

УДК 547.915+547.953+577.153+54-39

А. Р. Хачатрян, М. К. Карагезян

**Сравнительный анализ изменений динамики интенсивности
свободнорадикального окисления липидов в ферментативной и
неферментативной системах при интоксикации микотоксином
зеараленоном**

(Представлено академиком К. Г. Карагезяном 22/VIII 2003)

Изучение метаболизма мембран лимфоцитов (МЛ) селезенки белых крыс при отравлении их микотоксином зеараленоном (МТЗ) представляет интерес для многих направлений медико-биологического профиля [1].

Жирнокислотные компоненты липидов в качестве субстратов окисления, активно вовлекающихся в процессы свободнорадикального окисления (СРО), образуют продукты переокисления типа гидроперекисей, моно-, ди-, триеновых конъюгатов, соединений типа Шиффа, малонового диальдегида (МДА), формирующие в комплексе систему с мощным мембранотоксическим и мембранолитическим действием. Последнее обуславливает одно из главных молекулярно-биологических звеньев патогенетического механизма действия МТЗ [2].

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей изменения в МЛ селезенки белых крыс в различные периоды интоксикации МТЗ, сдвигов интенсивности течения реакций СРО липидов. Исследования проводились по выявлению и изучению особенностей нарушения интенсивности течения процессов СРО липидов в деталях при интоксикации в ферментативной и неферментативной системах [3].

Исследования проводились на 10 беспородных белых крысах-самцах массой 150-170 г, содержащихся на ординарном пищевом рационе в обычных условиях вивария. Интоксикацию МТЗ производили путем однократного внутривенного введения 1 мл этанолового раствора МТЗ в концентрации 15 мкг/мл в месте слияния верхней полый и подключичной вен (Angulus venosus); спустя 1, 2, 3, 4, 5 ч животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Изолированные и многократно промытые селезенки объединяли и использовали для выделения лимфоцитов из клеточной суспензии центрифугированием в градиенте плотности фикол 400-верографин 12 и в количестве 10^7 клеток на 1 мл суспензии преинкубировали при 37°C в 0,1 М растворе трис-HCl-буфера (рН 7.4) в смеси со средой 199 (соотношение 1 : 4) в присутствии митогена конканавалина А (6 мкг/мл). В мембранах лимфоцитов, полученных методом осмотического шока и осажденных центрифугированием, определяли содержание МДА [4].

Анализ данных заключается в вычислении и сравнении описательных статистик в каждой подгруппе (5 уровней времени). Проверка нормальности распределения, показанная в таблице 1, проведенная с помощью критерия Шапиро-Уилка, подтвердила нормальность

распределения во всех группах по всем признакам. Для проверки статистических гипотез равенства средних в разные периоды времени использовался классический дисперсионный анализ (ANOVA). В случае отвержения гипотезы равенства средних использовался метод линейных контрастов Шеффе. Критический уровень значимости принимался равным 5% [5, 6]. Результаты проведенных исследований выявляют принципиально новую информацию по двум группам данных, касающихся количественных изменений МДА/мг белка в течение 5 ч в аскорбат-зависимой (неферментативной) (МДА1) и NADPH-зависимой (ферментативной) (МДА2) системах. В случае превышения уровня значимости $Pr < W$ над величиной 0.05 (т.е. 5%), мы руководствуемся нулевой гипотезой о нормальности данного признака в данной подгруппе. Анализ полученных результатов при подобном подходе позволяет сделать заключение о подчиненности всех изученных признаков по исследованным подгруппам нормальному распределению, что и послужило основанием для использования параметрический дисперсионный анализ - ANOVA для сравнения средних групповых (табл.2).

Данные, приведенные в табл. 2, построены на сравнении дисперсий, порождаемых внутригрупповой и межгрупповой вариациями с использованием F-критерия Фишера. Исходя из смысла фактора можно сформулировать нулевую гипотезу, согласно которой среднее количество МДА при отравлениях МТЗ не демонстрирует заметных различий в аскорбат- и NADPH-зависимой системах перекисления липидов, несмотря на то, что альтернативная гипотеза допускает возможность существования таких различий. В случае, когда $Pr > F < 5\%$, гипотеза о равенстве генеральных средних отклоняется.

