

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Специализированный учебно-научный центр (факультет) — школа-интернат
имени А.Н.Колмогорова

Курсовая работа на тему
«Оценка уровня малонового диальдегида в крови»

Автор: Токтомаматов Марлэн Нурланбекович;
ученик 10 Н класса
СУНЦ МГУ имени М.В.Ломоносова.

Руководитель: Архипенко Юрий Владимирович;
профессор, доктор биол. наук,
заведующий лабораторией
адаптационной медицины ФФМ МГУ.

Работа выполнена в Научно-исследовательской лаборатории адаптационной медицины
Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова.

г. Москва

2016

Оглавление

Список сокращений.....	4
Введение.....	5
Литературный обзор.....	6
1. Оксидативный стресс и малоновый диальдегид.....	6
1.1 Оксидативный стресс.....	6
1.2 Процесс перекисного окисления липидов.....	6
1.3 Малоновый диальдегид.....	8
2. Способы диагностики оксидативного стресса.....	8
2.1 По концентрации тирозина и его производных.....	8
2.2 По отношению концентраций окисленного глутатиона к восстановленному.....	8
2.3 По концентрации изменённых нуклеозидов.....	10
2.4 По концентрации диеновых конъюгатов.....	11
2.5 По концентрации малонового диальдегида.....	11
3. Применение производной спектрофотометрии для анализа трудноразрешимых спектров.....	12
Материалы и методы исследования.....	14
1. Регистрация спектров оптической плотности при разных концентрациях гомогената сердца крысы.....	14
2. Построение калибровочных графиков.....	14
2.1. Определение концентрации хромогена в стандарте МДА.....	14
2.2. Определение концентрации хромогена в сыворотке крови.....	15
3. Сравнение калибровочных графиков для чистого стандарта МДА и его смеси с сывороткой.....	15
3.1. Построение калибровочного графика для раствора стандарта.....	15
3.2. Построение калибровочного графика для раствора стандарта.....	16
4. Регистрация спектров оптической плотности триметинового комплекса в образцах крови пациентов с полиорганный патологией.....	16
5. Параметры спектрофотометрии.....	17
6. Материалы и оборудование.....	17
Результаты и обсуждения.....	18
1. Спектры оптической плотности сердца крысы Вистар.....	18
2. Спектры оптической плотности в различных образцах.....	19
3. Построение калибровочных графиков.....	20

3.1. Стандарт МДА.....	20
3.2. Сыворотка крови.....	21
3.3. Смесь раствора стандарта МДА и сыворотки крови.....	22
4. Спектры оптической плотности образцов сыворотки крови пациентов с полиорганной патологией.....	24
Заключение.....	25
Список использованной литературы.....	26

Список сокращений

АФК — активные формы кислорода;

МДА — малоновый диальдегид;

ОС — оксидативный стресс;

ПНЖК — полиненасыщенная жирная кислота;

ПОЛ — перекисное окисление липидов;

ТБК — тиобарбитуровая кислота.

Введение

Малоновый диальдегид (МДА) — один из продуктов свободнорадикального окисления липидов, накопление которого отражает степень оксидативного стресса в организме. Оценка этого показателя необходима для определения причин и механизмов развития того или иного патологического процесса и предложения способов лечения заболеваний.

Известным методом оценки уровня МДА является его реакция с тиобарбитуровой кислотой, в результате которой образуется розовый хромоген, носящий название «триметиновый комплекс». По значению оптической плотности этого хромогена, полученному на спектрофотометре, определяют концентрацию МДА. Наиболее доступным объектом такого исследования является кровь, а также её плазма или сыворотка. Однако наличие в крови многих компонентов, которые также вступают в реакцию с ТБК, осложняет определение истинной концентрации МДА.

Данная работа посвящена поиску метода корректного определения концентрации МДА в крови на основе спектрофотометрии продукта реакции с ТБК. В соответствии с этим необходимо выполнить следующие задачи:

1. Сравнить спектры оптической плотности триметинового комплекса в образцах тканей и крови;
2. Подобрать условия для производной спектрофотометрии триметинового комплекса при определении уровня МДА в крови.

Литературный обзор

1. Оксидативный стресс и малоновый диальдегид.

1.1. Оксидативный стресс (ОС) – совокупность процессов повреждения клетки в результате окисления её компонентов. В основе ОС лежит цепь радикальных реакций между т.н. активными формами кислорода (АФК) и полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК) в липидах мембран клеток – перекисное окисление липидов (ПОЛ). Свободные радикалы, образующиеся в ходе этого цепного процесса, способны атаковать молекулы как соседних липидов, так и белков, нуклеиновых кислот и других структурно-функциональных элементов клетки [7].

1.2. В митохондриях многих аэробных клеток постоянно происходят процессы клеточного дыхания. В организме человека, обычно, 95% кислорода восстанавливаются до воды, а 5% могут преобразовываться в активные формы (рис. 1).

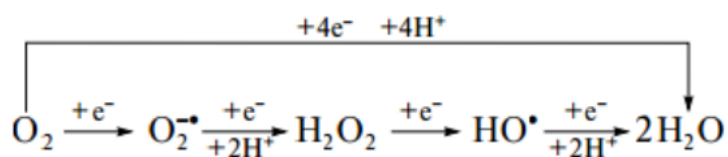


Рис. 1. Схема образования АФК [4].

Незначительное количество АФК не опасно для целого организма. Наоборот, многие из них в небольших дозах даже могут участвовать в биосинтезе, выполнять сигнальную функцию, стимулировать защиту от микроорганизмов и пр. Однако избыток АФК приводит к тому, что кислород вступает в реакцию с мембранными липидами клетки, постепенно разрушая её — начинаются процессы ПОЛ. Как и любая другая радикальная реакция, ПОЛ имеет несколько стадий (рис. 2):

- I. Инициирование: вследствие миграции электронов на молекулы кислорода в ходе работы дыхательной цепи в митохондриях образуются АФК, в т. ч. супероксидный и гидроксильный радикалы.
- II. Развитие цепи:
 1. Гидроксильный радикал вступает в реакцию с находящейся в мембране ПНЖК, отщепляя у неё водород, с образованием липидного радикала.
 2. К нему, в свою очередь, присоединяется молекула кислорода и формирует уже следующий радикал, который называется липид-пероксильным ($\text{LOO}^{\bullet}$).

3. Липид-пероксил «отбирает» атом водорода у следующей ПНЖК, что приводит к образованию нового липидного радикала и липид-пероксида (LOOH). Последний также может разлагаться, инициируя новую цепь.

III. Обрыв цепи может произойти несколькими путями: взаимодействием двух радикалов с образованием неактивного продукта, присоединением Fe^{2+} и некоторых других реагентов, а также при действии антиоксидантной системы клетки [4,6].

