

ОБЗОРЫ

УДК 54.06:577.125.3:612.085.1/.2]

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Э.В.Некрасов

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАН, 675000,
г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

РЕЗЮМЕ

Представлен краткий обзор методов анализа продуктов свободно-радикального перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот, представляющих интерес для медико-биологических исследований состояний, сопровождающихся окислительным стрессом. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) является следствием окислительного стресса и выражается в образовании многочисленных продуктов, различающихся по химической структуре, времени жизни, токсичности и биологической активности. Интенсивность ПОЛ существенно возрастает при многих патологических состояниях. 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 в диагностике некоторых заболеваний. Предложенные методы анализа продуктов ПОЛ различаются по специфичности, чувствительности, сложности исполнения и необходимого оборудования. В массовых клинических исследованиях предпочтение отдается менее трудоемким и специфичным методам анализа стабильных продуктов ПОЛ, хотя возрастающее применение физико-химических методов анализа, прежде всего масс-спектрометрии, делает возможным одновременный анализ широкого круга продуктов ПОЛ. Введение в практику высокоспецифичных антител делает иммуноферментный анализ многих крайне минорных и сложно определяемых продуктов ПОЛ рутинным занятием. Достоверность и точность анализа во многом определяются предпринятыми при отборе и хранении проб мерами, предотвращающими распад или дальнейшее образование продуктов ПОЛ в образце.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, гидроперекиси, изопростаны, альдегиды, методы анализа.

SUMMARY

METHODS FOR LIPID PEROXIDATION ANALYSIS IN MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH

E.V.Nekrasov

*Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration of Siberian Branch RAMS, 22
Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000,
Russian Federation*

A brief review of methods for analysis of products of free-radical polyunsaturated fatty acids peroxidation which are of some interest for medical and biological studies of the states which are accompanied by oxidative stress is presented. Lipid peroxidation (LPO) is the consequence of oxidative stress and results in the formation of numerous products which differ in structure, life time, toxicity and biological activity. LPO significantly accelerates at different diseases. Analysis of LPO products is of interest for the estimation of oxidative stress, for the research of toxic, metabolic and signaling effects of the products on an organism, and for diagnosis of different diseases. Multiple methods for analysis of LPO products have been developed. They vary in specificity, sensitivity, complexity of procedure and equipment. In clinical studies, less complicated and specific methods for analysis of stable LPO products are preferred, though increasing application of more advanced techniques like mass spectrometry gives opportunity for the analysis of wide spectrum of LPO products. Development of highly specific antibodies makes ELISA a common tool of analysis of minor and otherwise difficult-to-determine LPO products. Reliability and precision of analysis depend highly on precautions taken on sample handling, preparation and storage, which are to avoid degradation or further formation of LPO products.

Key words: lipid peroxidation, hydroperoxides, isoprostanes, aldehydes, analytical methods.

Аэробные условия существования и процесс дыхания живых организмов сопровождаются постоянным образованием, превращением и потреблением актив-

ных форм кислорода (АФК). Перекисное окисление биомолекул обычно протекает как результат окислительного стресса, т.е. накопления АФК выше определенного уровня в результате дисбаланса между образованием АФК и их разрушением антиоксидательной системой организма. Окислительный стресс сопровождается различными патологическими процессами, его степень часто связана с тяжестью заболевания и оценка этой степени может быть использована для прогноза течения и исхода болезни [1, 40].

Будучи компонентами клеточных мембран, липиды являются первичными мишенями для АФК. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) протекает по свободно-радикальному механизму с участием АФК [59], однако может быть инициировано собственными ферментными системами клетки, в частности циклооксигеназами [46] и липоксигеназами [24]. Основными субстратами ПОЛ являются полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), содержащие две и более двойные связи, разделенные метиленовой группой ($-\text{CH}_2-$). Процесс образования продуктов ПОЛ в упрощенном виде можно представить следующим образом. Под действием АФК происходит отщепление атома Н от метиленовой группы в составе структуры $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$, образование С-центрированного радикала ($=\text{CH}-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{CH}=\text{CH}-$), перегруппировка и изомеризация системы двойных связей с образованием диенового конъюгата ($=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\dot{\text{C}}\text{H}-$). Кислород присоединяется по атому С, несущему неспаренный электрон, с образованием пероксид радикала ($\text{R}-\text{OO}\cdot$), который в зависимости от наличия внешнего донора Н, либо превращается в гидроперекись ($\text{R}-\text{OOH}$), либо в результате внутримолекулярного взаимодействия и циклизации – в эндопероксиды и далее различные циклические производные, включая изопростаны. Дальнейшее окисление этих гидроперекисей и эндопероксидов ведет к расщеплению и образованию альдегидов и фосфолипидов с укороченными окисленными остатками жирных кислот. Реакционноспособные альдегиды способны взаимодействовать с белками, нуклеиновыми кислотами и липидами с образованием карбонильных производных. Помимо ПНЖК, другим субстратом ПОЛ является холестерин, давая начало многочисленным оксипроизводным [59]. В настоящей работе представлен краткий обзор методов анализа продуктов свободно-радикального перекисного окисления ПНЖК, представляющих интерес для медико-биологических исследований состояний, сопровождающихся окислительным стрессом.

Анализ субстратов перекисного окисления липидов

Состав ПНЖК в липидах может существенно влиять на набор продуктов ПОЛ, поэтому анализ потенциальных субстратов, а также изменения в содержании субстратов ПОЛ является важным условием комплексной оценки окислительного стресса в биологической системе. Основная часть ПНЖК входит в состав сложных липидов: фосфолипидов (ФЛ), триацилглицеринов, эфиров холестерина. Преобладающей ПНЖК в

организме человека является линолевая кислота ($18:2n-6$), за которой следует арахидоновая кислота ($20:4n-6$). Именно арахидоновая кислота обычно рассматривается как наиболее важная с точки зрения перекисного окисления. Другие ПНЖК также присутствуют в организме человека, их количества варьируют в зависимости от ткани, диеты и физиологического состояния: γ -линоленовая ($18:3n-6$), α -линоленовая ($18:3n-3$), дигомо- γ -линоленовая ($20:3n-6$), эйкозапентаеновая ($20:5n-3$), докозапентаеновая ($22:5n-3$), докозагексаеновая ($22:6n-3$) [3, 6]. Основным методом количественного анализа жирных кислот является газо-жидкостная хроматография (ГЖХ) с пламенно-ионизационным детектором. Для количественного определения жирных кислот в образец добавляют внутренний стандарт, которым является жирная кислота, отсутствующая в образце или присутствующая в следовых количествах. Анализ жирных кислот стал рутинным во многих биохимических лабораториях и процедура для анализа может быть найдена в сетевых ресурсах [5].