Таблица 1

**Результаты проверки нормальности распределения признаков
в сравниваемых группах (МДА1 и МДА2)**

Переменная	Время	N	Mean	Sum	Std Dev	Variance	Skewness	Kurtosis	CV	Std Mean	W:Normal	Pr<W
МДА1	1	8	15,5	124	0.430946	0.185714	0.585474	-0.9177	2.780296	0.152362	0.927812	0.5012
МДА2		8	9.025	72.2	0.212132	0.045	-0.31427	-1.24444	2.350493	0.075	0.953426	0.7471
МДА1	2	8	20.2	161.6	0.4	0.16	0	-0.7	0.980198	0.141421	0.983282	0.9736
МДА2		8	11.975	95.8	0.265922	0.070714	0.660938	-1.02847	2.220639	0.094017	0.896811	0.2745
МДА1	3	8	20.4875	163.9	0.429077	0.184107	-1.40491	1.951579	2.094336	0.151702	0.867978	0.1468
МДА2		8	17	136	0.29277	0.085714	0	-1.596	1.722177	0.10351	0.951729	0.7305
МДА1	4	8	25.2	201.6	0.250713	0.062857	0	-0.14463	0.994894	0.088641	0.980637	0.9621
МДА2		8	18	144	0.29277	0.085714	0	-1.596	1.6265	0.10351	0.951729	0.7305
МДА1	5	8	30.2	241.6	0.320713	0.102857	0.519675	-0.89444	1.061965	0.113389	0.944218	0.6563

МДА2		8	22.5	180	0.267261	0.071429	0	-1.01584	1.187828	0.094491	0.958077	0.7919
------	--	---	------	-----	----------	----------	---	----------	----------	----------	----------	--------

Примечание. N – число непропущенных значений признака МДА1 и МДА2 в данной подгруппе. Mean – среднее арифметическое; Sum – сумма значений анализируемого признака (МДА1 и МДА2) в данной подгруппе, Std Dev – стандартное отклонение, Variance – вариация, Skewness – асимметрия, Kurtosis – эксцесс, CV – коэффициент вариации, W – значение критерия Шапиро-Уилка для проверки нормальности распределения; Pr<W – достигнутый уровень значимости для данного критерия.

Таблица 2

Параметрический дисперсионный анализ - ANOVA

Переменная	Анализ вариаций						
	Выделенные эффекты значимы при $p < 0.05000$						
	SS	MS	SS Error	R-Square	MS Error	F	Pr>F
МДА1	998.029	249.507	4.86875	0.995145	0.13910	1793.63	0.0001
МДА2	893.210	223.302	2.5100	0.997198	0.07171	3113.78	0.0001

Примечание. SS - сумма квадратов, MS - средний квадрат, SS Error - ошибка суммы квадратов, R-Square - коэффициент детерминации, показывающий силу связи между фактором T и зависимой переменной МДА1 или МДА2, MS Error - ошибка средних квадратов, F - критерий Фишера, Pr > F - уровень значимости при данном критерии.

Из табл. 2 вытекает, что Pr > F оказывается значительно меньше величины 0.05 (5%), что свидетельствует о правильности отказа от применения нулевой гипотезы. При внутригрупповом попарном сравнении генеральных средних при помощи теста Шеффе (табл. 3, 4) становится очевидным наличие довольно интенсивно совершающегося процесса изменения количества МДА в обеих системах перекисеобразования, особенно в аскорбат-зависимой. R-Square - показатель, называемый коэффициентом детерминации, показывающий силу связи между фактором (время T) и зависимой переменной (МДА1 и МДА2). Его значение изменяется от 0 до 1. Очевидно, что этот показатель подчеркивает очень большую зависимость между этими двумя признаками. С каждым последующим часом его среднее значение достаточно сильно меняется (рис. 1 и 2). В период времени перекисления от T1 к T2 и T3 до T5 наиболее интенсивно совершающиеся изменения в значениях МДА отличаются в аскорбат-зависимой системе, в то время как ко второму и третьему часу их значения оказываются максимально приближенными. Количество же МДА в NADPH -зависимой системе также обнаруживает время-зависимый рост с каждым часом, с наиболее резким скачком в интервале между 3-им и 4-ым часом. Проверка по Шеффе говорит о наличии статистически значимого различия между средними на 3-й и 4-й час наблюдения. Хотя средние и близки, но они все же статистически значимо различаются.

Таблица 3

Результаты теста Шеффе для переменной МДА1

Т Сравнение	Нижняя граница доверительного интервала	Разность средних	Верхняя граница доверительного интервала	Значимость сравнения при $\alpha = 0.05$
5-4	4.3938	5.0000	5.6062	***
5-3	9.1063	9.7125	10.3187	***
5-2	9.3938	10.0000	10.6062	***
5-1	14.0938	14.7000	15.3062	***
4-5	-5.6062	-5.0000	-4.3938	***
4-3	4.1063	4.7125	5.3187	***
4-2	4.3938	5.0000	5.6062	***
4-1	9.0938	9.7000	10.3062	***
3-5	-10.3187	-9.7125	-9.1063	***
3-4	-5.3187	-4.7125	-4.1063	***
3-2	-0.3187	0.2875	0.8937	
3-1	4.3813	4.9875	5.5937	***
2-5	-10.6062	-10.0000	-9.3938	***
2-4	-5.6062	-5.0000	-4.3938	***
2-3	-0.8937	-0.2875	0.3187	
2-1	4.0938	4.7000	5.3062	***
1-5	-15.3062	-14.7000	-14.0938	***
1-4	-10.3062	-9.7000	-9.0938	***
1-3	-5.5937	-4.9875	-4.3813	***
1-2	-5.3062	-4.7000	-4.0938	***

..