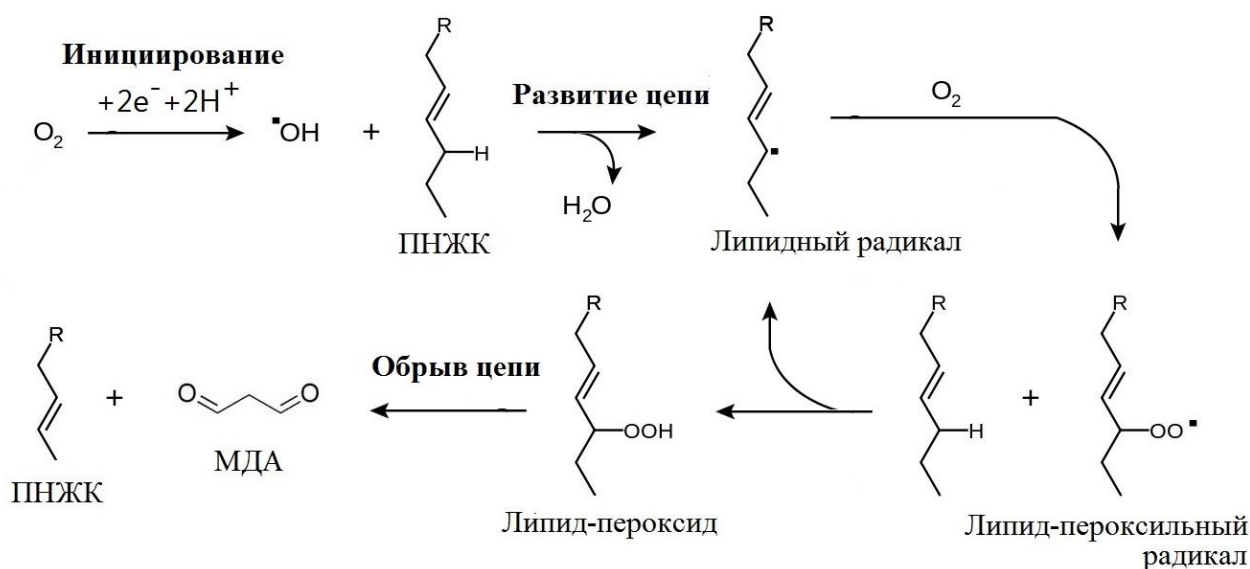


Рис. 2. Схема перекисного окисления липидов.

Продуктами ПОЛ может быть целый ряд веществ:

- перекиси ненасыщенных липидов;
- кетоны;
- низкомолекулярные карбоновые кислоты;
- альдегиды;
- и др.

Многие из этих веществ токсичны и могут нарушать естественные процессы метаболизма [6].

В целом оксидативный стресс является причиной возникновения многих серьёзных заболеваний, таких как атеросклероз, болезнь Альцгеймера, диабет и др. Некоторые исследования также показывают, что уровень оксидативного стресса напрямую влияет на процессы старения в организме [7].

1.3. Одним из наиболее характерных продуктов ПОЛ является малоновый диальдегид (МДА) - органическое соединение с трёхчленной углеродной цепью и двумя альдегидными группами на концах, альдегид малоновой кислоты (рис.3). Реагирует с тиобарбитуровой кислотой (ТБК); продуктом реакции является т.н. триметиновый комплекс, имеющий характерную розовую окраску ($\lambda_{\text{макс.}} = 532 \text{ нм}$). Благодаря этому свойству МДА часто используется как маркёр оксидативного стресса в организме.

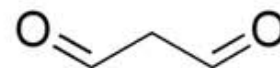


Рис. 3. Структурная формула малонового диальдегида [5].

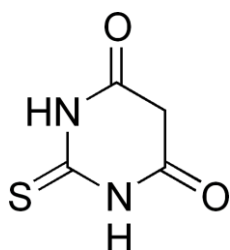


Рис. 4. Структурная формула тиобарбитуровой кислоты [11].

Помимо этого, МДА, образуясь при ПОЛ, является очень активным веществом и может формировать различные аддукты и нерастворимые конгломераты с компонентами клетки, в т.ч. и с дезоксиаденозином и дезоксигуанозином в молекулах ДНК, тем самым неся в себе мутагенный потенциал [7,15].

Тиобарбитуровая кислота — органическое гетероциклическое соединение с брутто-формулой $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (рис. 4). В нормальных условиях существует в виде пластинчатых кристаллов. ТБК растворима в этаноле и воде при 100°C . Является высокоактивным веществом. Наиболее широко применяется как реагент для определения МДА (рис. 5).

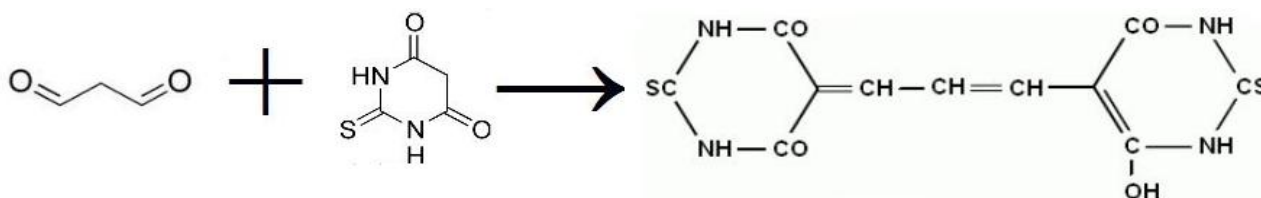


Рис. 5. Схема реакции между МДА и ТБК с образованием триметинового комплекса [11].

2. Способы диагностики оксидативного стресса.

2.1. По концентрации тирозина и его производных.

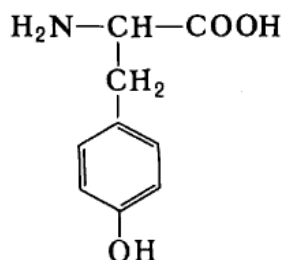


Рис. 6. Структурная формула тирозина [12].

Тирозин (α -амино- β -(p -оксифенил)пропиловая кислота) — заменимая аминокислота с бензольным кольцом и гидроксильной группой на ней (рис. 6); природный антиоксидант. Он является предшественником многих важных биологически активных соединений, таких как адреналин, норадреналин, дофамин. В организме человека присутствует только L-тирозин, входящий в состав белков и ферментов. При взаимодействии как свободного, так и связанного с белками тирозина со свободными радикалами происходит его окисление и

образуются различные производные — 3-хлортирозин, 3-нитротирозин, 3,5-дихлортирозин, дитирозин — маркёры свободнорадикального окисления полипептидов.

Очевидно, что исследуемый гомогенат (или сыворотка) содержит смесь продуктов, а также исходный тирозин. Для разделения смеси используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) обращённо-фазового режима. Этот метод, хотя и даёт довольно точно определить содержание глутатиона в гомогенате, используется исследователями не очень часто, т.к. требует больших затрат на оборудование [12].

2.2. По отношению концентраций окисленного глутатиона к восстановленному.

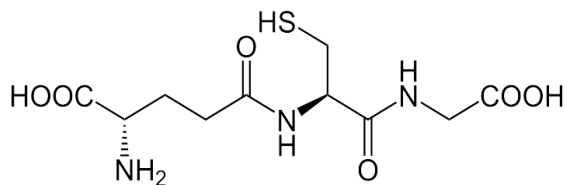


Рис. 7. Структурная формула глутатиона [14].

Глутатион — полипептид, состоящий из трёх аминокислот (цистеин, глутаминовая кислота, глицин). Молекула глутатиона имеет необычную пептидную связь между аминогруппой цистеина и карбоксильной группой боковой цепи глутаминовой кислоты

(рис. 7). Это вещество содержится в тканях многих млекопитающих. В клетке оно выступает в роли антиоксиданта и принимает участие в детоксикации продуктов метаболизма.

Благодаря высокой концентрации своей GSH формы в клетке глутатион может легко восстановить любую дисульфидную связь (S-S), образующуюся между цистеинами белков цитоплазмы в ходе окислительных превращений. В результате GSH окисляется до GSSG. Затем под действием фермента глутатионредуктазы, активизируемого в ходе процессов ОС, окисленный глутатион восстанавливается обратно до GSH. Соотношение окисленный/восстановленный глутатион является важным показателем уровня ОС в клетке [9,14].

Для определения концентрации восстановленного глутатиона мембраны клеток взятого образца разрушают, а белки подвергают денатурации; для осаждения обломков структур и хлопьев денатурированного белка образцы центрифугируют. Жидкость, оставшуюся над осадком (супернатант), доводят до слабощелочной среды (pH=7,8), а затем добавляют раствор 2-нитробензойной кислоты (реактив Элмана). В результате реакции в пробирке появляется характерное жёлтое окрашивание. Оптическую плотность раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 412 нм. По полученному значению оптической плотности и коэффициенту молярной экстинкции вычисляют концентрацию восстановленного глутатиона в исследуемом образце.

