канд. мед. наук: 03.00.04 / Бакурова Олена Михайлівна. - Донецьк, 2005. - 190 с. - Бібліогр.: с. 117-150.
273. Drabkin, D. A simplified technique for a large scale crystallization of human oxyhemoglobin; isomorphous transformations of hemoglobin and myoglobin in the crystalline state / D. Drabkin // Arch. Biochem. - 1949. - Vol. 21. - № 1. - P. 224-232.

274. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. - 1951. - Vol. 193. - № 1. - P. 265-275.
275. Шатова, О.П. Лактатдегидрогеназная, аденозиндезаминазная и тимидинфосфорилазная активности крови и тканей при опухолях молочной железы / О.П. Шатова, Б.Г. Борзенко, И.И. Зинкович, И.Е. Седаков // Укр. Біохм. Журнал. - 2009. - Т. 81. - № 4. - С. 88-93.
276. Tritsch, G.L. Validity of the continuous spectrophotometric assay of Kalckar for adenosine deaminase activity / G.L. Tritsch // Anal. Biochem. - 1983. - Vol. 129. - № 1. - P. 207-209.
277. Kalckar, H.M. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes: II. Determination of adenine compounds / H.M. Kalckar // J. Biol. Chem. - 1947. - Vol. 167. - P. 445-459.
278. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 т. / [В. В. Алексеев и др.]; под ред. А.И. Карпищенко. - 3-е изд., перераб. и доп. - Т. 2. - М.: ГЕОТАР-Медиа, 2013. - С. 40-41.
279. Макаревич, О.П. Активность супероксиддисмутазы крови в острый период различных заболеваний / О.П. Макаревич, П.П. Голиков // Лаб. дело. - 1983. - № 6. - С. 24-27.
280. Moin, V.M. A simple and specific method for determining glutathione peroxidase activity in erythrocytes / V.M. Moin // Lab Delo. - 1986. - № 12. - P. 724-727.
281. Кіселик, І.О. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології / І.О. Кіселик, М.Д. Луцик, Л.Ю. Шевченко // Лабораторна діагностика. - 2001. - № 3. - С. 43-45.
282. Мажитова, М.В. Спектрофотометрическое определение уровня метаболитов монооксида азота в плазме крови и ткани мозга белых крыс / М.В. Мажитова // Современные проблемы науки и образования. - 2011. - № 3. - (<http://www.science-education.ru/97-4655>).

283. Дубинина, Е.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов, Г.Е. Поротов // Вопросы мед. химии. - 1995. - Т. 41. - Вып. 1. - С. 24-25.
284. Унанян, Л.С. Окислительная модификация белков сыворотки крови белых крыс под влиянием шума и $\alpha 2$ -адреноблокаторов / Л.С. Унанян, О.П. Соцкий, Л. Г. Хачатрян [и др.] // Биолог. журн. Армении. - 2010. - Т. 1. - Вып. 62. - С. 79-83.
285. Чубенко, А.В. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение первое. Сравнение двух пропорций / А.В. Чубенко, П.Н. Бабич, С.Н. Лапач, Т.К. Ефимцева // Український медичний часопис. - 2003. - № 4. - С. 139-143.
286. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. - М.: МедиаСфера, 2002. - 312 с.
287. Лапач, С.Н. Основные принципы применения статистических методов в клинических испытаниях / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. - Киев: "Морион", 2002. -160 с.
288. Казаков, В.Н. Применение математических методов в исследованиях по физиологии человека / В.Н. Казаков. - Донецк, 2000. - 84 с.
289. Ho, M.C. Structural and metabolic specificity of methylthioformycin for malarial adenosine deaminases / M.C. Ho, M.B. Cassera, D.C. Madrid [et al.] // Biochemistry. - 2009. - Vol. 48. - № 40. - P. 9618-9626. - Doi: 10.1021/bi9012484.