Анализ продуктов перекисного окисления полиненасыщенный жирных кислот

Диеновые конъюгаты. Диеновые конъюгаты имеют сильное поглощение в ультрафиолетовой (УФ) области (230-235 нм). Метод включает экстракцию липидов органическим растворителем, несмешивающимся с водной фазой, и измерение поглощения при 233 нм [2, 48]. Метод прост в исполнении и очень удобен для мониторинга изменений в кинетических исследованиях изолированных липидов и липопротеинов. В биологических жидкостях могут присутствовать вещества с сильным поглощением в УФ области (гем-содержащие белки, пурины, пиримидины) [47], которые, впрочем, должны оставаться в водной фазе при двухфазном распределении с органическим растворителем. В биологических жидкостях человека присутствует конъюгированная линолевая кислота (КЛК), не содержащая кислород, основной изомер которой идентифицирован как 9-цис,11-транс-18:2. Эта кислота может поступать с пищей (молочные продукты и мясо жвачных) [47]. Так, мясные продукты содержат 3-6 мг КЛК на 1 г жира, в молоке и молочных продуктах содержание КЛК варьирует от 1,5 до 30 мг на 1 г жира [13]. Поэтому измерение диеновых конъюгатов в многокомпонентных биологических жидкостях имеет ограниченную ценность в клинических исследованиях, но может быть использовано как дополнительный показатель ПОЛ при анализе липидов, экстрагированных из биологического материала.

Гидроперекиси липидов. Гидроперекиси липидов (ГПЛ) рассматриваются как токсичные молекулы, видимо, благодаря способности вызывать образование радикалов и усиливать ПОЛ по типу цепной реакции. Уровень ГПЛ традиционно рассматривается как показатель ПОЛ в биологических системах. ГПЛ являются относительно стабильными молекулами. Распад может быть вызван высокой температурой и взаимодействием с ионами переходных металлов (железа и

меди). Гидроперекиси арахидоновой кислоты были стабильны в течение 2 недель при -70°C и до 53% потерь обнаруживали после 1 месяца хранения. Хранение образцов плазмы крови при -70°C в течение 6 недель приводило как к потерям (до 78%), так и образованию (до 52%) ГПЛ по сравнению с образцами, проанализированными сразу после отбора [47].

Для количественной оценки уровня ГПЛ наиболее распространенными являются косвенные методы анализа с измерением продуктов реакции ГПЛ с различными соединениями. При взаимодействии ГПЛ с Fe^{2+} образуются Fe^{3+} , алкоксил и пероксид радикалы, происходит дальнейшая деградация ГПЛ до альдегидов. Образование ионов железа (III) может быть определено спектрофотометрически с использованием тиоцианата аммония (максимум поглощения комплекса при 480 нм) [2] или ксиленового оранжевого (560 нм) [47]. Алкоксил и пероксид радикалы в реакции с хромофором или люминофором дают окрашенные [14] и люминесцирующие [60] соединения, соответственно. Образование малонового диальдегида, выделяющегося в реакции с Fe^{2+} , количественно измеряют в реакции с тиобарбитуровой кислотой [18]. Преимуществами этих методов является отсутствие этапа экстракции липидов. Для определения ГПЛ этими методами нельзя добавлять металл-хелатирующие агенты, например, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), и использовать образцы после гемолиза. Присутствие витамина С в высоких концентрациях дает завышенный фон, поскольку он способен в сочетании с Fe^{3+} индуцировать дальнейшее ПОЛ [47]. В целом, трудно избежать развитие ПОЛ в присутствии ионов железа, что может вести к завышенным результатам.

Более «мягким» методом является прямое взаимодействие перекисей с различными триарилфосфинами без промежуточного образования пероксид радикалов, способных индуцировать цепную реакцию. В зависимости от структуры исходного триарилфосфина получают хромофоры или люминофоры [10, 51]. Хромофоры обычно отделяют от предшественников методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [51], в то время как содержание люминофоров может быть измерено непосредственно в реакционной смеси [10]. Недостатками метода можно назвать необходимость предварительной экстракции липидов, хотя это может быть использовано и как преимущество, поскольку становится возможным определять ГПЛ и водорастворимые гидроперекиси раздельно [10]. Также необходимы специфические внутренние стандарты для количественного анализа (гидроперекиси кумена или жирной кислоты, трет-бутил-гидропероксида), которые различаются по интенсивности сигнала при построении калибровочных кривых [10] и имеют большие вариации в извлечении из анализируемого образца (19-83% для гидроперекиси кумена) [51].

Для прямого анализа гидроперекисей ПНЖК обычно получают их стабильные производные – гидроксильные жирные кислоты (гидрокси-ЖК) [55]. При

этом гидроперекиси восстанавливают и гидрируют с образованием насыщенных гидрокси-ЖК, которые не подвергаются дальнейшему превращению. После очистки и дополнительной дериватизации их используют для анализа методом ГЖХ с масс-спектрометром (ГЖХ-МС). Полученные при этом фрагменты позволяют судить о строении гидрокси-ЖК и, соответственно, их происхождении (C18 или C20 ПНЖК) [55]. Хотя этот метод достаточно информативен, среди его недостатков можно отметить многостадийность и трудозатратность в получении конечных производных жирных кислот, необходимость специальных внутренних стандартов, а также наличие дорогостоящего оборудования (ГЖХ-МС) и, соответственно, обученного персонала для работы на нем.

Циклические продукты перекисного окисления жирных кислот (изопростаны). Среди продуктов циклизации различных ПНЖК, прежде всего арахидоновой кислоты, особое внимание уделяют бициклическим эндопероксидам и продуктам их восстановления – изопростанам, благодаря их структурному сходству с биологически активными соединениями – простагландинами. В отличие от простагландинов, которые синтезируются ферментами и потому представляют собой только одну энантиомерную форму, изопростаны представляют большое число регио- и диастереоизомеров. Кроме того, простагландины образуются из свободной арахидоновой кислоты, а изопростаны обычно формируются из остатков жирных кислот, прикрепленных к молекулам фосфолипидов [37, 59]. Изопростаны обнаружены в различных биологических жидкостях и тканях человека, их содержание увеличивается при многих заболеваниях [37]. Заболевания дыхательных путей также сопровождаются увеличением содержания изопростанов, в частности, в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) [8, 26, 43], индуцированной мокроте [57] и плазме крови [56]. Количественное определение изопростанов признано «золотым стандартом» для оценки уровня окислительного стресса в организме [37], однако должны быть предприняты предосторожности при отборе и хранении проб перед анализом. Образование изопростанов наблюдали при хранении плазмы крови в течение нескольких месяцев при -20°C (с 5-40 пг/мл до 1000-4000 пг/мл) и при щелочном гидролизе. Их образование существенно снижалось при добавлении антиоксидантов, например, бутилированного гидрокситолуола (БГТ) и восстанавливающих агентов (трифенилфосфин) [38]. Образцы, предназначенные для анализа изопростанов, рекомендуется немедленно после получения замораживать в жидком азоте и не оттаивать до анализа [32].

