**Арсланова Динара Ришатовна. Система "перекисное окисление липидов-антиоксиданты" у крыс на разных стадиях онтогенеза и канцерогенеза : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.00.13, 16.00.02 / Арсланова Динара Ришатовна; [Место защиты: Ульян. гос. ун-т].- Ульяновск, 2009.- 96 с.: ил. РГБ ОД, 61 09-3/930**

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

04">00957113 *На пРавахрукописи*

**Арсланова Динара Ришатовна СИСТЕМА «ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ - АНТИОКСИДАНТЫ» У КРЫС НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА И КАНЦЕРОГЕНЕЗА**

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

03.00.13 - физиология 16.00.02 - патология, морфология, онкология животных

Научные руководители:

д.б.н., профессор, академик РАЕН Т.П. Г'енинг,

к.м.н., доцент И.И. Антонеева

Ульяновск

2009

ОГ ДАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3

[ВВЕДЕНИЕ 4](#bookmark1)

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 9

( 1.1 Яичник млекопитающих в процессе онтогенеза 9

1. Функциональная морфология яичников циклирующих млекопитающих 9
2. Возрастная периодизация функции яичников 13

[1.2 Регуляторная функция компонентов системы ПОЛ-АО 16](#bookmark5)

1. Роль системы ПОЛ-АО в регуляции клеточного метаболизма 16
2. Кислородно-перекисная теория старения 22
3. Окислительный стресс в регуляции апоптоза и пролиферации....29 1.3 Система ПОЛ-АО в процессе развития опухолей 33
4. Изменения про- и антиоксидантных факторов в процессе экспериментального канцерогенеза 33
5. Проблема канцерогенеза на поздних этапах онтогенеза 37

[ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 40](#bookmark8)

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 44

1. Анализ системы ПОЛ-АО в яичниках, эритроцитах

и плазме крови крыс в процессе индивидуального развития 44

1. Показатели ПОЛ-АО в яичниках крыс в процессе онтогенеза 44
2. Показатели ПОЛ-АО в крови крыс в процессе онтогенеза 48
3. Уровень митоза и апоптоза в покровном эпителии яичников крыс

на разных этапах индивидуального развития 53

1. Анализ параметров системы ПОЛ-АО в организме животных-опухоленосителей с асцитной опухолью яичников 56

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 69

ВЫВОДЫ 78

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК 79

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АЖ - асцитическая жидкость АОЗ - антиоксидантная защита АФК - активные формы кислорода ГПО - глутатионпероксидаза ГР - глутатионредуктаза МДА - малоновый диальдегид

НАД - окисленная форма никотинамидадениндинуклеотида

НАДН — восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида

ОЯ - опухоль яичников

ПМЯЛ — полиморфноядерные лейкоциты

ПОЛ - перекисное окисление липидов

СОД - супероксиддисмутаза

СРО - свободнорадикальное окисление

ТБК — тиобарбитуровая кислота

ТХУ - трихлоруксусная кислота

GSH - глутатион восстановленный

GSSG — глутатион окисленный

Log-фаза - логарифмическая фаза

Term-фаза - терминальная фаза

**ВВЕДЕНИЕ**

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) - в строго ограниченных пределах - это физиологический процесс, который принимает участие в регуляции клеточных функций [37,69]. При повышении уровня свободнорадикапьного окисления возможно быстрое разрушение клеточных структур в результате их повреждения. Показано, что практически все патологические состояния помимо специфического ответа сопровождаются повышенным уровнем ПОЛ [4, 11, 44]. Повреждающим фактором при этом служит избыточный уровень активных форм кислорода (АФК), которые меняют свою физиологическую, сигнальную (регуляторную) роль на патогенетическую. Одним из универсальных механизмов защиты клетки от избыточного ПОЛ является многоуровневая система антиоксидантов. Оценить баланс прооксидантов и антиоксидантов позволяет соотношение ДПО-АО, предложенное Б.Н. Лю [53].