290. Cassera, M.B. Erythrocytic adenosine monophosphate as an alternative purine source in Plasmodium falciparum / M.B. Cassera, K.Z. Hazleton, P.M. Riegelhaupt [et al.] // J. Biol. Chem. - 2008. - Vol. 283. - № 47. - P 32889-32899. - Doi: 10.1074/jbc.M804497200.
291. Lopez-Cruz, R.I. Purine nucleoside phosphorylase and xanthine oxidase activities in erythrocytes and plasma from marine, semiaquatic and terrestrial mammals / R.I. Lopez-Cruz, M.B. Perez-Milicua, D.E. Crocker [et al.] // Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. - 2014. - Vol. 171. - P. 31-35. - Doi: 10.1016/j.cbpa.2014.02.007.

292. Maia, L.B. Nitrite reduction by xanthine oxidase family enzymes: a new class of nitrite reductases / L.B. Maia, J.J. Moura // J. Biol. Inorg. Chem. - 2011. - Vol. 16. - № 3. - P. 443-460. - Doi: 10.1007/s00775-010-0741-z.
293. Poth, J.M. Transcriptional control of adenosine signaling by hypoxia-inducible transcription factors during ischemic or inflammatory disease / J.M. Poth, K. Brodsky, H. Ehrentaut [et al.] // J. Mol. Med. (Berl). - 2013. - Vol. 91. - № 2. - P. 183-193. - Doi: 10.1007/s00109-012-0988-7.
294. Kuo, T. Altered Plasma Profile of Antioxidant Proteins as an Early Correlate of Pancreatic β Cell Dysfunction / T. Kuo, J. Kim-Muller, T. McGraw, D. Accili // Journal of Biological Chemistry. - 2016. - Vol. 291. - № 18. - P. 9648-9656. - Doi: 10.1074/jbc.m115.702183.
295. Arif, Z. Effect of peroxynitrite on human serum albumin: a multi technique approach / Z. Arif, M.Y. Arfat, K. Neelofar [et al.] // J. Biomol. Struct. Dyn. - 2017. - Vol. 35. - № 9. - P. 2066-2076. - Doi: 10.1080/07391102.2016.1206489.
296. Sies, H. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase / H. Sies, V.S. Sharov, L.O. Klotz, K. Briviba // J. Biol. Chem. - 1997. - Vol. 272. - № 44. - P. 27812-27817.
297. Cristiano, F. Changes in the levels of enzymes which modulate the antioxidant balance occur during aging and correlate with cellular damage / F. Cristiano, J.B. Dehaan, R.C. Iannello, I. Kola // Mech. Ageing Dev. - 1995. - Vol. 80. - № 2. - P. 93-105.
298. Millar, T.M. Peroxynitrite formation from the simultaneous reduction of nitrite and oxygen by xanthine oxidase / T.M. Millar // FEBS Lett. - 2004. - Vol. 562. - № (1-3). - P. 129-133.
299. Celedon, G. Peroxynitrite oxidizes erythrocyte membrane band 3 protein and diminishes its anion transport capacity / G. Celedon, G. Gonzalez, J. Pino, E.A. Lissi // Free Radic. Res. - 2007. - Vol. 41. - № 3. - P. 316-323.

300. Friebe, A. Stimulation of soluble guanylate cyclase by superoxide dismutase is mediated by NO / A. Friebe, G. Schultz, D. Koesling // *Biochemical Journal*. - 1998. - Vol. 335. - № 3. - P. 527-531.
301. Gottfredsen, R.H. Hydrogen peroxide induce modifications of human extracellular superoxide dismutase that results in enzyme inhibition / R.H. Gottfredsen, U.G. Larsen, J.J. Enghild, S.V. Petersen // *Redox. Biol.* - 2013. - Vol. 1. - P. 24-31. - Doi: 10.1016/j.redox.2012.12.004.
302. Nikolaidis, M.G. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations / M.G. Nikolaidis, A.Z. Jamurtas, V. Paschalis [et al.] // *Sports Med.* - 2008. - Vol. 38. - № 7. - P. 579-606.