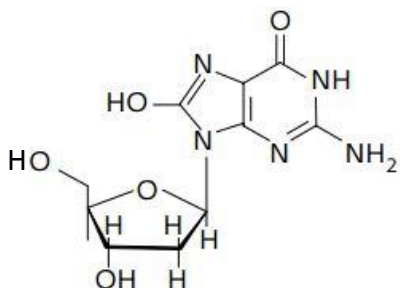
Спектрофотометрический метод является достаточно точным и надёжным методом. Однако проблема заключается в том, что концентрация глутатиона в тканях не всегда

зависит от степени повреждения клеток при ОС. К тому же, есть некоторые сложности в проведении данного опыта: исследования образца необходимо проводить в максимально короткие сроки после его взятия, а реактив Эллмана следует приливать к супернатанту как можно быстрее. Поэтому данный метод не очень популярен в клинических и лабораторных исследованиях [3].

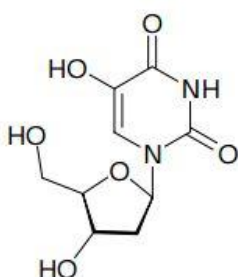
2.3. По концентрации изменённых нуклеозидов.

Свободнорадикальному окислению подвержены многие соединения в клетке, в том числе и нуклеиновые кислоты. Окисление молекул ДНК и РНК приводит к мутациям, онкологическим заболеваниям и раннему старению. В результате окислительных процессов образуются изменённые формы нуклеозидов — соединений одного из азотистых оснований с пентозой. Эти изменённые нуклеозиды, в отличие от нормальных, не могут встраиваться в ДНК и РНК и выводятся из организма с мочой. Поэтому по концентрации изменённых нуклеозидов в моче можно определить степень окисления нуклеиновых кислот. Наиболее важными из них являются следующие соединения:

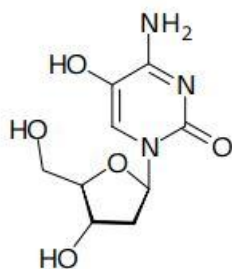
- 1) 8-гидрокси-2'- дезоксигуанозин;



- 2) 5-гидрокси-2'- дезоксицитидин;



3) 5-гидрокси-2'- дезоксиуридин.



Измененные нуклеозиды выделяют из мочи на специальные картриджи, определяют их концентрацию с помощью УФ-детектора. Окисленные формы могут быть определены амперометрическим детектором. В последние годы удалось разработать способы обнаружения измененных нуклеозидов, в том числе, и 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина непосредственно в моче, а не на картридже. Для этого мочу больного центрифугируют и пробу вводят в хроматограф. На хроматограмме этой пробы может присутствовать более 60 пиков. Пик, появившийся на 27-й минуте, соответствует нуклеозиду 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозину.

Необходимость использования методов хроматографии, как и в случае с определением тирозина, делает данный способ дорогостоящим и трудноосуществимым в клинической лаборатории [3].

2.4. По концентрации диеновых конъюгатов.

Диеновые конъюгаты - соединения, образующиеся в результате перегруппировки двойных связей в ПНЖК во время свободнорадикального окисления липидов.

Когда от молекулы ПНЖК отрывается атом водорода, атом углерода с неспаренным на внешней оболочке электроном приобретает sp^2 гибридизацию. Это приводит к тому, что формирующаяся негибридизованная p-орбиталь может образовывать π -связь с p-орбиталями соседних sp^2 -гибридизованных атомов углерода. В результате возникает система сопряженных двойных связей в молекуле ПНЖК (диеновый конъюгат). Концентрацию таких ПНЖК в организме можно определить при помощи измерения оптической плотности образца на спектрофотометре при максимуме поглощения 232-234 нм [3].

2.5. По концентрации МДА.

В образец крови, сыворотки или гомогената ткани последовательно добавляют 1% раствор детергента (третон Х-100 или дезоксихолат), 0,6 М раствор HCl и 0,06 М рабочий раствор ТБК; образец инкубируют при постоянной температуре (95°) 30 – 60 минут. Полученная смесь имеет характерную розовую окраску. Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при 532 нм. Контролем служит смесь с теми же реагентами, где гомогенат

заменен на дистиллированную воду [10].

Количество образованного триметинового комплекса соответствует количеству прореагировавшего МДА, поэтому его концентрацию можно легко вычислить, зная оптическую плотность исследуемого образца.

Из вышеизложенного ясно, что данный метод не является сложным в осуществлении. Он не требует больших затрат на оборудование, т.к. спектрофотометр является относительно недорогим и распространенным прибором, а необходимые реагенты легкодоступны. Сами образцы для этого метода при определённых условиях можно хранить длительный период и исследовать в любое удобное время.

Кроме того, метод определения уровня оксидативного стресса по МДА является очень чувствительным. Даже очень малый объём образца (меньше 0,1 мл) позволяет достаточно точно выявить концентрацию данного вещества.

Однако не всегда исследования, основанные на этом методе, являются безошибочными. Иногда полученные данные (а именно, концентрация МДА) не соответствуют истинной степени оксидативного стресса в организме. Это возникает по нескольким причинам, главной из которых является использование ТБК в качестве реагента.

Дело в том, что не только МДА, но и другие компоненты исследуемых тканей или крови активно реагируют с ТБК. Продукты таких реакций изменяют прозрачность и окраску полученной смеси, что мешает определению её оптической плотности на спектрофотометре. Это явление проявляется наиболее ярко при исследованиях крови. Помимо этого, кровь содержит особенно большое количество окрашивающих веществ, что в несколько раз повышает оптическую плотность в области поглощения триметинового комплекса (532 нм) [12].

3. Применение производной спектрофотометрии для анализа трудноразрешимых спектров.

Как отмечалось выше, наличие в крови различных компонентов, которые также вступают в реакцию с ТБК, осложняет определение истинной концентрации МДА, т. к. получаемый спектр отличается большой сложностью. Вычленить составляющую МДА можно с помощью производной спектрофотометрии.

Основная идея метода производной спектрофотометрии заключается в том, что последовательная дифференцировка функции по значению аргумента с экстремумом, которая описывает какой-либо сигнал (в данном случае – оптическую плотность), значительно уменьшает ширину пика.

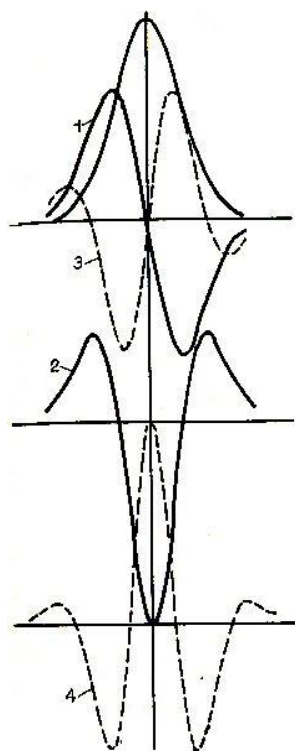


Рис. 8. Производные спектра (цифрами указаны номера порядков) [2].

Рассмотрим пример отдельного спектра, изображённого слева вверху. Из рис. 8 видно, что все производные нечётных порядков подобны друг другу, а производные чётных порядков подобны друг другу и исходному спектру. Также очевидно, что нулевые значения функций нечётных порядков совпадают с экстремумами функций чётных порядков и исходного спектра, а экстремумы функций нечётных порядков совпадают с точками перегиба функций чётных порядков и исходного спектра.

