

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ДЕРИВАТИЗАЦИИ И БУТИЛГИДРОКСИТОЛУОЛА НА СОДЕРЖАНИЕ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В ГОМОГЕНАТАХ ПЕЧЕНИ

А.Д. Конев^{1*}, И.В. Аксенов¹, В.А. Тутельян^{1,2}¹Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, 109240, Москва, Устьинский пр., 2/14; *e-mail: konevtonyion@gmail.com²Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119048, Москва, Трубецкая ул., 8

Малоновый диальдегид (МДА) — продукт перекисного окисления липидов, который широко используется в качестве маркера окислительного стресса в медико-биологических исследованиях. Обнаруживаемые при этом уровни МДА могут существенно различаться, что может быть связано с его образованием *in vitro* в процессе пробоподготовки. Целью работы был анализ методических причин завышения содержания МДА в печени и поиск подходов для устранения недостатков этого метода. Количество МДА оценивали путём его дериватизации с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) с последующим анализом методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием. Повышение температуры дериватизации не оказывало значимого влияния на интенсивность образования комплекса МДА-ТБК при использовании стандартных растворов МДА, однако приводило к резкому увеличению его содержания в гомогенатах печени, чему дозависимо препятствовало включение бутилгидрокситолуола (БГТ) в состав реакционной смеси. Полученные результаты могут быть использованы при разработке методов анализа МДА в органах и тканях, а также для интерпретации релевантных данных медико-биологических исследований.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов; малоновый диальдегид; температура дериватизации; бутилгидрокситолуол; 2-тиобарбитуровая кислота; гомогенат печени

DOI: 10.18097/BMCRM00215

ВВЕДЕНИЕ

Окислительный стресс тесно связан с патогенезом целого ряда заболеваний [1] и характеризуется интенсивным образованием активных форм кислорода, что приводит к интенсификации перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот и их распаду до малонового диальдегида (МДА) [2].

МДА является распространенным маркером окислительного стресса [1-3]. При этом, согласно данным литературы, выявленное количество МДА в печени может существенно варьировать: от 3.78 нмоль/мг белка [4, 5] до 5000 нмоль/мг белка [6, 7]. Различия могут быть обусловлены образованием МДА в условиях *in vitro* при нагревании до 100°C на этапе дериватизации с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [2, 8].

Методическим подходом для предупреждения образования МДА из-за высоких температур инкубации и окисления биоматериала может являться включение синтетического антиоксиданта бутилгидрокситолуола (БГТ) в состав реакционной смеси [9, 10].

Цель исследования – анализ методических причин завышения содержания МДА в печени и поиск подходов для устранения недостатков метода.

МЕТОДИКА

Содержание МДА изучали в приготовленном согласно [11] однократно размороженном пулированном гомогенате печени (масса навески / объём буфера (154 М КСl в 0.05 М Трис-НСl (рН 7.4)) = 1/4; концентрация белка –

34 мг/мл) крыс самцов линии Wistar, получавших стандартный полусинтетический рацион [12]. В работе использовали 1,1,3,3-тетраметоксипропан ($\geq 99\%$, “Acros Organics”, Бельгия) в качестве стандарта МДА, а также ТБК ($\geq 98\%$, “Sigma”, США), H_3PO_4 (85%, “Merck”, Германия), додецилсульфат натрия ($\geq 97\%$, “Merck”), БГТ ($\geq 99\%$, “CDH”, Индия), CH_3OH ($\geq 99.8\%$, “J.T.Baker”, Нидерланды), KH_2PO_4 (хч, “Реахим”, Россия), деионизованную воду.

При изучении влияния температурного фактора в реакционную смесь объемом 1.0 мл, включающую 740 мкл 0.1% H_3PO_4 , 200 мкл 0.6% ТБК, 60 мкл 8.1% додецилсульфата натрия, вносили 100 мкл 10 мкМ стандартного раствора МДА или разведенных в 10 раз гомогенатов печени.

