

УДК 61:577.1

Г. К. Рубцов, Н. В. Безручко, С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин, С. С. Гамзин

РАЗРАБОТКА МОДЕЛЬНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА ПРИ ПОДПЕЧЕНОЧНОМ ХОЛЕСТАЗЕ (В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VITRO)

На основе литературных данных рассматривается подпеченочный холестаз – один из видов нарушений оттока желчи из печени (холестаз), достаточно распространенный в клинической практике. Актуальна проблема оценки его степени на основе диагностических комплексов маркерных показателей метаболического статуса организма (статических и динамических), в числе которых одними из ведущих могут быть антиоксидантная активность и уровень окислительной модификации белков, в комплексе с молекулами средней массы – универсальным тестом выраженности эндотоксикоза. Для экспериментальных исследований такого плана (in vitro) целесообразна разработка модельных биологических систем, что позволит протестировать чувствительность изучаемых метаболических тестов к различной степени выраженности подпеченочного холестаза и в перспективе – создать на их основе соответствующие диагностические комплексы.

Ключевые слова: подпеченочный холестаз, модельные биологические системы, окислительная модификация белков, молекулы средней массы.

Образование желчи – жизненно важная функция организма, ее нарушение ведет к синдрому холестаза. Синдром холестаза отмечается при различных состояниях, которые можно объединить в следующие группы: 1) нарушение образования желчи (вирусные, алкогольные, лекарственные и токсические поражения печени, холестаз беременных, цирроз, бактериальные инфекции); 2) нарушение тока желчи (первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, туберкулез, реакция отторжения трансплантата) [1].

Проблема разработки комплексного подхода к сохранению здоровья человека и профилактики холестаза, в том числе подпеченочного, – одного из ведущих синдромов при патологии гепатобилиарной системы – лежит в области экологии человека. Это одна из ключевых проблем современной фундаментальной медико-биологической науки, междисциплинарного характера, социально значимая вследствие широкой распространенности заболеваний желчевыводящих путей, в первую очередь среди работоспособного населения, а также в связи со снижением возрастной категории заболевающих данной патологией.

Для комплексного решения рассматриваемой научной проблемы необходимо апробирование маркерных тестов антиоксидантной активности и уровня окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы в условиях подпеченочного холестаза на модельных биологических системах (спонтанное и инициированное (Fe^{2+} -индуцируемое) окисление). Маркерные тесты, весьма чувствительные к тяжести заболевания, могут послужить основой диагностических комплексов холестаза (например, подпеченочного), позволяющих выявлять его на самых ранних стадиях формирования и развития, как однократно, так и в мониторинге. Это будет способствовать реализации профилактических мер по предотвращению заболева-

мости гепатобилиарной системы и в целом снижению потерь от социально значимой патологии.

Подпеченочный холестаз – один из видов нарушений оттока желчи из печени (холестаза), достаточно распространенный в клинической практике. Он может быть смоделирован в эксперименте, причем данная модель патологии гепатобилиарной системы ранее была обоснована и клинически, и экспериментально [2, 3].

Однако остается актуальной проблема оценки степени подпеченочного холестаза с помощью диагностических комплексов маркерных показателей метаболического статуса организма, проявляющих характерные нарушения динамики при данном состоянии (как статических (контекстных), так и динамических). В числе таких маркеров ведущими параметрами могут быть антиоксидантная активность и уровень окислительной модификации белков, который целесообразно оценивать в пуле молекул средней массы как универсального теста выраженности эндотоксикоза. Для экспериментальных исследований такого плана (in vitro) целесообразна разработка информативных модельных биологических систем, которые позволяли бы протестировать чувствительность изучаемых метаболических тестов к различной степени выраженности подпеченочного холестаза и в перспективе – создать на их основе соответствующие диагностические комплексы.

Цель работы – методологическое обоснование применения модельных биологических систем (in vitro) для оценки степени подпеченочного холестаза на основе мониторинга антиоксидантной активности и уровня окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы.

В настоящее время накоплены многочисленные данные, касающиеся изучения механизмов пероксидного окисления липидов, его роли в нормальном функционировании клеток, в патогенезе раз-

личных заболеваний. Однако активные формы кислорода могут вызывать окислительную деструкцию не только липидов, но и белков. Белки являются не только мишенью окислительного воздействия в клетках, но могут выступать и как катализаторы окислительного повреждения. Считается, что окислительная модификация белков играет ключевую роль в молекулярных механизмах окислительного стресса и может являться пусковым механизмом окислительной деструкции других молекул (липиды, ДНК) клетки [4].