Изопростаны являются крайне минорными компонентами с концентрациями порядка десятков пикограмм на мл плазмы крови или КВВ [26, 38], поэтому для их анализа необходимы высокочувствительные методы. В большинстве случаев их предварительно очищают с использованием методов тонкослойной хроматографии (ТСХ) и твердофазной экстракции. Физико-химические методы анализа всегда включают

масс-спектрометрию, сопряженную с ГЖХ или ВЭЖХ. ГЖХ требует предварительной дериватизации соединений с тем, чтобы получить летучие соединения. Такими производными являются пентафторбензиловые эфиры изопростанов, свободные гидроксильные группы защищают триметилсилилированием. Полученные производные очищают путем довольно сложной последовательности твердофазной экстракции и ТСХ и затем анализируют в режиме химической ионизации с регистрацией отрицательных ионов. Предел обнаружения метода составляет 10 пг/мл. Метод является высокочувствительным и селективным для изопростанов, позволяет обнаруживать все возможные стереоизомеры, общее число которых может достигать 64 только для F₂-изопростана. Основным недостатком является необходимость двух стадий химической дериватизации и трудоемкой операции их очистки. Кроме того, изопростаны предварительно должны быть высвобождены из состава сложных липидных молекул, составной частью которых они обычно являются [32]. Использование ВЭЖХ позволяет анализировать изопростаны без предварительной дериватизации (предварительная очистка образца также необходима) и в составе сложных молекул. Однако в этом случае МС-детектор должен быть tandemным (ВЭЖХ-МС/МС), позволяющим дальнейшую фрагментацию молекулярного иона, что необходимо для идентификации вещества. Количественный анализ проводят в присутствии дейтерированного внутреннего стандарта, например, d₄-15-F₂-изопростана или d₄-простагландина F_{2ω}, который вводится на стадии экстракции и очистки препарата [48, 59]. При ВЭЖХ региоизомеры изопростанов могут быть разделены, однако часто только один региоизомер, обычно 8-эпи-простагландин F_{2ω}, учитывается, что ведет к более низким значениям по сравнению с ГЖХ-МС [11].

В медицинских исследованиях большой популярностью пользуется метод иммуноферментного анализа (ИФА) изопростанов [12, 57], который отличается высокой чувствительностью и простотой исполнения. Сравнение результатов, полученных с помощью ИФА и ГЖХ-МС, показало близкие значения для КВВ, хотя более высокую аккуратность дал метод ГЖХ-МС [12]. Аналогичное сравнение ВЭЖХ-МС/МС и ИФА при анализе образцов мочи также было в пользу физико-химического метода, поскольку ИФА давал завышенные результаты [58]. Уровень соответствия между методами ВЭЖХ-МС/МС и ИФА может зависеть от компании-производителя набора [45]. Основной причиной этого, видимо, является специфичность и перекрестная реактивность антител, используемых в наборах. Большинство коммерческих наборов для ИФА разработано для 8-изопростана, тогда как другие классы изопростанов могут присутствовать в образце и по количеству даже превосходить 8-изопростан [58].

Альдегиды. Образованные в ходе ПОЛ альдегиды составляют несколько основных групп, существенно различающиеся по реакционной способности, и как следствие по стабильности и токсичности: насыщенные алканали; ненасыщенные 2-алкенали, 2,4-алкадие-

нали, 4-гидроперокси- и 4-гидрокси-2-алкенали, дикарбонильные альдегиды. Набор образующихся альдегидов зависит от подвергшихся перекисному окислению субстрата – количеству и положению двойных связей в ПНЖК [18, 28, 53]. Будучи конечными продуктами ПОЛ, альдегиды традиционно рассматриваются как биомаркеры этого процесса. Среди них малоновый диальдегид (МДА) наиболее популярный индикатор окислительного стресса в медицинских исследованиях, поскольку МДА – относительно стабильный продукт при физиологических условиях и процедура его определения довольно проста в исполнении и может быть использована при массовом анализе образцов. Однако МДА может также образовываться в ходе ферментативной реакции из некоторых простагландинов [21], которая, видимо, обеспечивает существенный вклад в содержание этого метаболита в крови даже здоровых людей [30]. Нельзя исключать, что МДА, как и другие продукты ПОЛ, попадает в организм с пищей [25], поэтому предпочтительно исключать прием пищи за несколько часов до взятия проб на анализы. В КВВ и индуцированной мокроте были обнаружены, главным образом, МДА и насыщенные альдегиды (гексаналь, гептаналь и нонаналь), в гораздо меньшей степени ненасыщенный акролеин и 4-гидроксиалкенали [15]. Гидроксиалкенали, в первую очередь 4-гидрокси-2-ноненаль (ГНЕ), являются более специфичными продуктами ПОЛ, хотя возможность образования ГНЕ через ферментативный путь также была показана [39]. ГНЕ представляют большой интерес благодаря своему токсичному действию и сигнальной функции [39, 53]. Повышенный уровень ГНЕ был обнаружен при многих заболеваниях, сопровождающихся окислительным стрессом, включая ХОБЛ, респираторный дистресс-синдром взрослых, хроническое вдыхание озона [39]. Аддукты ГНЕ с белками идентифицированы в различных клетках бронхов и легких с более высоким уровнем у больных ХОБЛ [41]. Тем не менее, анализ гидроксиалкеналя сопряжен с трудностями из-за их высокой реакционной способности [18, 53]. Насыщенные альдегиды (пентаналь, гексаналь, октаналь, нонаналь) рассматриваются как потенциальные биомаркеры рака легкого при определении в выдыхаемом воздухе [20] и моче [23].

При анализе альдегидов в биологических жидкостях необходимы те же предосторожности, что и для анализа других продуктов ПОЛ: хранение образцов при низкой отрицательной температуре (до -80°C) [44], использование ЭДТА, которая хелатирует ионы железа и проявляет слабую антиокислительную способность, и БГТ, являющийся антиоксидантом. Эффективность ЭДТА и БГТ в предотвращении развития ПОЛ иногда ставят под сомнение [22]. Условия хранения образцов и время, прошедшее между отбором образца и его заморозкой или анализом, сильно сказываются на определяемом уровне ГНЕ. Даже кратковременное (1 ч) выдерживание плазмы крови при 4°C перед заморозкой в жидком азоте приводило к снижению уровня ГНЕ на 25% [49]. МДА разрушается со скоростью 10%

в час при комнатной температуре, поэтому рекомендуется проводить анализ в течение часа [4]. Однако более существенным при анализе МДА представляется образование этого альдегида в ходе дериватизации в жестких условиях (см. ниже).

