DOI: 10.22138/2500-0918-2021-18-2-78-84

УДК 612.123

Ю.В. Болдырева[1], Ю.М. Марданов[1], И.А. Лебедев[1], М.Н. Алехина[2], Е.В. Захарчук[1], С.В. Адамчук[1]

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

[1] ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет, Тюмень, Российская Федерация;
[2] ГАУЗ ТО Городская поликлиника №8, г. Тюмень, Российская Федерация

Резюме. Охарактеризованы основы биохимических процессов, лежащих в основе повреждения клеточных мембран, и рассмотрены современные методы диагностики перекисного окисления липидов (ПОЛ). ПОЛ представляет собой цепные реакции, обеспечивающие расширенное воспроизводство свободных радикалов (активных форм кислорода), которые инициируют дальнейшее распространение ПОЛ. Активные формы кислорода могут отнимать электрон (-ы) от молекул и тем самым запускать каскад свободно-радикальных реакций окисления, в результате чего вещество становится не способным выполнять свои функции, т.к. в первую очередь происходит окисление липидов клетки, которое ведет к повреждению клеточной мембраны и гибели клетки, в целом. Высокая активность ПОЛ характерна для многих заболеваний. В связи с чем, важно уметь диагностировать уровень окислительного стресса в организме. Окислительный стресс выражается в образовании многочисленных продуктов, различающихся по химической структуре, времени жизни, токсичности и биологической активности. Анализ продуктов ПОЛ представляет интерес для оценки уровня окислительного стресса в организме, для исследования токсического, метаболического и регулирующего действия этого процесса на организм, а также для диагностики некоторых заболеваний.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, фосфолипиды, методы диагностики, антиоксидантная защита, клеточные мембраны

Конфликт интересов отсутствует.
Контактная информация автора, ответственного за переписку:
Лебедев Илья Аркадьевич
lebedef@inbox.ru
Дата поступления 03.06.2021 г.
Образец цитирования:
Болдырева Ю.В., Марданов Ю.М., Лебедев И.А., Алехина М.Н., Захарчук Е.В., Адамчук С.В. Биохимические аспекты перекисного окисления липидов. Современные методы диагностики повреждения клеточных мембран. [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2021, Том 18, №2, с. 78–84, DOI: 10.22138/2500-0918-2021-18-2-78-84

Аэробные условия существования организмов сопровождаются постоянным процессом образования активных форм кислорода (АФК). В норме образованные АФК не приводят к биохимическим патологическим изменениям клетки, поскольку в них имеется система антиоксидантной защиты (САЗ). Однако при патологических состояниях в организме (например, ишемия тканей) количество АФК возрастает и происходит дисбаланс между количеством образованных и разрушенных частиц, что приводит к накоплению в клетке АФК.

Основным источником образования АФК являются «утечки» электронов из цепи переноса электронов, локализованной в митохондриях, и их взаимодействие с кислородом. Возможен и другой сценарий. Например, кофермент Q может непосредственно контактировать с кислородом, что также может

привести к образованию АФК.

Образование АФК возможно при участии оксигеназ. Оксигеназы — ферменты, непосредственно восстанавливающие кислород, образуют пероксид водорода — H_2O_2 . К таким оксигеназам относятся: циклооксигеназы, липооксигеназы, супероксид дисмутаза, оксидазы аминокислот. Реакции идут по схеме (SH_2-субстрат): $O_2 + SH_2 \rightarrow S + H_2O_2$.

Вследствие избытка АФК происходит окисление субстратов в клетке, протекающих по свободно-радикальному механизму. Первыми мишенями для АФК являются полиненасыщенные липиды клеточной мембраны, двойные связи которых разделены метиленовой группой (-CH_2). Именно метиленовая группа будет акцептором электрона в процессе окисления. ПОЛ идет по следующей схеме:

1. Под действием АФК происходит отщепление атома Н от метиленовой группы в составе структуры (= CH – CH – CH = CH –) и образование С-центрированного радикала.
2. Перегруппировка и изомеризация системы двойных связей с образованием диенового конъюгата (= CH – CH = CH – CH =).
3. Присоединение кислорода к атому углерода, несущего неспаренный электрон, с образованием перокисил радикала (R-OO), который может превратиться в гидроперикись (R-OOH) либо за счет внутримолекулярных взаимодействий и циклизации в эндопероксиды или изопростаны.
4. Расщепление эндопероксидов с образованием малонового диальдегида и гидропероксид жирной кислоты. Малоновый диальдегид способен реагировать с белками и нуклеиновыми кислотами с образованием карбонильных производных.