Реакционную смесь инкубировали 30 мин при каждой температуре в диапазоне от 55°C до 95°C с шагом в 5°C; охлаждали на ледяной подложке 10 мин. После центрифугирования при 10000 g и 4°C в течение 15 мин отбирали надосадок, который исследовали с использованием системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (Хроматрон 1411, “Лабтех”, Россия). Хроматограф был оснащён колонкой Eclipse XDB-C18 (4.6x150 мм, 5 мкм; “Agilent”, США), флуориметрическим детектором RF-20A/20Axs (“Shimadzu”, Япония). Измерения проводили при длинах волн $\lambda_{ex}=527$ нм, $\lambda_{em}=551$ нм. Подвижная фаза состояла из 0.05 мМ KH_2PO_4 (рН 6.8) и CH_3OH в соотношении 6/4 соответственно; скорость потока – 1 мл/мин; объём вкола – 50 мкл; продолжительность анализа – 6 мин.

При изучении эффектов БГТ его растворяли в CH_3OH для получения растворов с концентрацией 2.5-125000 мкМ и добавляли полученные растворы в объёме 27.5 мкл к



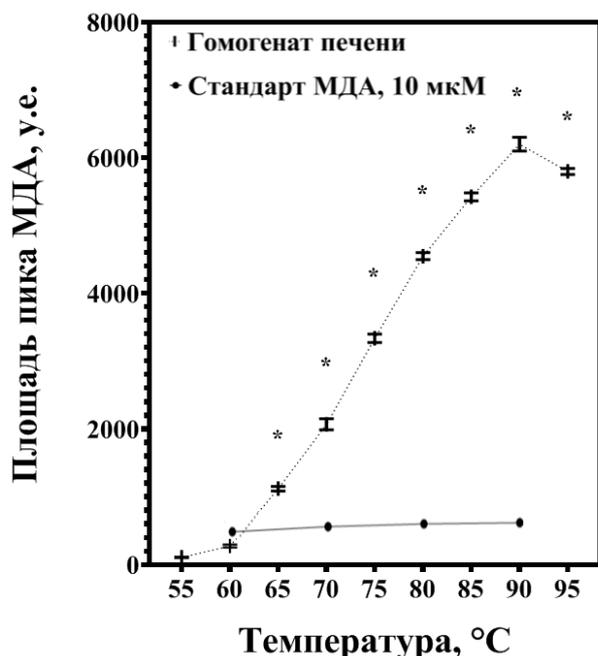


Рисунок 1. Влияние температуры инкубации реакционной смеси на содержание МДА при использовании стандартного раствора МДА и гомогената печени ($M \pm m$; $n=3$). * – $p < 0.05$ значимые различия по сравнению с результатом, полученным на предыдущем шаге повышения температуры.

реакционной смеси для получения диапазона концентраций антиоксидантера 0.0625 мкМ - 3125 мкМ, снижая содержание кислоты (0.1% H_3PO_4) до 712.5 мкл. Реакционную смесь инкубировали при 90°C.

Для установления статистически значимых ($p < 0.05$) различий использовали дисперсионный анализ и *post hoc* тест множественного сравнения Tukey после предварительной проверки на нормальность распределения (тест D'Agostino & Pearson) и равенство дисперсий (тест Brown-Forsythe) с помощью программы GraphPad Prism 8.0.1 ("GraphPad Software", США). Данные представлены в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для стандартного 10 мкМ раствора МДА возрастание температуры инкубации реакционной смеси с 60°C до 90°C не оказывало значимого влияния на интенсивность образования комплекса МДА-ТБК (рис. 1). В гомогенатах печени повышение температуры с 55°C до 90°C сопровождалось резким возрастанием уровня МДА (в 57 раз), наиболее выраженным при нагревании с 60°C до 65°C (в 4 раза). При этом содержание МДА статистически значимо увеличивалось при каждом подъёме температуры, за исключением результатов, полученных при 60°C ($p > 0.05$) и 95°C.

Добавление к реакционной смеси антиоксиданта БГТ дозозависимо препятствовало росту уровня МДА в гомогенате печени при нагревании до 90°C (рис. 2). В максимальной изученной концентрации (3125 мкМ в реакционной смеси) БГТ на 92% уменьшал содержание МДА по сравнению с образцом, не содержащим БГТ. При этом каждое пошаговое увеличение концентрации