С увеличением значения порядка производных увеличивается количество дополнительных структур, находящихся сбоку от пиков, которые называются сателлитами, и уменьшается значение ширины пика. Например, при переходе от исходного спектра ко второй и к четвёртой производной пик сужается в 1,3 и 1,8 раза, соответственно. С сужением пика также происходит увеличение его контрастности. Так, например, на рис. 9 можно наблюдать, что амплитуда каждого из пиков первой и второй производной намного больше амплитуды пиков при тех же

значениях абсцисс исходного спектра.

Аналогичные выводы можно сделать и при рассмотрении симметричного спектра с двумя пиками. В этом случае последовательное дифференцирование данного спектра позволяет увеличить его разрешение, т.е. буквально «вычленишь» два пика отдельно друг от друга.

В результате применения производной спектрофотометрии в работе со спектрами удаётся уменьшать ширину пиков, увеличивать их контрастность, осуществлять разрешение сильно перекрывающихся полос поглощения и избегать вклада мутности раствора (рис. 9). Всё это значительно облегчает процесс определения максимального значения данного пика в спектре [2].

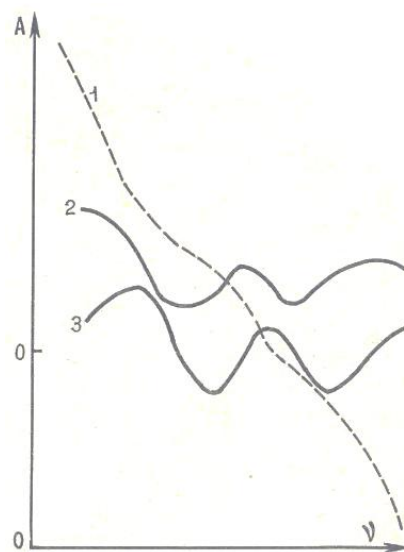


Рис. 9. Увеличение контрастности пика в первой (2) и во второй (3) производных по сравнению с исходным спектром (1) [2].

Материалы и методы исследования

1. Регистрация спектров оптической плотности при разных концентрациях гомогената сердца крысы.

В эксперименте использовали крыс-самцов Вистар массой 250-280 г. Изолированное сердце крысы промывали физиологическим раствором, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до использования.

Гомогенат ткани сердца готовили в ножевом гомогенизаторе при скорости 20000 об/мин в течение 30 секунд; соотношение массы ткани к объёму физиологического раствора составляло 1:5. Полученный гомогенат наливали в пробирки и добавляли определённые количества воды и рабочего раствора реагента (0,57 % ТБК, 10% уксусной кислоты, 0,8 % додецилсульфата натрия, pH=3,5).

Количественный и качественный состав содержимого пробирок представлен в таблице 1:

Таблица 1

№ пробирки	1	2	3	4
Объём гомогената, мл	0	0,1	0,2	0,3
Объём H ₂ O, мл	1	0,9	0,8	0,7
Объём раствора реагента, мл	2,5	2,5	2,5	2,5

Пробирки с обратным холодильником инкубировали в сухом термостате при 95°C в течение 60 мин, а затем - центрифугировали при 4400 об/мин в течение 15 мин. Полученный супернатант использовали для регистрации оптических спектров.

2. Построение калибровочных графиков.

2.1. Определение концентрации хромогена в стандарте МДА.

В эксперименте использовали раствор стандарта МДА (1,1,3,3-тетраэтоксипропана), полученный смешиванием 10 мл стандарта (массовая доля 1,1,3,3-тетраэтоксипропана – 97 %) и 100 мл дистиллированной воды. В каждую пробирку добавили по 2,5 мл рабочего раствора реагента (ТБК). Количественный и качественный состав остальных компонентов представлен в таблице 2:

Пробирки инкубировали в сухом термостате как описано выше. После окончания инкубации содержимое пробирок использовали для регистрации оптических спектров.

2.2. Определение концентрации хромогена в сыворотке крови.

В эксперименте использовали кровь здоровых добровольцев. Сыворотку крови налили в 6 пробирок, в каждую пробирку добавили по 2,5 мл раствора реагента. Объёмы сыворотки и H_2O , добавленные в каждый из образцов, представлены в таблице 3.

Таблица 2.

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Объём раствора стандарта, мл	5	10	20	30	40	50	60	70	80	100
Объём H_2O , мл	995	990	980	970	960	950	940	930	920	900
Концентрация стандарта, μM	2,201 3	4,402 6	8,805 2	13,207 9	17,610 4	22,01 3	26,415 6	30,818 2	35,220 8	44,0 6

Пробирки инкубировали в сухом термостате как описано выше, а затем центрифугировали при 4400 об/мин в течение 15 мин. Полученный супернатант использовали для регистрации оптических спектров.

Таблица 3.

№ пробирки	1	2	3	4	5	6
Объём сыворотки, мл	5	10	20	50	100	200
Объём H_2O , мл	995	990	980	950	900	800

3. Сравнение калибровочных графиков для чистого стандарта МДА и его смеси с сывороткой.

3.1. Построение калибровочного графика для раствора стандарта.

Для регистрации спектров и последующего построения калибровочного графика использовали раствор стандарта 1,1,3,3-тетраэтоксипропана, полученный смешиванием 10 мл стандарта и 400 мл дистиллированной воды. Смесь налили в 8 пробирок, в каждую пробирку добавили 2,5 мл рабочего раствора реагента. Объёмы остальных компонентов в образцах представлены в таблице 4.

Пробирки инкубировали в сухом термостате. После окончания инкубации содержимое пробирок использовали для регистрации оптических спектров.

Таблица 4.

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8
Объём раствора стандарта, мл	5	10	15	20	25	30	35	40
Объём H ₂ O, мл	995	990	985	980	975	970	965	960
Концентрация стандарта, мМ	0,55037	1,10074	1,65112	2,20149	2,75186	3,30223	3,852605	4,40298

3.2. Построение калибровочного графика для смеси раствора стандарта и сыворотки крови.

В этом эксперименте использовали тот же раствор стандарта, что и в п. 3.1. Смесь налили в 8 пробирок, в каждую пробирку добавили по 0,2 мл сыворотки и 2,5 мл рабочего раствора реагента. Объёмы растворов реагирующих веществ в образцах представлены в таблице 5.

Таблица 5

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8
Объём раствора стандарта, мл	0	5	10	15	20	25	30	40
Объём H ₂ O, мл	800	795	790	785	780	775	770	760
Объём сыворотки, мл	200	200	200	200	200	200	200	200

Пробирки инкубировали в сухом термостате, а затем центрифугировали при 4400 об/мин в течение 15 мин. Полученный супернатант использовали для регистрации оптических спектров.

4. Регистрация спектров оптической плотности триметинового комплекса в образцах крови пациентов с полиорганной патологией.

В эксперименте использовали кровь 6 пациентов с полиорганной патологией, полученную из клиники им. Е.М.Тареева в соответствии с правилами биомедицинской этики (информированное согласие, разрешение этического комитета).

Для получения достоверных результатов исследования от каждого пациента взяли по 2 пробы сыворотки, объёмом 0,2 мл каждая, и добавили в них по 0,8 мл H₂O и 2,5 мл рабочего раствора реагента. Пробирки инкубировали в сухом термостате, а затем центрифугировали при 4400 об/мин в течение 15 мин. Полученный супернатант использовали для регистрации оптических спектров. Значение оптической плотности для

образцов каждого пациента получали путём вычисления среднего арифметического значения обеих проб.

В другом эксперименте использовали спектры оптической плотности проб цельной крови 4 пациентов с полиорганной патологией, полученную из клиники им. Е.М.Тареева в соответствии с правилами биомедицинской этики (информированное согласие, разрешение этического комитета). Спектры были зарегистрированы в стандартных условиях, описанных ранее для сыворотки.