Модельные биологические системы (*in vitro*) для оценки степени подпеченочного холестаза на основе мониторинга антиоксидантной активности и уровня окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы отсутствуют. Известны фундаментальные разработки модельных биологических систем (*in vitro*) для оценки уровня окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы, но они не адаптированы для оценки степени подпеченочного холестаза. Не рассмотрены в совокупности изменения антиоксидантной активности и уровня окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы в данных модельных биологических системах. Метод изучения окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы также характеризуется новизной, что подтверждается наличием патента на изобретение Российской Федерации – «Способ определения окислительной модификации белков в пуле веществ средней молекулярной массы в сыворотке крови, плазме, эритроцитах и в моче» [5].

Использование экспериментальной модели подпеченочного холестаза позволит апробировать модельные биологические системы (*in vitro*) для оценки его степени на основе мониторинга антиоксидантной активности и уровня окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы. На этой основе возможно также подтверждение информативности и прогностической значимости изучаемых маркерных тестов метаболических нарушений для оценки проявлений подпеченочного холестаза.

Экспериментальные модельные биологические системы *in vitro* для оценки уровня окислительных процессов и возможных проявлений окислительного стресса, а также прооксидантного или антиоксидантного действия вводимых в них веществ позволяют выделить и обосновать критерии различной степени выраженности свободнорадикальной патологии [6, 7].

Одними из ранних и надежных индикаторов поражения тканей при свободнорадикальной патологии считаются параметры окислительной модификации белков [8, 9].

Свободнорадикальное окисление белков имеет важное значение для организма, принимает участие в различных патофизиологических процессах. Методы их оценки различны. Наиболее распространена реакция с 2,4-динитрофенилгидразином. Динитрофенилгидразиновый тест является наиболее чувствительным в отношении карбонильных групп. Установлено, что пептиды плазмы, происходящие из окисленных белков, содержат большое количество кетонных групп [10].

С позиций клинической биохимии значимо исследование окислительной модификации белков в комплексе с уровнем веществ средней молекулярной массы, так как данные биохимические тесты – маркеры выраженности эндотоксикоза, чувствительные к изменению степени окислительного стресса. В комплексе его клинико-биохимических проявлений нарушения динамики этих тестов могут служить маркерными параметрами [11–16]. С этих позиций необходимо исследование данных параметров (МСМ и ОМБ) в комплексе, в одной пробе биологической среды. Актуально применение для этого модельных биологических систем при спонтанной и инициированной ОМБ, на которых может быть апробирован метод оценки ОМБ в пуле МСМ.

Выбор применяемых ранее модельных биологических систем оценки уровня окислительной модификации белков в пуле веществ средней молекулярной массы был обусловлен их способностью реагировать на изменение уровня свободнорадикальных процессов. Уровни ОМБ в пуле МСМ изучались с помощью разработанного способа определения окислительной модификации белков в пуле веществ средней молекулярной массы [5].

В основе определения продуктов ОМБ – оценка уровня карбонильных соединений, реагирующих с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов основного и нейтрального характера в условиях спонтанного и/или металлкатализируемого окисления [17]. В результате реакции окисления белков могут образовываться альдегидные и кетонные группировки аминокислотных остатков, которые и взаимодействуют с 2,4-динитрофенилгидразином [14].

Регистрация уровней ОМБ на четырех длинах волн позволяет выявлять уровень ОМБ различного характера: при 356 нм – алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны нейтрального характера, при 370 нм – алифатические кетондинитрофенилгидразоны нейтрального характера, при 430 и 530 – алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны и кетондинитрофенилгидразоны основного характера [17].

В наших предыдущих исследованиях проведены следующие основные серии наблюдений для

оценки окислительной модификации белков и величин молекул средней массы [18, 19]: изучение исходных параметров анализируемых тестов в желточных липопротеидах, сыворотке крови экспериментальных животных (крыс), продуктах пчеловодства (прополисе, гомогенате трутневого расплода, меде, маточном молочке); определение изменений изучаемых тестов в модельной биологической системе «желточные липопротеиды», получаемой по методике Г. И. Клебанова и соавт. [20], при введении сыворотки крови и (или) продуктов пчеловодства.

