

ФОТОМЕТРИЯ МДА В РАСТВОРАХ: СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ПРЯМЫХ ДАННЫХ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ И АНАЛИЗА ПРОИЗВОДНЫХ СПЕКТРОВ ОПТИЧЕСКОГО ПОГЛОЩЕНИЯ

Смирнова О.Д.¹, Калашникова И.В.¹, Курбатов Г.А.²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение НИЦ «Курчатовский институт»
ул. Площадь Курчатова, 1, г. Москва, 123182, РФ; e-mail: smirnova@ksana@ya.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Ленинские горы, д. 1, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ

Поступила в редакцию 04.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0648

Аннотация. Проанализированы спектры поглощения продуктов реакции водных экстрактов тканей мышей с тиобарбитуровой кислотой, с целью определения в них содержания малонового диальдегида (МДА). Концентрация МДА является важной частью анализа окислительно-восстановительного статуса тканей, что существенно при исследовании воспалительных реакций, например, после различных стрессовых воздействий, а также при изучении старения. В обычной практике концентрацию МДА в растворе рассчитывают по его оптической плотности при 532 нм, соотнося с аналогичными растворами реакции с заданными концентрациями тетраметоксипропана (ТМП). Нами показано, что при субмикромольном содержании МДА флуктуации неспецифического фонового уровня оптической плотности растворов могут быть соразмерны с величиной реального сигнала поглощения образующегося окрашенного аддукта. Растворы экстрактов биологических тканей, в силу дополнительного содержания белков, липидов и углеводов, обладают мутностью, искажающей спектр поглощения нелинейно. Однако вторые производные спектров лишены искажений фонового рассеяния и могут быть использованы при автоматическом программном расчете содержания интересующего пигмента. Получение корректных производных осложняется необходимостью сглаживания исходных спектральных зависимостей. Мы использовали сглаживание методом скользящей средней, а также фильтром Савицкого – Голея с полиномом третьей степени. Сопоставлены данные, полученные на основе измерения оптических плотностей растворов при 532 нм, с таковыми на основе анализа вторых производных их спектров поглощения, а также на основе интегральных сумм вторых производных в диапазоне 520-550 нм. Результаты расчётов при помощи анализа вторых производных дали в 2-5 раз меньшее содержание МДА, чем полученные на основании оптических плотностей в максимуме поглощения пигмента, однако их сходимость, особенно при использовании интегральных сумм, оказалась существенно лучше, чем для нулевого порядка, и результирующие погрешности были в 2-3 раза меньшими.

Ключевые слова: спектроскопия производных, сглаживание спектров, малоновый диальдегид (МДА), печень, лёгкие и головной мозг мышей, окислительный стресс.

ВВЕДЕНИЕ

При количественном измерении содержания пигментов в биологических экстрактах спектрофотометрическими методами исследователи могут заметить спектральные искажения вследствие многокомпонентного рассеяния растворов [1]. Флуктуации общего уровня оптической плотности вблизи полосы поглощения целевого вещества могут быть сопоставимы с амплитудой его поглощения в анализируемом экстракте, что ухудшает чувствительность и точность определения. В то же время известно, что низкочастотный шум типа сплошного фонового поглощения или рассеяния отбрасывается в режиме производной спектроскопии [2], а высокочастотный – возможно подавить в режиме сглаживания [3]. Однако, по мере увеличения порядка взятия производных увеличивается и уровень шума [4,5]. Поэтому в качестве оптимального решения удобно использовать вторые производные спектров поглощения.

Спектроскопия малонового диальдегида (МДА), продукта перекисного окисления липидов, основана на специфическом полосе поглощения вблизи 532 нм его продукта реакции в кислой среде с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [6-8]. Малоновый диальдегид и другие тиобарбитуровые реактивные вещества (TBARS) конденсируются с двумя эквивалентами ТБК с образованием флуоресцентного красного производного, которые и детектируют спектрофотометрически [6-10]. В большом количестве методик рекомендуется просто измерение оптической плотности растворов при 532 нм. По её результатам для калибровочных растворов 1,1,3,3-тетраметоксипропана (используемого в качестве стандарта, предполагая, что 1 моль ТМП даёт такое же количество пигмента в реакции с ТБК, что и 1 моль МДА) получают калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации. При этом сходимость данных, получаемых разными исследователями, оставляет желать лучшего [9]. Более того, измеряемые количества МДА часто представляют в виде отношения к содержанию общего белка в растворе, что также вносит дополнительные вариации и погрешности в результаты.

Данная работа фокусируется на спектроскопии TBARS для определения содержания МДА в водных экстрактах тканей мышей, что является полезным инструментом в анализе окислительно-восстановительного статуса тканей при различных стрессовых воздействиях, в том числе после ионизирующего облучения [10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использованы ткани самок и самцов мышей линии C57Bl/6J, возрастом около 10 недель. Животных содержали в стандартных условиях вивария, со свободным доступом к воде и пище. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с требованиями этического комитета НИЦ «Курчатовский институт» (протокол № НГ-1/109ПР от 13.02.2020). Животных декапитуировали, извлекали головной мозг, лёгкие и печень, органы взвешивали и гомогенизировали в 1,15% растворе KCl с добавлением 0,05% бутилгидрокситолуола в виде его 10% раствора в метаноле (для предотвращения дальнейшего окисления). Гомогенаты центрифугировали в течение 15 мин при 14000g и 4°C, отбирали супернатанты, – которые подвергали реакции в кислой среде с раствором ТБК в течение 60 минут при 90°C. При этом к 0,5 мл экстракта добавляли 0,5 мл 1% Тритон-Х100 в 0,05N-HCl и 0,5 мл 0,67% ТБК в 0,05N-NaOH. Затем растворы охлаждали до комнатной температуры, добавляли по 0,25 мл 40% трихлоруксусной кислоты для осаждения белка и, после 20-минутного центрифугирования при 14000 g и 25°C, отбирали супернатант для спектрофотометрического анализа.

