

*На правах рукописи*

**Рубцов Георгий Константинович**

**МОДЕЛЬНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА  
ЖЕЛТОЧНЫХ ЛИПОПРОТЕИДОВ: ПАРАМЕТРЫ  
СПОНТАННОЙ И Fe<sup>2+</sup>-ИНИЦИИРОВАННОЙ  
ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ В  
КОМПЛЕКСЕ С УРОВНЕМ  
МОЛЕКУЛ СРЕДНЕЙ МАССЫ**

03.01.04 – Биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Пенза-2014

Работа выполнена на кафедре биохимии Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Пензенский государственный университет».

Научный руководитель – доктор биологических наук, доцент **Безручко Наталья Валериановна**.

Официальные оппоненты: **Алексеева Людмила Владимировна**, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВПО «Тверская государственная сельскохозяйственная академия» (ФГБОУ ВПО Тверская ГСХА), заведующая кафедрой физиологии, общей биологии и основ ветеринарии технологического факультета;  
**Зайцев Валерий Геннадьевич**, кандидат биологических наук, доцент, ФГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», доцент кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии.

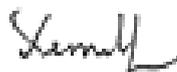
Ведущая организация – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет».

Защита состоится 12 февраля 2015 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.263.08 на базе ФГБОУ ВПО «Тверской государственной университет» по адресу: 170002, г. Тверь, пр-т Чайковского, д. 70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВПО «Тверской государственной университета», [university.tversu.ru](http://university.tversu.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета кандидат биологических наук



М.Н. Петушков

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ЖЛП – желточные липопропротеиды

МБС – модельная биологическая система

МСМ – молекулы средней массы

ОМБ – окислительная модификация белков

2,4-ДФГ – 2,4-динитрофенилгидразин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

Изучение биохимических механизмов развития окислительного стресса весьма актуально, так как затрагивает большое число заболеваний и патологий, но – необычайно сложно, так как требует решения комплекса проблем методического и теоретического плана (Е.Б. Меньщикова и соавт., 2006, 2008). Одним из аспектов исследований составляющих окислительного стресса может служить анализ свободно-радикальных процессов, затрагивающих белки.

Значимость исследований окислительной модификации белков в комплексе с уровнем веществ средней молекулярной массы обусловлена тем, что данные биохимические тесты – маркеры выраженности эндотоксикоза, чувствительные к изменению степени окислительного стресса. (Р.Н. Белоногов и соавт., 2009; Т.В. Копытова и соавт., 2009; Н.Ю. Келина и соавт., 2012; О. Халдун и соавт., 2012; Н.В. Безручко и соавт., 2013; Г.К. Рубцов и соавт., 2013.) Изучение их в совокупности, в одной пробе биологической среды, позволит увеличить информативность каждого из этих параметров и снизить расход используемого материала, что особенно важно в клинической биохимии.

Метод оценки окислительной модификации белков (ОМБ) в совокупности с уровнем молекул средней массы (МСМ) может быть реализован в соответствии с авторским способом (Г.К. Рубцов и соавт., 2012). Метод предполагает определение в одной и той же пробе биологического материала и уровня МСМ, и величин ОМБ. Для этого проводят осаждение белков трихлоруксусной кислотой. Надосадочную жидкость используют для регистрации экстинкций МСМ (при 254 нм), а осадок – для определения величин ОМБ (при 356 нм, 370 нм, 430 нм, 530 нм). Уровень ОМБ изучают в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДФГ) с образованием карбонильных производных белков (2,4-динитрофенилгидразонов). Регистрация уровней ОМБ спектрофотометрически на четырех длинах волн позволяет выявить уровни 2,4-динитрофенилгидразонов различной природы: при 356 нм - алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны нейтрального характера, при 370 нм – алифатические кетондинитрофенилгидразоны нейтрального характера, при 430 и 530 – алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны и кетондинитрофенилгидразоны основного характера (Е.Е. Дубинина и соавт., 1995).

Для изучения спонтанной и инициированной (металлкатализируемой) окислительной модификации белков и уровня молекул средней массы удобно использовать модельные биологические системы (МБС), например МБС желточных липопропротеидов (ЖЛП).

Металлкатализируемое окисление представляет собой местный специфический процесс, протекающий в нормально функционирующем организме, и его уровень является важным прогностическим показателем. Т.е. диагностическое значение имеет не только определение спонтанной ОМБ, кото-

рая указывает на количество модифицированных аминокислот, но и металл-индуцированная деструкция белковых молекул. Индуцированная ОМБ позволяет выявить как изменения аминокислот, входящих в состав полипептидной цепи, так и модификации, связанные с конформацией молекулы и состоянием белкового окружения. (М.В. Ведунова и соавт., 2010.)

В связи с этим в работе проведены серии наблюдений не только в условиях спонтанного, но и в условиях металлкатализируемого окисления, в качестве которого было применено  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированное окисление. Выбор способа индуцирования ОМБ в пуле МСМ с помощью ионов  $\text{Fe}^{2+}$  обусловлен следующим.

Введение в систему ионов  $\text{Fe}^{2+}$  сопровождается ускорением процессов свободно-радикального окисления, уровень аутоокисления плазмы крови и суспензии желточных липопротеидов крайне мал, причем плазма крови, по сравнению с желточными липопротеидами, в присутствии ионов  $\text{Fe}^{2+}$  окисляется намного меньше (Г.И. Клебанов и соавт., 1988). Г.И. Клебанов и соавт. (1988) предположили, что в самом общем случае ингибирование плазмой крови пероксидации липидов желточных липопротеидов в присутствии ионов  $\text{Fe}^{2+}$  обусловлено наличием в плазме крови антиоксидантов и (или) веществ, обеспечивающих окисление и связывание ионов  $\text{Fe}^{2+}$ .

С этих позиций представляют практический интерес разработка и оптимизация методического обеспечения исследования данных параметров (МСМ и ОМБ) в комплексе, в одной пробе биологической среды. Актуально применение для этого модельной биологической системы желточных липопротеидов в условиях спонтанной и инициированной ОМБ, что позволяет апробировать предложенный метод оценки ОМБ и уровня МСМ.

Наше исследование ориентировано на изучение биологического значения параметров спонтанной и  $\text{Fe}^{2+}$ -инициированной окислительной модификации белков и молекул средней массы на модельной биологической системе желточных липопротеидов. Это направлено на решение задачи повышения информативности исследуемых биохимических тестов путем исследования их в комплексе – в одной и той же пробе, снизив расход биологического материала, имеющей ключевое значение для развития медицинской биохимии и ее клинического раздела.

Таким образом, необходимость изучения как спонтанной, так и индуцируемой ионами металлов ОМБ, обусловлена тем, что это дает возможность определить чувствительность модельной биологической системы к изменению условий процессов свободно-радикального окисления. В нашей работе в основе применяемого метода регистрации уровня ОМБ использовалась реакция с 2,4-динитрофенилгидразином, в процессе которой могут образовываться динитрофенилгидразоны альдегидной и кетонной природы. Изучение инициированной ОМБ проводилось в модельной биологической системе в присутствии ионов железа ( $\text{Fe}^{2+}$ ).

**Цель исследования:** предложить маркерные параметры оценки уровня спонтанной и  $\text{Fe}^{2+}$ -инициированной окислительной модификации белков,

коррелирующие с уровнем молекул средней массы, и обосновать диапазоны их чувствительности к изменению условий процессов свободно-радикального окисления на модельной биологической системе желточных липопротеидов.