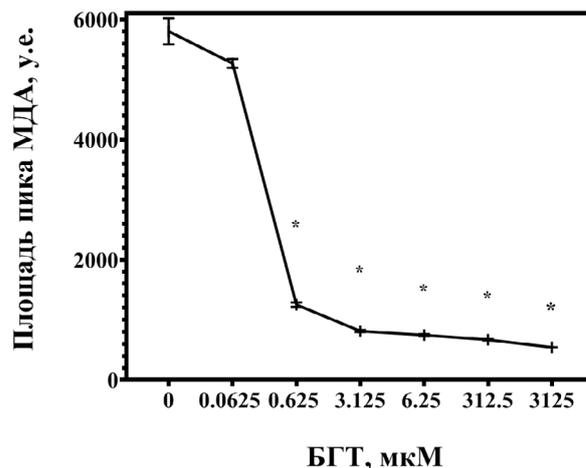


Рисунок 2. Влияние БГТ на содержание МДА в гомогенате печени при температуре инкубации реакционной смеси 90°C ($M \pm m$; $n=6$). * – $p < 0.05$ значимые различия по сравнению с результатом, полученным на предыдущем шаге повышения концентрации БГТ.

БГТ в реакционной смеси приводило, начиная с уровня в 0.0625 мкМ, к статистически значимому снижению уровня МДА в гомогенате печени, наиболее выраженному при возрастании содержания БГТ с 0.0625 мкМ до 0.625 мкМ (в 4.5 раза).

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено последовательное возрастание содержания МДА в гомогенатах печени при увеличении температуры реакционной смеси до 90°C, чему дозозависимо препятствовало внесение БГТ. Возможной причиной накопления МДА при повышении температуры инкубации может являться интенсификация перекисного окисления липидов *in vitro* вследствие катализа образования свободных радикалов металлами переменной валентности (в т.ч. железо и медь) (как входящими в состав геминных соединений (в т.ч. гемоглобин и цитохромы), так и высвобождающимися вследствие разрушения их комплексов с белками) [13-15], что подтверждается установленным в настоящей работе эффектом антиоксиданта БГТ.

Наряду с этим, при увеличении температуры инкубации образование нового МДА полностью не подавлялось внесением БГТ (при 90°C антиоксидант лишь в 11 раз уменьшал 57-кратный рост МДА-ТБК относительно 55°C), что свидетельствует о дополнительном вкладе иных процессов, например связанных с выходом МДА из его комплексов с биомолекулами [3, 16-18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований показано, что:

- в стандартных растворах МДА температура инкубации не оказывает существенного влияния на образование его комплекса с ТБК;
- в гомогенате печени возрастание температуры инкубации приводит к повышению уровня МДА, вероятно, обусловленному интенсификацией перекисного окисления липидов металлами переменной валентности;

• в гомогенате печени БГТ подавляет вызванное температурой возрастание содержания МДА пропорционально своей концентрации в реакционной смеси.

Таким образом, введение нового этапа с БГТ при определении МДА в печени препятствует искусственному завышению результатов, что следует учитывать при оптимизации схожих методик анализа и интерпретации релевантных данных, полученных в медико-биологических исследованиях.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было выполнено с использованием биологического материала (печень), полученного от крыс в рамках эксперимента, проводимого согласно ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» и одобренного Этическим комитетом Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания (НИР № FGMF-2023-0006).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Janero, D.R. (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.*, **9**(6), 515-540. DOI: 10.1016/0891-5849(90)90131-2

2. Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N. (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **15**(4), 316-328. DOI: 10.1016/j.numecd.2005.05.003

3. Tsikas, D. (2017) Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem.*, **524**, 13-30. DOI: 10.1016/j.ab.2016.10.021

4. Romuk, E.B., Szczurek, W., Nowak, P.G., Hudziec, E., Chwalinska, E., Birkner, E. (2016) Effects of propofol on the liver oxidative-antioxidant balance in a rat model of Parkinson's disease. *Adv. Clin. Exp. Med.*, **25**(5), 815-820. DOI: 10.17219/acem/36459

5. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**(2), 351-358. DOI: 10.1016/0003-2697(79)90738-3

6. Koyu, A., Gokcimen, A., Ozguner, F., Bayram, D.S., Kocak, A. (2006) Evaluation of the effects of cadmium on rat liver. *Mol. Cell. Biochem.*, **284**, 81-85. DOI: 10.1007/s11010-005-9017-2

7. Draper, H.H., Hadley, M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **186**, 421-431. DOI: 10.1016/0076-6879(90)86135-i

8. Domijan, A.M., Ralic, J., Brkanac, S. R., Rumora, L., Zanic-Grubisic, T. (2015) Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL - application to various biological samples. *Biomed. Chromatogr.*, **29**(1), 41-46. DOI: 10.1002/bmc.3361