Спектрофотометрию растворов проводили в 2-мм кварцевых кюветках на спектрофотометре Shimadzu UV3600 при средней скорости сканирования, с шагом 0,1 нм, с временным интервалом 0,1 с, при ширине щели 2 нм в диапазоне 450-600 нм. Данные, полученные для растворов с ТМП, использовали для построения калибровочных зависимостей данных функции оптической плотности от концентрации МДА. Затем из данных для оптических плотностей растворов с экстрактами тканей по этим зависимостям рассчитывали содержание МДА в 10% экстрактах.

Для анализа вторых производных спектры оптической плотности $f(x)$ подвергали сглаживанию методом скользящей средней по 39 точкам, т.е. внутри 4-нм диапазона, а также, в качестве способа сравнения, кубическими сплайнами на скользящем 10-нм интервале фильтром Савицкого – Голея [11] с шириной окна в 100 точек. От сглаженных функций строили первую производную $f'(x)$, которую также сглаживали и после рассчитывали вторую производную $f''(x)$. Для полноты учёта разброса данных сигнала поглощения рассчитывали также интегральные суммы второй производной внутри пика поглощения $\int_{520}^{550} f''(x)$.

Содержание белка в экстрактах тканей при этом определяли по методу Смита, в реакции с бичинхониновой кислотой [12]. В качестве стандарта использовали свежеприготовленный раствор 10 мг/мл БСА в 1,15% растворе KCl. Реакцию и фотометрию проводили в 96-луночных планшетах. Спустя 30 мин реакции при 37°C оптическую плотность растворов измеряли на планшетном фотометре iMark с фильтром 570 нм. По полученным данным оптических плотностей для различных концентраций БСА получали калибровочную зависимость оптической плотности от содержания белка, – на основании которых определяли среднее содержание белка в каждом отдельном экстракте по 3 точкам гомогената ткани различного разведения. При расчёте данных по МДА относительно содержания белка отношение рассчитывали для каждого отдельного образца ткани отдельного животного, вычисляли отношение измеренной в нём концентрации МДА к измеренной в нём концентрации белка, – а затем эти данные усредняли по группе из 5 образцов данной ткани для разных животных. Статистические различия выборок определяли с использованием t-критерия Стьюдента двухвыборочным тестом с неравными двусторонними дисперсиями.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Вид спектров поглощения растворов стандарта (ТМП) разной концентрации и их вторых производных представлен на рисунке 1.

Обобщенные калибровочные графики зависимости значения оптической плотности на длине волны 532 нм, производных второго порядка и их интегральных сумм 520-550 нм от концентрации ТМП имели вид, представленный на рисунке 2 а-в.

На основе полученных линейной аппроксимацией этих калибровочных зависимостей (рис. 2а, 2в) от концентрации ТМП в растворе (x): значений оптической плотности в максимуме $f_{532\text{нм}}(x)$, соответствующего значения второй производной $f''_{532\text{нм}}(x)$ (б) и площади ее пика от 520 до 550 нм в виде интегральной суммы $\int_{520}^{550} f''(x)$ (в) по аналогичным данным растворов реакции экстрактов тканей с ТБК (см. пример на рис. 3) – было рассчитано содержание МДА в соответствующих 10% экстрактах.

Можно заметить, что исходные спектры оптической плотности сильно варьируют вследствие флуктуации неспецифического фонового уровня поглощения раствора. Еще в большей степени такие скачки общего фонового поглощения наблюдались для растворов реакции экстрактов тканей, несмотря на суммарно двойное центрифугирование. Примеры спектров растворов реакции с ТБК для гомогенатов печени самок мышей представлены на рисунке 3.