**Задачи исследования:**

1. Изучить спонтанную и  $\text{Fe}^{2+}$ -инициированную окислительную модификацию белков и уровни молекул средней массы на модельной биологической системе желточных липопротеидов, продуктах пчеловодства как веществах природного происхождения, обладающих антиоксидантным действием, и сыворотке крови экспериментальных животных (крысы).
2. Исследовать спонтанную и  $\text{Fe}^{2+}$ -инициированную окислительную модификацию белков и уровни молекул средней массы на модельной биологической системе желточных липопротеидов при добавлении продуктов пчеловодства как веществ природного происхождения, обладающих антиоксидантным действием, и сыворотки крови экспериментальных животных (крысы).
3. Определить особенности спонтанной и  $\text{Fe}^{2+}$ -инициированной окислительной модификации белков и уровней молекул средней массы на модельной биологической системе желточных липопротеидов при одновременном добавлении продуктов пчеловодства как веществ природного происхождения, обладающих антиоксидантным действием, и сыворотки крови экспериментальных животных (крысы).
4. Выявить возможности комплексного использования маркерных параметров оценки уровня спонтанной и  $\text{Fe}^{2+}$ -инициированной окислительной модификации белков, коррелирующих с уровнем молекул средней массы, на модельной биологической системе желточных липопротеидов.

**Научная новизна.**

Предложен способ определения уровня окислительной модификации белков и молекул средней массы (патент на изобретение Российской Федерации № 2525437, в соавторстве).

Исследованы спонтанная и  $\text{Fe}^{2+}$ -инициированная окислительная модификация белков и уровни молекул средней массы на модельной биологической системе, в качестве которой были выбраны желточные липопротеиды. Соответствующие тесты определены в продуктах пчеловодства как веществах природного происхождения, обладающих антиоксидантным действием, и сыворотке крови экспериментальных животных (крысы).

Изучены особенности проанализированной модельной биологической системы по уровню окислительной модификации белков различного характера (в условиях спонтанного и  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированного окисления), регистрируемой по изменению концентрации карбонильных соединений, реагирующих с 2,4-динитрофенилгидразином. Выявлено, что наиболее показательна регистрация уровней ОМБ при длинах волн 430 и 530 нм, на которых отмечается образование алифатических альдегиддинитрофенилгидразонов и кетондинитрофенилгидразонов основного характера.

Установлены возможности комплексного использования изученных маркерных параметров оценки уровня спонтанной и  $\text{Fe}^{2+}$ -инициированной окислительной модификации белков, коррелирующих с уровнем молекул средней массы, на модельной биологической системе желточных липопротеидов.

#### **Практическая ценность работы.**

Работа является фрагментом научных исследований Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Пензенский государственный университет». Научно-практическим значением данной работы является повышение информативности биохимических тестов окислительной модификации белков и молекул средней массы: предложена методика исследования их в комплексе, в одной и той же пробе, апробированная на модельной биологической системе. Эта методика может быть рекомендована к практическому использованию.

**Реализация результатов исследования.** Полученные результаты внедрены с 2013 г. в учебный процесс на кафедре биохимии Пензенского государственного университета. Издано учебное пособие по медицинской биохимии (в соавторстве): «Медицинская биохимия: Учебное пособие. – Издательство Пензенского государственного университета» (2013). (Данное учебное пособие было представлено на IV Дальневосточный региональный конкурс изданий высших учебных заведений «Университетская книга – 2013» и награждено грамотой: выписка из протокола заседания жюри № 4 от 01.10.2013.)

Получен патент на изобретение Российской Федерации (№ 2525437, в соавторстве) по способу определения окислительной модификации белков в пуле веществ средней молекулярной массы.

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

$\text{Fe}^{2+}$ -инициированная окислительная модификация белков на модельной биологической системе желточных липопротеидов, продуктах пчеловодства как веществах природного происхождения, обладающие антиоксидантным действием, и сыворотке крови экспериментальных животных (крысы) наиболее показательно изменялась, по отношению к спонтанному окислению, при 430 нм и 530 нм (длинах волн, проявивших себя как маркерные).

Установлены возможности комплексного использования маркерных параметров оценки уровня спонтанной и  $\text{Fe}^{2+}$ -инициированной окислительной модификации белков, коррелирующих с уровнем молекул средней массы, на модельной биологической системе желточных липопротеидов.

Выявлены тенденции увеличения величин окислительной модификации белков, регистрируемых при 430 нм и 530 нм, и молекул средней массы при  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированном окислении, по отношению к спонтанному окислению, на модельной биологической системе желточных липопротеидов при добавлении продуктов пчеловодства как веществ природного происхождения, обладающих антиоксидантным действием, и сыворотки крови экспериментальных животных (крысы).

Показана перспективность комплексного использования модельной биологической системы желточных липопротеидов при одновременном до-

бавлении продуктов пчеловодства как веществ природного происхождения, обладающих антиоксидантным действием, и сыворотки крови экспериментальных животных (крысы) при спонтанном и  $Fe^{2+}$ -индуцированном окислении: «желточные липопротеиды + продукты пчеловодства или сыворотка крови крыс», «желточные липопротеиды + продукты пчеловодства + сыворотка крови крыс».

#### **Апробация диссертации.**

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на совещаниях кафедры биохимии Пензенского государственного университета, а также на:

- XI межвузовской биохимической научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении» (Ростов-на-Дону, 2012, 2013);
- V Беломорском симпозиуме (Архангельск, 2013);
- V ежегодной конференции «Балтийский форум. Актуальные проблемы анестезиологии и реаниматологии» (Светлогорск, 2012);
- XVII Форума «Национальные дни лабораторной медицины России –2013» (Москва, 2012, 2013);
- Девятой международной крымской конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Судак, Крым, Украина, 2012, 2013).

#### **Публикации результатов исследования.**

По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе двух на международных научно-практических конференциях, 9 статей в российских рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 111 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы.

Работа иллюстрирована 8 таблицами, 31 рисунком.

Список литературы включает 189 источников (140 отечественных, 49 зарубежных).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования.

Выбор применяемой нами модельной биологической системы оценки уровня окислительной модификации белков и молекул средней массы был обусловлен ее способностью реагировать на изменение уровня свободно-радикальных процессов.

В работе были использованы в качестве базовой модельной биологической системы желточные липопротеиды, полученные по методике Г.И. Клебанова и соавт. (1988). В соответствии с указанной методикой, желточные липопротеиды – одна из модельных систем, позволяющая оценить антиоксидантную активность исследуемых веществ и чувствительная к инициации свободно-радикальных процессов ионами  $Fe^{2+}$ .

К модельной биологической системе добавляли сыворотку крови белых беспородных крыс (самок и самцов) и продукты пчеловодства – прополис, гомогенат трутневого расплода, мед, маточное молочко (препарат «Апилак»), в виде 30 % водных растворов. Протокол приготовления растворов продуктов пчеловодства для исследования *in vitro* был стандартизирован. Растворы прополиса, гомогената трутневого расплода и препарата «Апилак» готовили по методике, аналогичной предложенной Е.А. Дубцовой (2009).

Продукты пчеловодства, по данным литературы (Ю.Л. Баймурзина, 2002; Л.Р. Ялалетдинова и соавт., 2011), обладают различной степени выраженности антиоксидантной активностью.

Считается, что по уровню белков трутневый расплод идентичен маточному молочку, но выражено отличается от него по показателям окисляемости. Трутневый расплод содержит меньшее количество ненасыщенных соединений, о чем свидетельствует показатель окисляемости, коррелирующий с меньшим количеством деценовых кислот. (Л.А. Бурмистрова, 1999.) По данным Т.В. Вахониной (1995), в личинках деценовые кислоты содержатся в основном в связанном состоянии, в виде эфиров с миристиновой, пальмитиновой, стеариновой и себациновой кислотами; их уровень в трутневом расплоде составляет около 42% от количества в маточном молочке.

Прополис может оказывать антикатаболический и антиоксидантный эффекты (Ш.М. Омаров, А.Ш. Омаров, 1995).

Н.И. Белостоцкий и соавт. (2009) отметили наличие у меда, маточного молочка и прополиса общего конечного функционального вектора воздействия на экспериментально вызванный язвенный процесс, а именно репарационного заживляющего вектора, который выражается в ускорении заживления язвенного дефекта. При этом конечный репарационный вектор является для различных исследованных продуктов результирующей различных по составу и интенсивности внутренних процессов, определяемых их функциональным воздействием на различные звенья патогенеза язвенного процесса. Для меда выделяют несколько элементов воздействия: стимуляция эндогенных антиоксидантных систем, общее анаболическое действие, стимуляция цитопротекции. Действие прополиса основано на его противовоспалитель-

ных и антиоксидантных свойствах. Маточное молочко обладает антиоксидантными свойствами и способно воздействовать на все виды метаболизма.