На сегодня показано, что процесс физиологического старения организма носит многофакторный, многоочаговый, необратимый характер. Современная свободно-радикальная теория старения предполагает, что наступающая с возрастом дезадаптация связана с повреждениями важных биомолекул продуктами ПОЛ [118, 130]. В ходе многочисленных

экспериментов выяснено, что митохондрии - наиболее уязвимое и основное «стартовое» звено в старении клетки [71, 113, 128]. Внутриклеточная гипероксия, как результат первичного процесса старения митохондрий, становится фактором поражения не только всех субклеточных структур, но внеклеточных образований. Полагают также, что модификация структуры плазматической мембраны - один из наиболее вероятных механизмов нарушения регуляции тканевого метаболизма при старении [21]. Исследование параметров системы ПОЛ-АО в крови, тканях печени, мозга у животных разных возрастных групп позволило определить существенную роль избыточности процессов пероксидации и недостаточности антиоксидантной защиты в возрастных перестройках этих тканей [5, 25, 166].

Однако работ, посвященных возрастной динамике в системе ПОЛ-АО в яичнике, являющимся, органом, рано подверженным инволютивным процессам, нет.

Накопление соматических мутаций в клетке, как, результат воздействия эндогенных метаболитов вообще и продуктов повышенного ПОЛ в частности, может представлять один из механизмов патогенеза - общий для процессов старения и канцерогенеза [31, 87, 103, 137]. Злокачественный рост, который является болезнью регуляции, в первую очередь регуляции размножения и дифференцировки, может сопровождаться изменениями или сбоями в работе системы ПОЛ-АО [12, 39, 48, 64, 109]. Установлено, что как для малигнизации, так и для поддержания: трансформированного состояния клеток активно растущих участков опухоли необходимо создание внутри клеток гиггероксических условий [54]. Однако оксидативный стресс, наблюдаемый в неопластической клетке, может возникнуть не только при избыточности активных форм кислорода, но и при недостаточности антиоксидантов.

Существует мнение, что дисбаланс в системе продукции и инактивации' АФК может с одной стороны вызывать изменения функциональной активности яичников в процессе онтогенеза, а с другой, являться одной из причин, провоцирующей канцерогенную ситуацию [6,75]. Однако в доступной литературе отсутствуют данные, позволяющие оценить динамику компонентов системы ПОЛ-АО в яичнике в онтогенезе и на различных стадиях канцерогенеза.

**Целью настоящей работы** явилось изучение системы «перекисное окисление липидов - антиоксиданты» у крыс на разных стадиях онтогенеза и канцерогенеза:

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Изучить динамику активности компонентов системы «перекисное окисление липидов - антиоксиданты» в ткани яичников, плазме крови и эритроцитах у крыс в процессе онтогенеза.
2. Оценить уровень митоза и апоптоза в покровном эпителии яичника крыс на разных стадиях онтогенеза.
3. Определить изменения в системе ПО Л-АО в опухолевых клетках, асцитической жидкости, плазме крови и эритроцитах животных- опухоленосителей с асцитной опухолью яичника на разных стадиях канцерогенеза.
4. Изучить динамику в системе ПОЛ-АО в опухолевых клетках, асцитической, жидкости, плазме крови и эритроцитах у животных- опухоленосителей на разных стадиях онтогенеза.

**Научная новизна.** Получены новые данные об изменении системы ПОЛ-АО в яичниках крыс в процессе индивидуального развития и при прогрессировании асцитной опухоли яичника у крыс. Также впервые оценен уровень ферментативного» звена АОС (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатион-редуктазы) в плазме и-, эритроцитах крови животных- опухоленосителей. Проведены морфологические исследования покровного эпителия яичника крыс в процессе старения органа. Впервые установлена корреляционная-связь между накоплением продукта ПОЛ - МДА в яичниках крыс с возрастом животных, а также с уровнем митоза и апоптоза в» покровном эпителии яичников. Проведена оценка параметров системы ПОЛ- АО в опухолевых клетках, асцитической жидкости, плазме крови и эритроцитах крыс с асцитной опухолью яичников в логарифмическую и терминальную фазу процесса в разных возрастных группах.