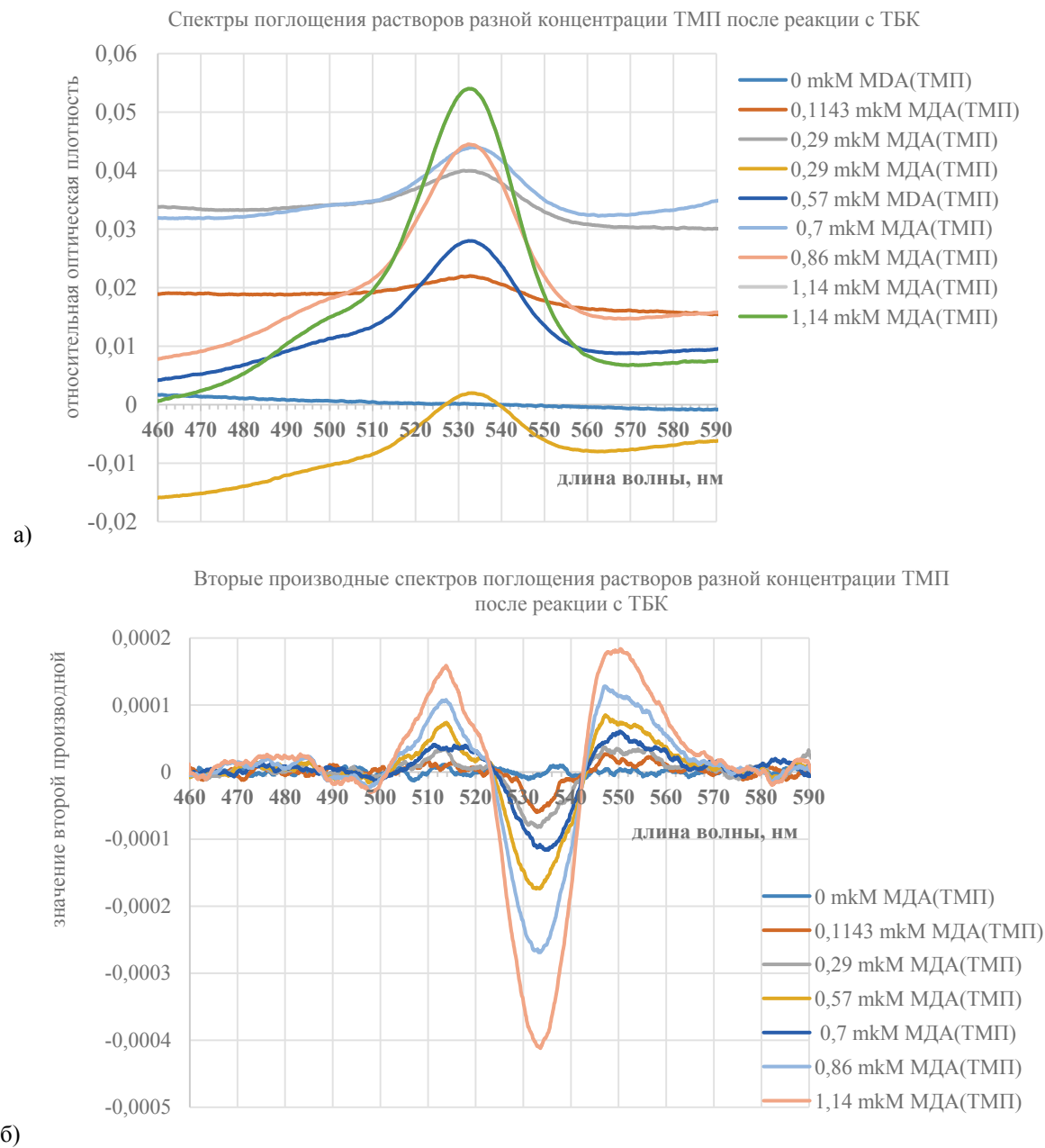


Рисунок 1. Примеры спектров оптической плотности растворов реакции различных концентраций ТМП с ТБК (а) и их вторых производных (б)

Можно заметить, что общий уровень фонового поглощения растворов флукуирует с амплитудой большей, чем сигнал поглощения окрашенного аддукта в этих растворах. Поэтому для корректного учета содержания пигмента в растворе единственного значения оптической плотности в максимуме поглощения недостаточно, – необходимы математические преобразования данных, с учетом значений оптической плотности на участках спектра, где нет поглощения целевого вещества.

В результате обратных расчетов по аппроксимирующим зависимостям значений разных порядков производной функций оптической плотности от содержания МДА были рассчитаны количества МДА в растворах реакции тканей мышей, отдельно для каждой особи, и затем они были усреднены по 5 значениям для каждой экспериментальной группы. Средние значения содержания МДА в растворе каждого типа ткани, полученные с использованием различного типа сглаживающих процедур, представлены в таблице 1, а также наглядно отображены на гистограммах рисунке 4. Гистограмма 4б сопоставляет разные способы сглаживающих процедур и отражает хорошую сходимость при анализе именно интегральных сумм пика второй производной.