Продукты пчеловодства – это биологически активные вещества, содержащие белки, липиды, углеводы, витамины, минеральные вещества, энзимы, гормоны и благодаря своей высокой биологической активности способные влиять на множество функций организма (Е.А. Дубцова, 2009).

Таким образом, применение выбранной модельной биологической системы может служить основой для изучения окислительной модификации белков в комплексе с молекулами средней массы. Изучение биохимических особенностей продуктов пчеловодства по исследуемым тестам может быть перспективно в плане дальнейших разработок фармакологических препаратов и индикаторных тест-систем оценки свободно-радикальных процессов.

В соответствии с поставленной целью и задачами исследования были сформированы серии наблюдений в условиях спонтанного и  $Fe^{2+}$ -индуцированного окисления:

- I. в изучаемой модельной биологической системе (желточные липопротеиды), а также в сыворотке крови крыс, продуктах пчеловодства (прополис, гомогенат трутневого расплода, мед, маточное молочко);
- II. в модельной биологической системе с добавлением продуктов пчеловодства или сыворотки крови экспериментальных животных (крысы);
- III. в модельной биологической системе с одновременным добавлением продуктов пчеловодства и сыворотки крови экспериментальных животных (крысы).

Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях вивария на обычном рационе питания. Кровь у крыс забиралась из хвостовой вены, с соблюдением необходимых требований к проведению экспериментов.

В каждой серии наблюдений эксперименты проводили в 7 повторностях.

Схема построения серий наблюдений в модельных биологических системах (МБС) в условиях спонтанного и  $Fe^{2+}$ -индуцированного окисления показана на рисунке 1.

Изучались уровни окислительной модификации белков (ОМБ) в пуле молекул средней массы (МСМ) с помощью разработанного способа (патент на изобретение Российской Федерации № 2525437, в соавторстве).

Спецификой метода, используемого нами, является его нацеленность на увеличение информативности биохимических тестов определения МСМ и ОМБ путем исследования их в комплексе – в одной и той же пробе и снижение расхода биологического материала (рисунок 2). Т.е. одновременно в пробах производят определение уровня и МСМ, и ОМБ.

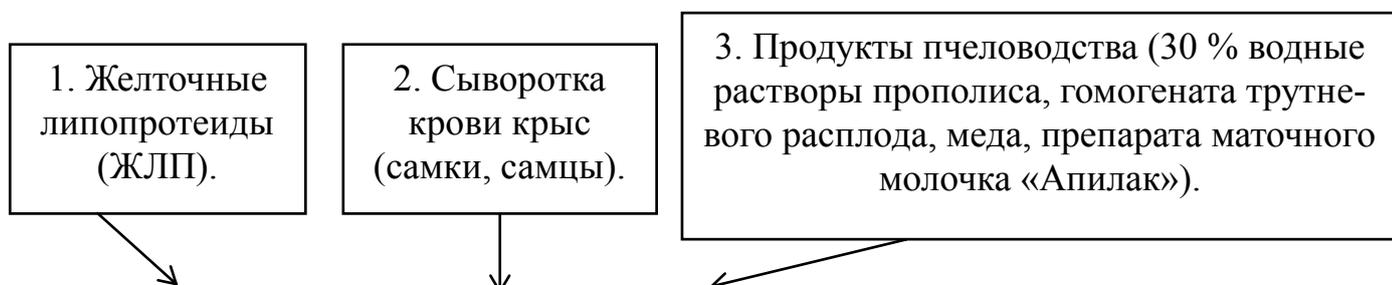


Рисунок 1. Схема построения серий наблюдений в модельных биологических системах (МБС) в условиях спонтанного и  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированного окисления.

Для проведения измерений экстинкций МСМ (при 254 нм) и ОМБ (при 356 нм, 370 нм, 430 нм, 530 нм) использовался спектрофотометр СФ-2000 (лаборатория кафедры биохимии Пензенского государственного университета).

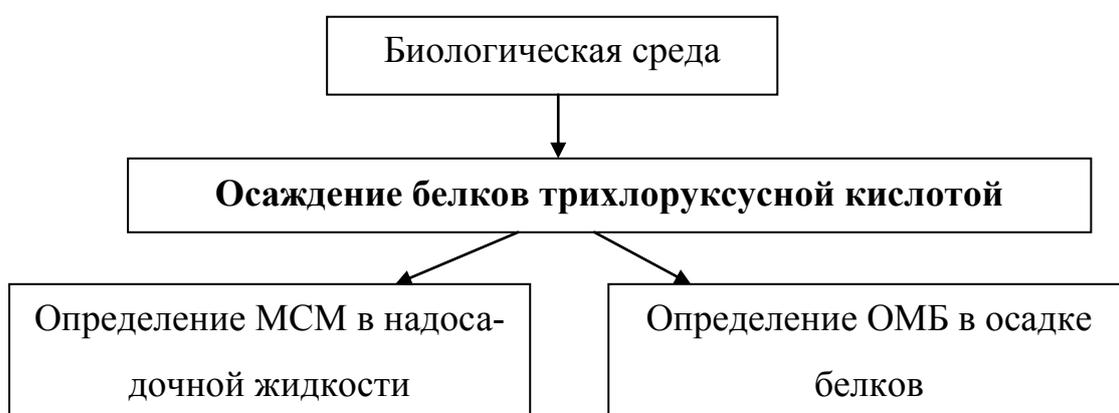


Рисунок 2. Схема метода оценки окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы.

Для обработки и интерпретации полученных результатов применены стандартные методы статистического анализа полученных данных с использованием компьютерной программы «Excel»: вариационная статистика для малых выборок с применением t-критерия Стьюдента, корреляционный анализ (С. Глянц, 1998).

### **Результаты собственных исследований.**

В нашей работе применена модельная биологическая система желточных липопротеидов, на которой исследованы уровни окислительной модификации белков и молекул средней массы по запатентованному способу (патент на изобретение Российской Федерации № 2525437, в соавторстве).

Комплексная оценка величин МСМ и уровней ОМБ при спонтанном и  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированном окислении проведена:

1) в модельной биологической системе желточных липопротеидов с добавлением и без добавления сыворотки крови крыс при спонтанном и  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированном окислении (уровень МСМ показан на рисунке 3);

2) в модельной биологической системе желточных липопротеидов с добавлением и без добавления продуктов пчеловодства (уровень МСМ показан на рисунке 4);

3) в модельной биологической системе желточных липопротеидов с добавлением и без добавления продуктов пчеловодства и сыворотки крови крыс (уровень МСМ показан на рисунке 5).