Для одновременного анализа нескольких альдегидов наиболее популярными являются их гидразоновые производные в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [7, 15, 17]. Условия образования этих производных довольно мягкие, реакция протекает при комнатной температуре. Эти производные обычно разделяют методом ВЭЖХ и количественно измеряют спектрофотометрически [17] или в сочетании с масс-спектрометрией [7, 15]. В первом случае чувствительность метода составляла около 1 пмоль [17], во втором – 0,006-0,020 пмоль [7]. Для количественного анализа при масс-спектрометрии необходима внешняя калибровочная кривая для каждого альдегида, либо использование метода изотопного разбавления, при котором в реакционную среду добавляли динитрофенилгидразин с известным содержанием дейтерия [34].

ВЭЖХ также используют для разделения производных альдегидов с 1,3-циклогександионом с последующим флуоресцентным или масс-спектрометрическим детектированием. Минимум обнаружения для ГНЕ при флуоресцентном детектировании составлял около 0,1 пмоль. Для этого метода необходим внутренний стандарт [33]. В случае ВЭЖХ-МС/МС нижний предел обнаружения составлял 5 пг [54]. Недостатком является отсутствие реакции циклогександиона с МДА [7].

Биогенные альдегиды возможно также анализировать методом ГЖХ в виде О-(пентафторбензил)оксим-производных в реакции альдегидов с О-(пентафторбензил)гидроксиламином. Дериватизация альдегидов, содержащих гидроксильную группу, например ГНЕ, дополняется защитой этой группы триметилсилилированием. Метод ГЖХ-МС позволяет идентифицировать альдегиды всех пяти групп (алканыли, 2-алкеныли, 2,4-алкадиеныли, 2-гидроксиалканыли и 4-гидрокси-2-алкеныли) [28]. Недостатком метода является образование двух стереоизомеров в процессе дериватизации, которые могут разделяться при ГЖХ анализе и усложнять хроматограмму.

Способность белков образовывать аддукты с α,β -ненасыщенными альдегидами была использована для разработки простого метода измерения общего содержания этих альдегидов в плазме и сыворотке крови. В щелочных условиях среды ненасыщенные альдегиды вступают в реакцию альдольной конденсации с тиолат-анионными группами остатков цистеина в составе белков. Это сопровождается усилением поглощения при 266 нм, и на основе калибровочной кривой, построенной для сывороточного альбумина и акролеина, рассчитывали содержание так называемый альдольных белков [35].

Поскольку МДА способен образовывать конъюгаты с различными биомолекулами, прежде всего белками, результат анализа будет сильно зависеть от

формы МДА, которую предстоит проанализировать. Анализ свободного МДА предполагает более мягкие условия осаждения белка и определение МДА в надосадочной жидкости, тогда как белок-связанный МДА определяют после кислого или щелочного гидролиза полученного осадка или всего образца [25, 44, для обзора см. 21].

Содержание МДА может быть измерено напрямую без предварительной дериватизации, поскольку при нейтральных значениях pH МДА поглощает в УФ области (максимум при 267 нм). Для отделения МДА от других веществ, поглощающих в этой же области, использовали метод ВЭЖХ. Предел обнаружения составлял 12 нмоль/л сыворотки [27]. Анализ МДА без дериватизации проводили также с использованием ВЭЖХ-МС/МС. Это позволяло существенно снизить предел обнаружения компонентов: 0,4 нМ для КВВ и плазмы крови, и 1,3 нМ в моче [50]. Многочисленные методы дериватизации были разработаны для анализа МДА [18, 21], однако наиболее популярным среди них остается реакция с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) благодаря простоте исполнения и высокой чувствительности. Метод не отличается специфичностью и аккуратностью, поскольку существует множество веществ, способных образовывать комплексы с ТБК, тогда как достаточно жесткие условия реакции (около 100°C и кислые условия) могут вести к дальнейшему окислению липидов и выделению дополнительного МДА, реагирующего с ТБК. Различные модификации метода призваны обойти эти недостатки. Специфичность и чувствительность метода повышают путем разделения методом ВЭЖХ и последующим обнаружением спектрофотометрическим или флуоресцентным детектором [25, 44]. Проблему дальнейшего окисления жирных кислот, присутствующих в образце, и образование МДА из этих окисленных продуктов можно уменьшить путем предварительной экстракции липидов, осаждением липопротеиновых комплексов с помощью трихлоруксусной или фосфовольфрамовой кислот [18], либо путем предварительного добавления KI в пробы, который вызывает восстановление гидроперекисей [30]. Обнаруженные количества МДА в сыворотке и плазме крови существенно варьируют в зависимости от метода анализа. Сравнительный анализ содержания МДА в моче двумя методами (динитрофенилгидразиновые производные или с ТБК) показал, что метод с ТБК дал почти в 10 раз завышенные значения МДА, чем первый метод [29], однако для плазмы крови определение МДА как аддукта с ТБК с последующим ВЭЖХ анализом дало наилучшие результаты в сравнении с гидразиновыми производными МДА и другими биомаркерами ПОЛ [11].

Карбонильные производные белков. Благодаря своей способности образовывать аддукты с аминокислотами, альдегиды способны модифицировать белки с образованием карбонильных производных. Аддукты альдегидов и белков существенно различаются по стабильности химической связи между альдегидом и реакционной группой в составе белковой молекулы. Если МДА зачастую может быть высвобожден из со-

става аддукта путем гидролиза (см. выше), то многие гидроксикарбонильные соединения не могут быть извлечены в первоначальном виде, поскольку образуют стабильные циклические соединения [16, 53]. Стабильность при хранении образцов является преимуществом анализа карбонильных производных как показателя окислительного стресса в организме. Однако карбонилирование белков не всегда связано с ПОЛ и такие производные могут образовываться в результате других реакций [16]. Для обнаружения аддуктов ГНЕ с белками в ткани использовали иммуногистохимическое окрашивание, хотя в этом случае возможно получить только полуколичественные результаты [41]. Для количественного определения аддукта ГНЕ с белками предложены иммуноферментные методы с использованием специфичных антител [для обзора см. 39, 53]. Для аддуктов ГНЕ и белков были разработаны также метод ГЖХ-МС, при котором аддукты сперва подвергали превращениям и дериватизации для получения летучего соединения [31], и протеомный подход для обнаружения спектра белков, модифицированных ГНЕ, в сложных биологических жидкостях с применением специфического извлечения таких белков с помощью гидразид-сорбентов и последующего анализа методом ВЭЖХ-МС/МС [42].