Протокол приготовления растворов продуктов пчеловодства для исследования *in vitro* был стандартизирован. Растворы прополиса, гомогената трутневого расплода и маточного молочка (препарат «Апилак») готовили по методике, аналогичной предложенной Е. А. Дубцовой [21].

С позиций биохимического обоснования влияния продуктов пчеловодства на процессы ОМБ в пуле МСМ модельная биологическая система «желточные липопротеиды» и сыворотка крови могут выступать в качестве средства сравнения. Применение модельных биологических систем, содержащих продукты пчеловодства и предусматривающих инкубацию в присутствии крови, позволяет выявить степень их влияния на уровень окислительных процессов, в том числе окислительной модификации белков.

Проведено исследование окисляемости белков плазмы и сыворотки крови здоровых доноров при их медь-индуцированном окислении. Показано, что в образцах плазмы и сыворотки крови при их инкубации с ионами меди происходит накопление карбонильных продуктов окислительной модификации белков. Количество образующихся карбонильных зависело как от времени инкубации, так и от разведения плазмы и сыворотки крови. При одинаковых условиях окисления накопление карбонильных продуктов в сыворотке крови было выше, чем в плазме [22].

Считается, что комплексы окисленных липидов и белков способны защищать липиды и белки от окислительной деградации за счет активных форм кислорода, в том числе генерируемых в системах, содержащих металлы переменной валентности – железо, медь. Предполагают, что на начальных стадиях окислительного стресса окисленные липиды способны реагировать с реактивными группировками белков, образуя соответствующие комплексы, которые проявляют антиоксидантные свойства по отношению к процессам пероксидации липидов и окислительной деструкции белков [8].

Продукты пчеловодства обладают антиоксидантными свойствами и могут быть использованы для

коррекции нарушений процессов свободнорадикального окисления при патологических состояниях [23–26].

Каждую серию наблюдений провели в условиях спонтанной и металлдуцируемой ОМБ, что позволило характеризовать соотношение этих процессов в исследуемых модельных биологических системах. Необходимость изучения как спонтанной, так и индуцируемой ионами металлов ОМБ обусловлена также тем, что это дает возможность определить чувствительность данной модельной биологической системы к изменению условий процессов свободнорадикального окисления. В нашей работе изучалась Fe^{2+} -индуцированная ОМБ в соответствии с методикой Г. И. Клебанова и соавт. [20].

Известно, что при заболеваниях печени в гепатоцитах накапливаются ионы металлов переменной валентности. Характерной особенностью холестаза является накопление в гепатоцитах ионов металлов переменной валентности, которые могут инициировать свободнорадикальные процессы, в конечном итоге приводящие к окислительному повреждению белков. Увеличение содержания железа наблюдается, например, при алкогольном холестазе. Свободное железо или его хелаты вовлечены в свободнорадикальные реакции на различных уровнях [27].

Показано, что на фоне алкоголь-зависимого повышения окислительного стресса подвергаются карбонилированию и инактивации вирусные белки, которые выступают в роли дополнительных индукторов свободнорадикального окисления в клетке. У больных с типичным алкогольным делирием с сопутствующим вирусным гепатитом С по сравнению с больными гепатитом С без алкогольной зависимости, а также по сравнению с больными с типичным алкогольным делирием наблюдается снижение уровня окислительной модификации белков, что сопряжено с повышением уровня церулоплазмينا по сравнению с больными с типичным алкогольным делирием без сопутствующего вирусного гепатита С [28].

Метод определения карбонильных групп белков по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином может быть использован для анализа окислительной модификации в белках липопротеидов [9].

Согласно С. В. Низкодубовой и соавт. [29], глубокие исследования физико-химических свойств природного биологического сырья показали наличие органических биологически активных соединений именно в их липидорастворимой фракции.

Изученные нами биохимические характеристики возможных модельных биологических систем путем сравнительной оценки в условиях спонтанной и инициированной ОМБ в пуле МСМ для обоснования возможного их комплексного использо-

вания показали чувствительность к условиям Fe^{2+} -индуцированного окисления, что проявилось изменением уровней анализируемых тестов, по сравнению со спонтанным окислением [18, 19].

Вместе с тем модельные биологические системы для изучения окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы при холестазах (в том числе подпеченочном) для оценки степени его выраженности не разработаны.