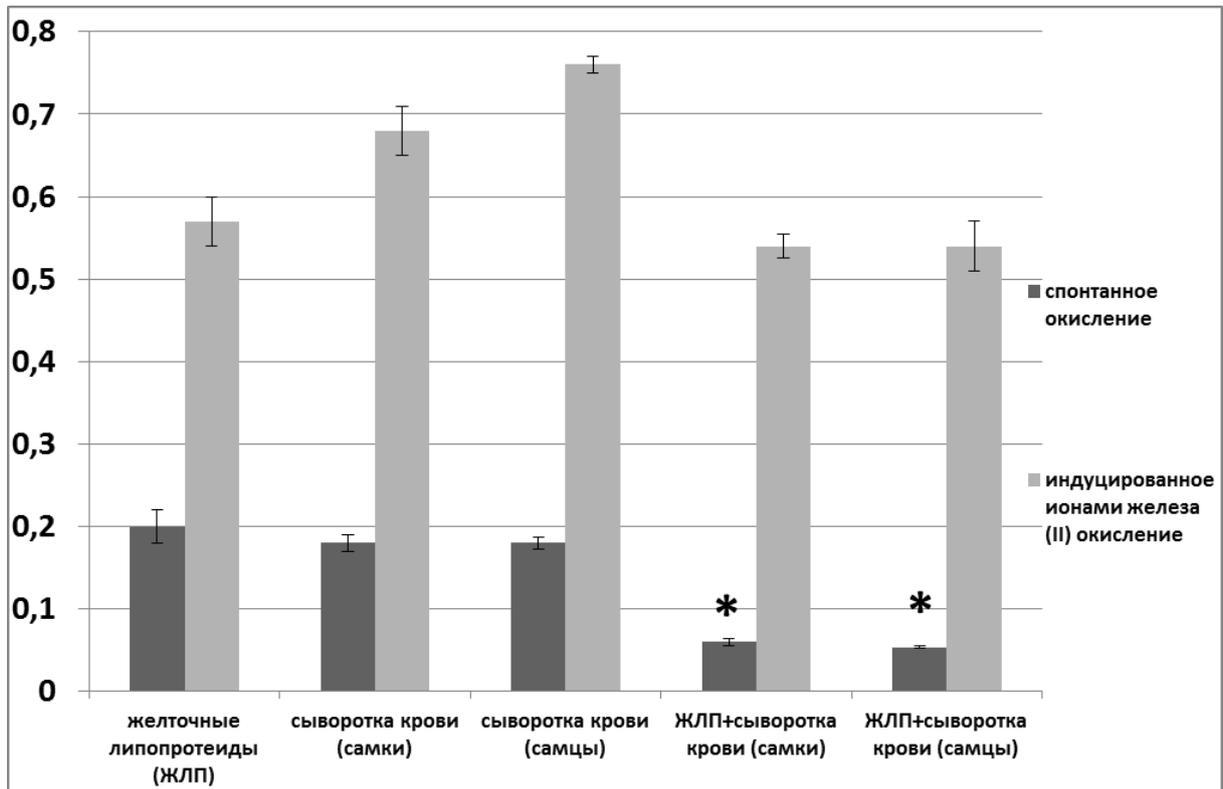


Рисунок 3. Уровни МСМ в модельной биологической системе желточных липопротеидов (ЖЛП) с добавлением и без добавления сыворотки крови крыс при спонтанном и Fe<sup>2+</sup>-индуцированном окислении (\* - p < 0,05 по отношению к желточным липопротеидам).

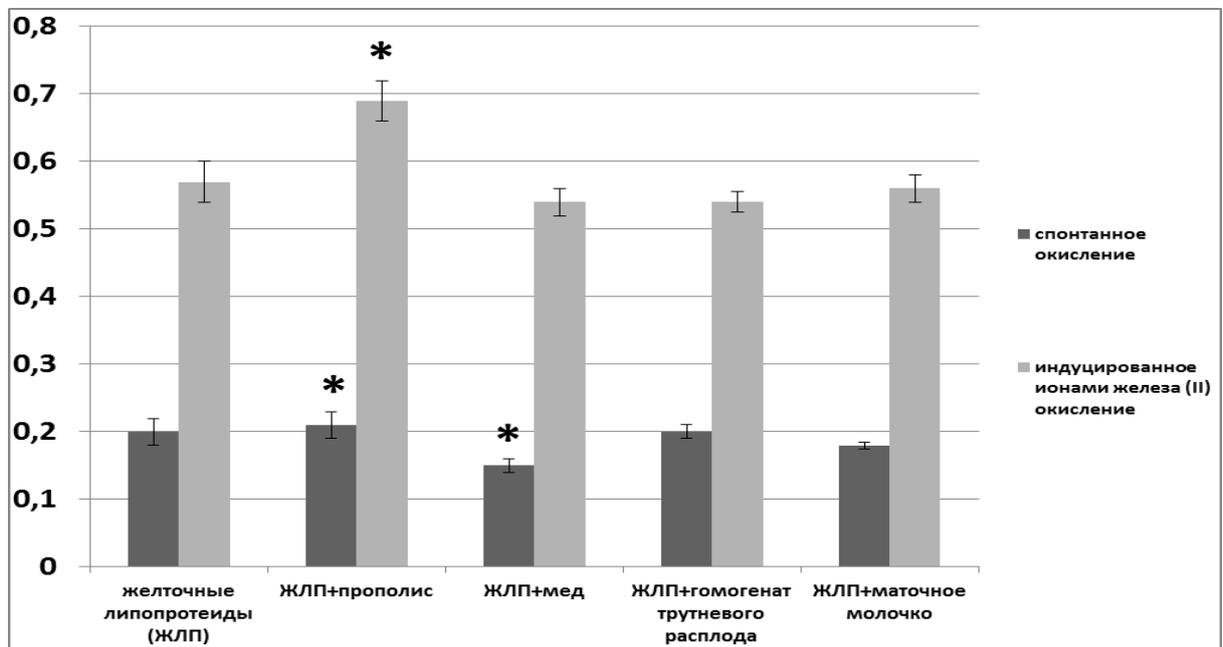


Рисунок 4. Уровни МСМ в модельной биологической системе желточных липопротеидов (ЖЛП) с добавлением и без добавления продуктов пчеловодства при спонтанном и Fe<sup>2+</sup>-индуцированном окислении (\* - p < 0,05 по отношению к желточным липопротеидам).

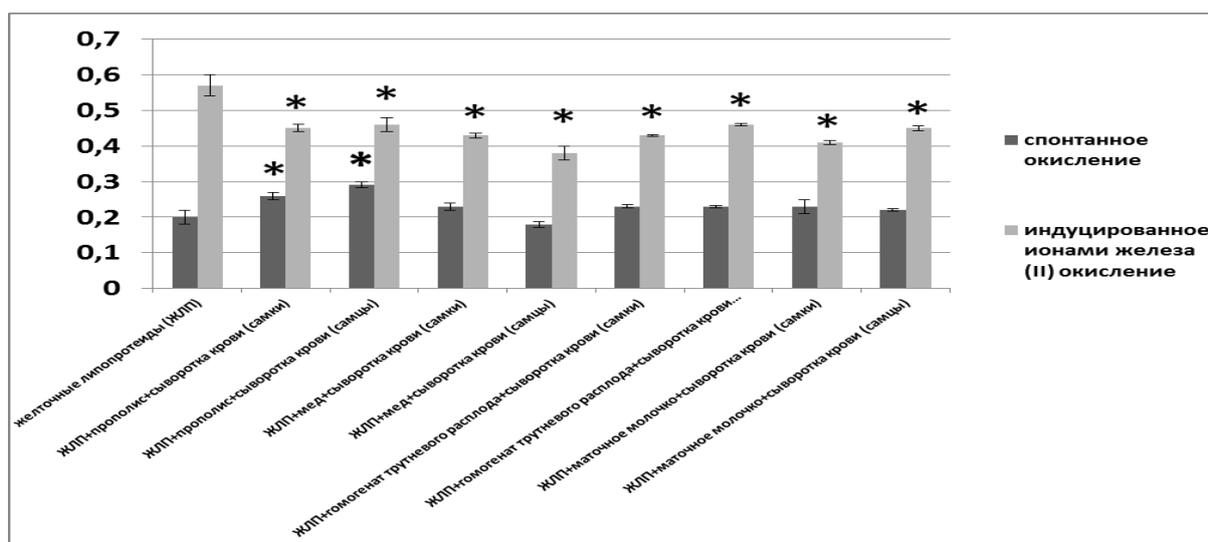


Рисунок 5. Уровни МСМ в модельной биологической системе желточных липопротейдов (ЖЛП) с добавлением и без добавления продуктов пчеловодства и сыворотки крови крыс при спонтанном и Fe<sup>2+</sup>-индуцированном окислении (\* - p<0,05 по отношению к желточным липопротейдам).

В первом и втором случаях была установлена общая тенденция увеличения уровня МСМ при Fe<sup>2+</sup>-индуцированном окислении, по сравнению со спонтанным окислением. Анализ уровней МСМ в модельной биологической системе желточных липопротейдов с добавлением продуктов пчеловодства и сыворотки крови крыс при спонтанном и Fe<sup>2+</sup>-индуцированном окислении показал аналогичные тенденции.