5. *Параметры спектрофотометрии.*

Спектры оптической плотности получали на спектрофотометре, программное обеспечение которого позволяет вычислять производные спектров. Сканирование осуществляли в диапазоне от 500 до 600 нм со скоростью 50 нм/мин; ширина щели – 2 нм; длина оптического пути – 1 см. Полученные спектры в каждом вышеописанном эксперименте дифференцировали с $\Delta\lambda = 17$ нм. Базовую линию прописывали между кюветами с рабочим раствором реагента (2,5 мл + 1 мл H₂O). Образцом сравнения при регистрации спектров служил тот же раствор. Амплитуды исходного спектра и его четвёртой производной измерялись от нуля до максимума при 532 нм (рис. 9,*a*; рис. 10,*a*)

6. *Материалы и оборудование.*

Гомогенат ткани готовили в ножевом гомогенизаторе «Ultra-turax» (Германия). Пробирки инкубировали в сухом термостате «Grant QBD4» (Великобритания) при 95 °С. Образцы крови, сыворотки, тканей хранили до измерений при -80 °С в морозильной камере «Sanyo MDF-U52V» (Япония). Экспериментальные животные – крысы-самцы линии Вистар – получены из питомника «Столбовая» с соответствующим сертификатом качества.

Использувавшаяся в экспериментах кровь была отобрана у добровольцев – пациентов Клиники нефрологии профессиональных болезней им. Е.М.Тареева. Воду для приготовления растворов очищали на установке «EASYPure II» (Германия), pH растворов доводили на приборе «Sartorius PB-11» (США). Центрифугирование пробирок проводили на центрифуге «Eppendorf-5417R» (США) при 4400 об/мин в течение 15 мин. Спектры оптической плотности получали на спектрофотометре «Cintra 10e» (Австралия), программное обеспечение которого позволяет вычислять производные спектров.

Рабочий раствор реагента состоит из 0,67% ТБК, 10% уксусной кислоты и 0,8% додецилсульфата натрия, pH = 3,5.

Результаты и обсуждение

1. Спектры оптической плотности сердца крысы Вистар.

Для демонстрации чувствительности метода определения концентрации МДА проведён эксперимент с гомогенатом сердца крысы. Как видно на рис. 9 величина максимальной оптической плотности триметинового комплекса пропорциональна концентрации гомогената. Это свидетельствует о корректности выбранных условий проведения реакции.

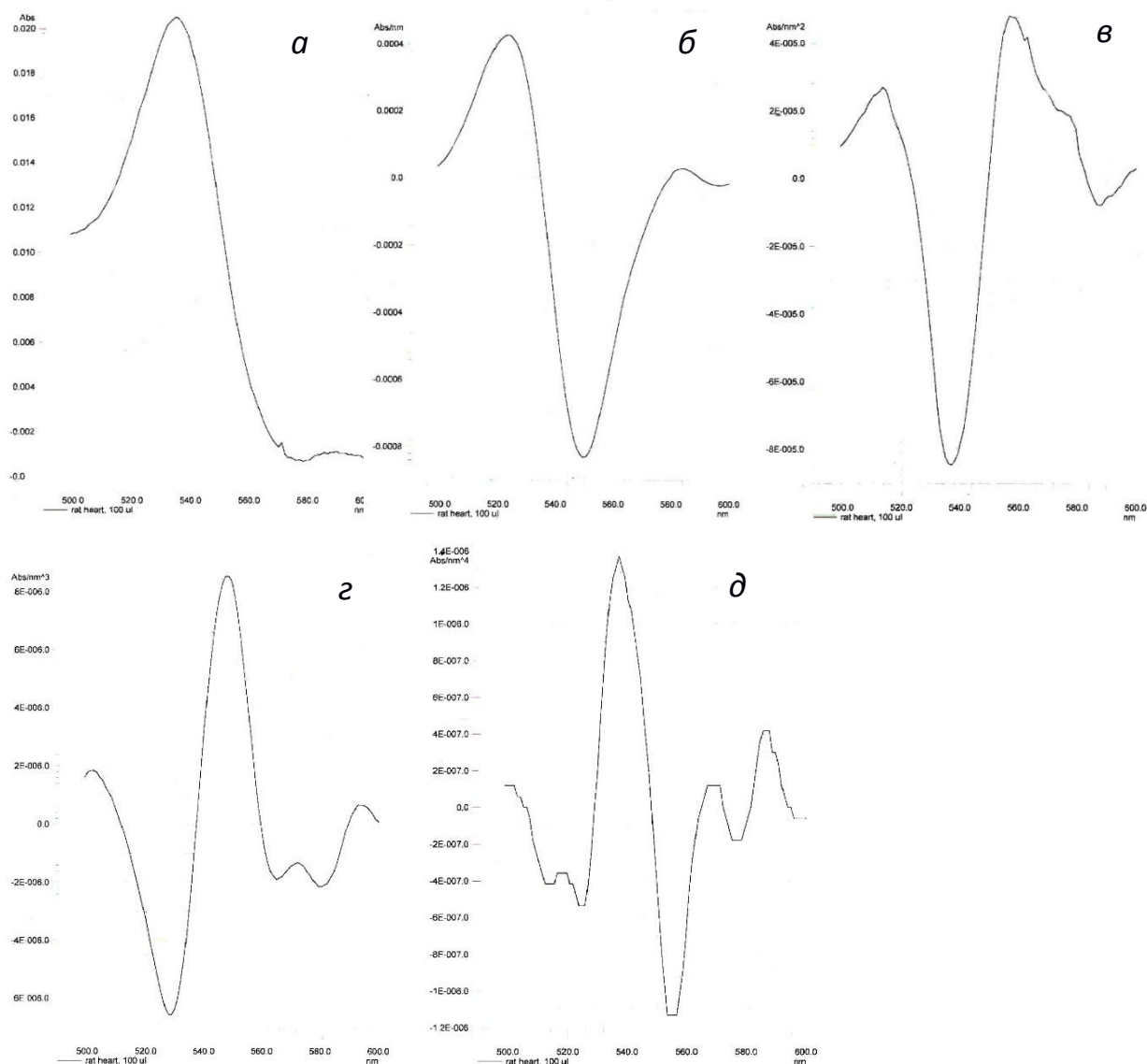


Рис. 9. Спектр оптической плотности ТБК-активных продуктов ткани сердца крысы (а), а также первая (б), вторая (в), третья (г) и четвертая (д) производные спектра.

2. Спектры оптической плотности в различных образцах.

При сравнении спектров оптической плотности, зарегистрированных в стандарте МДА, в гомогенате сердца крысы Вистар, в сыворотке крови и в цельной крови пациентов, видно, что выраженность пика при 532 нм в этом ряду убывает. Под каждым спектром приведена соответствующая четвёртая производная (рис. 10 и рис. 11).

