

<https://doi.org/10.31043/2410-2733-2020-1-50-54>

УДК 57,023:57,085.2

О. Н. Павлова¹, О. Н. Гуленко², П. В. Борискин¹, А. А. Девяткин¹, А. Н. Тороповский¹, В. В. Леонов²

Взаимосвязь распределения концентрации диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях белых беспородных крыс

Аннотация. Известно, что липиды являются строительным материалом клеточных мембран, играют важную роль в жизнедеятельности клеток и это своеобразная форма депонирования запасов метаболического топлива. В последнее десятилетие благодаря многочисленным исследованиям установлено, что липиды являются составной частью общего метаболизма и активно участвуют в процессах адаптации и регуляции многих функций в организме. Нарушения обмена липидов являются пусковым механизмом в патогенезе многочисленных заболеваний. В основе многих метаболических процессов в организме лежат окислительно-восстановительные реакции. Некомпенсированное образование активных форм кислорода или окислительный стресс приводит к нарушению физиологической активности клеточных мембран, что влечет за собой нарушение целостности клетки и запускает каскад дегенеративных процессов, в результате чего экспоненциально ускоряется старение организма. Состояние перекисного окисления липидов оценивают по содержанию промежуточных продуктов — диеновых конъюгатов (ДК), так как они отражают ранние стадии окисления. Цель нашего исследования состояла в изучении взаимосвязей распределения концентрации диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях белых беспородных крыс. Для реализации поставленной цели предстояло решить следующие задачи: определить концентрацию диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях печени, мозга, сердца, а также в скелетных мышечных тканях крыс; выявить взаимосвязи распределения концентрации ДК в сыворотке крови и тканях крыс. В статье представлены результаты непараметрического корреляционного анализа для оценки взаимосвязи распределения концентрации диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях белых беспородных крыс.

Ключевые слова: диеновые конъюгаты; перекисное окисление липидов; сыворотка крови; печень; головной мозг; сердце; скелетные мышцы.

Авторы:

Павлова Ольга Николаевна — доктор биологических наук, научный сотрудник; e-mail: casiopeya13@mail.ru;

Гуленко Ольга Николаевна — кандидат биологических наук, доцент; e-mail: gulenko_ol@mail.ru;

Борискин Павел Викторович — кандидат медицинских наук, научный сотрудник; e-mail: pboriskin@mail.ru;

Девяткин Анатолий Анатольевич — доктор медицинских наук, научный сотрудник;

Тороповский Андрей Николаевич — кандидат медицинских наук, генеральный директор ООО «ТестГен»;

Леонов Виктор Валериевич — лаборант; e-mail: casiopeya13@mail.ru.

¹ ООО «ТестГен»; 432072, Россия, г. Ульяновск, 44-й проезд Инженерный, дом 9;

² Медицинский университет «Реавиз»; 443001, Россия, Самара, ул. Чапаевская, 227.

Введение. Гомеостатическое равновесие организма достигается за счет уравнивания процессов свободнорадикального и перекисного окисления биологических субстратов и адекватной функциональной активности антиоксидантной защиты. Сочетание неблагоприятных внешних и внутренних факторов приводит к смещению равновесия и разрушительному воздействию активных форм кислорода. Свободные радикалы (супероксид анион, перекись водорода, гидроксил) неустойчивы и легко вступают в реакции с белками,

липидами, вызывая нарушения всех физиологических процессов клетки, способствуя деградации и старению организма [1]. При интенсивном образовании свободных радикалов элементы антиоксидантной системы (глутатион, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза) не способны нейтрализовать весь объем, вызывая состояние оксидативного стресса и деструктивные изменения мембранных структур. Динамика показателей оксидативного стресса, образующихся в результате дисбаланса меж-

ду процессами перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты, отражает специфику физиологического состояния организма, в частности, особенности патогенетических процессов [2; 3; 4; 5; 6]. Состояние перекисного окисления липидов оценивают по содержанию промежуточных продуктов — диеновых конъюгатов (ДК), так как они отражают ранние стадии окисления. При свободнорадикальном окислении арахидоновой кислоты происходит отрыв водорода в α -положении по отношению к двойной связи, что приводит к перемещению этой двойной связи с образованием ДК [7]. Диеновые конъюгаты, являющиеся первичными продуктами ПОЛ, относятся к токсическим метаболитам, которые оказывают повреждающее действие на липопротеиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты [8, 9].