Итак, основными направлениями разработки и развития проанализированной научной проблемы могут служить следующие направления исследований:

1. Обоснование системы мониторинга антиоксидантной активности крови и уровня окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы в ней в условиях экспериментального подпеченочного холестаза, что увеличит информатив-

ность и экспрессность оценки тяжести подпеченочного холестаза.

2. Характеристика модельных биологических систем, чувствительных к различным степеням подпеченочного холестаза на основе тестов антиоксидантной активности и уровня окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы в ней, что позволит протестировать и подтвердить прогностическую ценность этих параметров для ранней оценки проявлений холестаза однократно или в мониторинге холестаза.

3. Сопоставление изменений антиоксидантной активности и окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы при подпеченочном холестазах в условиях спонтанного и инициированного (Fe^{2+} -индуцируемого) окисления на предложенных модельных биологических системах, разработка информативных критериев их подбора.

Список литературы

1. Кушнарева Н. С. Регуляция экскреторной функции печени крысы при холестазах: роль пролактина: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2009. 25 с.
2. Емельянчик С. В., Зиматкин С. М. Мозг при холестазах: монография. Гродно: ГрГУ, 2011. 265 с.
3. Емельянчик С. В., Зиматкин С. М. Мозг при отведении желчи: монография. Гродно: ГрГУ, 2012. 303 с.
4. Методические положения по изучению процессов свободнорадикального окисления и системы антиоксидантной защиты организма. Методические положения разработаны ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии» (Рецкий М. И., Шабунин С. В., Близнацова Г. Н., Рогачева Т. Е., Ермолова Т. Г., Фоменко О. Ю., Братченко Э. В., Дубовцев В. Ю.), ФГОУ ВПО «Воронежский государственный университет» (Н. Н. Каверин), Николаевский государственный университет им. В. А. Сухолинского (О. И. Цебржинский). Воронеж. 2010. 70 с.
5. 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».
6. Меньщикова Е. Б. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Фирма «Слово», 2006. 556 с.
7. Меньщикова Е. Б. и др. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с. (Проект РФФИ № 07–04–07021.)
8. Дубинина Е. Е., Пустыгина А. В. Свободнорадикальные процессы при старении, нейродегенеративных заболеваниях и других патологических состояниях // Биомедицинская химия. 2007. Том 53. Вып. 4. С. 351–372.
9. Фролова М. Ю. Возможности метода определения карбонильных групп белков сыворотки крови для оценки состояния «окислительного стресса» в клинической практике: автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2003. 25 с.
10. Боев К. В., Василенко Д. В., Маслов А. И. Свободнорадикальное окисление белков: методологические аспекты количественной оценки окислительной модификации по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином // Химия и биология: электронный научный журнал. 2014. № 1 (2). URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/search-2/item/839>.
11. Белоногов Р. Н., Титова Н. М., Дыхно Ю. А., Лапешин П. В., Кудряшова Е. В., Савченко А. А. Окислительная модификация белков и липидов плазмы крови больных раком легкого // Сибирский онкологический журнал. 2009. № 4. С. 48–51.
12. Белоногов Р. Н., Титова Н. М., Лапешин П. В., Иванова Ю. Р., Шевцова А. О., Покровский А. А. Изменение содержания продуктов окислительной модификации белков и липидов в опухолевой ткани на разных стадиях рака легкого // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. № 5. С. 562–563.
13. Белоногов Р. Н., Титова Н. М., Дыхно Ю. А. Окислительная модификация белков и липидов плазмы крови при различных гистологических типах рака легкого // Сибирское медицинское обозрение. 2009. № 5. С. 42–45.
14. Копытова Т. В., Дмитриева О. Н., Химкина Л. И., Пантелеева Г. А. Окислительная модификация белков и олигопептидов у больных хроническими дерматозами с синдромом эндогенной интоксикации // Фундаментальные исследования. 2009. № 6. С. 25–29.
15. 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.