303. Саркисова, Е.Г. Влияние некоторых этиопатогенетических факторов на экспрессию АДА2 / Е.Г. Саркисова, Н.А. Андреасян, А.А. Арутюнян, Р.Л. Айрапетян // *Биолог. журн. Армении*. - 2012. - Т. 2. - Вып. 64. - С. 55-62.
304. Bielat, K. Ecto-enzyme activity of human erythrocyte adenosine deaminase / K. Bielat, G.L. Tritsch // *Mol. Cell Biochem.* - 1989. - Vol. 86. - № 2. - P. 135-142.
305. Wiginton, D.A. Purification, characterization and radioimmunoassay of adenosine deaminase from human leukaemic granulocytes / D.A. Wiginton, M.S. Coleman, J.J. Hutton // *Biochem. J.* - 1981. - Vol. 195. - № 2. - P. 389-397.
306. Шатова, О.П. Антиметаболическая терапия метформином / О.П. Шатова, Е.В. Бутенко, Е.В. Хомутов [и др.] // *Инновационные перспективы здравоохранения донбасса: материалы международной научно-практической конференции*. - Донецк. -2015. - С. 16-20.
307. Миронова, К.А. Особенности обмена аденозина и лактата в клетках крови при аденокарциноме желудка / К.А. Миронова // *Инновационные перспективы здравоохранения донбасса: материалы международной научно-практической конференции*. - Донецк. -2015. - С. 92-94.
308. Жебеленко, Я.Г. Метаболічні зміни в клітинах крові при виразковій хворобі та раку шлунка: автореф. дис... канд. мед. наук: 14.01.32 / Я.Г. Жебеленко. – Луганськ: ДЗ "Луган. держ. мед. ун-т", 2011. - 24 с.

309. Tousoulis, D. The role of nitric oxide on endothelial function / D. Tousoulis, A.M. Kampoli, C. Tentolouris [et al.] // *Curr. Vasc. Pharmacol.* - 2012. - Vol. 10. - № 1. - P. 4-18.
310. Carmeli, E. Oxidative Stress and Nitric Oxide in Sedentary Older Adults with Intellectual and Developmental Disabilities / E. Carmeli, A. Bachar, O. Rom, D. Aizenbud // *Adv. Exp. Med. Biol.* - 2016. - Vol. 884. - P. 21-27. - Doi: 10.1007/5584_2015_166.
311. Gumanova, N.G. Serum nitrate and nitrite levels in patients with hypertension and ischemic stroke depend on diet: a multicenter study / N.G. Gumanova, N.V. Teplova, A.U. Ryabchenko, E.N. Denisov // *Clin. Biochem.* - 2015. - Vol. 48. - № (1-2). - P. 29-32. - Doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.10.010.
312. Кишкун, А.А. Биологический возраст и старение: возможности определения и пути коррекции: руководство для врачей / А.А. Кишкун. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. - 976 с.
313. Руководство по геронтологии и гериатрии: в 4-х т. / под ред. акад. РАМН, проф. В.Н.Ярыгина, проф. А.С.Мелентьева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - Т. 1. Основы геронтологии. Общая гериатрия. - 720 с.
314. Goncharova, N.D. Age-related changes in the reliability of antioxidant enzyme defense in monkeys with different types of adaptive behavior / N.D. Goncharova, V.Yu. Marenin, A.A. Vengerin // *Curr. Aging Sci.* - 2013. - Vol. 6. - № 2. - P. 163-169. - Doi: 10.2174/18746098112059990004.
315. Губский, Ю.И. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях / Ю.И. Губский // *Современные проблемы токсикологии.* - 2005. - Т. 8. - № 3. - С. 20-27.