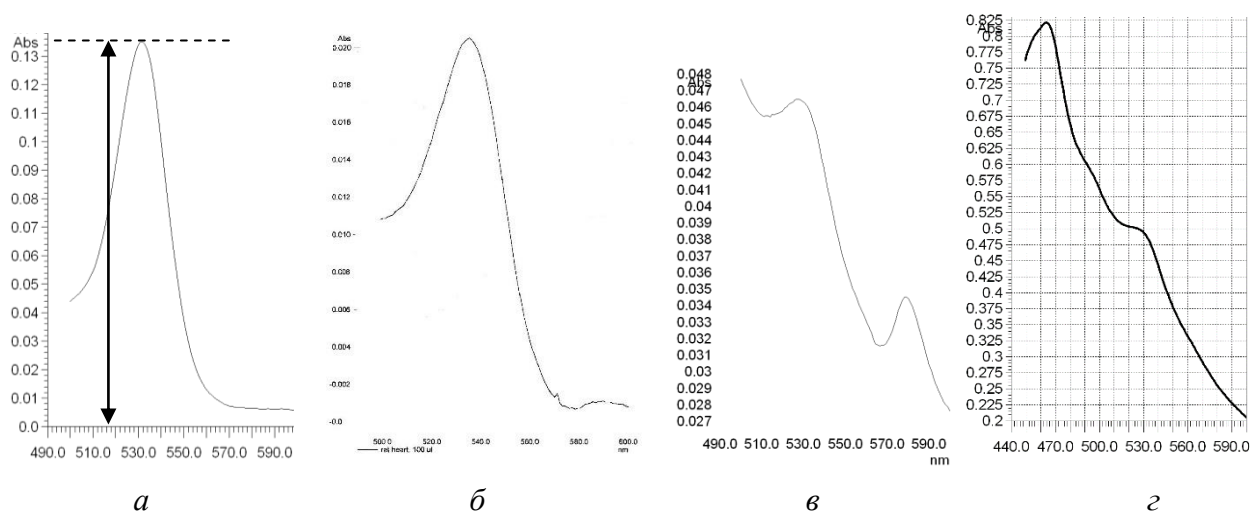


Рис. 10. Спектры оптической плотности в различных образцах: в стандарте МДА (а), в гомогенате сердца крысы (б), в сыворотке крови пациентов (в), в цельной крови пациентов (г).

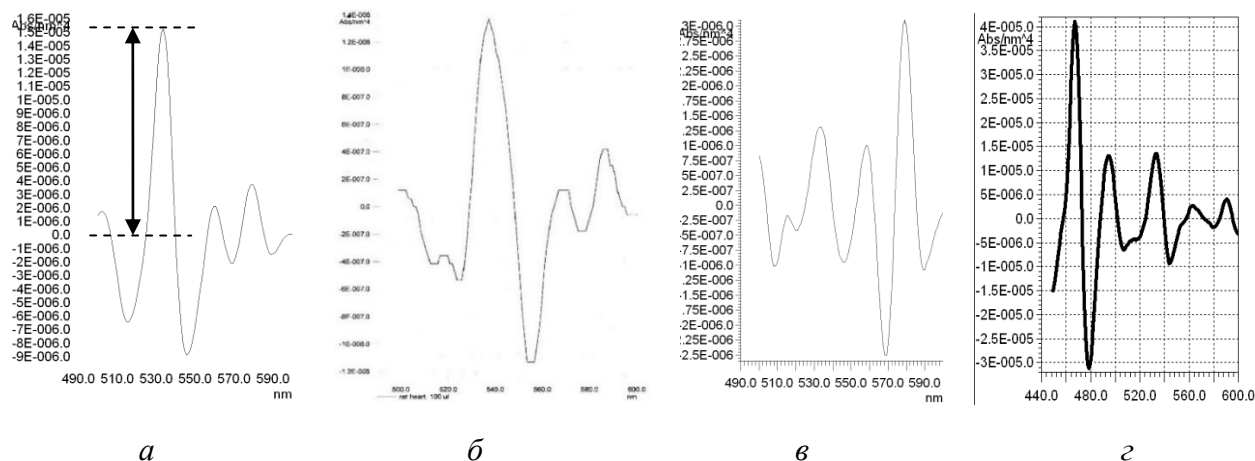


Рис. 11. Четвёртые производные спектров оптической плотности в различных образцах: в стандарте МДА (а), в гомогенате сердца крысы (б), в сыворотке крови пациентов (в), в цельной крови пациентов (г).

Исходя из приведённых рисунков (10 и 11) можно утверждать следующее:

- 1) Легче всего можно выявить пик оптической плотности при 532 нм в исходном спектре гомогената сердца (если не считать спектра стандарта малонового диальдегида, т. к. он является эталоном с чётко выраженным пиком), а сложнее всего – в спектре цельной крови. Сыворотка крови занимает промежуточное положение. Как уже обсуждалось выше, такое явление обуславливается наличием множества хромогенов и ТБК-активных реагентов в крови человека, чего не наблюдается в остальных тканях (в т. ч. и в сердечной мышце).
- 2) Из первого утверждения следует, что определить концентрацию МДА в крови гораздо труднее, чем в остальных тканях организма. Однако наиболее доступным и значимым биологическим образцом пациента является именно кровь (поэтому данное исследование направлено на разработку приемлемого усовершенствования метода определения концентрации МДА в крови).
- 3) Положение пика оптической плотности при 532 нм на четвёртых производных тех же спектров не зависит от вида исследуемого биологического образца, т.е. все пики чётко выявлены, позволяют с достаточной точностью определить оптическую плотность образцов при данной длине волны. Это подтверждает корректность выбранного нами метода.
- 4) Как и было оговорено выше, с увеличением порядка производной увеличиваются количество и амплитуда сателлитов изучаемого пика, что соответствует теории метода производной спектрофотометрии.
- 5) Исходный спектр МДА в цельной крови более трудноразличим, чем в сыворотке. Напомним, что это обуславливается наличием большего количества ТБК-реактивных веществ и прочих хромогенов. Поэтому, во избежание ошибок и более надёжной разработки метода, основная часть работы выполнена на образцах сыворотки, которая, как и цельная кровь, имеет большую клиническую значимость.

3. Построение калибровочных графиков.

3.1. Стандарт МДА.

Для определения концентрации МДА по спектрофотометрическому методу необходимо построить калибровочный график. Получив значение оптической плотности исследуемого образца, можно с достаточной точностью по этому графику установить концентрацию искомого вещества в этом образце (в данном случае – МДА).

Примеры таких калибровочных графиков приведены на рис. 12. Эти графики построены на основе данных, полученных в эксперименте №2.1, где были использованы образцы со стандартом МДА.

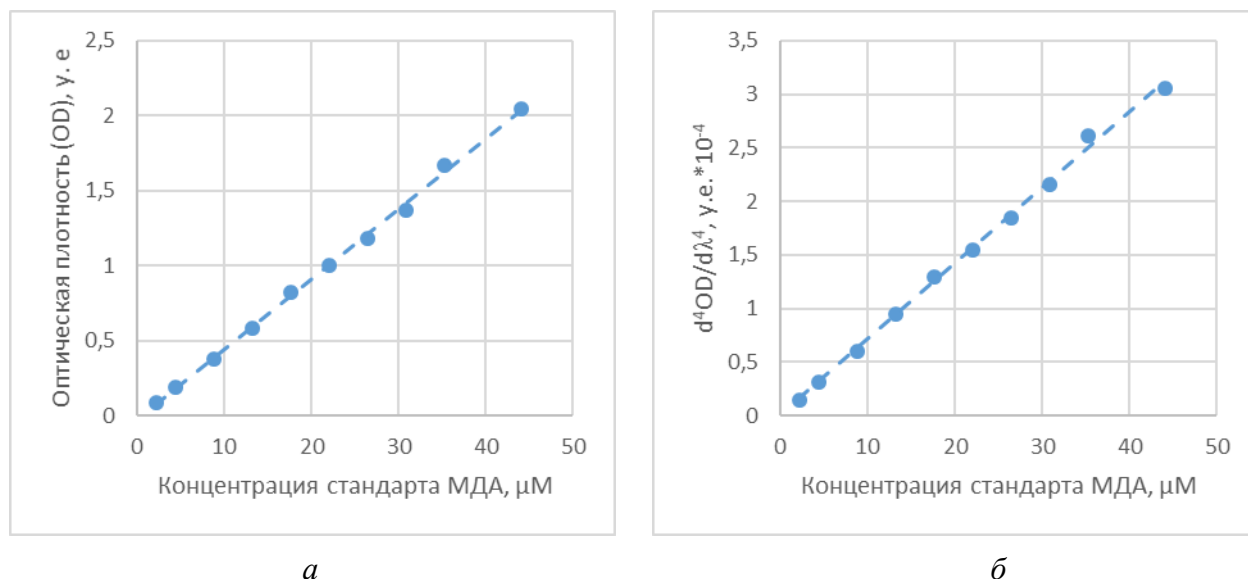


Рис. 12. Калибровочные графики, построенные на основе данных оптической плотности образцов со стандартом МДА при 532 нм исходных спектров (а) и их четвёртых производных (б).