16. Халдун О., Лакал А., Бекшоков К. С., Кличханов Н. К. Окислительная модификация белков плазмы крови ожоговых больных // Вестник Дагестанского гос. ун-та. 2012. № 1. С. 128–132.
17. Дубинина Е. Е., Бурмистров С. О., Ходов Д. А., Поротов И. Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопросы медицинской химии. 1995. № 1. С. 24–26.
18. 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.
19. 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 межвуз. биохим. науч.-практ. конф. с междунар. участием. Ростов-на-Дону: ГБОУ ВПО РостГМУ. 2013. С. 59–63.
20. Клебанов Г. И., Бабенкова И. В., Теселкин Ю. О., Комаров О. С., Владимиров Ю. А. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопропротеидов // Лабораторное дело. 1988. № 5. С. 59–62.
21. Дубцова Е. А. Клинико-экспериментальное обоснование применения продуктов пчеловодства в комплексной терапии некоторых заболеваний органов пищеварения: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Москва, 2009. 38 с.
22. Азизова О. А., Пирязев А. П., Москвина С. Н., Асейчев А. В. Метод определения окисляемости белков сыворотки и плазмы крови // Биомедицинская химия. 2007. Том 53, вып. 1. С. 99–106.
23. Kancheva V. D., Bankova V. S. Chain-breaking antioxidant of two new chalcones from propolis of el Salvador in homogeneous and micellar media // Bulgarian Chemical Communications. 2008. Vol. 40. № 4. P. 546–555.
24. Herken E. N., Erel O., Guzel S., Celik H., Ibanoglu S. Total antioxidant, phenolic compounds, and total oxidant status of certified and uncertified turkey's honeys // International Journal of Food Properties. 2009. Vol. 12. № 3. P. 461–468.
25. Dobre I., Gadei G., Patrascu L., Elisei A. M., Segal R. The antioxidant activity of selected Romanian honeys // Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI: Food Technology. 2010. Vol. 34. № 2. P. 67–73.
26. Abu-Mellal A., Koolaji N., Tran V. H., Duke C. C., Duke R. K. Prenylated cinnamate and stilbenes from kangaroo island propolis and their antioxidant activity // Phytochemistry. 2012. Vol. 77. P. 251–259.
27. Кузнецова Е. И., Семак И. В. Влияние мелатонина на окислительную модификацию белков при экспериментальном холестазае // Труды БГУ. 2010. Том 5, часть 1. С. 127–134.
28. Бабин К. А. Особенности обмена биогенных аминов и свободнорадикального окисления при алкогольном делирии с сопутствующим вирусным гепатитом С: дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 2014. 135 с.
29. Низкодубова С. В., Ласукова Т. В., Легостин С. А. Применение липидов сапропеля для коррекции метаболизма печени крыс при токсико-химическом гепатите // Вестн. Томского гос. пед. ун-та (TSPU Bulletin). 2013. Вып. 8. С. 94–99.

Безручко Н. В., профессор кафедры.

Пензенский государственный университет.

Ул. Красная, 40, Пенза, Россия, 440026.

E-mail: bnv1976@rambler.ru

Рубцов Г. К., ассистент кафедры.

Пензенский государственный университет.

Ул. Красная, 40, Пенза, Россия, 440026.

E-mail: rubczoff.georgij@yandex.ru

Емельянчик С. В., кандидат медицинских наук, доцент, зав. кафедрой.

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы.

Ул. Ожешко, 22, Гродно, Беларусь, 230023.

E-mail: semel@grsu.by

Зиматкин С. М., доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой.

Гродненский государственный медицинский университет.

Ул. Горького, 80, Гродно, Беларусь, 230009.

E-mail: smzimatkin@mail.ru

Гамзин С. С., ассистент кафедры общей биологии и биохимии.

Пензенский государственный университет.

Ул. Красная, 40, Пенза, Россия, 440026.

E-mail: s. s.gamzin@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 06.11.2014.

G. K. Rubtsov, N. V. Bezruchko, S. V. Yemelyanchik, S. M. Zimatkin, S. S. Gamzin

DEVELOPMENT MODEL OF BIOLOGICAL SYSTEMS TO ASSESS THE SEVERITY OF ORGANISM CONDITION AT AML-HEPATIC CHOLESTASIS (IN EXPERIMENT IN VITRO)

The article is devoted to the obstructive cholestasis – a type of violation of the outflow of bile from the liver (cholestasis), which is quite common in the clinical practice. An urgent problem is that of evaluation of its degree on the basis of diagnostic systems of marker indicators of metabolic status of the organism (static and dynamic), one of the leading may be the antioxidant activity and the level of oxidative modification of proteins, in combination with the average mass of the molecules – a universal test of the severity of endotoxemia. For such experimental studies (in vitro) it is suitable to develop model biological systems, which will allow to test the sensitivity of the studied metabolic tests to varying degrees of severity of subhepatic cholestasis and in the future – to create diagnostic systems on their basis.