316. Супрун, Э.В. Эффекты окислительной модификации белков и формирование неврологических дисфункций при экспериментальном ишемическом инсульте на фоне коррекции ронколейкином / Э. В. Супрун // *Український журнал екстремальної медицини імені Г. О. Можаєва.* - 2011. - Т. 12. - № 3. - С. 87-94.

317. Nikolaidis, M.G. Blood as a reactive species generator and redox status regulator during exercise / M.G. Nikolaidis, A.Z. Jamurtas // Arch. Biochem. Biophys. - 2009. - Vol. 490. - № 2. - P. 77-84. - Doi: 10.1016/j.abb.2009.08.015.
318. Чумакова, С.П. Антиоксидантный потенциал эритроцитов и плазмы крови у больных ишемической болезнью сердца с умеренным и выраженным гемолизом после операций с искусственным кровообращением / С.П. Чумакова, В.М. Шипулин, О.И. Уразова [и др.] // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. - 2012. - Т. 5. - № 6. - С. 95-99.
319. Sargisova, Y.G. Nitric oxide - an activating factor of adenosine deaminase 2 in vitro / Y.G. Sargisova, N.A. Andreasyan, H.L. Hayrapetyan, H.A. Harutyunyan // Biochemistry (Mosc). - 2012. - Vol. 77. - № 1. - P. 92-97. - Doi: 10.1134/S0006297912010117.
320. Алехина, И.Ю. Использование новых методов диагностики для определения специфических маркеров поражения сердечно-сосудистой системы у больных системной красной волчанкой и системной склеродермией / И.Ю. Алехина, Л.Н. Шилова, Н.В. Александрова [и др.] // Материалы X съезда «От профилактики к высоким технологиям». - Рязань, 2011. - С. 16-18.
321. Valko, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer / M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol [et al.] // Chem. Biol. Interact. - 2006. - Vol. 160. - № 1. - P. 1-40.
322. Zakowski, J.J. Purification and properties of rat liver mitochondrial glutathione peroxidase / J.J. Zakowski, A.L. Tappel // Biochim. Biophys. Acta. - 1978. - Vol. 526. - № 1. - P. 65-76.
323. Noyan, T. A study of oxidative stress parameters in anti-helicobacter pylorus immunoglobulin g positive and negative gastric cancer patients / T. Noyan, H. Guducuoglu, M. Ilhan // Yonsei Med. J. - 2009. - Vol. 50. - № 5. - P. 677-682. - Doi: 10.3349/ymj.2009.50.5.677.
324. Espinoza, S.E. Glutathione peroxidase enzyme activity in aging / S.E. Espinoza, H. Guo, N. Fedarko [et al.] // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. - 2008. - Vol. 63. - № 5. - P. 505-509.

325. Antonioli, L. Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis / L. Antonioli, M. Fornai, R. Colucci [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 2007. - Vol. 322. - № 2. - P. 435-442.
326. Mathews, J.J. Structure of human adenosine kinase at 1,5 Å resolution / Mathews J.J., Erion M.D., Ealick S.E. // Biochemistry. - 1998. - Vol. 37. - № 45. - P. 15607-15620.
327. Миронова, К.А. Особенности обмена аденозина и лактата в клетках крови при аденокарциноме желудка / К.А. Миронова // Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). - 2015. - Т. 17. - № 8. - С. 152-156.
328. Аттауллаханов, Ф.И. Энергозависимые процессы и метаболизм аденилатов в эритроцитах человека / Ф.И. Аттауллаханов, В.М. Витвицкий, С.В. Комарова, Е.В. Мошаров // Биохимия. -1996. - Т. 61. - Вып. 2. - С. 266-274.
329. Бакурова, О.М. Вікові особливості метаболічних процесів в еритроцитах в нормі та при виразковій хворобі і раку шлунка / О.М. Бакурова, Б.Г. Борзенко // Пробл. старения и долголетия. - 2005. - Т.14 (приложение). - С. 76-77.