Окисленные фосфолипиды. Активные формы кислорода атакуют, как уже упоминалось выше, в первую очередь ПНЖК фосфолипидов мембран, что приводит к образованию окисленных фосфолипидов (ОФЛ). При этом ОФЛ могут сохранять остатки жирных кислот полноцепочечными и содержащими гидроперокси-, гидрокси-, эндоперокси-группы и изопростаны, либо иметь укороченные жирнокислотные хвосты в результате β -расщепления гидроперекисей жирных кислот и образования альдегидных или карбоксильных групп, а также образовывать конъюгаты с аминокислотами пептидов. Повышенный уровень ОФЛ обнаружен при многих патологических состояниях [9]. Как и изопростаны, ОФЛ могут образоваться только в результате ПОЛ, что делает их специфичными биомаркерами окислительного стресса. Основным методом анализа ОФЛ является ВЭЖХ-МС/МС [для обзора см. 48]. Для количественного измерения используют метод изотопного разбавления, при котором к анализируемому образцу добавляют меченные изотопом ОФЛ [36]. В клинических испытаниях используют метод хемилюминесцентного ИФА, который основан на способности антител распознавать полярную часть окисленного фосфатидилхолина [19]. Количественное определение гидроперекисей фосфолипидов проводили также комбинацией методов, которая включала предварительное разделение фосфолипидов методом двумерной ТСХ, гидролиз фосфолипазой A_2 и флуорометрическое определение высвободившихся гидроперекисей жирных кислот с применением Амплекс красного и микропероксидазы-11 [52].

Заключение

Выбор продукта ПОЛ для анализа определяется целями и задачами исследования. Наибольший интерес

представляют продукты ПОЛ с высокой токсичностью и биологической активностью, но они, как правило, имеют короткий период жизни. В этом случае рекомендуется анализировать их метаболиты или специфичные продукты взаимодействия с другими молекулами. Анализ стабильных соединений наиболее предпочтителен при массовых клинических исследованиях, когда образцы должны храниться продолжительное время до проведения анализа. Такие соединения могут дать представление об общем уровне ПОЛ и окислительного стресса в целом. Отдельную категорию составляют специфические биомаркеры конкретных заболеваний, представляющие интерес для диагностики. При выборе биомаркеров ПОЛ и метода анализа образцов, полученных *in vivo*, необходимо учитывать следующие условия [47]: 1) хранение и пробоподготовка образцов не ведет к дальнейшему развитию ПОЛ; 2) продукты перекисного окисления или сходные соединения не поступают с пищей; 3) химический состав продуктов ПОЛ соответствует составу исходного липидного субстрата. Наконец, нужно учитывать возможный вклад ферментативных процессов в образование анализируемых биомаркеров. Поскольку существуют разные пути превращения ПНЖК и продуктов их окисления, представляется полезным определение нескольких маркеров ПОЛ. Однако методы анализа этих маркеров должны быть сопоставимы по чувствительности, специфичности и аккуратности. Межлабораторная оценка ПОЛ в плазме крови, облученной УФ, по трем показателям – МДА, ГНЕ и F_2 -изопростанам выявила большие вариации в содержании этих компонентов в зависимости от метода анализа, лаборатории и анализируемого компонента [11]. Это исследование демонстрирует необходимость предварительной апробации нескольких методов на хорошо известной модели ПОЛ и, кроме того, мер предосторожности при хранении образцов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клиническое значение определения показателей оксидативного стресса в конденсате выдыхаемого воздуха у больных бронхиальной астмой / Н.М.Горячкина [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2011. Вып.42. С.8–12.
2. Динамика показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы у пациентов с болезнью Легга-Кальве-Пертеса на фоне антиоксидантной терапии / Н.В.Захарова [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2010. Вып.38. С.66–70.
3. Ишутина Н.А. Мембранные липиды при беременности, осложненной герпес-вирусной инфекцией // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2008. Вып.30. С.41–45.
4. Agarwal R., Chase S.D. Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2002. Vol.775, №1. P.121–126.
5. Analysis of fatty acids // Cyberlipid Center; resource site for lipid studies. URL: <http://www.cyberlipid.org/cy>

berlip/home0001.htm (дата обращения: 13.08.2012).

6. Fatty acid composition of skeletal muscle reflects dietary fat composition in humans / A.Andersson [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* 2002. Vol.76, №6. P.1222–1229.

7. Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry / R.Andreoli [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003. Vol.17, №7. P.637–645.

8. Leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with episodic and persistent asthma / C.S.Balanza [et al.] // *Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2010. Vol.20, №3. P.237–243.

9. Bochkov V.N. Inflammatory profile of oxidized phospholipids // *Thromb. Haemost.* 2007. Vol.97, №3. P.348–354.

10. Determination of lipid and protein hydroperoxides using the fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine / R.Bou [et al.] // *Food Chem.* 2010. Vol.123, №3. P.892–900.

11. An inter-laboratory validation of methods of lipid peroxidation measurement in UVA-treated human plasma samples / N.Breusing [et al.] // *Free Radic. Res.* 2010. Vol.44, №10. P.1203–1215.

12. EIA and GC/MS analysis of 8-isoprostane in EBC of children with problematic asthma / S.Carraro [et al.] // *Eur. Respir. J.* 2010. Vol.35, №6. P.1364–1369.

13. Conjugated fatty acids // Cyberlipid Center: resource site for lipid studies. URL: <http://www.cyberlipid.org/fa/acid0003.htm#1c> (дата обращения: 30.10.2012).

14. Bioavailability and antioxidant activity of some food supplements in men and women using the D-ROMs test as a marker of oxidative stress / U.Cornelli [et al.] // *J. Nutr.* 2001. Vol.131, №12. P.3208–3211.

15. Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation / M.Corradi [et al.] // *Eur. Respir. J.* 2004. Vol.24, №6. P.1011–1017.

16. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress / I.Dalle-Donne [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* 2003. Vol.329, №1–2. P.23–38.

17. Esterbauer H., Cheeseman K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal // *Meth. Enzymol.* 1990. Vol.186. P.407–421.

18. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes // *Free Radic. Biol. Med.* 1991. Vol.11, №1. P.81–128.

19. Changes in lipoprotein(a), oxidized phospholipids, and LDL subclasses with a low-fat high-carbohydrate diet / N.Faghihnia [et al.] // *J. Lipid Res.* 2010. Vol.51, №11. P.3324–3330.

20. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer / P.Fuchs [et al.] // *Int. J. Cancer.* 2010. Vol.126, №11. P.2663–2670.