Из рис. 12 видно, что калибровочные графики стандарта МДА и по исходным спектрам, и по их четвёртым производным очень близки к графику прямой. Обе полученные прямые пересекают нулевую точку координат. Это говорит о том, что метод дифференцирования спектров не нарушает линейную зависимость оптической плотности образца от концентрации МДА в нём ($A=\epsilon cl$) в пределах выбранного диапазона концентрации (до 44 μM).

3.2. Сыворотка крови.

Для сыворотки крови на основе эксперимента №2.2 были построены такие же калибровочные графики, как в предыдущем пункте. Полученные зависимости представлены на рис. 13.

Из этого рисунка можно заметить, что расположение точек на рис. 13б больше соответствует графику линейной зависимости, чем точек на рис. 13а. На графике «б» прямая проходит значительно ближе к точке начала координат по сравнению с прямой на графике «а». Это свидетельствует о большей корректности определения концентрации МДА в сыворотке крови по методу производной спектров по сравнению с исходными спектрами оптической плотности. Следовательно, как и было предположено выше, для точного

определения концентрации МДА в образце корректнее пользоваться значениями графиков четвёртых производных получаемых спектров при 532 нм.

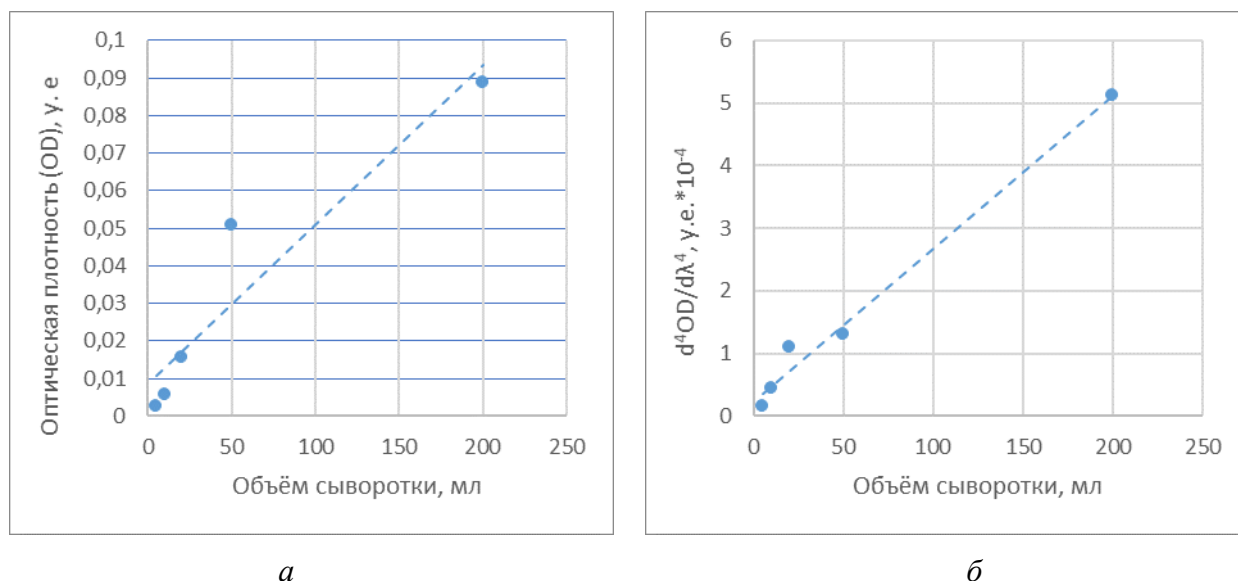


Рис. 13. Концентрационная зависимость величины оптической плотности (а) и амплитуды четвёртой производной (б) при 532 нм от различных объемов сыворотки крови.

Кроме того, линейность графика, приведённого на рис. 13б, подтверждает корректность выбранного метода и по другой причине. Она заключается в том, что из-за определённых эффектов, возникающих в образцах с высокими концентрациями хромогена при регистрации спектров, калибровочный график может выйти из области линейной функции, и происходит т.н. «загиб прямой». Это приводит к ошибочным результатам при определении концентрации исследуемого вещества в образце. Однако на данном графике такое явление не наблюдается, а значит, в целом, при исследовании небольших объёмов сыворотки крови вышеописанные эффекты не влияют на полученный результат.

3.3. Смесь раствора стандарта МДА и сыворотки крови.

Как было сказано ранее, основной трудностью определения концентрации МДА в сыворотке крови является наличие в ней множества окрашенных и/или реагирующих с ТБК компонентов, изменяющих значение оптической плотности. В результате этого наличие сыворотки в образце МДА должно сдвинуть калибровочный график в область более высоких значений оптической плотности.

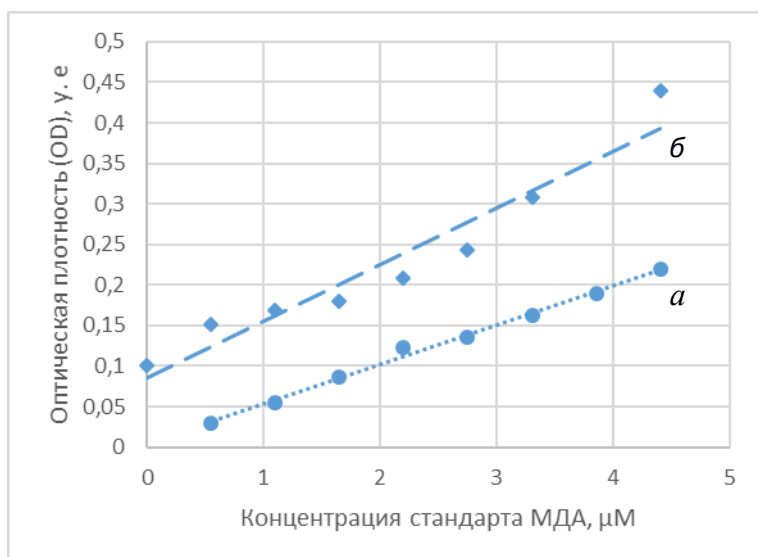


Рис. 14. Графики зависимости значений спектров оптической плотности (при 532 нм) проб без сыворотки (а) и с сывороткой (б) от концентрации МДА в пробе.

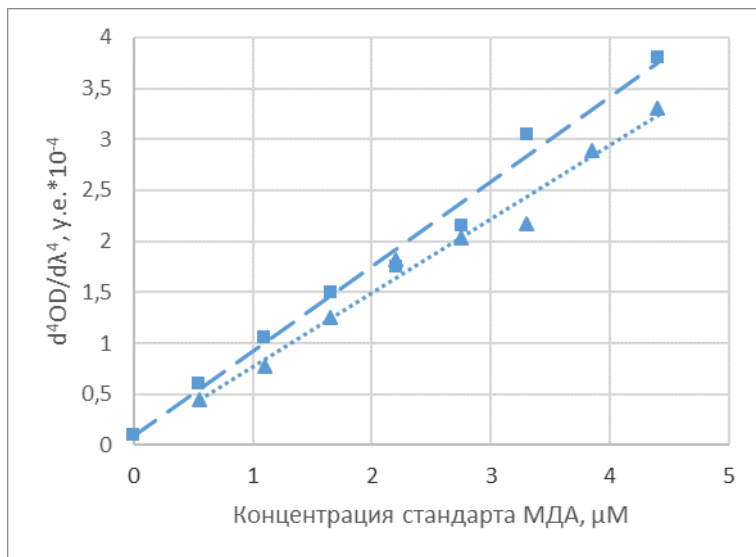


Рис. 15. Графики зависимости значений четвертых производных спектров (при 532 нм) проб без сыворотки (а) и с сывороткой (б) от концентрации МДА в пробе.