330. Baranowska-Bosiacka, I. Disorders of Purine Metabolism in Human Erythrocytes in the State of Lead Contamination / I. Baranowska-Bosiacka, A.J. Hlynchak, B. Wiszniewska, M. Marchlewicz // Pol. J. Environ. Stud. - 2004. - Vol. 13. - № 5. - P. 467-476.
331. Merighi, S. A3 adenosine receptors modulate hypoxia-inducible factor-1α expression in human A375 melanoma cells / S. Merighi, A. Benini, P. Mirandola [et al.] // Neoplasia. - 2005. - Vol. 7. - № 10. - P. 894-903.
332. Nemeti, B. Glutathione-dependent reduction of arsenate in human erythrocytes--a process independent of purine nucleoside phosphorylase / B. Nemeti, Z. Gregus // Toxicol. Sci. - 2004. - Vol. 82. - № 2. - P. 419-428.
333. Gladwin, M.T. The functional nitrite reductase activity of the heme-globins / M.T. Gladwin, D.B. Kim-Shapiro // Blood. - 2008. - Vol. 112. - № 7. - P. 2636-2647. - Doi: 10.1182/blood-2008-01-115261.
334. Кульчицький, О.К. Система оксиду азоту та вік / О.К. Кульчицький // Буков. мед. вісник. - 2005. - Т. 9. - № 2. - С. 143-144.

335. Drexler, H. Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans / H. Drexler // *Rev.Cardiovasc.Res.* - 1999. - Vol. 43. - № 3. - P. 572-579.
336. Agarwal, A. Xanthine oxidoreductase: a journey from purine metabolism to cardiovascular excitation-contraction coupling / A. Agarwal, A. Banerjee, U.C. Banerjee // *Crit. Rev. Biotechnol.* - 2011. - Vol. 31. - № 3. - P. 264-280. - Doi: 10.3109/07388551.2010.527823.
337. Springer, J. The xanthine oxidase inhibitor oxypurinol reduces cancer cachexia-induced cardiomyopathy / J. Springer, A. Tschirner, K. Hartman [et al.] // *Int. J. Cardiol.* - 2013. - Vol. 168. - № 4. - P. 3527-3531. - Doi: 10.1016/j.ijcard.2013.05.063.
338. Занозина, О.В. Окислительная модификация белков у больных сахарным диабетом в зависимости от длительности и компенсации заболевания / О.В. Занозина, Т.Г. Щербатюк, Н.Н. Боровков // *Российский медико-биологический вестник им. Акад. И. П. Павлова.* - 2010. - № 1. - С. 98-103.
339. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров // *Соросовский образовательный журнал.* - 2000. - № 4. - С. 71-78.
340. Лишневская, В.Ю. Эритроциты при старении / В.Ю. Лишневская, Г.В. Дужак // *Проблемы старения и долголетия.* - 2005. - Т.14 (приложение). - С. 157-158.
341. Nikolic-Kokic, A. Complexity of free radical metabolism in human erythrocytes / A. Nikolic-Kokic, D. Blagojevic, M. Spasic // *J. Med. Biochem.* - 2010. - Vol. 29. - № 3. - P. 189-195. - Doi: 10.2478/v10011-010-0018-7.
342. Levine, S.A. Antioxidant adaptation: A unified disease theory / S.A. Levine, P.M. Kidd // *J. Orthomol. Psych.* - 1985. - Vol. 14. - № 1. - P. 19-38.
343. Їолкіна, Н.М. Показники метаболізму оксиду азоту в еритроцитах хворих на кардіоміопатію / Н.М. Їолкіна, С.В. Коношенко, А.В. Коцюруба // *Експерим. та клініч. фізіологія і біохімія.* - 2014. - № 1. - С. 53-58.
344. Cheng, M.L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient cells show an increased propensity for oxidant-induced senescence / M.L. Cheng, H.Y. Ho, Y.H. Wu, D.T. Chiu // *Free Radic. Biol. Med.* - 2004. - Vol. 36. - № 5. - P. 580-591.