Таким образом, **цель** нашего исследования состояла в изучении взаимосвязей распределения концентрации диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях белых беспородных крыс.

Для реализации поставленной цели предстояло решить следующие **задачи**: определить концентрацию диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях печени, мозга, сердца, а также в скелетных мышечных тканях крыс; выявить взаимосвязи распределения концентрации ДК в сыворотке крови и тканях крыс.

Материалы и методы. Исследование проводили на белых беспородных половозрелых здоровых крысах-самцах одного месяца рождения, массой 190–210 г в количестве 150 штук, которые содержались в виварии в стандартных условиях.

Определение концентрации диеновых конъюгатов осуществляли спектрометрическим методом [10].

Принцип метода основывается на установлении содержания *первичных* продуктов перекисного окисления липидов в крови по поглощению липидным экстрактом монохроматического светового потока в ультрафиолетовой области спектра, так как молекулы с двумя сопряженными связями (диеновые конъюгаты) обладают максимумом поглощения при 233 нм.

К 0,2 мл плазмы (гомогената ткани) добавляли 4 мл смеси гептан : изопропанол (1:1) и встряхивали 10–15 мин на лабораторном встряхивателе. Затем в пробирку добавляли 1 мл раствора HCL (рН=2) и 2 мл гептана, и интенсивно встряхивали, а после отстаивания и расслоения смеси на фазы (через 20–25 мин) отбирали верхний, гептановый слой, который использовали для определения в нем ацилгидроперекисей по степени светопоглощения при длине волны λ — 233 нм (A233).

В качестве контрольной пробы использовали образец, содержащий вместо плазмы (гомогената ткани) 0,2 мл воды, подвергнутый всем вышеперечисленным видам обработки.

Расчет содержания первичных продуктов перекисного окисления липидов производили в относительных единицах по формуле:

$$A_{233} \text{ на } 1 \text{ мл плазмы} = A_{233} \cdot V_{\text{Э}} : V_{\text{пл}} = (A_{233} \cdot 4) : 0,2 = A_{233} \cdot 206,$$

где A233 — значение оптической плотности опытной пробы при λ — 233 нм;

VЭ = 4 мл — конечный объем гептанового экстракта (в мл);

Упл = 0,2 мл — объем взятой плазмы крови (гомогената ткани).

Расчет производили на 1 мг липидов, для чего дополнительно определяли общее содержание липидов сульфофосфованилиновым методом.

Концентрацию диеновых конъюгатов изучали в тканях печени, сердца, мозга и в скелетной мышечной ткани крыс, а также в сыворотке крови. Для этого крыс убивали в соответствии с этическими нормами под эфирным наркозом методом декапитации, затем проводили извлечение необходимых тканей, которые (кроме сыворотки крови) промывали физиологическим раствором и сразу замораживали. Гомогенаты готовили механическим измельчением тканей массой 1 г с 9 мл трис-буфера (рН 7,4), со скоростью 5000 об/мин в сосуде с двойными стенками, постоянно охлаждаемым проточной водой [11].

Цифровой материал подвергали статистической обработке путем непараметрического корреляционного анализа по Спирмену, а также с использованием коэффициентов гамма корреляции и Кенделла Тау.

Результаты исследования. В результате экспериментов был получен массив числовых данных концентрации ДК в сыворотке крови и тканях крыс. Полученные результаты подвергали статистической обработке (табл. 1). На первом этапе проведения статистического анализа проводили проверку на соответствие нормальному распределению концентрации ДК в сыворотке крови и тканях крыс. Для этого использовался одновыборочный критерий Колмогорова — Смирнова. В результате было установлено, что распределение концентрации диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях не соответствует нормальному. В связи с тем при дальнейшей статистической обработке нами были применены непараметрические методы анализа.

Для оценки взаимосвязи распределения концентрации ДК в сыворотке крови и тканях малых экспериментальных животных проводили исследование корреляций внутри группы наблюдения по непараметрическому коэффициенту корреляции Спирмена (табл. 2), а также с использованием коэффициентов гамма корреляции и Кенделла Тау (табл. 3).

По данным, представленным в таблице 2, прослеживается достоверно наличие слабой силы прямой корреляционной связи между концентрацией диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях мозга (0,21 при $p \leq 0,010654$).

Так как никаких других взаимосвязей между концентрацией ДК в сыворотке крови и тканях крыс с помощью коэффициента корреляции Спирмена выявлено не было, решено было провести анализ с использованием критериев гамма корреляции и Кенделла Тау (табл. 3).