**Научно-практическая значимость.** Результаты работы о роли липопероксидации в онтогенезе могут быть использованы в теоретической и прикладной геронтологии при разработке теории старения и методов коррекции оксидативного стресса на поздних этапах онтогенеза. Данные, полученные в результате оценки уровня ПОЛ в ткани яичников на разных этапах онтогенеза и канцерогенеза, могут быть использованы в онкогинекологии при оценке факторов риска заболевания раком яичников. Полученные показатели митотического и апоптотического индексов в

клетках покровного эпителия яичников, а также данные по оценке их коррелятивных связей с динамикой МДА могут быть использованы в возрастной физиологии при оценке функций репродуктивной системы. Результаты изучения активности ферментативного звена антиоксидантной системы в опухолевой ткани, асцитической жидкости, плазме и эритроцитах животных-опухоленосителей могут быть использованы в теоретической и практической онкогинекологии, а также в экспериментальной онкологии животных при разработке терапевтических схем на разных стадиях опухолевого процесса.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. В ходе индивидуального развития в яичниках и крови крыс происходят разнонаправленные изменения в системе ПОЛ-АО. Старение яичника сопровождается накоплением МДА и снижением активности ферментов антиоксидантной защиты. Наиболее выраженный дисбаланс в системе ПОЛ-АО в ткани яичников наблюдается у старых животных в возрасте 21 месяц.
2. На исследуемых этапах онтогенеза (4, 9, 15, 21 месяц) одновременно с нарастанием уровня МДА в ткани яичников крыс в покровном эпителии отмечено снижение митотического индекса и возрастание апоптотического индекса.
3. Функционирование системы ПОЛ-АО в клетках асцитной опухоли яичников зависит от стадии роста опухоли. На терминальной стадии по сравнению с логарифмической наблюдается усиление окислительного стресса, что проявляется в снижении активности СОД и каталазы на фоне увеличения содержания МДА.
4. Рост асцитной опухоли яичников сопровождается увеличением уровня МДА в асцитической жидкости, плазме крови и эритроцитах. У молодых животных-опухоленосителей (4 месяца) по мере прогрессирования опухоли степень и направленность динамики ферментов антиоксидантной защиты в эритроцитах, плазме и асцитической жидкости отлична от аналогичных показателей животных 15 месяцев.
5. Динамика активности компонентов системы ПОЛ-АО в яичниках крыс в процессе онтогенеза сходна с таковой в процессе канцерогенеза.

**Апробация работы**

Основные положения диссертации были доложены на Всероссийской научной конференции «Механизмы индивидуальной адаптации» (Томск, 2006), конгрессе с международным участием «Паллиативная медицина и реабилитация в здравоохранении» (Турция, 2006), на 2-й Всероссийской конференции с международным участием «Медико-физиологические проблемы экологии человека» (Ульяновск, 2007), Всероссийской конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно­

приспособительных процессов» (Новосибирск, 2007), I Всероссийской молодежной научной конференции «Молодежь и наука на севере», (Сыктывкар,2008), VIII Молодежной научной конференции Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар,2009).

**Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, из них 2 - в изданиях, рекомендованных ВАК.

ВЫВОДЫ

1. В процессе онтогенеза в яичниках, плазме крови и эритроцитах крыс имеет место возрастание уровня МДА при одновременном снижении активности ферментативного звена антиоксидантной защиты.
2. В покровном эпителии яичника крыс в процессе онтогенеза имеет место значимое снижение уровня митоза и возрастание апоптоза.
3. У крыс с асцитной опухолью яичника в опухолевых клетках на терминальной стадии по сравнению с логарифмической имеет место увеличение содержания МДА при одновременном снижении активности ферментативного звена антиоксидантной защиты.
4. При развитии асцитной опухоли яичников динамика уровня МДА и активнбости ферментов антиоксидантной защиты в эритроцитах, плазме и асцитической жидкости молодых (4 месяца) животных отлична от таковой у стареющих (15 месяцев). В опухолевых клетках эти показатели не зависят от возраста животных-опухоленосителей.
5. Динамика активности компонентов системы ПОЛ-АО в яичниках крыс в процессе онтогенеза аналогична таковой в процессе канцерогенеза.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Андреева, Л'.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой /Л.И. Андреева, Л.А.Кожемякин,

А.А.Кишкун // Лаб. дело. — 1988. —№ 11. — С. 41-43.