21. Giera M., Lingeman H., Niessen W.M. Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malon-

dialdehyde (MDA): a brief overview // *Chromatographia.* 2012. Vol.75, №9–10. P.433–440.

22. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification / D.Grotto [et al.] // *Quim. Nova.* 2009. Vol.32, №1. P.169–174.

23. Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method validation for the determination of endogenous substances: urinary hexanal and heptanal as lung tumor biomarkers / R.Guadagni [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2011. Vol.701, №1. P.29–36.

24. Haeggström J.Z., Funk C.D. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease // *Chem. Rev.* 2011. Vol.111, №10. P.5866–5898.

25. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method / Y.L.Hong [et al.] // *Clin. Biochem.* 2000. Vol.33, №8. P.619–625.

26. Isoprostanes-biomarkers of lipid peroxidation: their utility in evaluating oxidative stress and analysis / M.Janicka [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* 2010. Vol.11, №11. P.4631–4659.

27. Karatas F., Karatepe M., Baysar A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography // *Anal. Biochem.* 2002. Vol.311, №1. P.76–79.

28. Kawai Y., Takeda S., Terao J. Lipidomic analysis for lipid peroxidation-derived aldehydes using gas chromatography-mass spectrometry // *Chem. Res. Toxicol.* 2007. Vol.20, №1. P.99–107.

29. Korchazhkina O., Exley C., Spencer S.A. Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatisation with 2,4-dinitrophenylhydrazine // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003. Vol.794, №2. P.353–362.

30. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma / D.Lapenna [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2001. Vol.31, №3. P.331–335.

31. Differential distribution of 4-hydroxynonenal adducts to sulfur and nitrogen residues in blood proteins as revealed using Raney nickel and gas chromatography-mass spectrometry / J.F.Lesgards [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 2009. Vol.47, №10. P.1375–1385.

32. Liu W., Morrow J.D., Yin H. Quantification of F2-isoprostanes as a reliable index of oxidative stress in vivo using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method // *Free Rad. Biol. Med.* 2009. Vol.47, №8. P.1101–1107.

33. Lovell M.A., Markesbery W.R. Analysis of aldehydic markers of lipid peroxidation in biological tissues by HPLC with fluorescence detection / K.Hensley, R.A.Floyd (eds.). *Methods in Pharmacology and Toxicology: Methods in Biological Oxidative Stress*. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2003. P.17–21.

34. Evaluation of Alternate Isotope-Coded Derivatization Assay (AIDA) in the LC-MS/MS analysis of aldehydes in exhaled breath condensate / P.Manini [et al.] // *J.*

- Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2010. Vol.878, №8. P.2616–2622.
35. Medina-Navarro R., Nieto-Aguilar R., Alvares-Aguilar C. Protein conjugated with aldehydes derived from lipid peroxidation as an independent parameter of the carbonyl stress in the kidney damage // *Lipids Health Dis.* 2011. Vol.10. P.201.
36. Identification and analysis of products formed from phospholipids in the free radical oxidation of human low density lipoproteins / G.L.Milne [et al.] // *J. Lipid Res.* 2005. Vol.46, №2. P.307–319.
37. Milne G.L., Yin H., Morrow J.D. Human biochemistry of isoprostane pathway // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol.283, №23. P.15533–15537.
38. Morrow J.D., Harris T.M., Roberts L.J. 2nd. Non-cyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: Analytical ramifications for measurement of eicosanoids // *Anal. Biochem.* 1990. Vol.184, №1. P.1–10.
39. 4-Hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest / G.Poli [et al.] // *Med. Res. Rev.* 2008. Vol.28, №4. P.569–631.
40. Protti A., Singer M. Oxidative stress and critical illness // *Minerva Anesthesiol.* 2007. Vol.73, №5. P.255–257.
41. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease / I.Rahman [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002. Vol.166, №4. P.490–495.
42. Proteomic mapping of 4-hydroxynonenal protein modification sites by solid-phase hydrazide chemistry and mass spectrometry / M.R.Roe [et al.] // *Anal. Chem.* 2007. Vol.79, №10. P.3747–3756.
43. Exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in patients with asthma and their relation to clinical severity / K.Samitas [et al.] // *Respir. Med.* 2008. Vol.103, №5. P.750–756.
44. Seljeskog E., Hervig T., Mansoor M.A. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit // *Clin. Biochem.* 2006. Vol.39, №9. P.947–954.
45. A comparison of methods for the measurement of 8-isoPGF(2 α): a marker of oxidative stress / K.A.Smith [et al.] // *Ann. Clin. Biochem.* 2011. Vol.48 (Pt 2). P.147–154.
46. Smith W.L., Urade Y., Jakobsson P.J. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis // *Chem. Rev.* 2011. Vol.111, №10. P.5821–5865.
47. Södergren E. Lipid peroxidation in vivo. Evaluation and application of methods for measurement // *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine.* Uppsala: Tryck & Medier, 2000. 78 p.
48. Advances in methods for determination of biologically relevant lipid peroxidation products / C.M.Spickett [et al.] // *Free Radic. Res.* 2010. Vol.44, №10. P.1172–1202.
49. Measurement of 4-hydroxynonenal in small volume blood plasma samples: modification of a gas chromatographic–mass spectrometric method for clinical settings / D.Spies-Martin [et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002. Vol.774, №2. P.231–239.
50. Rapid and easy method for monitoring oxidative stress markers in body fluids of patients with asbestos or silica-induced lung diseases / K.Syslová [et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009. Vol.877, №24. P.2477–2486.
51. Specific and sensitive determination of lipid hydroperoxides with chemical derivatization into 1-naphthylidiphenylphosphine oxide and high-performance liquid chromatography / S.Tokumaru [et al.] // *Analyt. Chim. Acta.* 1995. Vol.307, №1. P.97–102.
52. Oxidative lipidomics of apoptosis: quantitative assessment of phospholipid hydroperoxides in cells and tissues / V.A.Tyurin [et al.] // *Methods Mol. Biol.* 2010. Vol.610. P.353–374.
53. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress // *Prog. Lipid Res.* 2003. Vol.42, №2. P.318–343.
54. Williams T.I., Lovell M.A., Lynn B.C. Analysis of derivatized biogenic aldehydes by LC tandem mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2005. Vol.77, №10. P.3383–3389.
55. Quantitative gas chromatography-mass spectrometry isomer-specific measurement of hydroxy fatty acids in biological samples and food as a marker of lipid peroxidation / R.Wilson [et al.] // *Analyt. Biochem.* 1997. Vol.248, №1. P.76–85.
56. Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma / L.G.Wood [et al.] // *Lipids.* 2000. Vol.35, №9. P.967–974.
57. Induced sputum 8-isoprostane concentrations in inflammatory airway diseases / L.G.Wood [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005. Vol.171, №5. P.426–430.
58. Yan W., Byrd G.D., Ogden M.W. Quantitation of isoprostane isomers in human urine from smokers and nonsmokers by LC-MS/MS // *J. Lipid Res.* 2007. Vol.48, №7. P.1607–1617.
59. Yin H., Xu L., Porter N.A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis // *Chem. Rev.* 2011. Vol.111, №10. P.5944–5972.
60. Direct measurement by single photon counting of lipid hydroperoxides in human plasma and lipoproteins / A.Zamburlini [et al.] // *Analyt. Biochem.* 1995. Vol.232, №1. P.107–113.