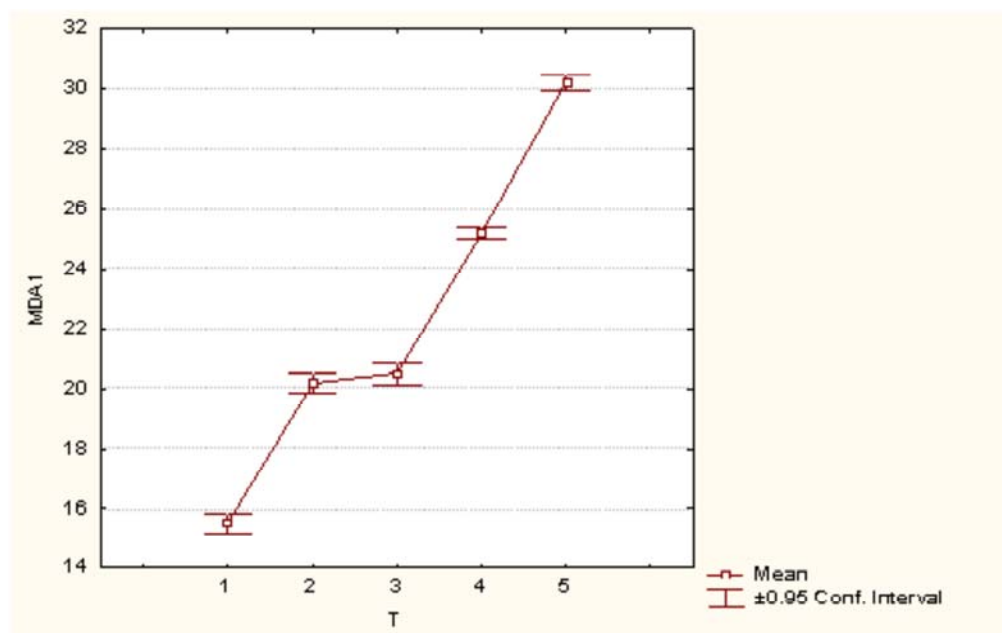


Рис. 1. Зависимость МДА1 от времени Т.

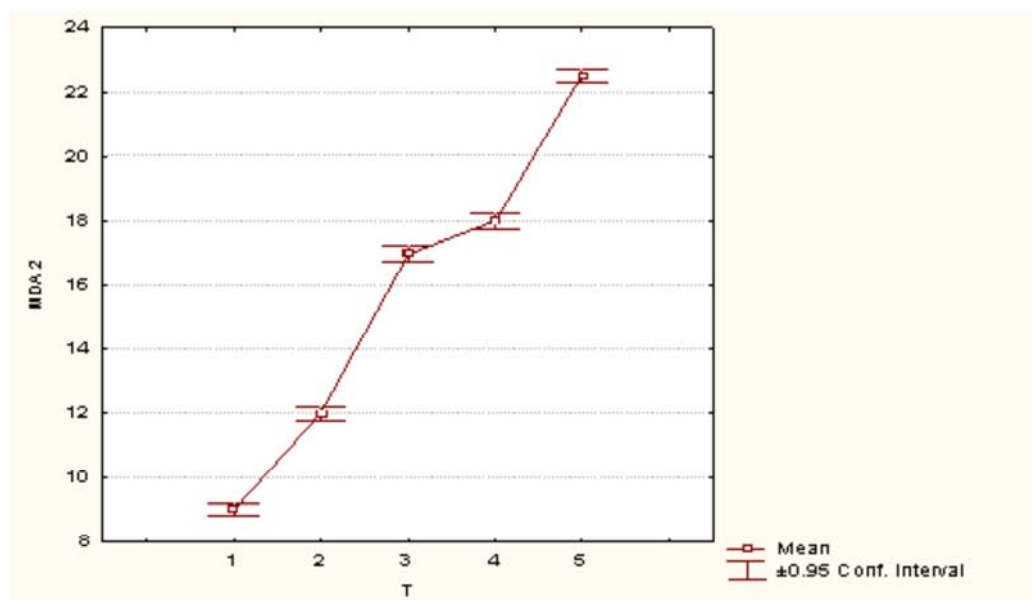


Рис. 2. Зависимость МДА2 от времени Т.