По данным, представленным в таблице 3, видно, что при изучении распределения концентрации диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях крыс выявлены прямая достоверная корреляционная связь слабой силы между концентрацией ДК в сыворотке крови и тканях мозга белых беспородных крыс (Gamma 0,16 при $p \leq 0,007167$; Kendall Tau 0,15 при $p \leq 0,007167$), а также обратная достоверная корреляционная связь слабой силы между концентрацией ДК в сыворотке

крови и тканях печени белых беспородных крыс (Gamma -0,12 при $p \leq 0,042695$; Kendall Tau -0,11 при $p \leq 0,042695$).

Выводы. Три примененных способа непараметрического корреляционного анализа для оценки взаимосвязи распределения концентрации диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях крыс выявили, что при концентрации ДК в организме животных в пределах физиологической нормы достоверно определяется с помощью коэффициента корреляции Спирмена слабой силы прямая корреляционная связь между концентрацией диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях мозга (0,21 при $p \leq 0,010654$), а с помощью коэффициента гамма корреляции и Кенделла Тау корреляции выявлены прямая достоверная корреляционная связь слабой силы между концентрацией ДК в сыворотке крови и тканях мозга белых беспородных крыс (Gamma 0,16 при $p \leq 0,007167$; Kendall Tau 0,15 при $p \leq 0,007167$), а также обратная достоверная корреляционная связь слабой

Таблица 1. Распределение значений концентрации диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях белых беспородных крыс

Описательная статистика объединённых групп	N	M	Me	Min	Max	25 Perc	75 Perc	10 Perc	90 Perc
Сыворотка крови	150	34,31	34,30	32,90	35,60	33,90	34,70	33,50	35,10
Печень	150	26,56	26,50	25,10	27,90	26,10	26,90	25,65	27,55
Головной мозг	150	16,36	16,40	15,10	17,90	15,80	16,80	15,40	17,40
Сердце	150	58,24	58,30	57,10	59,80	57,60	58,70	57,30	59,20
Скелетные мышцы	150	30,24	30,20	28,50	31,90	29,50	30,80	29,10	31,50

Таблица 2. Коэффициент корреляции Спирмена по распределению концентрации ДК в сыворотке крови и тканях крыс и значение p

Корреляция по Спирмену во всех объединённых измерениях	Valid N	Spearman R	p-level
Сыворотка крови & печень	150	-0,159332	0,051469
Сыворотка крови & мозг	150	0,207976	0,010654
Сыворотка крови & сердце	150	0,119623	0,144822
Сыворотка крови & мышцы	150	0,022562	0,784048

Таблица 3. Коэффициент гамма корреляции и Кенделла Тау корреляции по распределению концентрации ДК в сыворотке крови и тканях крыс

MD pairwise deleted Marked correlations are significant at $p < 0,5000$				
	Valid N	Gamma	Z	p-level
Сыворотка крови & печень	150	-0,118381	-2,02668	0,042695
Сыворотка крови & мозг	150	0,156569	2,68899	0,007167
Сыворотка крови & сердце	150	0,086370	1,48474	0,137613
Сыворотка крови & мышцы	150	0,015628	0,26986	0,787270
MD pairwise deleted Marked correlations are significant at $p < 0,5000$				
	Valid N	Kendall Tau	Z	p-level
Сыворотка крови & печень	150	-0,111607	-2,02668	0,042695
Сыворотка крови & мозг	150	0,148079	2,68899	0,007167
Сыворотка крови & сердце	150	0,081763	1,48474	0,137613
Сыворотка крови & мышцы	150	0,014861	0,26986	0,787270

силы между концентрацией ДК в сыворотке крови и тканях печени белых беспородных крыс (Gamma -0,12 при $p \leq 0,042695$; Kendall Tau -0,11 при $p \leq 0,042695$). В исследованиях свободнорадикальных процессов в организме крыс, проведенных коллективом отечественных ученых, было выявлено нелинейное изменение содержания диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в плазме крови, эритроцитах, ткани печени здоровых малых экспериментальных животных на фоне изменения состояния внешней среды, однако корреляцион-

ные анализ затрагивал только то, что изменение исследованных параметров свободнорадикального окисления происходит согласованно с динамикой геофизического F-индекса фазовых флуктуаций, характеризующего изменения во внешней среде. [12]. Таким образом, нами представлены новые результаты непараметрического корреляционного анализа для оценки взаимосвязи распределения концентрации диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях белых беспородных крыс.