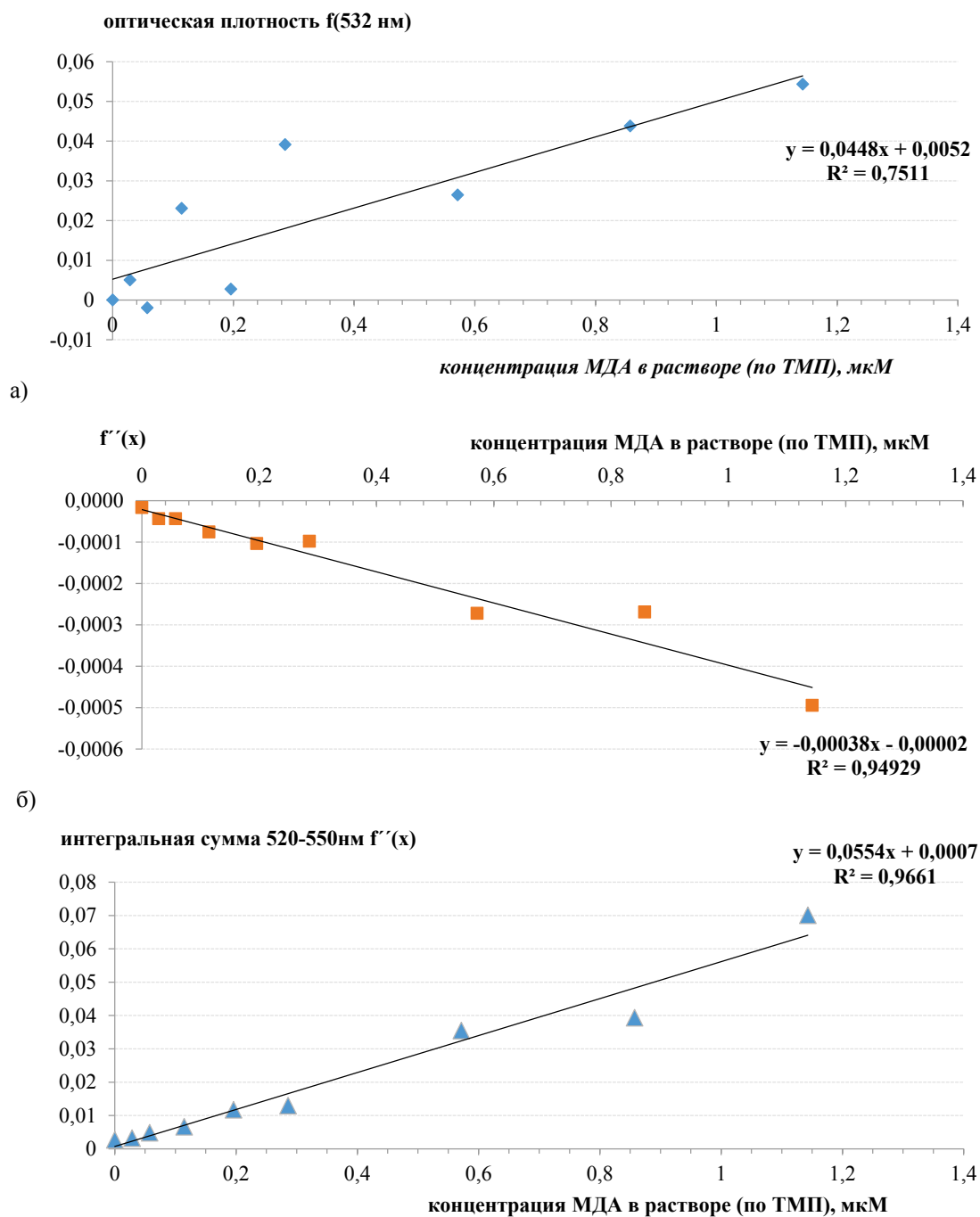
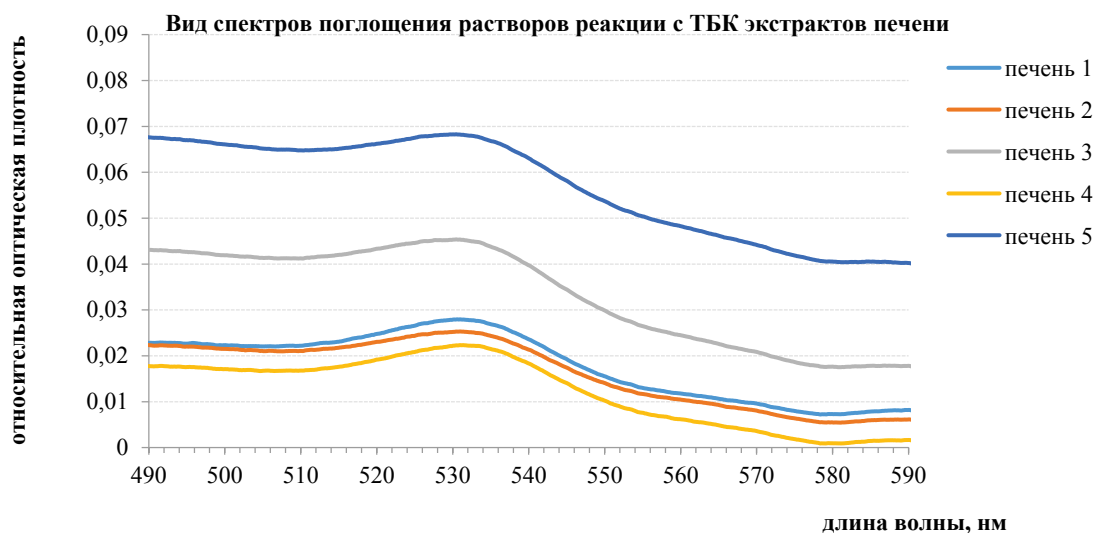


Рисунок 2. Значения оптической плотности при 532 нм для различных концентраций ТМП и построение аппроксимирующей зависимости на их основе (а), а также зависимостей для соответствующих значений второй производной $f''_{532\text{нм}}(x)$ (б) и площади ее пика от 520 до 550 нм в виде интегральной суммы $\int_{520}^{550} f''(x)$ (в)

Из полученных данных видно, что вследствие, по-видимому, повышенной мутности экстрактов биологических тканей, данные по содержанию пигмента, полученные только на основании значений оптической плотности на одной длине волны, получаются завышенными, с сильной вариацией. Анализ вторых производных функции поглощения показывает лучшую сходимость для растворов одинакового типа и поэтому видится более корректным для использования в расчётах содержания МДА. Общая сходимость между различными сглаживающими процедурами обнаруживается лучшей при использовании в расчетах интегральных сумм $\int_{520}^{550} f''(x)$.

Чтобы отнести полученные количества МДА в экстрактах к содержанию в них белка, как это принято при представлении данных во многих исследованиях, для нормализации количества клеточной массы [9], реакция на белок была проведена в соответствии с методикой [12] – и были рассчитаны количества белка по данным калибровочной зависимости по стандартному раствору БСА 10 мг/мл, представленной на рисунке 5.