REFERENCES

1. Goryachkina N.M., Zhou X.D., Li Q., Borodin E.A., Perelman J.M. *Bülleten' fiziologii i patologii dyhaniyâ* 2011; 42:8–12.
2. Zakharova N.V., Dorovskikh V.A., Borozda I.V., Shtarberg M.A. *Bülleten' fiziologii i patologii dyhaniyâ* 2010; 38:66–70.
3. Ishutina N.A. *Bülleten' fiziologii i patologii dyhaniyâ* 2008; 30:41–45.
4. Agarwal R., Chase S.D. Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002; 775(1):121–126.
5. Analysis of fatty acids. *Cyberlipid Center: resource site for lipid studies.* Available at:

<http://www.cyberlipid.org/cyberlip/home0001.htm> (accessed 13 August 2012).

6. Andersson A., Nälsén C., Tengblad S., Vessby B. Fatty acid composition of skeletal muscle reflects dietary fat composition in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002; 76(6):1222–1229.

7. Andreoli R., Manini P., Corradi M., Mutti A., Niessen W.M.A. Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; 17(7):637–645.

8. Balanzá C.S., Aragonés M.A., Mir C.J.C., Ramírez B.J., Iváñez N.R., Soriano N.A., Toledo F.R., Montaner E.A. Leukotriene B₄ and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with episodic and persistent asthma. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2010; 20(3):237–243.

9. Bochkov V.N. Inflammatory profile of oxidized phospholipids. *Thromb. Haemost.* 2007; 97(3):348–354.

10. Bou R., Chen B., Guardiola F., Codony R., Decker E.A. Determination of lipid and protein hydroperoxides using the fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine. *Food Chem.* 2010; 123(3):892–900.

11. Breusing N., Grune T., Andrisic L., Atalay M., Bartosz G., Biasi F., Borovic S., Bravo L., Casals I., Casillas R., Dinischiotu A., Drzewinska J., Faber H., Fauzi N.M., Gajewska A., Gambini J., Gradinaru D., Kokkola T., Lojek A., Luczaj W., Margina D., Mascia C., Mateos R., Meinitzer A., Mitjavila M.T., Mrakovcic L., Munteanu M.C., Podborska M., Poli G., Sicinska P., Skrzydlewska E., Vina J., Wiswedel I., Zarkovic N., Zelzer S., Spickett C.M. An inter-laboratory validation of methods of lipid peroxidation measurement in UVA-treated human plasma samples. *Free Radic. Res.* 2010; 44(10):1203–1215.

12. Carraro S., Cogo P.E., Isak I., Simonato M., Corradi M., Carnielli V.P., Baraldi E. EIA and GC/MS analysis of 8-isoprostane in EBC of children with problematic asthma. *Eur. Respir. J.* 2010; 35(6):1364–1369.

13. Conjugated fatty acids. *Cyberlipid Center: resource site for lipid studies*. Available at: <http://www.cyberlipid.org/fa/acid0003.htm#1c>

14. Cornelli U., Terranova R., Luca S., Cornelli M., Alberti A. Bioavailability and antioxidant activity of some food supplements in men and women using the D-ROMs test as a marker of oxidative stress. *J. Nutr.* 2001; 131(12):3208–3211.

15. Corradi M., Pignatti P., Manini P., Andreoli R., Goldoni M., Poppa M., Moscato G., Balbi B., Mutti A. Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation. *Eur. Respir. J.* 2004; 24(6):1011–1017.

16. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* 2003; 329(1-2):23–38.

17. Esterbauer H., Cheeseman K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth. Enzymol.* 1990; 186:407–421.

18. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde

and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 1991; 11(1):81–128.

19. Faghihnia N., Tsimikas S., Miller E.R., Witztum J.L., Krauss R.M. Changes in lipoprotein(a), oxidized phospholipids, and LDL subclasses with a low-fat high-carbohydrate diet. *J. Lipid Res.* 2010; 51(11):3324–3330.

20. Fuchs P., Loeseken C., Schubert J.K., Miekisch W. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. *Int. J. Cancer* 2010; 126(11):2663–2670.

21. Giera M., Lingeman H., Niessen W.M. Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview. *Chromatographia* 2012; 75(1-2):433–440.

22. Grotto D., Maria L.S., Valentini J., Paniz C., Schmitt G., Garcia S.C., Pomblum V.J., Rocha J.B.T., Farina M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim. Nova* 2009; 32(1):169–174.

23. Guadagni R., Miraglia N., Simonelli A., Silvestre A., Lamberti M., Feola D., Acampora A., Sannolo N. Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method validation for the determination of endogenous substances: urinary hexanal and heptanal as lung tumor biomarkers. *Anal. Chim. Acta* 2011; 701(1):29–36.

24. Haeggström J.Z., Funk C.D. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem. Rev.* 2011; 111(10):5866–5898.

25. Hong Y.L., Yeh S.L., Chang C.Y., Hu M.L. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin. Biochem.* 2000; 33(8):619–625.

26. Janicka M., Kot-Wasik A., Kot J., Namieśnik J. Isoprostanes-biomarkers of lipid peroxidation: their utility in evaluating oxidative stress and analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 2010; 11(11):4631–4659.

27. Karatas F., Karatepe M., Baysar A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 2002; 311(1):76–79.

28. Kawai Y., Takeda S., Terao J. Lipidomic analysis for lipid peroxidation-derived aldehydes using gas chromatography-mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 2007; 20(1):99–107.

29. Korchazhkina O., Exley C., Spencer S.A. Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatisation with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003; 794(2):353–362.

30. Lapenna D., Ciofani G., Pierdomenico S.D., Giamberardino M.A., Cuccurullo F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31(3):331–335.

31. Lesgards J.F., Frayne I.R., Comte B., Busseuil D., Rhéaume É., Tardif J.C., Rosiers C.D. Differential distribution of 4-hydroxynonenal adducts to sulfur and nitrogen residues in blood proteins as revealed using Raney nickel

and gas chromatography-mass spectrometry. *Free Radic. Biol. Med.* 2009; 47(10):1375–1385.