Литература

1. Нагорная Н. В. Оксидативный стресс: влияние на организм человека, методы оценки / Н. В. Нагорная // Здоровье ребенка. — 2010. — № 2(23). — С. 140–145.
2. Донченко Г. В. Активность ферментов антиоксидантной защиты организма и изменения липидного состава микросом при действии витамина Е и его производных / Г. В. Донченко // Биоантиоксидант: тезисы докл. VI конф. — 2002. — С. 167–169.
3. Ксейко Д. А. Процессы перекисного окисления липидов в норме и патологии. Система перекисного окисления липидов — антиоксиданты в норме и патологии. Ульяновск: Вектор-С. 2008. С. 6–48.
4. Мамадалиева Н. И. Влияние фармакокоррекции на активность ферментов защиты от активных форм кислорода в сердце при адаптации к гипоксии различной интенсивности и длительности / Н. И. Мамадалиева, Т. С. Саатов, З. Р. Хайбуллина, О. И. Умеров // Вестник Новосибирского государственного педагогического университета. — 2014. — № 1(17). — С. 222–231.
5. Угланова С. В. Стабилизация ферментов-антиоксидантов в комплексах и конъюгатах с блоксополимерами: перспективы лечения заболеваний центральной нервной системы / С. В. Угланова, М. В. Попов, С. В. Курова, Е. В. Батракова, Д. Манихам, А. В. Кабанов, Н. Л. Клячко // Вестник Московского Университета, сер. 2. Химия. — 2010. — Т. 51. — № 3. — С. 227–234.
6. Чеснокова Н. П. Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем / Н. П. Чеснокова, Е. В. Понукалина, М. Н. Бизенкова // Успехи современного естествознания. — 2006. — № 7. — С. 37–41.
7. Чеснокова Н. П. Типовые патологические процессы // Саратов: Саратовский медицинский университет. 2004. С. 132–136.
8. Тарасов Н. И. Состояние перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты крови у больных инфарктом миокарда, отягощенным недостаточностью кровообращения / Н. И. Тарасов, А. Т. Тепляков, Е. В. Малахович // Тер. архив. — 2002. — № 12. — С. 12–15.
9. Кудяева И. В. Методы оценки оксидативного статуса в лабораторной практике / И. В. Кудяева, Л. Б. Маснабиева // Медицинский алфавит. — 2015. — № 2. — Т. 1. — С. 14–18.
10. Аджиев Д. Д. Исследование продуктов перекисного окисления липидов, неферментативной и ферментативной антиоксидантной системы в возрастной динамике самцов кроликов / Д. Д. Аджиев // Вестник ВОГиС. — 2010. — Т. 14. — № 4. — С. 674–684.
11. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р. У. Хабриева. 2-изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. 832 с.
12. Кулакова К. В. Исследование свободнорадикальных процессов в организме крыс на фоне изменения состояния внешней среды / К. В. Кулакова, Д. В. Давыденко, Т. Г. Щербатюк, В. В. Чернов, М. А. Макушева // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. — 2010. — № 4(1). — С. 100–108.

Pavlova O.¹, Gulenko O.², Boriskina P.¹, Devyatkin A.¹, Leonov V.¹, Toropovsky A.²

The relationship of the concentration distribution of diene conjugates in the blood serum and tissues of white outbred rats

Abstract. It is known that lipids are the building material of cell membranes, play an important role in the vital functions of cells, and this is a peculiar form of deposition of metabolic fuel reserves. In the last decade, thanks to numerous studies, it has been established that lipids are an integral part of the general metabolism and are actively

involved in the processes of adaptation and regulation of many functions in the body. Disorders of lipid metabolism are the trigger in the pathogenesis of numerous diseases. The basis of many metabolic processes in the body is redox reactions. Uncompensated formation of reactive oxygen species or oxidative stress leads to a violation of the physiological activity of cell membranes, which leads to a violation of the integrity of the cell and triggers a cascade of degenerative processes, resulting in exponentially accelerated aging. The state of lipid peroxidation is estimated by the content of intermediate products — diene conjugates (DCs), since they reflect the early stages of oxidation. The aim of our study was to study the relationship between the distribution of concentration of diene conjugates in the blood serum and tissues of white outbred rats.