а)



б)

Рисунок 3: Примеры спектров оптической плотности 5 образцов продуктов реакции экстрактов печени самок мышей с ТБК (а) и соответствующих вторых производных (б)

Таблица 1. Содержание МДА в экстрактах тканей (П – печень, Л – лёгких и М – мозга) в группах самок (♀) и самцов (♂) мышей, рассчитанные по оптической плотности при 532 нм, а также после сглаживания двумя способами на основании функций аппроксимации, показанных на рисунке 2. Представлены средние по 5 особям значения ± стандартная ошибка среднего (* обозначены обнаруженные достоверные различия между выборками самцов и самок по 5 особей)

пол и орган	Концентрация МДА, мкМ				
	$f_{532\text{нм}}$	Сглаживание скользящими средними		Сглаживание фильтром Савицкого-Голея	
		$f''_{532\text{нм}}(x)$	$\int_{520}^{550} f''(x)$	$f''_{532\text{нм}}(x)$	$\int_{520}^{550} f''(x)$
♀П	2,62±0,74	0,93±0,06	0,91±0,04*	1,18±0,06	1,09±0,05
♂П	4,51±1,10	0,85±0,09	0,54±0,08	0,77±0,11	0,64±0,10
♀Л	2,34±0,53	0,52±0,09	0,52±0,10	0,69±0,10	0,63±0,12
♂Л	1,58±0,12	0,59±0,10	0,34±0,04	0,50±0,08	0,37±0,05
♀М	1,10±0,83	0,29±0,03*	0,19±0,01	0,25±0,01	0,17±0,01
♂М	2,48±2,1	0,42±0,05	0,23±0,04	0,28±0,05	0,21±0,06

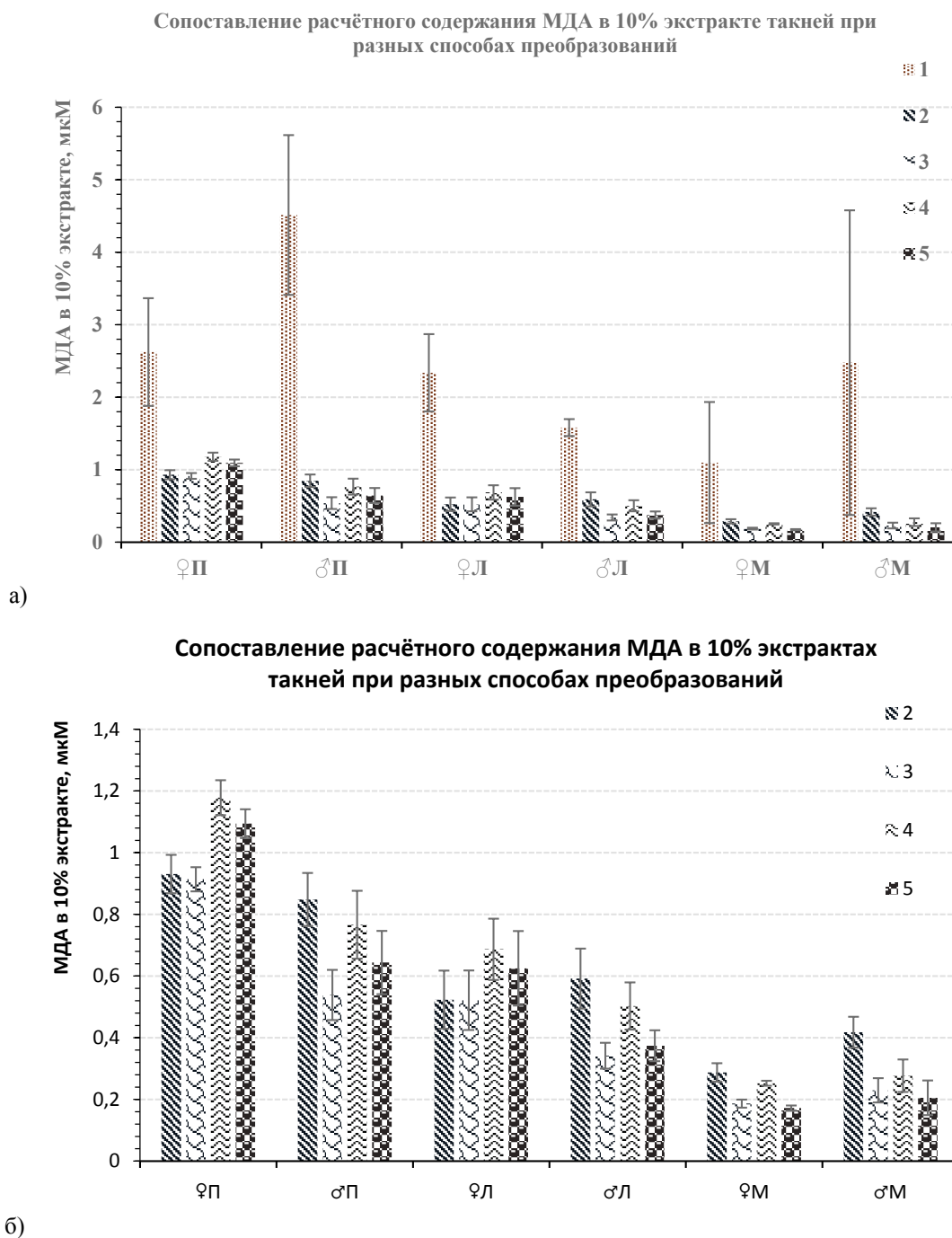


Рисунок 4. Сопоставление данных рассчитанного различными способами содержания МДА в экстрактах тканей: по данным поглощения в максимуме $f_{532\text{nm}}$ (столбики 1 на рис. 4а), а также по значениям второй производной при 532 нм (столбики 2 и 4) и площади её пика 520-550 нм в виде интегральной суммы $\int_{520}^{550} f''(x)$ (столбики 3 и 5), после разных сглаживающих процедур: столбцы 2 и 3 – скользящей средней, столбцы 4 и 5 – после предварительных преобразований фильтром Савицкого-Голея. Гистограмма 4б наглядно отражает хорошую сходимость данных при анализе именно интегральных сумм пика второй производной