Итоговыми продуктами ПОЛ являются:

1. Гидроперекиси липидов.
2. Диеновые конъюгаты.
3. Изопростаны.
4. Альдегиды.
5. Малоновый диальдегид.
6. Карбонильные производные белков.
7. Окисленные фосфолипиды.

Для оценки уровня выраженности ПОЛ применяют различные методы. Методы диагностики ПОЛ классифицируют по:

1. Субстратам ПОЛ.
2. Продуктам ПОЛ.

a) по гидроперекисям липидов;
b) по диеновым конъюгатам;
c) по изопростанам;
d) по альдегидам;
e) по малоновому диальдегиду;
f) по карбонильным производным белков;
g) по окисленным фосфолипидам.

Метод анализа субстратов ПОЛ

Субстратами ПОЛ являются полиненасыщенные жирные кислоты, основная масса которых в организме представлена линоленовой кислотой (18:2n-6) и арахидоновой кислотой (20:4n-6). Именно диагностика арахидоновой кислоты представляет большой интерес для врачей. Основным методом количественного анализа жирных кислот является газо-жидкостная хроматография (ГЖХ) с пламенно-ионизационным детектором. В исследуемый образец добавляют внутренний стандарт, которым является жирная кислота, отсутствующая в образце или присутствующая в следовых количествах.

Стоит отметить, что помимо вышеперечисленных жирных кислот, в зависимости от диеты и физического состояния, присутсвуют: γ-линоленовая (18:3n-6), дигомо-γ-линоленовая (20:3n-6), α-линоленовая (18:3n-3), эйкозапентаеновая (20:5n-3), докозапентаеновая (22:5n-3), докозагексаеновая (22:6n-3).

Методы анализа продуктов ПОЛ

Диеновые конъюгаты. Диеновые конъюгаты способны поглощать УФ-излучения. Методы включает в себя экстракцию липидов в органических растворителях, несмешивающихся с водной фазой, и из-

DOI: 10.22138/2500-0918-2021-18-2-78-84

мерение поглощения при 223 нм. Основным представителем диеновых конъюгатов является конъюгированная линоленовая кислота (9-цис, 11-транс – 18:2).

Гидроперекиси липидов (ГПЛ). Эти вещества являются токсичными для организма. Они могут образовываться в хранящейся донорской крови, что необходимо учитывать и хранить в условиях, которые предотвращают образование гидроперекисей липидов. Основным методом количественного анализа ГПЛ является измерение продуктов реакции ГПЛ с различными соединениями. При взаимодействии ГПЛ с Fe^{2+} образуется Fe^{3+} , алкоксил и пероксил радикалы, происходит разрушение ГПЛ до альдегидов. Ионы железа можно измерить методом спектрофотометрики с использованием тиоцианата аммония. Алкоксил и пероксил радикалы в реакции с хромофором или люминифором дают окрашенные и люминесцирующие соединения, соответственно. Малоновый альдегид измеряют в реакции с тиобарбитуровой кислотой.

Для прямого анализа ГПЛ получают их стабильные производные — гидроксильные жирные кислоты. Для этого гидроперекиси восстанавливают и гидрируют с образованием насыщенных гидрокси-ЖК. Получившиеся вещества дополнительно очищают и измеряют методов ГЖХ с масс-спектрометром.

Циклические продукты перекисного окисления жирных кислот (изопростаны). Особое внимание уделяется бициклическим эндопероксидам и продуктам их восстановления — изопростанам, поскольку они обладают большой схожестью с простагландинами. Анализ изопростанов должен быть весьма высокочувствительным вследствие скудного содержания в плазме крови. Предварительно осуществляют очищение с использованием методов тонкослойной хроматографии (ТСХ) и твердофазной экстракции. Далее выполняется количественный анализ, включающий в себя масс-спектрометрию (МС), сопряженную с газожидкостной хроматографией (ГЖХ) или высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). В медицинских условиях наиболее актуальны будет метод иммуноферментного анализа (ИФА) изопростанов, обладающий высокой чувствительностью и простотой выполнения.