To achieve this goal, the following tasks had to be solved: to determine the concentration of diene conjugates in the blood serum and tissues of the liver, brain, heart, as well as in the skeletal muscle tissues of rats; to reveal the relationship between the distribution of DC concentration in blood serum and rat tissues.

The article presents the results of a nonparametric correlation analysis to assess the relationship between the distribution of concentration of diene conjugates in blood serum and tissues of outbred rats.

Key words: diene conjugates; lipid peroxidation; blood serum; liver; brain; heart; skeletal muscle.

Authors:

Pavlova O. — Dr. Habil. (Biol. Sci.), research associate; e-mail: casiopeya13@mail.ru;

Gulenko O. — PhD (Biol. Sci.); e-mail: gulenko_ol@mail.ru;

Boriskin P. — PhD (Med. Sci.); research associate; e-mail: pboriskin@mail.ru;

Devyatkin A. — PhD (Med. Sci.); research associate;

Toropovsky A. — PhD (Med. Sci.); general director LLC «TestGen»;

Leonov V. — laboratory assistant; e-mail: casiopeya13@mail.ru.

¹ LLC «TestGen»; 432072, Russia, Ulyanovsk, 44th passage Engineering, house 9;

² Medical University «Reaviz»; 443001, Russia, Samara, ul. Chapayevskaya, 227.

References

1. Nagornaya N. V. Oxidative stress: effect on the human body, assessment methods / N. V. Nagornaya // Children's health. — 2010. — №. 2 (23). — P. 140–145.
2. Donchenko G. V. The activity of antioxidant enzymes of the body and changes in the lipid composition of microsomes under the action of vitamin E and its derivatives / G. V. Donchenko // Bioantioxidant: abstracts dokl. VI conf. — 2002. — P. 167–169.
3. Kseiko D. A. The processes of lipid peroxidation in normal and pathological conditions. The lipid peroxidation system — antioxidants are normal and pathological. Ulyanovsk: Vector-C. 2008. P. 6–48.
4. The effect of pharmacocorrection on the activity of protection enzymes against reactive oxygen species in the heart during adaptation to hypoxia of varying intensity and duration / N. I. Mamadalieva, T. S. Saatov, Z. R. Khaibullina, O. I. Umerov // Bulletin of Novosibirsk State Pedagogical University. — 2014. — № 1(17). — P. 222–231.
5. Stabilization of antioxidant enzymes in complexes and conjugates with block copolymers: prospects for the treatment of diseases of the central nervous system / S. V. Uglanova, M. V. Popov, S. V. Kurova, E. V. Batrakova, D. Maniam, A. V. Kabanov, N. L. Klyachko // Bulletin of Moscow University, ser. 2. Chemistry. — 2010. — Vol. 51. — №3. — P. 227–234.
6. Chesnokova N. P. General characteristics of the sources of formation of free radicals and antioxidant systems / N. P. Chesnokova, E. V. Ponukalina, M. N. Bizenkova // Successes in modern natural science. — 2006. — № 7. — P. 37–41.
7. Chesnokova N. P. Typical pathological processes // Saratov: Saratov Medical University. 2004. P. 132–136.
8. Tarasov N. I. The state of lipid peroxidation, antioxidant protection of blood in patients with myocardial infarction, weakened by circulatory failure / N. I. Tarasov, A. T. Teplyakov, E. V. Malakhovich // Ter. archive. — 2002. — № 12. — P. 12–15.
9. Kudaeva I. V. Methods for assessing oxidative status in laboratory practice / I. V. Kudaeva, L. B. Masnavieva // Medical alphabet. — 2015. — № 2. — Vol. 1. — P. 14–18.
10. Adzhiev D. D. Investigation of lipid peroxidation products, non-enzymatic and enzymatic antioxidant systems in the age dynamics of male rabbits / D. D. Adzhiev // VOGiS Vestnik. — 2010. — Vol. 14. — № 4. — P. 674–684.
11. Guidance on the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances / under total. ed. R. U. Khabrieva. 2-ed., Revised. and add. M.: Medicine, 2005. 832 p.
12. Kulakova K. V. The study of free radical processes in the organism of rats against the background of changes in the state of the environment / K. V. Kulakova, D. V. Davydenko, T. G. Shcherbatyuk, V. V. Chernov, M. A. Makusheva // Bulletin of the Nizhny Novgorod University. N. I. Lobachevsky. — 2010. — № 4(1). — P. 100–108.