По результатам аналогичной реакции растворов с исследуемыми экстрактами тканей были рассчитаны количества белка в каждом 10% экстракте для каждого раствора отдельного животного по данным его 3 различных разведений, опираясь на аппроксимирующую зависимость, представленную на рисунке 5. Далее, используя рассчитанные прежде разными способами количества МДА в 10% экстракте, рассчитывали отношение содержания МДА к белку. Полученные средние значения представлены в таблице 2. Измеренное таким образом количество белка в 10% экстрактах тканей очень варьировало внутри каждой группы и в сильной степени зависело от температурных режимов экстракции.

Содержание белка в экстрактах печени самцов было проведено с изменением методики и не будет здесь рассмотрено.

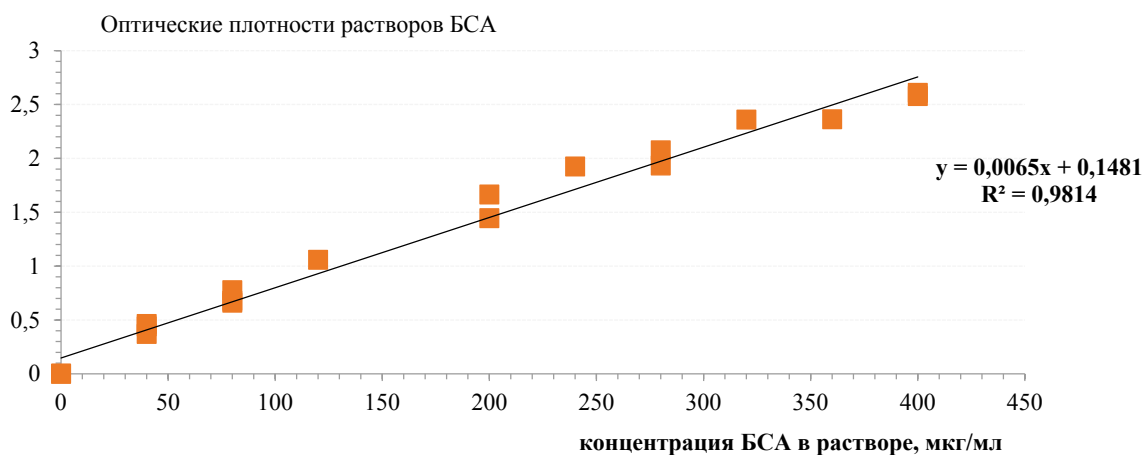


Рисунок 5. Калибровочная зависимость оптической плотности растворов 30-минутной реакции БСА с бицинхониновой кислотой и Cu_2SO_4

Оценка содержания белка описанным методом подвержена тем же искажениям, приводящим к высоким погрешностям, как и при определении содержания МДА и, возможно, стоило бы провести аналогичную процедуру спектрального анализа всех использованных растворов реакции с бицинхониновой кислотой и Cu_2SO_4 в диапазоне 550–650 нм. Этот ретроспективный вывод будет нами учтён при дальнейших исследованиях.

По данным расчетов, полученных после сглаживания методом скользящей средней, в 10% экстрактах печени нет различий по содержанию МДА между самцами и самками. В 10% экстрактах лёгких не обнаружено различий по содержанию МДА между самцами и самками. При сглаживании скользящими средними в экстрактах мозга обнаружены различия по содержанию МДА между самцами и самками только при расчёте с опорой на значение второй производной при 532 нм (но не при использовании её интегральных сумм), – с более низкими значениями МДА у группы самок по сравнению с самцами. При сглаживании фильтром Савицкого-Голея таких различий не выявлено. Обобщая эти данные, можно сделать вывод об отсутствии достоверных различий в уровне МДА ткани печени, лёгких и головного мозга между самцами и самками мышей линии C57Bl/6J.

Между двумя методами сглаживания проявились достоверные различия только в случае экстрактов печени самцов: данные, сглаженные скользящим средним, полученные при помощи интегральных сумм пика второй производной отличаются от полученных при её значении на 532 нм. При этом данные значений второй производной при 532 нм не различаются с данными, полученными после сглаживаний фильтром Савицкого-Голея с полиномами третьей степени. Сходимость данных между разными способами учёта второй производной после сглаживания кубическими полиномами, в целом, лучше.

Из сопоставления полученных данных мы заключили, что слепое использование единственного значения оптической плотности на одной длине волны не отражает реальную амплитуду пика и даёт завышенные результаты, получаемые с высокой погрешностью, которую уменьшает использование метода анализа вторых производных спектров. Вычленение истинной амплитуды сигнала поглощения можно сделать при графическом анализе спектров, что затруднительно при множественных рутинных измерениях. Напротив, сглаживание и расчёт производных легко автоматизируется, что упрощает получение итоговых результатов и улучшает сходимость данных.