Альдегиды. Основными представителями альдегидов ПОЛ являются: насыщенные алкенали, ненасыщенные 2-алкенали, 2,4-алкадиенали, 4-гидрперокси- и 4-гидрокси-2-алкенали, дикарбоновые альдегиды, малоновый диальдегид. Альдегиды — наиболее рассматриваемые биомаркеры ПОЛ. Наиболее простым методом является определение малонового диальдегида (МДА). Стоит отметить, что МДА в норме может синтезироваться нашим организмом в ходе ферментативной реакции из некоторых простагландинов, а также поступает с пищей, как и другие продукты ПОЛ, что стоит учитывать и исключить прием пищи перед анализом. Также еще одним частым представителем является 4-гидрокси-2-ноненаль (ГНЕ). Он является отравляющим веществом. Методом количественного анализа альдегидов является масс-спектрофотометрия [5] с калибровочной кривой для каждого альдегида.

Карбонильные производные белков. Альдегиды способны реагировать с белками с образованием карбонильных производных белков. Аддукты белков и альдегидов весьма нестабильны, зачастую МДА высвобождается от аддукта путем гидролиза. Для обнаружения аддуктов используется иммуногистохимическое окрашивание с применением специфических ферментов, также возможно определение методом ГЖХ-МС.

Окисленные фосфолипиды. АФК атакуют в первую очередь фосфолипиды мембран, что ведет к образованию ОФЛ. Структура ОФЛ при этом может быть различной: ОФЛ могут сохранять остатки жирных кислот, могут иметь гидрокси-, энтоперокси- группы и изопростаны, либо имеют укороченный хвост, вследствие β-окисления. ОФЛ являются специфическими биомаркерами ПОЛ, как и изопростаны, поэтому их количественный анализ весьма информативен. Основным методом анализа ОФЛ является ВЭЖХ-МС/МС [5], при котором используется метод изотопного разбавления. Также возможно использование метода хемилюминесцентного ИФА.

Отдельно хочется отметить современные методы диагностики ПОЛ. Данные методы основаны на главных методиках определения ПОЛ, указанных выше. Однако же отличие заключается в определении уровня более специфичных продуктов ПОЛ, с помощью которых исследуется поражение какого-либо органа или профилактика заболеваний. Так, были разработаны несколько методик определения уровня ПОЛ в организме.

• Уровень гидроксиоктадекадиеновой кислоты (HODE) как показатель уровня окислительного стресса при нерациональном питании. Может использоваться для ранней диагностики сахарного диабета [12].

• Диагностика уровня 8-изопростагландина F2α, малонового диальдегида в мокроте дает возмож-

on-line ISSN 2500-0918
vestnikural.ru

ность определить локализацию воспалительного процесса в дыхательной системе [5-7].

• Уровень 3-нитротирозина, 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин позволяет определить глубину поражений и стадию заболевания при гепатозе, гепатитах, НАЖБП [5].

• Увеличение количества липоксинов, нейропротектинов как продукта ПОЛ может использоваться для коррекции и выбора терапии при черепно-мозговых травмах [6].

• 7-гидропероксихолестерол является биомаркером атерогенеза в организме и может применяться для предупреждения атеросклероза [10].

Принципиальным отличием является большая специфичность продуктов ПОЛ, т.е. для поражения какого-либо органа свои субстраты для определения уровня ПОЛ. Данные примеры являются одними из многих видов. Все методы ПОЛ могут использоваться совместно, с их помощью можно определять общий уровень ПОЛ в организме.

Заключение

Таким образом, уровень ПОЛ — важный диагностический показатель, поскольку увеличение активности ПОЛ сопровождается развитием того или иного заболевания в организме. Выбор вещества для анализа ПОЛ зависит от заболевания. Наибольший интерес составляют токсичные вещества, но они имеют короткий период жизни. В клинических исследованиях лучше использовать наиболее стабильные вещества. Отдельная категория — это биомаркеры ПОЛ, которые дают наиболее полную и точную картину уровня ПОЛ. При любом методе анализа уровня ПОЛ нужно иметь в виду следующие условия:

1) продукты ПОЛ не должны поступать с пищей;

2) химический состав продуктов ПОЛ соответствует исходному составу липидного субстрата;

3) хранение и пробоподготовка не ведет к дальнейшему появлению продуктов ПОЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е.Б. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты / Е.Б. Бурлакова, Н.Г. Храпова // Успехи химии. 1998. Т.52. №9. С.540-558.

2. Винокурова Е.А., Франк Н.Н., Боярских Н.В., Яскевич Н.Н. Антиоксидантная активность и перекисное окисление липидов у больных раком эндометрия // Сибирский онкологический журнал. 2007. № S1. С.125-126.

3. Забродский П.Ф. Влияние дихлорэтана на показатели системы иммунитета и перекисного окисления липидов / П.Ф. Забродский, В.Г. Лим, Н.М. Трошкин // Вестник новых медицинских технологий. 2005. Т.XII. №2. С.16.