9. Pikul, J., Leszczynski, D.E., Kummerow, F.A. (1983) Elimination of sample autoxidation by butylated hydroxytoluene additions before thiobarbituric acid assay for malonaldehyde in fat from chicken meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **31**(6), 1338-1342. DOI: 10.1021/jf00120a047

10. Pikul, J., Leszczynski, D.E. (1986) Butylated hydroxytoluene addition improves the thiobarbituric acid assay for malonaldehyde from chicken plasma fat. *Nahrung*, **30**(7), 673-678. DOI: 10.1002/food.19860300708

11. Biochem. Toxicol.: A Practical Approach, *Lake B.G.* 1987, Oxford University Press: Oxford. p. 183-212.

12. Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey Jr., G.C. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, **123**(11), 1939-1951. DOI: 10.1093/jn/123.11.1939

13. Repetto, M. G., Ferrarotti, N. F., Boveris, A. (2009) The involvement of transition metal ions on iron-dependent lipid peroxidation. *Archives of Toxicology*, **84**(4), 255-262. DOI: 10.1007/s00204-009-0487-y

14. Miller, D.M., Buettner, G.R., Aust, S.D. (1990) Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic. Biol. Med.*, **8**(1), 95-108. DOI: 10.1016/0891-5849(90)90148-c

15. Vladimirov, Y.A., Archakov, A.I. (1972) *Perekisnoe okislenie lipidov v biolohicheskix membranah*, Nauka: Moscow. p. 52-95.

16. Tuma, D.J. (2002) Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic. Biol. Med.*, **32**(4), 303-308. DOI: 10.1016/s0891-5849(01)00742-0

17. Niemelä, O., Parkkila, S., Ylä-Herttua, S., Villanueva, J., Ruebner, B., Halsted, C.H. (1995) Sequential acetaldehyde production, lipid peroxidation, and fibrogenesis in micropig model of alcohol-induced liver disease. *Hepatology*, **22**(4), 1208-1214. DOI: 10.1016/0270-9139(95)90630-4

18. Chen, J., Petersen, D.R., Schenker, S., Henderson, G.I. (2000) Formation of malondialdehyde adducts in livers of rats exposed to ethanol: role in ethanol-mediated inhibition of cytochrome c oxidase. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **24**(4), 544-552. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2000.tb02023.x

Поступила: 29.03.2024
 После доработки: 28.05.2024
 Принята к публикации: 31.05.2024

INFLUENCE OF DERIVATIZATION TEMPERATURE AND BUTYLATED HYDROXYTOLUENE ON THE CONTENT OF MALONDIALDEHYDE IN LIVER HOMOGENATES

A.D. Konev^{1*}, I.V. Aksenov¹, V.A. Tutelyan^{1,2}

¹Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety,
2/14 Ustinsky pas., Moscow, 109240 Russia; *e-mail: konevtonyion@gmail.com

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8 Trubetskaya str., Moscow, 119048

Malondialdehyde (MDA) is a product of lipid peroxidation that is widely used as a marker of oxidative stress in biomedical research. Detectable levels of MDA can vary significantly, which may be due to its formation *in vitro* during sample preparation. The purpose of the work was to analyze the methodological reasons for overestimating the malondialdehyde content in the liver and to find approaches to eliminate the flaws of the method. The amount of MDA was estimated by its derivatization with 2-thiobarbituric acid (TBA) with subsequent analysis by HPLC with fluorimetric detection. Increasing the derivatization temperature had no significant effect on the intensity of MDA-TBA complex formation when standard MDA solutions were used, but led to a sharp increase in its content in liver homogenates, which was dose-dependently prevented by the inclusion of butylhydroxytoluene (BHT) in the reaction mixture. The results obtained may be in demand for the development of methods for the analysis of MDA in organs and tissues, as well as for the interpretation of relevant data from biomedical studies.

Key words: lipid peroxidation; malondialdehyde; derivatization temperature; butylated hydroxytoluene; 2-thiobarbituric acid; liver homogenate

FUNDING

This work was carried out using subsidies for the implementation of a state task in the Russian Federation (research No. FGMF-2023-0006).

Received: 29.03.2024, revised: 28.05.2024, accepted: 31.05.2024