Key words: *obstructive cholestasis, modeling biological systems, oxidative modification of proteins, the molecules of average weight.*

References

1. Kushnareva N. S. *Regulyatsiya ekskretornoy funktsii pecheni krysy pri holestaze*. Avtoref. dis. kand. biol. nauk. [Regulation of excretory function of rat liver in cholestasis: the role of prolactin: Abstract of thesis cand. of biol. sci.]. Moscow, 2009, 25 p. (in Russian).
2. Emel'yanchik S. V., Zimatkin S. M. *Mozg pri holestaze* [Brain in cholestasis]: a monograph. Grodno: GRGU Publ., 2011. 265 p. (in Belarussian).
3. Emel'yanchik S. V., Zimatkin S. M. *Mozg pri otvedenii zhelchi* [Brain in abduction of bile: a monograph]. Grodno: GRGU Publ, 2012. 303 p. (in Belarussian).
4. *Metodicheskie polozheniya po izucheniyu processov svobodnoradikal'nogo okisleniya i sistemy antioksidantnoy zashchity organizma* [Methodical positions on the study of free radical oxidation and antioxidant defense system of the body]. Guidelines developed in Proposition All-Russia Research Institute veterinar-stationary-Pathology, Pharmacology and Therapeutics (Retsky M. I., Shabunin S. V., Bliznetsova G. N., Rogachev T. E., Ermolova T. G., Fomenko O. J., Bratchenko E. V., Dubovtsev V. Y.), FSEIHPE Voronezh State University (Kaverin N. N.), Mykolayiv State University V. A. Sukhomlinsky (Tsebrzhinsky O. I.). Voronezh, 2010, 70 p. (in Russian).
5. Rubtsov G. K., Bezruchko N. V., Gengin M. T., Vasil'kov V. G., Borisova E. Yu., Anopin K. D., Vasilieva A. D., Sadovnikova D. G., Kozlova G. A., Kruchinina A. D., Gamzin S. S. *Sposob opredeleniya oksilitel'noy modifikatsii belkov v pule veshchestv sredney molekulyarnoy massy v syvorotke krovi, plazme, eritrotsitah i v moche* [A method for determining oxidative modification of proteins in pool average molecular weight substances in blood serum, plasma and red blood cells, urine]. The patent for the invention № 2525437. patent application for the invention of the Russian Federation № 2012153044, priority of 12.07.2012, the decision to grant a patent on 04.14.2014, the applicant – State Educational Institution of Higher Professional Education "Penza State University" (in Russian).
6. Mentshchikova E. B. et al. *Okislitel'ny stress. Prooksidanty i antioksidanty* [Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants]. Moscow, Firma "Slovo" Publ., 2006. 556 p. (in Russian).
7. Mentshchikova E. B. et al. *Okislitel'ny stress. Patologicheskie sostoyaniya i zabolevaniya* [Oxidative stress. Pathological conditions and diseases]. Novosibirsk: ARTA Publ., 2008. 284 p. (RFBR project № 07–04–07021) (in Russian).
8. Dubinina E. E., Pustygina A. V. *Svobodnoradikal'nye protsessy pri starenii, neyrodegenerativnyh zabolevaniyah i drugih patologicheskikh sostoyaniyah* [Free-radical processes during aging, neurodegenerative diseases, and other pathological conditions]. *Biomeditsinskaya himiya – Biomedical Chemistry*, 2007, vol. 53, no. 4, pp. 351–372 (in Russian).
9. Frolova M. Y. *Vozmozhnosti metoda opredeleniya karbonil'nykh grupp belkov syvorotki krovi dlya otsenki sostoyaniya «okislitel'nogo stressa» v klinicheskoy praktike*. Avtoref. dis. kand. med. nauk. [The possibility of the method for determining the carbonyl groups of serum proteins to assess the state of "oxidative stress" in clinical practice: Abstract of thesis. cand. med. sci.]. SPb., 2003. 25 p. (in Russian).
10. Boev K. V., Vasilenko D. V., Maslov A. I. *Svobodnoradikal'noe okislenie belkov: metodologicheskie aspekty kolichestvennoy otsenki oksilitel'noy modifikatsii po reaktsii s 2,4-dinitrofenilgidrazinom* [Free radical oxidation of proteins: methodological aspects of quantifying oxidative modification by reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine]. *Himiya i biologiya: elektronny nauchny zhurnal – Chemistry and biology: the electronic scientific journal*, 2014, no. 1 (2). URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/search-2/item/839> (in Russian).
11. Belonogov R. N., Titova N. M., Dykhno Yu. A., Lapeshin P. V., Kudryashov E. V., Savchenko A. A. *Okislitel'naya modifikatsiya belkov i lipidov plazmy krovi bolnykh rakom krovi* [Oxidative modification of proteins and lipids of blood plasma of patients with lung cancer]. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal – Siberian Journal of Oncology*, 2009, no. 4, pp. 48–51 (in Russian).
12. Belonogov R. N., Titova N. M., Lapeshin P. V., Ivanova Yu. R., Shevtsova A. O., Pokrovsky A. A. *Izmenenie sodержaniya produktov oksilitel'noy modifikatsii belkov i lipidov v opuholevoy tkani na raznykh stadiyah raka legkogo* [Changes in the content of oxidative modification of proteins and lipids in the tumor tissue at various stages of lung cancer]. *Bjulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2009, no. 5, pp. 562–563 (in Russian).
13. Belonogov R. N., Titova N. M., Dykhno Yu. A. *Okislitel'naya modifikatsiya belkov i lipidov plazmy krovi pri razlichnykh gistologicheskikh tipah raka legkogo* [Oxidative modification of proteins and lipids of blood plasma for different histological types of lung cancer]. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie – Siberian medical review*, 2009, no. 5, pp. 42–45 (in Russia).