4. Михалкина Н.И. Интенсивность перекисного окисления липидов в микросомах внутренних органов при стрессе после гипоксических тренировок / Н.И. Михалкина, М.К. Мурзахметова, В.К. Турмухамбетова, Р.С. Утегалиева // Вестник КазНУ им. аль-Фараби. Серия биол. 2006. №20. С.110-115.

5. Некрасов Э.В. Обзоры. Методы анализа перекисного окисления липидов в медико-биологических исследованиях. 2012. 120 с.

6. Чернова А.Л., Винокурова Е.А., Баклаева Н.Б. Состояние гемостаза и перекисного окисления липидов при лапароскопических операциях на придатках матки // Тромбоз, гемостаз и реология. 2006. № 3 (27). С.44-51.

7. Ayokanmi O., Oluseyi A.A. Oxidative Stress and Antioxidant Biomarkers in Clinical and Experimental Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease // Medicina (Kaunas). 2019. P.58-62.

8. Etsuo N. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material // Biochim Biophys Acta. 2014. P.41-47.

9. Juan C.S. Lipid Peroxidation Assay Using BODIPY-Phenylbutadiene Probes: A Methodological Overview // Methods Mol. Biol. 2021. P.24-30.

10. Leaf D.A., Kleinman M.T., Hamilton M., Barstow T.J. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation // Med. Sci. Sports Exerc. 2015. P.34-41.

11. Moazamian R., Polhemus A., Connaughton H., Fraser B., Whiting S., Gharagozloo P., Aitken R.J. Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation // Mol. Hum. Reprod. 2015. P.20-30.

12. Wood L.G., Gibson P.G., Garg M.L. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma // Eur. Respir J. 2014. P.12-16.

DOI: 10.22138/2500-0918-2021-18-2-78-84

Авторы
Болдырева Юлия Викторовна
ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет
Кандидат медицинских наук
Российская Федерация, 625023, Тюмень, улица Одесская, д. 54
ORCID: 0000-0002-3276-7615
eLibrary SPIN: 1449-4485
tgma.06@mail.ru

Марданов Юнус Муслюмович
ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет
студент лечебного факультета
Российская Федерация, 625023, Тюмень, улица Одесская, д. 54

Лебедев Илья Аркадьевич
ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет
Доктор медицинских наук
Российская Федерация, 625023, Тюмень, улица Одесская, д. 54
ORCID: 0000-0001-5405-7182
eLibrary SPIN: 6155-1308
lebedef@inbox.ru

Алехина Мария Николаевна
ГАУЗ ТО Городская поликлиника №8, г. Тюмень
Врач-терапевт
Российская Федерация, 625031, Тюмень, улица Ватутина, д. 10 Б

Захарчук Екатерина Владимировна
ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет
Ассистент
Российская Федерация, 625023, Тюмень, улица Одесская, д. 54
ORCID: 0000-0002-1317-5219;

Адамчук Софья Вадимовна
ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет
Студентка педиатрического факультета
Российская Федерация, 625023, Тюмень, улица Одесская, д. 54

Yu.V. Boldyreva[1], Yu.M. Mardanov[1], I.A. Lebedev[1], M.N. Alyokhina[2], E.V. Zakharchuk[1], S.V. Adamchuk[1]

BIOCHEMICAL ASPECTS OF LIPID PEROXIDATION. MODERN METHODS OF DIAGNOSTICS OF CELL MEMBRANE DAMAGE

[1] Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;
[2] GAU TO City polyclinic No. 8, Tyumen, Russian Federation

Abstract. The fundamentals of the biochemical processes underlying the damage of cell membranes are characterized, and modern methods of diagnosing lipid peroxidation (POL) are considered. POL is a chain reaction that provides an expanded reproduction of free radicals (reactive oxygen species), which initiate the further spread of POL. Reactive oxygen species can take an electron (s) away from molecules and, thereby,

on-line ISSN 2500-0918
vestnikural.ru

start a cascade of free radical oxidation reactions, as a result of which the substance becomes unable to perform its functions, because first of all, the oxidation of cell lipids occurs, which leads to damage to the cell membrane and cell death as a whole. High activity of sex is characteristic of many diseases. Therefore, it is important to be able to diagnose the level of oxidative stress in the body. Oxidative stress is expressed in the formation of numerous products that differ in chemical structure, lifetime, toxicity and biological activity. The analysis of POL products is of interest for assessing the level of oxidative stress in the body, for studying the toxic, metabolic and regulatory effects of this process on the body, as well as for the diagnosis of certain diseases.