1. Агапова, Л.С. Прогресс в изучении молекулярных основ онкогенеза и новые способы контроля опухолевого роста /Л.С.Агапова, Б.П.Копнин // Вестник РАМН. - 2007. - № 11. - С. 3-8.
2. Анисимов, В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. - СПб.: Изд-во Наука, 2003.
3. Анисимов, В.Н. Возрастные изменения активности свободнорадикальных процессов в тканях и сыворотке крови крыс / Анисимов В.Н., Арутюнян А.В., Опарина Т.Н.// Рос. физиол. журн. — 1999. - Вып. 85, № 4. - С. 502-507.
4. Антонеева, И.И. Перекисное окисление липидов и ферментативное звено антиоксидантной системы крови при раке яичников // Казанский медицинский журнал. — 2006. - № 3. - С. 213-215.
5. Асатиани, B.C. Ферментные методы анализа. - М.: Медицина, 1969. - С. 607-610.
6. Банкова, В.В. Роль малонового диальдегида в регуляции перекисного окисления липидов в норме и патологии. /Автореф. дис. д.б.н. — М., 1990.
7. Барабой, В.А. Перекисное окисление и стресс /В.А. Барабой, И.И. Брехман, В.Г. Голотин, Ю.Б. Кудряшов. - СПб.: Наука, 1992. - 147 с.
8. Берштейн, Л.М. Гормональный канцерогенез. — СПб.: Наука, 2000. - 199 с.
9. Бессалова, Е.Ю. Физиологические и структурные методы оценки морфофункционального статуса яичников млекопитающих // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. - 2006. - Т. 5, № 3. — С. 85-90.
10. Биленко, М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. - М.: Наука, 1989.-231 с.
11. Борунов, Е.В. Низкая активность антиоксидантних ферментов в опухолевых клетках как фактор кислородной зависимости противоопухолевой цитотоксичности макрофагов /Борунов Е.В., Хавалкин И.В., Смирнова Л.П., Щепеткин И.А., Ланкин В.З., Васильева Н.В.// Бюллетень эксперим. биол. и медицины. - 1989. - № 8. - С. 233- 235.
12. Бурлакова, Е.Б. Перекисное окисление липидов мембран и природные анитоксиданты /Е.Б. Бурлакова, Н.Г. Храпова // Успехи химии. - 1985. - Т. 54.-С. 1540-1558.
13. Бурлакова, Е.Б. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. / Е.Б.Бурлакова, А.В.Алесенко, Е.М.Молочкина -М.: Наука, 1975. -214 с.
14. Бурлакова, Е.Б. Система окислительно-восстановительного гомеостаза при радиационио индуцируемой нестабильности генома/ Е.Б. Бурлакова,

В.Ф. Михайлов, В.К. Мазурик // Радиац. биол. Радиоэкол. - 2001. - Т. 41, № 5.-С. 489-499.

1. Владимиров, Ю.А. Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембран митохондрий, некроз и апоптоз / Ю.А. Владимиров // Биологические мембраны. - 2001. -Т. 19,№5: -С. 356-377.
2. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в живых системах /Ю.А.Владимиров, О.А.Азизова, А.И.Деев // Итоги науки и техники,- Сер. Биофизика. — Т. 29. - М., 1991. — 250 с.
3. Волкова, О.В. Функциональная морфология женской репродуктивной системы. - М.: Медицина, 1983. - 224 с.
4. Волкова, О.В. Морфогенетические основы развития и функции яичников / Волкова О.В., Боровая Т.Г.- М., 1999. - 253 с.