14. Kopytova T. V., Dmitrieva O. N., Himkina L. I., Panteleeva G. A. Okislitel'naya modifikatsiya belkov i oligopeptidov u bol'nyh hronicheskimi dermatozami s sindromom endogennoy intoksikatsii [Oxidative modification of proteins and oligopeptides in patients with chronic dermatoses with the syndrome of endogenous intoxication]. *Fundamental'nye issledovaniya – Basic Research*, 2009, no.6, pp. 25–29 (in Russian).
15. Rubtsov G. K., Bezruchko N. V., Sadovnikova D. G., Kozlova G. A., Anopin K. D. Kliniko-biohimicheskoe znachenie kompleksnogo izucheniya molekul sredney massy i okislitel'noy modifikatsii belkov dlya otsenki endotoksikoza [Clinical and biochemical importance of a comprehensive study of medium-weight molecules and oxidative modification of proteins to assess endotoxemia]. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoj i farmatsevticheskoy himii – Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry*, 2013, no. 2, pp. 41–47 (in Russian).
16. Khaldun O., Lakal A., Bekshokov K. S., Klichhanov N. K. Okislitel'naya modifikatsiya belkov plazmy krovi ozhogovyh bol'nyh [Oxidative modification of plasma proteins of ambustials]. *Vestnik Dagestanskogo gosudarstvennogo universiteta – Bulletin of Dagestan State University*, 2012, no. 1, pp. 128–132 (in Russian).
17. Dubinina E. E., Burmistrov S. O., Hodov D. A., Porotov I. G. Okislitel'naya modifikatsiya belkov syvorotki krovi cheloveka, metod ee opredeleniya [Oxidative modification of proteins of human serum, the method of its determination] *Voprosy meditsinskoj himii – Problems of Medical Chemistry*, 1995, no. 1, pp. 24–26. (in Russian).
18. Bezruchko N. V., Rubtsov G. K. Model'nye biologicheskie sistemy i metod otsenki spontannoy i initsirovannoy okislitel'noy modifikatsii belkov v pule molekul sredney massy [Modeling biological systems and method of assessing spontaneous and initiated oxidative modification of proteins in a pool of medium-weight molecules]. *Tehnologii zhivyh sistem – Technologies of living systems*, 2013, no. 5, pp. 46–50. (in Russian).
19. Rubtsov G. K., Bezruchko N. V., Gengin M. T. Razrabotka i optimizatsiya model'nykh biologicheskikh system dlya otsenki urovnya OMB v pule MSM [Development and optimization of model biological systems to assess the level of OMP in the pool MSM]. *Obmen veshchestv pri adaptatsii i povrezhdenii (dni meditsinskoj i laboratornoj diagnostiki). Materialy XII mezhvuzovskoy biohimicheskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem [Metabolism in adapting and injury (days of medical laboratory diagnostics): Proceedings of the XII Inter-University biochemical scientific-practical conference with international participation]. Rostov-on-Don: GBOU VPO RostGMU Publ., 2013. Pp. 59–63. (in Russian).*
20. Klebanov G. I., Babenkova I. V., Teselkin Yu. O., Komarov O. S., Vladimirov Yu. A. Otsenka antiokislitel'noy aktivnosti plazmy krovi s primeneniem zheltokhnykh lipoproteidov [Evaluation of the antioxidant activity of blood plasma using yolk lipoprotein]. *Laboratornoe delo – Laboratory work*, 1988, no. 5, pp. 59–62 (in Russian).