При использовании модельной биологической системы «желточные липопротейды + сыворотка крови» выявлено, что уровень МСМ в ней меньше, чем в сыворотке крови самок и самцов (p<0,05): при спонтанном окислении – в 3 раза и в 3,3 раза соответственно; при Fe<sup>2+</sup>-индуцированном окислении – в 1,3 раза и 1,4 раза соответственно.

Уровень ОМБ, регистрируемый при 430 нм, рассмотрен аналогично анализу величин МСМ:

1) в модельной биологической системе желточных липопротейдов с добавлением и без добавления сыворотки крови крыс при спонтанном и Fe<sup>2+</sup>-индуцированном окислении (рисунок 6);

2) в модельной биологической системе желточных липопротейдов с добавлением и без добавления продуктов пчеловодства (рисунок 7);

3) в модельной биологической системе желточных липопротейдов с добавлением и без добавления продуктов пчеловодства и сыворотки крови крыс (рисунок 8).

В первом и втором случаях была установлена общая тенденция увеличения уровня ОМБ, регистрируемой при 430 нм, в условиях Fe<sup>2+</sup>-индуцированного окисления, по сравнению со спонтанным окислением, при добавлении к желточным липопротейдам сыворотки крови или продуктов пчеловодства. Анализ уровней ОМБ, регистрируемой при 430 нм, в модель-

ной биологической системе с добавлением продуктов пчеловодства и сыворотки крови крыс при спонтанном и  $Fe^{2+}$ -индуцированном окислении (третья серия наблюдений) показал аналогичные тенденции, за исключением модельной биологической системы «желточные липопротеиды + мед + сыворотка крови (самцы)».

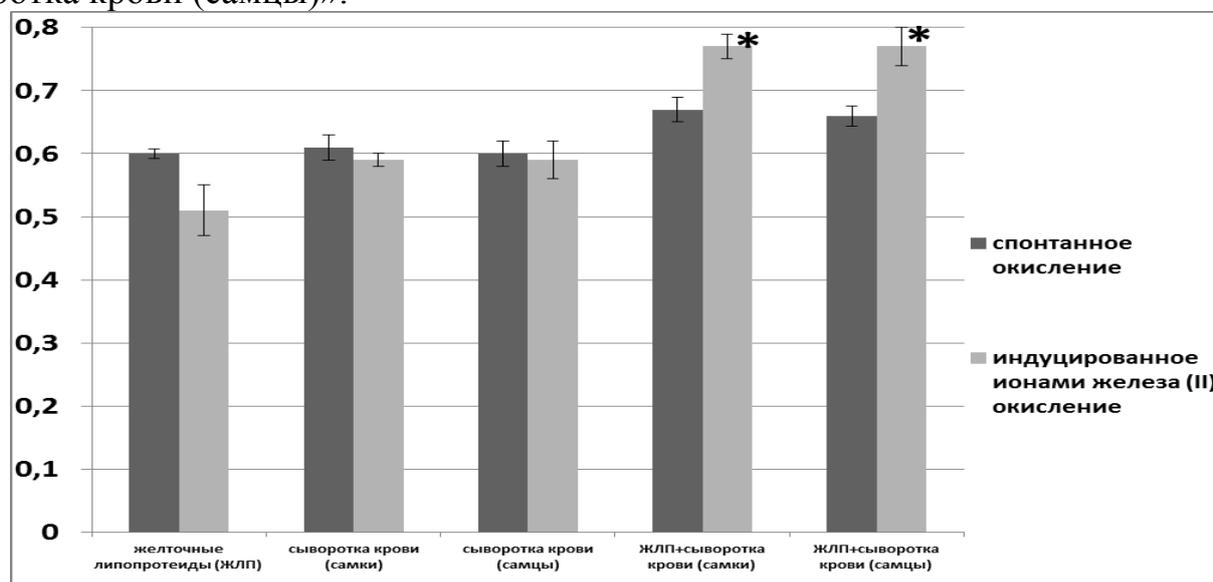


Рисунок 6. Уровни ОМБ, регистрируемые при 430 нм, в модельной биологической системе желточных липопротеидов (ЖЛП) с добавлением и без добавления сыворотки крови крыс при спонтанном и  $Fe^{2+}$ -индуцированном окислении

(\* -  $p < 0,05$  по отношению к желточным липопротеидам).

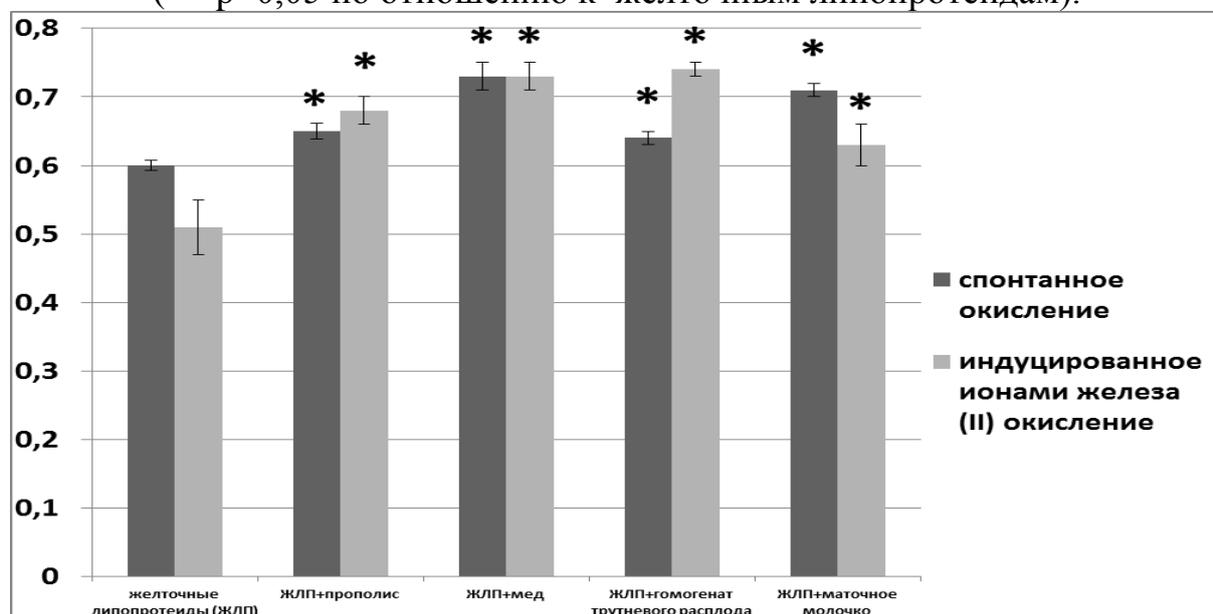


Рисунок 7. Уровни ОМБ, регистрируемые при 430 нм, в модельной биологической системе желточных липопротеидов (ЖЛП) с добавлением и без добавления продуктов пчеловодства при спонтанном и  $Fe^{2+}$ -индуцированном окислении

(\* -  $p < 0,05$  по отношению к желточным липопротеидам).