Таблица 2. Содержание МДА на 1 мг белка в экстрактах тканях мышей, при использовании разных способов сглаживания, усреднённые по 5 образцам каждого 10%-экстракта. Представлены средние по 5 особям значения \pm стандартная ошибка среднего (* обозначены достоверные межполовые различия выборок по 5 особей)

пол и орган	содержание белка, мг/мл	МДА/белок, нмоль/мг				
		$f_{532\text{нм}}$	Сглаживание скользящими средними		Сглаживание фильтром Савицкого-Голея	
			$f''_{532\text{нм}}(x)$	$\int_{520}^{550} f''(x)$	$f''_{532\text{нм}}(x)$	$\int_{520}^{550} f''(x)$
♀П	8,8±0,8	0,32±0,11	0,109±0,013	0,106±0,010	0,14±0,01	0,13±0,01
♀Л	8,9±0,8	0,27±0,07	0,058±0,009	0,058±0,007	0,077±0,007	0,069±0,010
♂Л	8,6±1,3	0,21±0,05	0,077±0,023	0,045±0,011	0,067±0,020	0,049±0,013
♀М	5,4±0,7	0,23±0,17	0,057±0,009	0,036±0,004	0,049±0,007	0,034±0,004
♂М	8,2±1,4	0,48±0,46	0,060±0,019	0,034±0,013	0,041±0,017	0,032±0,016

Сопоставление полученных концентраций МДА с другими исследованиями [7-9, 13-15] показывает, что значения, полученные на основании оптических плотностей только на одной длине волны максимума поглощения, лучше согласуются данными, полученными аналогичным методом [14]. Однако спектральный анализ показывает некорректность такой методики, а результаты, полученные методом анализа вторых производных, лучше согласуются с данными, получаемыми методами ВЭЖХ и газовой хромато-масс-спектрометрии [9,13-15].

Также на получаемые значения МДА в экстрактах тканей в сильной степени влияет использование либо нет антиоксидантов, в частности БГТ. Можно предположить, что этот момент также является важной причиной широкого разброса данных, получаемых разными исследователями при измерениях МДА. В большинстве публикаций при описаниях метода о введении БГТ не упоминается. Согласно нашим экспериментальным исследованиям, без введения ТБК в гомогенат ткани, определяемый в нём уровень МДА описанным методом оказывается в несколько раз выше, чем с добавлением ТБК, и растёт со временем хранения экстракта (данные здесь не представлены). Это может быть следствием реакций эндогенных ферментов тканей с липидами при гомогенизации. Эффект полностью нивелируется введением антиоксиданта. Поэтому для чистоты результатов анализа мы рекомендуем вводить БГТ или иной антиоксидант на стадии гомогенизации. Ещё одним существенным параметром является температура охлаждения смеси после реакции с ТБК. Если до начала реакции количество белка в экстракте стоит минимизировать, например, холодным центрифугированием, то после появления аддукта для стабильности результирующего коллоидного раствора плавные понижения температуры ниже комнатной могут привести к образованию окрашенного нерастворимого осадка. В то же время, резкое замораживание и оттаивание не изменяет детектируемое содержание МДА в нём.

В конечные данные с соотношением МДА к белку также вносит погрешность методика анализа на белок, основанная на анализе оптической плотности на одной длине волны, которая также может быть улучшена по сходимости данных при анализе производных спектров поглощения получаемых растворов.

ВЫВОДЫ

Визуализация спектральных данных оптического поглощения растворов реакции экстрактов тканей животных с ТБК показывает, что метод измерения единственного значения оптической плотности на одной длине волны обладает неудовлетворительной точностью для анализа содержания МДА в нём. Показано, что расчетные количества МДА, полученные на основании только значений оптической плотности растворов реакции тканей с ТБК при 532 нм, могут быть в несколько раз выше данных, получаемых при анализе производных функций поглощения. Анализ вторых производных спектров показывает лучшую сходимость и в несколько раз меньшую вариацию. Наиболее корректным способом расчета нам видится использование интегральных сумм второй производной на участке пика поглощения пигмента, отражающих заметаемую ею площадь пика, что учитывает возможные спектральные уширения. Также показано, что получаемые значения могут зависеть от способа сглаживания исходных спектров поглощения.

Анализ содержания МДА в тканях печени, лёгких и головного мозга самцов и самок мышей не выявил существенных различий между полами.

Благодарности. Авторы выражают благодарность за помощь в получении данных научному сотруднику «Курчатовского института» Малахову С.Н.

Также авторы выражают огромную благодарность Токтомаматову М.Н. и его научному руководителю д.м.н., проф., зав. лаб. адаптационной медицины ФФМ МГУ, Архипенко Ю.В. за идею спектроскопии производных в применении к определению содержания МДА, опубликованную в открытом источнике в виде курсовой работы «Оценка уровня малонового диальдегида в крови».

Работа выполнена с использованием оборудования ресурсного центра «Оптика» НИЦ «Курчатовский институт».

Список литературы / References:

1. Пушкарева А.Е. *Методы математического моделирования в оптике биоткани*. Учебное пособие. СПб: СПбГУ ИТМО, 2008, 103 с. [Pushkareva A.E. *Methods of mathematical modeling in biotissue optics*. Study guide. St. Petersburg: St. Petersburg State University ITMO, 2008, 103 p. (In Russ.)].
2. Bridge T.P., Fell A.F., Wardman R.H. Perspectives in derivative spectroscopy, Part 1-Theoretical principles. *JSDS*, 1987, vol. 103, no 1, pp.17-27, doi: 10.1111/j.1478-4408.1987.tb01081.x.
3. O'Haver, Thomas C. and T.H. Begley. Signal-to-noise ratio in higher order derivative spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1981, vol. 53, pp. 1876-1878, doi: 10.1021/AC00235A036.
4. Sahini K., Nalini Dr.C.N. A review on derivative spectroscopy and its benefits in drug analysis. *IJCRT*, 2020, vol. 8, iss. 12, ISSN: 2320-2882.
5. Howard M., Workman Jr. Derivatives in Spectroscopy. Part II - The True Derivative. *Spectroscopy*, 2003, vol. 18, no. 9, p. 25.
6. Костюк А.И., Котова Д.А., Демидович А.Д. и др. Изменение ключевых параметров метаболизма липидов в тканях мозга крыс при перманентной ишемии. *Вестник РГМУ*, 2019, 1, с. 50-57 [Kostyuk A. I.,