Keywords: lipid peroxidation, phospholipids, diagnostic methods, antioxidant protection, cell membranes

There is no conflict of interest.
Contact details of the corresponding author:
Ilya A. Lebedev
lebedef@inbox.ru
Received 03.06.2021
For citation:
Boldyreva Yu.V., Mardanov Yu.M., Lebedev I.A., Alyokhina M.N., Zakharchuk E.V.,
Adamchuk S.V. Biochemical Aspects of Lipid Peroxidation. Modern Methods of Diagnostics of Cell Membrane Damage. [Online] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2021, Vol. 18, no. 2, pp. 78–84. DOI: 10.22138/2500-0918-2021-18-2-78-84 (In Russ)

REFERENCES

1. Burlakova E. B. Peroxidation of membrane lipids and natural antioxidants. E. B. Burlakova, N. G. Khrapova. Uspekhi khimii. 1998. Vol. 52. No. 9. pp. 540-558.

2. Vinokurova E. A., Frank N. N., Boyarskikh N. V., Yaskevich N. N. Antioxidant activity and lipid peroxidation in patients with endometrial cancer. Siberian Oncological Journal. 2007. No. S1. pp. 125-126.

3. Zabrodsky P. F. The influence of dichloroethane on the indicators of the immune system and lipid peroxidation. P. F. Zabrodsky, V. G. Lim, N. M. Troshkin. Journal of new Medical Technologies. 2005. Vol. 12. No. 2. p. 16.

4. Mikhalkina N. I. Intensity of lipid peroxidation in microsomes of internal organs under stress after hypoxic training. N. I. Mikhalkina, M. K. Murzakhmetova, V. K. Turmukhambetova, R. S. Utegalieva. Bulletin of the Al-Farabi Kazakh National University. 2006. № 20. pp. 110-115.

5. Nekrasov E. V. Reviews. Methods of analysis of lipid peroxidation in biomedical research. 2012. 120 p.

6. Chernova A. L., Vinokurova E. A., Baklaeva N. B. The state of hemostasis and lipid peroxidation during laparoscopic operations on the uterine appendages. Thrombosis, hemostasis and rheology. 2006. No. 3 (27). pp. 44-51.

7. Ayokanmi O., Olusei A. A. Oxidative stress and antioxidant biomarkers in clinical and experimental models of non-alcoholic fatty liver disease. Medicine (Kaunas). 2019. p.

58-62. 8. Etsuo N. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. Biochim Biophys Acta. 2014. p. 41-47.

9. Huang S. S. Analysis of Lipid Peroxidation Using BODYPI-Phenylbutadiene Probes: A Methodological Review. Methods Of Mol. Biol. 2021. p. 24-30.

10. List D. A., Kleinman M. T., Hamilton M., Barstow T. J. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. Med.nauka. Sports exercises. 2015. p. 34-41.

11. Moazamyan R., Polhemus A., Connaughton H., Fraser B., Whiting S., Garagoz P., Aitken R. J. Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes formed as a result of lipid peroxidation. 2015. p. 20-30.

12. Wood L. G., Gibson P. G., Garg M. L. Biomarkers of lipid peroxidation, respiratory tract inflammation and asthma. Eur. Respir J. 2014. p. 12-16.

DOI: 10.22138/2500-0918-2021-18-2-78-84

Authors
Yulia V. Boldyreva
Tyumen State Medical University
PhD
54 Odesskaya street Tyumen Russian Federation 625023
ORCID: 0000-0002-3276-7615
eLibrary SPIN: 1449-4485
tgma.06@mail.ru

Yunus M. Mardanov
Tyumen State Medical University
Student of the Faculty of Medicine
54 Odesskaya street Tyumen Russian Federation 625023

Ilya A. Lebedev
Tyumen State Medical University
MD
54 Odesskaya street Tyumen Russian Federation 625023
ORCID: 0000-0001-5405-7182
eLibrary SPIN: 6155-1308
lebedef@inbox.ru

Maria N. Alyokhina
City Polyclinic No. 8, Tyumen
General practitioner
10B Vatutina street Tyumen Russian Federation 625031

Ekaterina V. Zakharchuk
Tyumen State Medical University
Assistant
54 Odesskaya street Tyumen Russian Federation 625023
ORCID: 0000-0002-1317-5219

Sofia V. Adamchuk
Tyumen State Medical University
Student of the Faculty of Pediatrics
54 Odesskaya street Tyumen Russian Federation 625023