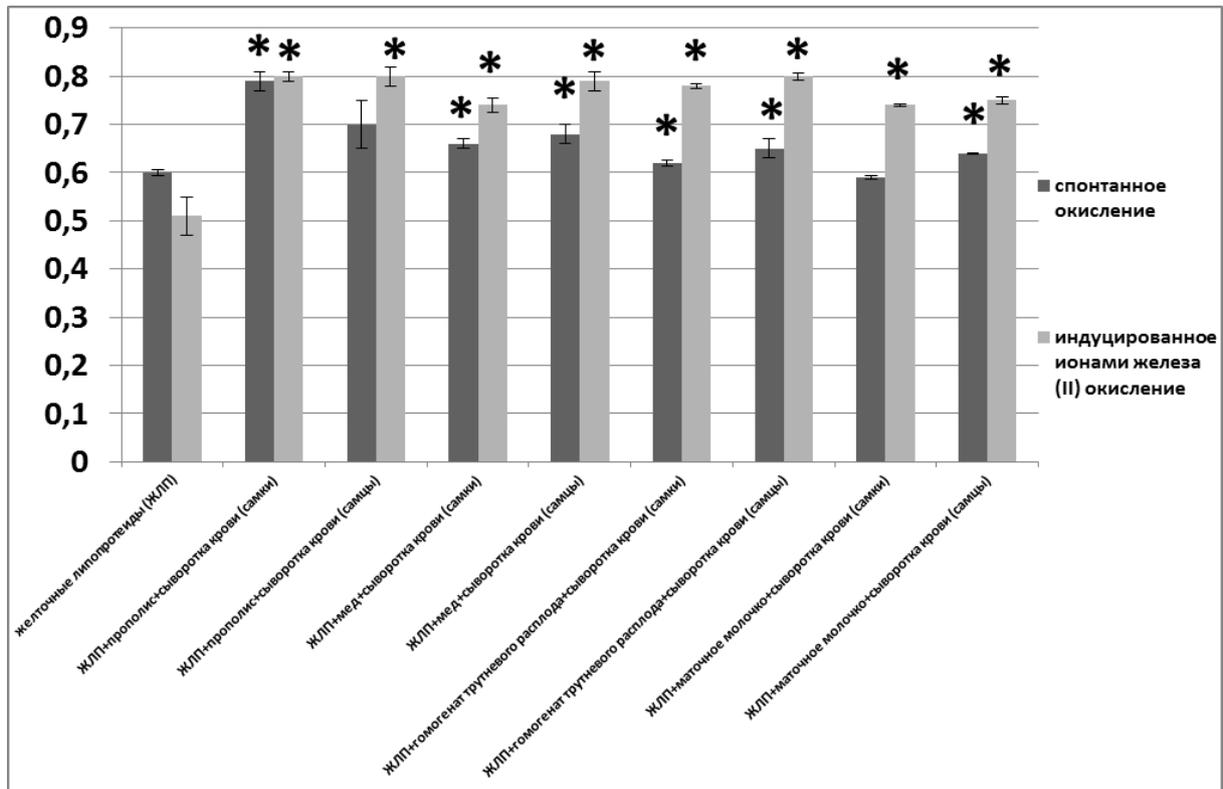


Рисунок 8. Уровни ОМБ, регистрируемые при 430 нм, в модельной биологической системе желточных липопротеидов (ЖЛП) с добавлением и без добавления продуктов пчеловодства и сыворотки крови крыс при спонтанном и  $Fe^{2+}$ -индуцированном окислении (\* -  $p < 0,05$  по отношению к желточным липопротеидам).

При использовании модельной биологической системы «желточные липопротеиды + сыворотка крови» выявлено, что уровень ОМБ, регистрируемый при 430 нм, в ней выше, чем в сыворотке крови самок и самцов: при спонтанном окислении – в 1,1 раза; при  $Fe^{2+}$ -индуцированном окислении – в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ).

Уровень ОМБ, регистрируемый при 530 нм, рассмотрен аналогично анализу значений МСМ и величин ОМБ, определяемых при 430 нм:

1) в модельной биологической системе желточных липопротеидов с добавлением и без добавления сыворотки крови крыс при спонтанном и  $Fe^{2+}$ -индуцированном окислении (рисунок 9);

2) в модельной биологической системе желточных липопротеидов с добавлением и без добавления продуктов пчеловодства (рисунок 10);

3) в модельной биологической системе желточных липопротеидов с добавлением и без добавления продуктов пчеловодства и сыворотки крови крыс (рисунок 11).

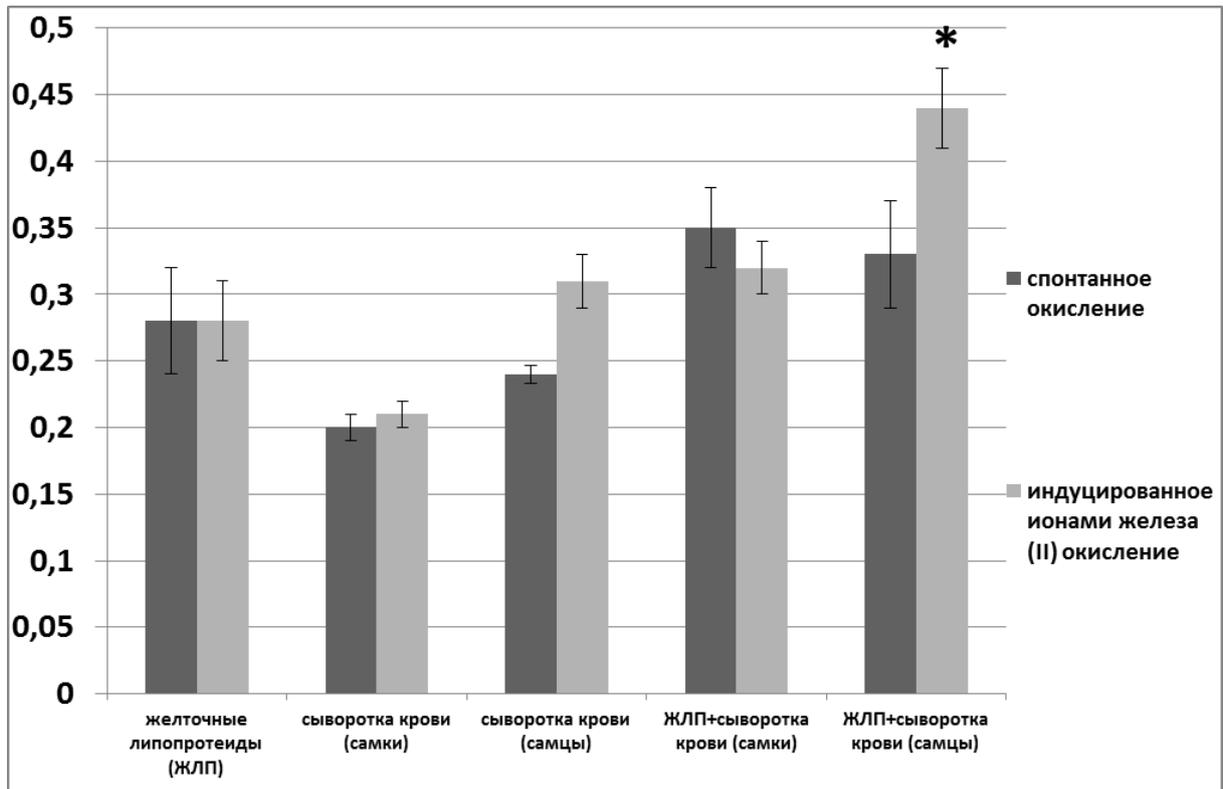


Рисунок 9. Уровни ОМБ, регистрируемые при 530 нм, в модельной биологической системе желточных липопротеидов (ЖЛП) с добавлением и без добавления сыворотки крови крыс при спонтанном и Fe<sup>2+</sup>-индуцированном окислении (\* - p<0,05 по отношению к желточным липопротеидам).