32. Liu W., Morrow J.D., Yin H. Quantification of F2-isoprostanes as a reliable index of oxidative stress in vivo using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method. *Free Radic. Biol. Med.* 2009; 47(8):1101–1107.

33. Lovell M.A., Markesbery W.R. Analysis of aldehydic markers of lipid peroxidation in biological tissues by HPLC with fluorescence detection. In: Hensley K., Floyd R.A., editors. *Methods in Pharmacology and Toxicology: Methods in Biological Oxidative Stress*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2003: pp.17–21.

34. Manini P., Andreoli R., Sforza S., Dall'Asta C., Galaverna G., Mutti A., Niessen W.M. Evaluation of Alternate Isotope-Coded Derivatization Assay (AIDA) in the LC-MS/MS analysis of aldehydes in exhaled breath condensate. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2010; 878(27):2616–2622.

35. Medina-Navarro R., Nieto-Aguilar R., Alvarez-Aguilar C. Protein conjugated with aldehydes derived from lipid peroxidation as an independent parameter of the carbonyl stress in the kidney damage. *Lipids Health Dis.* 2011; 10:201.

36. Milne G.L., Seal J.R., Havrilla C.M., Wijtmans M., Porter N.A. Identification and analysis of products formed from phospholipids in the free radical oxidation of human low density lipoproteins. *J. Lipid Res.* 2005; 46(2):307–319.

37. Milne G.L., Yin H., Morrow J.D. Human biochemistry of isoprostane pathway. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(23):15533–15537.

38. Morrow J.D., Harris T.M., Roberts L.J. 2nd. Non-cyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal. Biochem.* 1990; 184(1):1–10.

39. Poli G., Schaur R.J., Siems W.G., Leonarduzzi G. 4-Hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med. Res. Rev.* 2008; 28(4):569–631.

40. Protti A., Singer M. Oxidative stress and critical illness. *Minerva Anesthesiol.* 2007; 73(5):255–257.

41. Rahman I., van Schadewijk A.A.M., Crowther A.J.L., Hiemstra P.S., Stolk J., MacNee W., De Boer W.I. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 166(4):490–495.

42. Roe M.R., Xie H., Bandhakavi S., Griffin T.J. Proteomic mapping of 4-hydroxynonenal protein modification sites by solid-phase hydrazide chemistry and mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2007; 79(10):3747–3756.

43. Samitas K., Chorianopoulos D., Vittorakis S., Zervas E., Economidou E., Papatheodorou G., Loukides S., Gaga M. Exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in patients with asthma and their relation to clinical severity. *Respir. Med.* 2008; 103(5):750–756.

44. Seljeskog E., Hervig T., Mansoor M.A. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clin. Biochem.* 2006; 39(9):947–954.

45. Smith K.A., Shepherd J., Wakil A., Kilpatrick E.S. A comparison of methods for the measurement of 8-isoPGF(2α): a marker of oxidative stress. *Ann. Clin. Biochem.* 2011; 48(Pt 2):147–154.

46. Smith W.L., Urade Y., Jakobsson P.-J. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chem. Rev.* 2011; 111(10):5821–5865.

47. Södergren E. Lipid peroxidation in vivo. Evaluation and application of methods for measurement. Acta Universitatis Upsaliensis. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine*. Uppsala: Tryck & Medier; 2000.

48. Spickett C.M., Wiswedel I., Siems W., Zarkovic K., Zarkovic N. Advances in methods for determination of biologically relevant lipid peroxidation products. *Free Radic. Res.* 2010; 44(10):1172–1202.

49. Spies-Martin D., Sommerburg O., Langhans C.-D., Leichsenring M. Measurement of 4-hydroxynonenal in small volume blood plasma samples: modification of a gas chromatographic-mass spectrometric method for clinical settings. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002; 774(2):231–239.

50. Syslová K., Kačer P., Kuzma M., Najmanová V., Fenclová Z., Vlčková Š., Lebedová J., Pelclová D. Rapid and easy method for monitoring oxidative stress markers in body fluids of patients with asbestos or silica-induced lung diseases. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009; 877(24):2477–2486.

51. Tokumaru S., Tsukamoto I., Iguchi H., Kojo S. Specific and sensitive determination of lipid hydroperoxides with chemical derivatization into 1-naphthylidiphenylphosphine oxide and high-performance liquid chromatography. *Analyt. Chim. Acta.* 1995; 307(1):97–102.

52. Tyurin V.A., Tyurina Y.Y., Ritov V.B., Lysytsya A., Amoscato A.A., Kochanek P.M., Hamilton R., Dekosky S.T., Greenberger J.S., Bayir H., Kagan V.E. Oxidative lipidomics of apoptosis: quantitative assessment of phospholipid hydroperoxides in cells and tissues. *Methods Mol. Biol.* 2010; 610:353–374.

53. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progr. Lipid Res.* 2003; 42(2):318–343.

54. Williams T.I., Lovell M.A., Lynn B.C. Analysis of derivatized biogenic aldehydes by LC tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2005; 77(10):3383–3389.

55. Wilson R., Smith R., Wilson P., Shepherd M.J., Riemersma R.A. Quantitative gas chromatography-mass spectrometry isomer-specific measurement of hydroxy fatty acids in biological samples and food as a marker of lipid peroxidation. *Anal. Biochem.* 1997; 248(1):76–85.

56. Wood L.G., Fitzgerald D.A., Gibson P.C., Cooper D.M., Garg M.L. Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma. *Lipids* 2000; 35(9):967–974.

57. Wood L.G., Garg M.L., Simpson J.L., Mori T.A., Croft K.D., Wark P.A.B., Gibson P.G. Induced sputum 8-isoprostane concentrations in inflammatory airway diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005; 171(5):426–430.

58. Yan W., Byrd G.D., Ogden M.W. Quantitation of

isoprostane isomers in human urine from smokers and nonsmokers by LC-MS/MS. *J. Lipid Res.* 2007; 48(7):1607–1617.

59. Yin H., Xu L., Porter N.A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem. Rev.* 2011;

111(10):5944–5972.

60. Zamburlini A., Maiorino M., Barbera P., Roveri A., Ursini F. Direct measurement by single photon counting of lipid hydroperoxides in human plasma and lipoproteins. *Anal. Biochem.* 1995; 232(1):107–113.

Поступила 02.11.2012

Контактная информация

Эдуард Витальевич Некрасов,

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональных методов исследования дыхательной системы,

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАМН, 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22.

E-mail: ed_nekrasov@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Eduard V. Nekrasov,

PhD, Senior staff scientist of Laboratory of Functional Research of Respiratory System, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration SB RAMS, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: ed_nekrasov@mail.ru