345. Andriichuk, A. Oxidative Stress Biomarkers and Erythrocytes Hemolysis in Well-Trained Equine Athletes Before and After Exercise / A. Andriichuk, H. Tkachenko, I. Tkachova // *J. Equine Vet.Sci.* - 2016. - Vol. 36. - P. 32-43. - Doi:10.1016/j.jevs.2015.09.011.
346. Eckle, T. Role of extracellular adenosine in acute lung injury / T. Eckle, M. Koeppen, H.K. Eltzschig // *Physiology (Bethesda)*. - 2009. - Vol. 24. - P. 298-306. - Doi: 10.1152/physiol.00022.2009.
347. Бакурова, О.М. Чи є дисметаболичні процеси в еритроцитах одним з факторів патогенезу виразки та раку шлунка / О.М. Бакурова, К.О. Миронова, С.О. Зуйков [и др.] // *Питання експериментальної та клінічної медицини*. - 2011. - Вип. 15. - Т. 1. - С. 342-345.
348. Thakur, S. Inactivation of adenosine A2A receptor attenuates basal and angiotensin II-induced ROS production by Nox2 in endothelial cells / S. Thakur, J. Du, S. Hourani J. [et al.] // *Biol. Chem.* - 2010. - Vol. 285. - № 51. - P. 40104-40113. - Doi: 10.1074/jbc.M110.184606.
349. George, A. Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease / A. George, S. Pushkaran, D.G. Konstantinidis [et al.] // *Blood*. - 2013. - Vol. 121. - № 11. - P. 2099-2107. - Doi: 10.1182/blood-2012-07-441188.
350. Crawford, J.H. Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation / J.H. Crawford, T.S. Isbell, Z. Huang [et al.] // *Blood*. - 2006. - Vol. 107. - № 2. - P. 566-574.
351. Осинский, С.П. Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора-1 α в ткани рака желудка человека и ее связь с некоторыми клиническими характеристиками заболевания / С.П. Осинский, Л.Д. Гуменюк, Д.С. Осинский, С.П. Меренцев // *Онкологія*. - 2006. - Т. 8. - № 1. - С. 33-37.
352. 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. - (<http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=5674>).
353. Beyer, W. Superoxide dismutases / W. Beyer, J. Imlay, I. Fridovich // *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.* - 1991. - Vol. 40. - P. 221-253.
354. Marklund, S.L. Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung / S.L. Marklund // *Biochem. J.* - 1984. - Vol. 220. - № 1. - P. 269-272.
355. Lin, C.C. Nitric oxide activates superoxide dismutase and ascorbate peroxidase to repress the cell death induced by wounding / C.C. Lin, P.J. Jih, H.H. Lin [et al.] // *Plant. Mol. Biol.* - 2011. - Vol. 77. - № 3. - P. 235-249. - Doi: 10.1007/s11103-011-9805-x.
356. Asahi, M. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity / M. Asahi, J. Fujii, K. Suzuki [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 1995. - Vol. 270. - № 36. - P. 21035-21039.
357. Lundberg, J.O. Supplementation with nitrate and nitrite salts in exercise: a word of caution / J.O. Lundberg, F.J. Larsen, E. Weitzberg // *J. Appl. Physiol.* - 2011. - Vol. 111. - P. 616-617. - Doi: 10.1152/japplphysiol.00521.2011.
358. Dobashi, K. Induction of glutathione peroxidase in response to inactivation by nitric oxide / K. Dobashi, K. Asayama, T. Nakane [et al.] // *Free Radic. Res.* - 2001. - Vol. 35. - № 3. - P. 319-327.
359. Nikolaidis, M.G. Common questions and tentative answers on how to assess oxidative stress after antioxidant supplementation and exercise / M.G. Nikolaidis, N.V. Margaritelis, V. Paschalis [et al.] // *Antioxidants in Sports Nutrition*, (Ed. Lamprecht M), CRC Press, New York, 2015. - (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK299044/>).