21. Dubtsova E. A. *Kliniko-eksperimental'noe obosnovanie primeneniya produktov pchelovodstva v kompleksnoy terapii nekotorykh zabolevaniy organov pishhevareniya*. Avtoref. dis. doct. med. nauk [Clinical and experimental study of the use of products of beekeeping in the complex treatment of some diseases of the digestive system]. Abstract of thesis doct. med. sci.]. Moscow, 2009. 38 p. (in Russian).
22. Azizova O. A., Piryazev A. P., Moskvina S. N., Aseychev A. V. Metod opredeleniya oksilyaemosti belkov syvorotki i plazmy krovi [Method for determination of the oxidizability of serum proteins and blood plasma]. *Biomeditsinskaya himiya – Biomedical Chemistry*, 2007, vol. 53, no. 1, pp. 99–106. (in Russian).
23. Kancheva V. D., Bankova V. S. Chain-breaking antioxidant of two new chalcones from propolis of el Salvador in homogeneous and micellar media. *Bulgarian Chemical Communications*, 2008, vol. 40, no. 4, pp. 546–555.
24. Herken E. N., Erel O., Guzel S., Celik H., Ibanoglu S. Total antioxidant, phenolic compounds, and total oxidant status of certified and uncertified turkey's honeys. *International Journal of Food Properties*, 2009, vol. 12, no. 3, pp. 461–468.
25. Dobre I., Gadei G., Patrascu L., Elisei A. M., Segal R. The antioxidant activity of selected Romanian honeys. *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI: Food Technology*, 2010, vol. 34, no. 2, pp. 67–73.
26. Abu-Mellal A., Koolaji N., Tran V. H., Duke C. C., Duke R. K. Prenylated cin-namate and stilbenes from kangaroo island propolis and their antioxidant activity. *Phytochemistry*, 2012, vol. 77, pp. 251–259.
27. Kuznetsova E. I., Semak I. V. Vliyanie melatonina na okislitel'nuyu modifikatsiyu belkov pri eksperimental'nom holestaze [Effect of melatonin on oxidative modification of proteins in experimental cholestasis]. *Trudy BGU – Proceedings of the BSU*, 2010, vol. 5, part 1, pp. 127–134 (in Russian).
28. Babin K. A. *Osobennosti obmena biogennykh aminov i svobodnoradikal'nogo okisleniya pri alkogol'nom delirii s soputstvuyushhim virusnym gepatitom C*. Dis. Cand. med. nauk. [Features of the exchange of biogenic amines and free radical oxidation in alcoholic delirium with concomitant hepatitis C: Thesis. cand. med. sci.]. Chelyabinsk, 2014. 135 p. (in Russia).
29. Nizkodubova S. V., Lasukova T. V., Legostin S. A. Primenenie lipidov sapropelya dlya korrektsii metabolizma pecheni krysa pri toksiko-himicheskom gepatite [The use of lipid metabolism sapropel for correction of rat liver with toxic-chemical hepatitis]. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta – TSPU Bulletin*, 2013, no. 8, pp. 94–99 (in Russia).

Bezruchko N. V.

Penza State University.

Ul. Krasnaya, 40, Penza, Russia, 440026.

E-mail: bnv1976@rambler.ru

Rubtsov G. K.

Penza State University.

Ul. Krasnaya, 40, Penza, Russia, 440026.

E-mail: rubczoff.georgij@yandex.ru

Yemialyanchyk S. V.

Grodno State University Yanka Kupala.

Ul. Ozheshko, 22, Grodno, Belarus, 230023.

E-mail: semel@grsu.by

Zimatkin S. M.

Grodno Medical State University.

Ul. Gorky, 80, Grodno, Belarus, 230009.

E-mail: smzimatkin@mail.ru

Gamzin S. S.

Penza State University.

Ul. Krasnaya, 40, Penza, Russia, 440026.

E-mail: s.s.gamzin@yandex.ru