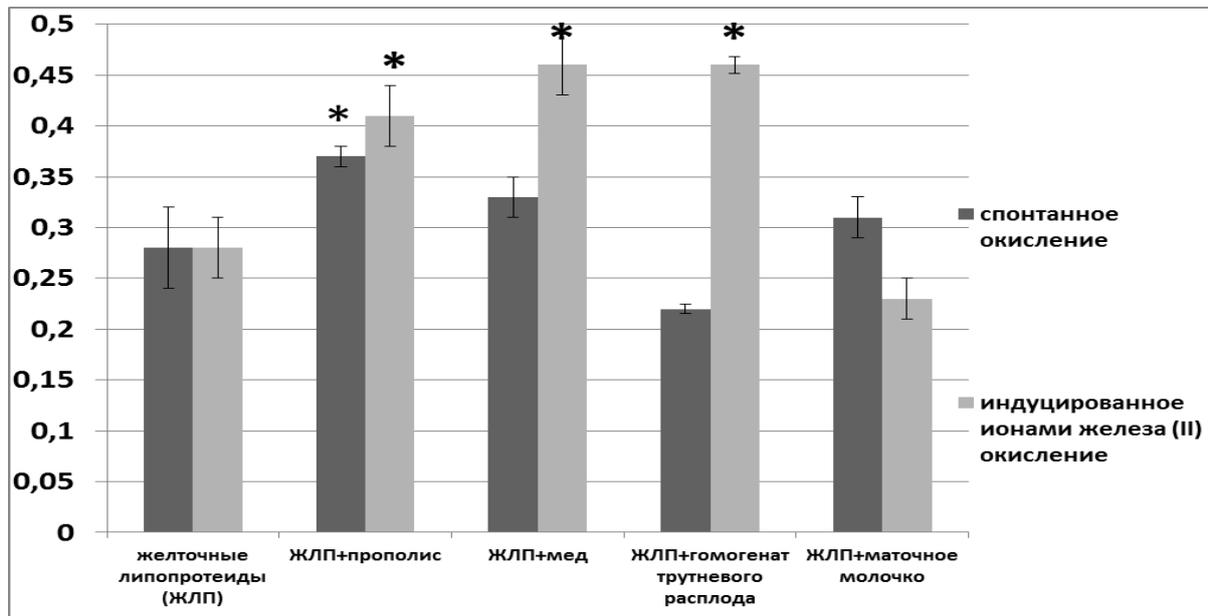


Рисунок 10. Уровни ОМБ, регистрируемые при 530 нм, в модельной биологической системе желточных липопротеидов (ЖЛП) с добавлением и без добавления продуктов пчеловодства при спонтанном и Fe<sup>2+</sup>-индуцированном окислении (\* - p<0,05 по отношению к желточным липопротеидам).

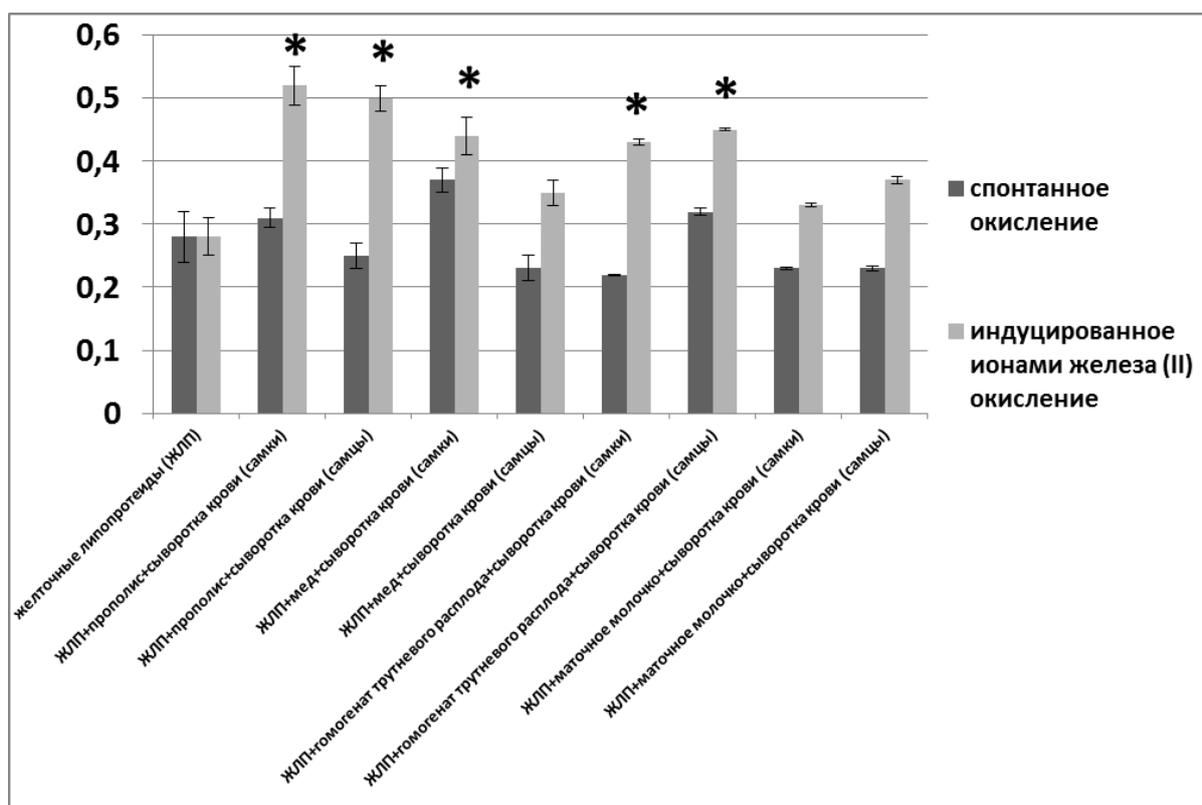


Рисунок 11. Уровни ОМБ, регистрируемые при 530 нм, в модельной биологической системе желточных липопротеидов (ЖЛП) с добавлением и без добавления продуктов пчеловодства и сыворотки крови крыс при спонтанном и  $Fe^{2+}$ -индуцированном окислении (\* -  $p < 0,05$  по отношению к желточным липопротеидам).

В первом и втором случаях была установлена общая тенденция увеличения уровня ОМБ, регистрируемой при 530 нм, в условиях  $Fe^{2+}$ -индуцированного окисления, по сравнению со спонтанным окислением, при добавлении к желточным липопротеидам сыворотки крови или продуктов пчеловодства. Исключение составила модельная биологическая система «желточные липопротеиды + маточное молочко», у которой не были обнаружены статистически значимые отличия по величине изучаемого теста от его значений в желточных липопротеидах.

Анализ уровней ОМБ, регистрируемой при 530 нм, в модельной биологической системе желточных липопротеидов с добавлением продуктов пчеловодства и сыворотки крови крыс при спонтанном и  $Fe^{2+}$ -индуцированном окислении (третья серия наблюдений) показал аналогичные тенденции.

Таким образом, изучены биохимические характеристики модельной биологической системы желточных липопротеидов путем сравнительной оценки в условиях спонтанной и  $Fe^{2+}$ -иницированной ОМБ и уровня МСМ для обоснования возможного их комплексного использования. Установлена чувствительность анализируемой модельной биологической системы к условиям  $Fe^{2+}$ -индуцированного окисления, что проявилось изменением уровней анализируемых тестов, по сравнению со спонтанным окислением.

## Выводы

1. При  $\text{Fe}^{2+}$ -инициированной окислительной модификации белков, по сравнению со спонтанным окислением, уровни молекул средней массы на модельной биологической системе желточных липопропротеидов, продуктах пчеловодства как веществах природного происхождения, обладающие антиоксидантным действием, и сыворотке крови экспериментальных животных (крысы) проявили тенденцию увеличения значений.
2. Спонтанная и  $\text{Fe}^{2+}$ -инициированная окислительная модификация белков и уровни молекул средней массы на модельной биологической системе желточных липопропротеидов при добавлении к ней продуктов пчеловодства как веществ природного происхождения, обладающих антиоксидантным действием, и сыворотки крови экспериментальных животных (крысы) показали следующие тенденции:
  - 2.1. увеличение уровня ОМБ, регистрируемой при 430 нм, в условиях  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированного окисления, по сравнению со спонтанным окислением, при добавлении к желточным липопропротеидам сыворотки крови или продуктов пчеловодства;
  - 2.2. при 530 нм – аналогично, за исключением модельной биологической системы желточных липопропротеидов с добавлением маточного молочка;
  - 2.3. при использовании модельной биологической системы желточных липопропротеидов с добавлением сыворотки крови выявлено, что уровень МСМ в ней меньше, чем в сыворотке крови самок и самцов ( $p < 0,05$ ): при спонтанном окислении – в 3 раза и в 3,3 раза соответственно; при  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированном окислении – в 1,3 раза и 1,4 раза соответственно.
3. Спонтанная и  $\text{Fe}^{2+}$ -инициированная окислительная модификация белков и уровней молекул средней массы на модельной биологической системе желточных липопропротеидов при одновременном добавлении продуктов пчеловодства как веществ природного происхождения, обладающих антиоксидантным действием, и сыворотки крови экспериментальных животных (крысы) проявили аналогичные тенденции.
4. Выявлены возможности комплексного использования маркерных параметров оценки уровня спонтанной и  $\text{Fe}^{2+}$ -инициированной окислительной модификации белков, коррелирующих с уровнем молекул средней массы, на модельной биологической системе желточных липопропротеидов.

