

УДК 57

DOI 10.21661/r-555033

*Гуленко О.Н., Леонов В.В., Федотова А.А., Дворянкина Е.В., Павлова О.Н.*

## НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ КОНЦЕНТРАЦИИ ДИЕНОВЫХ КОНЬЮГАТОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ТКАНЯХ КРЫС

***Аннотация:** одним из механизмов поддержания гомеостаза в организме является перекисное окисление липидов (ПОЛ). Влияние внешних и внутренних факторов, воздействующих на организм, может менять динамику процессов ПОЛ, вызывая многочисленные нарушения в функционировании систем органов. Динамику процессов ПОЛ на ранних стадиях можно оценить по изменению концентрации промежуточных продуктов окисления – диеновых конъюгатов (ДК). Цель нашего исследования состояла в выявлении особенностей дифференциации распределения концентрации диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях белых беспородных крыс. Представлены новые результаты непараметрического корреляционного анализа для оценки взаимосвязи распределения концентрации диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях белых беспородных крыс.*

***Ключевые слова:** перекисное окисление липидов, печень, сердце, головной мозг, оксидативный стресс, диеновые конъюгаты, сыворотка крови, скелетные мышцы.*

***Введение.** Оптимальное сочетание процессов свободнорадикального и перекисного окисления биосубстратов обеспечивает гомеостаз и нормальную функциональность антиоксидантной системы организма, являющуюся совокупностью всех защитных механизмов на клеточном, тканевом и органном уровнях.*

*Совместное действие неблагоприятных внешних и внутренних факторов приводит к повышенному образованию активных форм кислорода (АКФ), таким как супероксид анион, перекись водорода, гидроксил. Свободные радикалы высокореагентны, взаимодействуя с белками и липидами изменяют динамику*

физиологических процессов организма, интенсифицируют старение. При этом показателем адаптивного потенциала организма является уровень контроля интенсивности липопероксидации.

Также любые патологические процессы, протекающие в организме резко, интенсифицируют свободнорадикальное окисление (СРО) стимулируя рост уровня прооксидантов, которые в свою очередь усиливают СРО. Следовательно, уже СРО становится неспецифическим патогенетическим звеном, запуская функциональный дисбаланс в неферментативном и ферментативном звеньях системы антиоксидантной защиты.

Элементы антиоксидантной защиты не справляются с их экспрессией, провоцируется деструкция мембран и как следствие это цепи продуцируется оксидативный стресс. Оксидативный (окислительный) стресс – это процесс повреждения клетки в результате действия свободных радикалов. При этом данный процесс не имеет абсолютно отрицательного значения. Для организма оксидативный стресс может быть защитным механизмом, используемым в борьбе с антигенами. Реактивные формы кислорода могут выступать как посредники при передаче нервных импульсов.

Ткани и системы органов имеют разную чувствительность к воздействию (АФК). Вероятно, это обусловлено динамичным восприятием экспрессии антиоксидантных ферментов и спецификой метаболизма различных тканей, которая обеспечивается внутриклеточным окислительно-восстановительным потенциалом (редокс-потенциал), являющимся производным всех биохимических реакций клетки.

Физиологическое состояние организма можно оценить посредством анализа дисбаланса между процессами ПОЛ и антиоксидантной системы [2; 4; 7; 10].

Состояние перекисного окисления липидов оценивают по содержанию промежуточных продуктов ПОЛ, к которым относятся: гидроперекиси липидов, альдегиды, кетоны, ряд низкомолекулярных кислот (муравьиная, уксусная, масляная). Эти продукты являются токсичными агентами, нарушающие функциональность мембран и полноценность метаболизма. При этом идет синтез диеновых

конъюгатов, перекисных радикалов, малонового диальдегида, шиффовых оснований

При этом синтез диеновых конъюгатов (ДК) отражает ранние стадии окисления.

При свободнорадикальном окислении арахидоновой кислоты происходит, отрыв водорода в  $\alpha$ -положении по отношению к двойной связи, что приводит к перемещению этой двойной связи с образованием ДК [9]. Диеновые конъюгаты, являющиеся первичными продуктами ПОЛ, относятся к токсическим метаболитам, которые оказывают повреждающее действие на липопротеиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты [5; 8].

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 [1].