не наличием посторонних компонентов (при дифференцировке спектров их вклад значительно снижается), а присутствием определённого количества МДА в сыворотке.

Для демонстрации вышеизложенного на основании данных, полученных в экспериментах № 3.1 и 3.2, где сначала построили калибровочный график стандарта МДА, а затем к каждой исследуемой пробе добавляли по 0,2 мл сыворотки крови, построили графики зависимости значений спектров оптической плотности (рис. 14) и их четвертых производных (рис. 15) от концентрации стандарта МДА.

Как и следовало ожидать, график «б» на рис. 14 смещён относительно графика «а» примерно на 0,1 у.е. выше. Это доказывает то, что сыворотка крови вносит собственный вклад в значение оптической плотности исследуемого образца, но в целом не влияет на линейность концентрационной зависимости.

Что касается рис. 15, то на нём график «б» сдвинут относительно графика «а» незначительно, что обуславливается

4. Спектры оптической плотности образцов сыворотки крови пациентов с полиорганной патологией.

У разных пациентов вклад мешающих определению МДА компонентов крови может быть различным. Четвертая производная спектра позволяет избежать ошибки, связанной с примесью этих компонентов.

Для демонстрации этого полученные в ходе эксперимента №4 значения спектров (при 532 нм) оптической плотности сыворотки крови, отобранной у шести разных пациентов, были расположены на графике по возрастанию. На этом же графике поместили значения четвёртых производных полученных спектров сыворотки тех же пациентов при 532 нм (рис. 16).

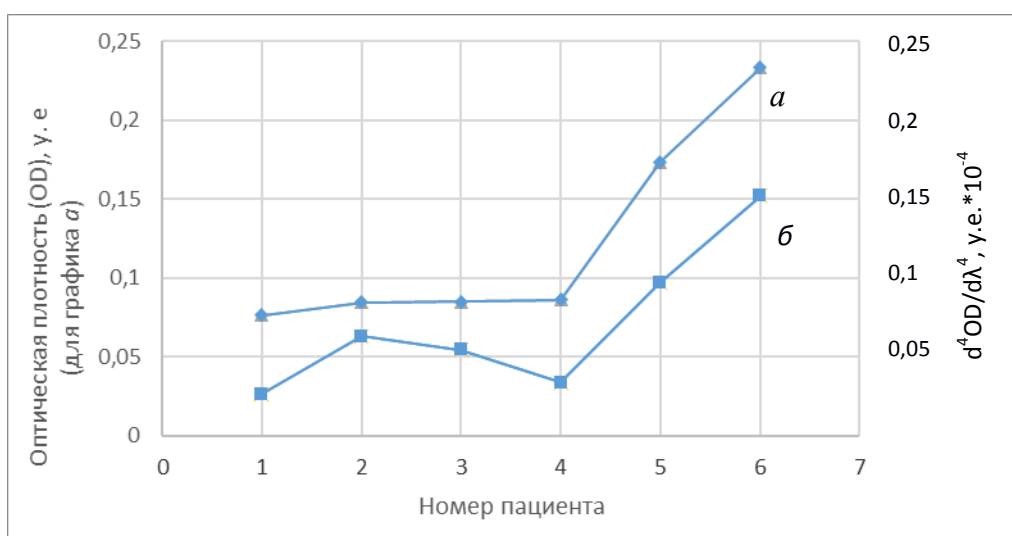


Рис. 16. График, на котором упорядочены значения спектров оптической плотности (а) и их четвёртых производных (б) образцов шести разных пациентов при 532 нм. Возрастание номеров пациентов соответствует возрастанию значений спектров оптической плотности их образцов (указано на оси абсцисс).

Как видно из рис. 16, ход полученной кривой «а» не совпадает с ходом кривой «б», что может быть причиной существенной ошибки в диагностике состояния больных, например №2 и №4. Действительно, при определении концентрации МДА по спектру между этими пациентами разница отсутствует и, таким образом, им может быть предложена одинаковая терапия. Однако при определении концентрации МДА с помощью четвёртой производной, что исключает влияние посторонних соединений, видно, что у больного №4 концентрация продуктов ПОЛ вдвое ниже, чем у больного №2, который нуждается в коррекции оксидативного стресса.

Заключение

Из приведённых выше экспериментов мы установили, что при наличии примесей в исследуемом образце затрудняется его спектрофотометрический анализ. Это служит причиной того, что метод определения концентрации МДА в крови, основанный на значениях спектров оптической плотности при 532 нм, не является корректным. Гораздо более достоверные сведения можно получить при использовании значений четвёртых производных тех же спектров при той же длине волны.

В соответствии с этим, в результате проведенной работы были сформулированы следующие выводы:

1. Спектрофотометрия триметинового комплекса (продукта реакции МДА с ТБК) в образцах тканей и крови показала, что «чистота» спектров убывает в ряду: стандарт МДА > сердце > сыворотка крови > цельная кровь.
2. Оптимальными условиями получения четвёртой производной спектров триметинового комплекса в крови являются: ширина щели монохроматора – 2 нм, скорость развёртки спектра – 50 нм/мин, $\Delta\lambda = 17$ нм.
3. Четвертая производная спектров оптической плотности при анализе уровня МДА в крови или сыворотке позволяет получить корректные величины концентрации, в отличие от анализа с использованием самих спектров.

Список использованной литературы

1. Буеверов А. О. Оксидативный стресс и его роль в повреждении печени //Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2002. – Т. 12. – №. 4. – С. 21-25.
2. Дубровкин И. М., Беликов В. Г. Производная спектрометрия. Теория, техника, применение. – Издательство Ростовского университета, 1988. – С. 8-10.
3. Кондрахин И. П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник — М.: Колос, - 2004. — 520 с.
4. Кулинский В. И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита //Соросовский образовательный журнал. – 1999. – Т. 1. – №. 38. – С. 2.
5. Малондиальдегид // Википедия. [2013—2013]. Дата обновления: 07.10.2013. URL: <http://ru.wikipedia.org/?oldid=58782877> (дата обращения: 07.10.2013).
6. Нагорная Н. В., Четверик Н. А. Оксидативный стресс: влияние на организм человека, методы оценки //Здоровье ребенка. – 2010. – №. 2. – С. 23.
7. Окислительный стресс // Википедия. [2015—2015]. Дата обновления: 22.06.2015. URL: <http://ru.wikipedia.org/?oldid=71625619> (дата обращения: 22.06.2015).
8. Потехин А.А., Л. «Химия. Свойства органических соединений: Справочник» 1984 стр. 294-295.
9. Резяпкин В. И., Слышенков В. С., Заводник И. Б., Бурдь В. Н., Сушко Л. И., Романчук Е. И., Караедова Л. М. Лабораторный практикум по биохимии и биофизике. - Гродненский государственный университет имени Янки Купалы. - 2009.
10. Рогожин В.В.; Курилюк Т.Т.; Кершенгольц Б.М. Патент Российской федерации № 2112241 “Способ определения концентрации малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты”. – 1998
11. Тиобарбитуровая кислота // Википедия. [2013—2013]. Дата обновления: 11.08.2013. URL: <http://ru.wikipedia.org/?oldid=57640030> (дата обращения: 11.08.2013).
12. Яшин А., Яшин Я. Жидкостная хроматография маркеров окислительного стресса.

13. Janero D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury //Free Radical Biology and Medicine. – 1990. – T. 9. – №. 6. – C. 515-540.
14. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=10964. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10964>.
15. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=124886, [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/124886...](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/124886)