- Kotova D.A., Demidovich A.D. et al. Changes in key parameters of lipid metabolism in rat brain tissues during permanent ischemia. *Bulletin of RSMU*, 2019, vol. 1, pp. 50-57 (In Russ.).
7. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 1979, vol. 95, no. 2, pp. 351-358.
 8. Moselhy H.F., Reid R.G., Yousef S., Boyle S.P. A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC. *J. Lipid Res.*, 2013, vol. 54, pp. 852-858.
 9. Domijan A.-M., Ralic J., Brkanac S.R., Rumora L., Zanic-Grubisic T. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL - application to various biological samples. *Biomedical Chromatography*, 2015, vol. 29, iss. 1, pp. 41-46.
 10. Gulbahar O., Aricioglu A., Akmansu M., and Turkozer Z. Effects of Radiation on Protein Oxidation and Lipid Peroxidation in the Brain Tissue. *Transplantation Proceedings*, 2009, vol. 41, pp. 4394-4396.
 11. Savitzky A., Golay M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least-squares procedures. *Analytical Chemistry*, 1964, vol. 36, no. 8, pp. 1627-1639.
 12. Smith P.K., Krohn O.H., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 1985, vol. 150, no. 1, pp. 76-85.
 13. Zelzer S., Oberreither R., Bernecker C., Stelzer I., Truschnig-Wilders M., Fauler G. Measurement of total and free malondialdehyde by gas-chromatography mass spectrometry-comparison with high-performance liquid chromatography methology. *Free Radic Res.*, 2013, vol. 47, no. 8, pp. 651-656, doi: 10.3109/10715762.2013.812205.
 14. Ran Y., Wang R., Gao Q., Jia Q., Hasan M., Awan M.U., Tang B., Zhou R., Dong Y., Wang X., Li Q., Ma H., Deng Y., Qing H. Dragon's blood and its extracts attenuate radiation-induced oxidative stress in mice. *J Radiat Res.*, 2014, vol. 55, no. 4, pp. 699-706.
 15. Tsikas D., Rothmann S., Schneider J.Y., Suchy M.-T., Trettin A., Modun D., Stuke N., Maassen N., Frolich J.C. Development, validation and biomedical applications of stable-isotope dilution GC-MS and GC-MS/MS techniques for circulating malondialdehyde (MDA) after pentafluorobenzyl bromide derivatization: MDA as a biomarker of oxidative stress and its relation to 15(S)-8-iso-prostaglandin F2 α and nitric oxide (NO). *Journal of Chromatography B*, 2016, vol. 1019, pp. 95-111.

MDA PHOTOMETRY IN SOLUTIONS: COMPARISON OF METHODS OF DIRECT OPTICAL DENSITY DATA AND DERIVATIVE SPECTROSCOPY

Smirnova O.D.¹, Kalashnikova I.V.¹, Kurbatov G.A.²

¹ Federal State Budgetary Institution SIC "Kurchatov Institute"

Kurchatov Square str., Moscow, 123182, Russia; e-mail: smirnovaoksana@ya.ru

² Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory, 1, p. 2, Moscow, 119991, Russia

Received 14.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0648

Abstract. In this study, we analyzed the absorption spectra of the reaction products of aqueous extracts of mouse tissues with thiobarbituric acid, with the aim to determine the concentration of malonic dialdehyde (MDA) in them. The concentration of MDA is an important part of the analysis of the redox status of tissues, which is important in the study of inflammatory reactions, for example, after various stressful effects, as well as in the study of aging. In normal practice, they calculate the concentration of MDA in a solution by its optical density at 532 nm, then these data are related with similar solutions of the tetramethoxypropane (TMP) reaction with known concentration. We have shown that in cases of submicromolar MDA content, fluctuations in the nonspecific background level of the optical density of solutions can be commensurate to the magnitude of the actual absorption signal of the resulting colored adduct. Solutions of biological tissue extracts, due to the additional content of proteins, lipids and carbohydrates, are characterized by turbidity, which distorts the absorption spectrum non-linearly. The second derivatives of the absorption spectra deprived of background scattering distortions and can be used for automatic software calculation of the pigment content. Obtaining correct derivatives is complicated by the need to smooth the original spectra. We used two smoothing methods: the moving average method and the Savitsky-Goley filter with a polynomial of the third degree. We compared the data obtained on the basis of measuring the optical densities of solutions at 532 nm with those based on the analysis of the second derivatives of their absorption spectra, and also on the basis of integral sums of the second derivatives in the range of 520-550 nm. The results of calculations using the second derivatives gave 2-5 times lower concentrations of MDA than those obtained from optical densities at the maximum absorption of the adduct. At the same time, the convergence of the data, especially when using integral sums of the second derivatives, turned out to be significantly better than for the zero order, and the resulting errors were 2-3 times smaller.

Key words: *derivative spectroscopy, smoothing of spectra, malondialdehyde (MDA), liver, lungs and brain of mice, oxidative stress.*