## Практические рекомендации

1. Модельная биологическая система желточных липопропротеидов позволяет оценить уровень ОМБ в пуле МСМ при комплексном их анализе на 430 нм и 530 нм.
2. Особенности изученной модельной биологической системы по уровням ОМБ различного характера могут служить биохимическими тестами, отличающимися их реакционную способность в условиях спонтанного и  $\text{Fe}^{2+}$ -

индуцированного окисления.

3. Комплексное использование оценки уровня спонтанной и  $Fe^{2+}$ -инициированной окислительной модификации белков, коррелирующих с уровнем молекул средней массы, на модельной биологической системе желточных липопротеидов может быть информативно для характеристики величин 2,4-динитрофенилгидразонов как маркерных биохимических тестов, отличающих спонтанное и  $Fe^{2+}$ -индуцированное окисление.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации.**

1. Besruchko N.V., Vasilkov V.G., Kelina N.U., Osinkin D.V., Rubsov G.K. Program of clinical-laboratory monitoring biochemical markers of estimation from endogen intoksikation during chronicle and acute cholecystitis// Tomsk state pedagogical university bulletin. – 2011. – Vol. 8. – P. 115-118. (Журнал, реферируемый ВАК.)
2. Рубцов Г.К., Безручко Н.В., Васильков В.Г., Генгин М.Т., Кузнецова Е.А., Ганяева Н.Б., Козлова Г.А., Садовникова Д.Г., Дивеева Е.Ю., Широкина А.А., Кривченкова Е.В. Уровни каталазы, церулоплазмина, малонового диальдегида и пула молекул средней массы в оценке эндотоксикоза при холецистите// Обмен веществ при адаптации и повреждении (дни медицинской лабораторной диагностики): материалы XI региональной конференции с международным участием (г. Ростов-на-Дону, 28.02, 11-12.05 2012 г.) / Под ред. проф. З.И. Микашинович. – Ростов-на-Дону: ГБОУ ВПО РостГМУ. – 2012. – С. 44-47.
3. Келина Н.Ю., Безручко Н.В., Рубцов Г.К. Биохимические проявления эндотоксикоза: методические аспекты изучения и оценки, прогностическая значимость (аналитический обзор)// Вестник Тюменского государственного университета (серия медико-биологические науки). – 2012. – № 6. – С. 143-147. (Журнал, реферируемый ВАК.)
4. Безручко Н.В., Васильков В.Г., Рубцов Г.К., Генгин М.Т., Дивеева Е.Ю., Широкина А.А., Кривченкова Е.В. Биохимическая оценка эндотоксикоза при холецистите по соотношению уровней составляющих пула молекул средней массы в крови и моче// Известия ПГПУ им. В.Г. Белинского. Естественные науки. - 2012. - № 29. – С. 12-16. (Журнал, реферируемый ВАК.)
5. Безручко Н.В., Рубцов Г.К., Анопин К.Д., Кривченкова Е.В. Клинико-биохимические перспективы разработки неинвазивных методов оценки эндогенной интоксикации, значение показателей мочи и слюны// Технологии живых систем. – 2013. – № 1. – С. 47-52. (Журнал, реферируемый ВАК.)
6. Рубцов Г.К., Безручко Н.В., Садовникова Д.Г., Козлова Г.А., Анопин К.Д. Клинико-биохимическое значение комплексного изучения молекул средней массы и окислительной модификации белков для оценки эндотоксикоза// Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. - № 2. – С. 41-47. (Журнал, реферируемый ВАК.)

7. Безручко Н.В., Рубцов Г.К. Модельные биологические системы и метод оценки спонтанной и инициированной окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы// Технологии живых систем. – 2013. - № 5. – С. 46-50. (Журнал, реферируемый ВАК.)
8. Рубцов Г.К., Безручко Н.В., Генгин М.Т. Разработка и оптимизация модельных биологических систем для оценки уровня ОМБ в пуле МСМ// Обмен веществ при адаптации и повреждении (дни медицинской лабораторной диагностики): материалы XII межвузовской биохимической научно-практической конференции с международным участием. – Ростов-на-Дону: ГБОУ ВПО РостГМУ. – 2013. – С. 59-63.
9. Рубцов Г.К. Комплексное применение модельных биологических систем для оценки окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы// Вестник Томского государственного педагогического университета. – 2013. - № 8. – С. 81-90. (Журнал, реферируемый ВАК.)
10. Безручко Н.В., Рубцов Г.К., Генгин М.Т. Обоснование подходов комплексного использования модельных биологических систем для изучения спонтанной окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы// Сборник докладов и тезисов V Беломорского симпозиума. – Архангельск: СГМУ, 2013. – С. 86-87.
11. Рубцов Г.К., Безручко Н.В., Генгин М.Т., Васильков В.Г., Борисова Е.Ю., Анопин К.Д., Васильева А.Д., Садовникова Д.Г., Козлова Г.А., Кручинина А.Д., Гамзин С.С. Методика анализа окислительной модификации белков в пуле веществ средней молекулярной массы// Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. - № 9. – С. 93. (Журнал, реферируемый ВАК.)
12. Рубцов Г.К., Безручко Н.В., Генгин М.Т. Методологическое обоснование комплекса модельных биологических систем оценки окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы// Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии: материалы восьмой международной крымской конференции. – Судак, Крым, Украина: ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ. – 2013. – С. 60.
13. Рубцов Г.К., Безручко Н.В. Модельная биологическая система желточных липопротеидов: параметры инициированной окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы// Вестник Тверского государственного университета. Серия «Биология и экология». – 2014. – Вып. 2 . – С. 30-37. (Журнал, реферируемый ВАК.)
14. Рубцов Г.К., Безручко Н.В., Генгин М.Т., Васильков В.Г., Борисова Е.Ю., Анопин К.Д., Васильева А.Д., Садовникова Д.Г., Козлова Г.А., Кручинина А.Д., Гамзин С.С. Применение анализа окислительной модификации белков в пуле веществ средней молекулярной массы в клинко-биохимической оценке эндотоксикоза при холецистите// Эфферентная терапия. – 2014. – Т. 20, № 1. Специальный выпуск – материалы V Балтийского форума «Актуальные проблемы анестезиологии и реаниматологии». – С. 25. (Журнал, реферируемый ВАК.)

15. Безручко Н.В., Рубцов Г.К. Методология и метод оценки окислительной модификации белков в комплексе с молекулами средней массы, перспективы их применения// Вестник Томского государственного педагогического университета. – 2014. – № 8. – С. 185-189. (Журнал, реферируемый ВАК.)

#### **Учебное пособие**

Безручко Н.В., Рубцов Г.К., Борисова Е.Ю. Медицинская биохимия: Учебный комплекс. – Пенза: Изд-во ПГУ, 2013. – 76 с. (Данное учебное пособие было представлено на IV Дальневосточный региональный конкурс изданий высших учебных заведений «Университетская книга – 2013» и награждено грамотой: выписка из протокола заседания жюри № 4 от 01.10.2013.)

#### **Патент на изобретение**

Рубцов Г.К., Безручко Н.В., Генгин М.Т., Васильков В.Г., Борисова Е.Ю., Анопин К.Д., Васильева А.Д., Садовникова Д.Г., Козлова Г.А., Кручинина А.Д., Гамзин С.С. Способ определения окислительной модификации белков в пуле веществ средней молекулярной массы в сыворотке крови, плазме, эритроцитах и в моче. – Патент на изобретение № 2525437. Заявка на патент на изобретение Российской Федерации № 2012153044, приоритет от 7.12.2012, решение о выдаче патента от 14.04.2014, заявитель - Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пензенский государственный университет».