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 (pH=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  $\lambda$  – 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:

$$A233 \text{ на } 1 \text{ мл плазмы} = A233 \cdot VЭ : V_{пл} = (A233 \cdot 4) : 0,2 = A233 \cdot 206$$

где A233 – значение оптической плотности опытной пробы при  $\lambda$  -233 нм;

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

Vпл = 0,2 мл – объем взятой плазмы крови (гомогената ткани).

Расчет производили на: 1 мг липидов, для чего дополнительно определяли общее содержание липидов сульфифосфованилиновым 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 (pH 7,4), со скоростью 5000 об/мин в сосуде с двойными стенками, постоянно охлаждаемым проточной водой [6].

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.

Таблица 1

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

Описательная статистика объединённых групп	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>Me</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>25 Perc</i>	<i>75 Perc</i>	<i>10 Perc</i>	<i>90 Perc</i>
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

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).

Коэффициент корреляции Спирмена по распределению концентрации ДК  
в сыворотке крови и тканям крыс и значение p

<i>Корреляция по Спирмену во всех объединённых измерениях</i>	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

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).

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

MD pairwise deleted Marked correlations are significant at $p < ,05000$				
	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 $p < ,05000$				
	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

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  $p \leq 0,042695$ ).

Три примененные 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 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 корреляционные анализ затрагивал только то, что изменение исследованных параметров свободнорадикального окисления происходит согласованно с динамикой геофизического F-индекса фазовых флуктуаций, характеризующего изменения во внешней среде [3].

Выводы: нами представлены новые результаты непараметрического корреляционного анализа для оценки взаимосвязи распределения концентрации диеновых конъюгатов в сыворотке крови и тканях белых беспородных крыс.

### *Список литературы*

1. D. Kirmizis, A. Papagianni, F. Dogrammatzi et al. «Effects of simvastatin on markers of inflammation, oxidative stress and endothelial cell apoptosis in patients on chronic hemodialysis». J Atheroscler Thromb. 2010. Vol. 17 (12). P. 1256–1265
2. N. Traverso, S. Menini, E.P. Maineri «Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins» J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 2004. Vol. 59 (9). P. B890-B895.
3. A.D. Mooradian, D. Reinacher, J.P. Li, J. Pinnas «Malondialdehyde modifications of proteins in vitro is enhanced in the presence of acetaldehyde» Nutrition. 2001. Vol. 17 (7–8). P. 619–622.
4. Ксейко Д.А. Процессы перекисного окисления липидов в норме и патологии. Система перекисного окисления липидов – антиоксиданты в норме и патологии» / Д.А. Ксейко. – Ульяновск: Вектор-С. 2008. – С. 6–48.
5. Кудяева И.В. Методы оценки оксидативного статуса в лабораторной практике / И.В. Кудяева, Л.Б. Маснавиева // Медицинский алфавит. – 2015. – №2. – Т. 1. – С. 14–18.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р.У. Хабриева. 2-изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. 832 с.
7. 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, [и др.] // Вестник Московского Университета, сер. 2. Химия. – 2010. – Т.51. – №3. – С. 227–234.
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. Чеснокова Н.П. Типовые патологические процессы / Саратов: Саратовский медицинский университет. – 2004. – С. 132–136.

10. 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.

11. Девяткин А.А. Корреляция концентраций ферментов системы ПОЛ-АО в сыворотке крови и тканях печени крыс / А.А. Девяткин, П.В. Борискин, О.Н. Гуленко, Р.Г. Каримова, В.В. Леонов, О.Н. Павлова, А.Н. Тороповский [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/korrelyatsiya-kontsentratsiy-fermentov-sistemy-pol-ao-v-syvorotke-krovi-i-tkanyah-pecheni-krys> (дата обращения: 21.10.2021).

---

**Гуленко Ольга Николаевна** – канд. биол. наук, доцент, ФГБОУ ВО «Самарский государственный университет путей сообщения» Самара, Россия.

**Леонов Виктор Валериевич** – ассистент кафедры морфологии и патологии, ЧУОО ВО «Медицинский университет «Реавиз», Самара, Россия.

**Федотова Анна Александровна** – старший преподаватель, ФГБОУ ВО «Самарский государственный университет путей сообщения» Самара, Россия.

**Дворянкина Елена Владимировна** – ФГБОУ ВО «Самарский государственный университет путей сообщения» Самара, Россия.

**Павлова Ольга Николаевна** – д-р. биол. наук, доцент, заведующая кафедрой, ФГБОУ ВО «Самарский государственный университет путей сообщения» Самара, Россия.

---