Таблица 4

Результаты теста Шеффе для переменной МДА2

Т Сравнение	Нижняя граница доверительного интервала	Разность средних	Верхняя граница доверительного интервала	Значимость сравнения при $\alpha = 0.05$
5-4	4.0648	4.5000	4.9352	***
5-3	5.0648	5.5000	5.9352	***
5-2	10.0898	10.5250	10.9602	***
5-1	13.0398	13.4750	13.9102	***
4-5	-4.9352	-4.5000	-4.0648	***
4-3	0.5648	1.000	1.4352	***
4-2	5.5898	6.0250	6.4602	***
4-1	8.5398	8.9750	9.4102	***
3-5	-5.9352	-5.5000	-5.0648	***
3-4	-1.4352	-1.0000	-0.5648	***
3-2	4.5898	5.0250	5.4602	***
3-1	7.5398	7.9750	8.4102	***
2-5	-10.9602	-10.5250	-10.0898	***
2-4	-6.4602	-6.0250	-5.5898	***
2-3	-5.4602	-5.0250	-4.5898	***
2-1	2.5148	2.9500	3.3852	***
1-5	-13.9102	-13.4750	-13.0398	***
1-4	-9.4102	-8.9750	-8.5398	***
1-3	-8.4102	-7.9750	-7.5398	***
1-2	-3.3852	-2.9500	-2.5148	***

Как видно из графиков зависимости МДА1 и МДА2 от времени Т с групповыми средними и 95%-ными доверительными интервалами для среднего, доверительные интервалы оказываются довольно узкими, что говорит о достаточно высокой точности оценки среднего этой величины и ее малой дисперсии (рис.1,2).

Вышеизложенное позволяет сделать заключение о более выраженных нарушениях перекисеобразовательного процесса в условиях интоксикации МКЗ в неферментативной системе перекисления, нежели в ферментативной, что подчеркивает важность статистического анализа в максимально объективной оценке патогенетической роли

изменений интенсивности течения реакций СРО липидов в мембранах лимфоцитов селезенки при изученной патологии, ответственных в целом за становление и модулирование иммунологической функции организма в экстремальных условиях его существования. Выражаем особую благодарность за помощь в выполнении статистического анализа В. П. Леонову (Центр БИОСТАТИСТИКА, Томск, РФ).

Институт молекулярной биологии НАН РА

Литература

1. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М. Наука. 1972. 230 с.
2. *Карагезян М. К., Овсепян Л. М., Овакимян С. С., Бояджян А. С., Осипян Л. Л., Карагезян К. Г.* - ДАН РА. 1995. Т. 341. N 2. С. 259-361.
3. *Карагезян М. К.* - Укр. биохим. журн. 2000. Т. 72. N3. С. 105-109.
4. *Хачатрян А. Р., Амирханян О. М., Карагезян М. К.* - Матер. шестого съезда Арм. физиол. о-ва. Ереван. 2001. С. 192-195.
5. *Ллойда Э., Ледермана У., Тюрина Ю. Н.* Справочник по прикладной статистике. В 2-х т. Финансы и статистика. М. Т.1. 1989. 510 с.; Т. 2. 1990. 526 с.
6. *Леонов В. П.* Обработка экспериментальных данных на программируемых микрокалькуляторах. Томск. Изд-во ТГУ. 1990. 376 с.

Ա. Ռ. Խաչատրյան, Մ. Կ. Ղարազյոզյան

**Լիպիդների ազատ ռադիկալային օքսիդացման ինտենսիվության դինամիկայի
համեմատական վերլուծությունը ֆերմենտային և ոչ ֆերմենտային համակարգերում
միկոտոքսին զեարալենոնով թունավորման ժամանակ**

Միկոտոքսին զեարալենոնով թունավորման ժամանակ լիպիդների ազատ ռադիկալային օքսիդացման հետազոտությունների արդյունքում առաջ են բերվել մի շարք վարկածներ, որոնց օբյեկտիվ գնահատման համար անհրաժեշտ է կատարել համապատասխան վիճակագրական վերլուծություն: Փորձարարական տվյալների նման վերլուծությունը հանգեցրեց այն եզրահանգմանը, որ ակնհայտ են պերօքսիդացիայի ընթացքի ընդգծված խախտումներ ոչ ֆերմենտատիվ միջավայրում զեարալենոնային թունավորման ժամանակ: