

КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ КАРБОНИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕЛКОВ УЛЬТРАПАСТЕРИЗОВАННОГО МОЛОКА

Ю.А. Подольникова¹, Ю.Г. Розенфельд¹, В.Е. Высокогорский¹, С.А. Коновалов¹,
Н.А. Беланова², К.К. Полянский^{3,4}

¹ ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина»

² ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

³ Воронежский филиал Российского экономического университета имени Г.В. Плеханова

⁴ ФГБОУ ВО "Воронежский государственный университет инженерных технологий"

Поступила в редакцию 04.09.2025 г.

Аннотация. Одни из самых частых повреждений белков являются их окислительные модификации, которые наблюдаются как в тканях живых организмов, так и в продуктах питания. Наиболее распространённой посттрансляционной модификацией белков является образование их карбонильных производных, для определения которых широко используется 2,4-динитрофенилгидразин (2,4-ДНФГ). Образующиеся продукты взаимодействия карбонильных производных регистрируются в широком диапазоне волн как в ультрафиолетовой, так и видимой части спектра от 230 до 535 нм, при отдельных длинах волн регистрируют максимальное поглощение альдегидных производных, а при других – кетонов. Учитывая определённые различия этих карбонильных производных в механизме окислительной модификации белков представляется целесообразным выяснить значимые корреляции первичных и вторичных продуктов окислительной модификации молочных белков.

Данное исследование является фрагментом комплексной работы по изучению окислительной модификации белков молочных продуктов, предназначенных для питания детей раннего возраста. Объектами исследования служили: образцы ультрапастеризованного коровьего молока «Тёма»; образцы ультрапастеризованного козьего молока «Село Зеленое», так как ультрапастеризованное молоко данных видов животных чаще всего используется в качестве молочной основы для получения адаптированных молочных смесей. Для сравнения использованы образцы зрелого молока, взятого через 1–6 мес после родов у здоровых матерей, среднего возраста. Окислительную модификацию белков молока оценивали по методу, основанному на реакции взаимодействия карбонильных производных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием производных 2,4-динитрофенилгидразона, с регистрацией продуктов их превращения на спектрофотометре UNICO 2800 (США) при длинах волн от 230 до 535 нм. Для оценки уровня окислительной модификации исследуемого материала определяли уровень карбонильных производных после индукции окисления *in vitro* по реакции Фентона добавлением растворов FeSO₄ и пероксида водорода – металл-катализируемое окисление (МКО) белков.

Использование корреляционно-регрессионного анализа для выявления взаимосвязи уровня альдегид-динитрофенилгидразонов (первичные маркёры окислительного повреждения) и кетон-динитрофенилгидразонов (вторичные маркёры) позволило выявить различные значения коэффициента корреляции в пробах ультрапастеризованного молока коров, коз и грудного молока.

При спонтанном окислении белков ультрапастеризованного молока установлены сильные прямые корреляции между альдегид-динитрофенилгидразонами и кетон-динитрофенилгидразонами при длинах волн 356 и 370 нм ультрафиолетовой части спектра и $\lambda = 428, 430$ нм с показателями при 434 нм видимого спектра. Показатели молока коз при спонтанном окислении отличаются от данных коровьего молока выявлением сильной обратной корреляции между значениями при $\lambda = 280$ и 370 нм. В отличие от показателей пастеризованного молока коров и коз, коэффициент Пирсона грудного молока при спонтанном окислении указывает на сильную прямую корреляцию между альдегид-динитрофенилгидразонами и кетон-динитрофенилгидразонами по данным на всех исследуемых волн как в ультрафиолетовой, так и в видимой части спектра. При активации окисления ионами железа значительно снизилась значимость сильных корреляций, но сохранилась статистическая значимость между показателями при близких значениях волн, при которых регистрируются как альдегид-динитрофенилгидразоны, так и кетон-динитрофенилгидразоны.

Ключевые слова: спектрофотометрия, окислительная модификация белков, гликоксидация белков,

металл – катализируемое окисление, карбонильные производные, коэффициент корреляции, ультрапастеризованное молоко.

Окислительные повреждения белков одни из самых распространённых нарушений, встречающихся как в живой системе, так и вне организма [1, 2]. Наиболее распространённой посттрансляционной модификацией белков является их карбонилирование, которое обычно развивается в условиях окислительного стресса без участия ферментов. Помимо этого, неконтролируемого окислительного образования карбонильных соединений в белках (первичные карбонилы), в результате окисления липидов образуются «вторичные карбонилы», которые впоследствии встраиваются в белки путём образования ковалентных связей [3, 4].

Для характеристики степени окислительного стресса при различных воздействиях и патологических состояниях широко распространено определение карбонильных производных белков в живых организмах [1, 3], так как оба основных механизма окислительной модификации белков: радикально-опосредованный «путь Штадтмана», включающий в качестве источников активных форм кислорода ионы металлов [5] и альтернативный механизм с участием митохондрий и реакций гликоксиляции [6] приводят к карбонилированию белков.

До последнего времени считалось, что в пищевых системах окисление белков, приводящее к образованию первичных карбонилов, осуществляется в основном, радикалами [7, 8], но по данным [9], глюкоза более эффективно, чем перекись водорода, вступает в реакцию с ионами металлов, создавая необходимую окислительную среду для карбонилирования различных пищевых белков, включая мясные белки, овальбумин, β -лактоглобулин и соевые белки.

Определённое значение в повышение уровня карбонильных производных белков имеет и образование вторичных карбонилов. Так, малоновый диальдегид и другие карбонильные производные липидного происхождения взаимодействуют с аминокгруппами белков и образуют вторичные комплексы [10].

Таким образом, все эти сведения подтверждают важность определения уровня карбонильных соединений в качестве маркёров степени окислительного повреждения белков. Достаточно широко распространённым методом определения количества карбонильных производных белков является применение 2,4-динитрофенилгидразина (2,4-ДНФ) с последующим определением динитрофенилгидразонов (2,4-ДНФГ). Levine R.L. [11] рекомендовал регистрировать данные при

370 нм. Данную длину волны использовали в работах [12, 13]. Однако, динитрофенилгидразоны регистрируются в широком диапазоне волн как ультрафиолетового, так и видимого спектра, причём максимальное поглощение при длинах волн 230, 254, 270, 280, 356, 428 и 430 нм характерно для альдегид-динитрофенилгидразонов, а при длинах волн 363, 370, 434, 524, 530, 535 нм регистрируются кетон-динитрофенилгидразоны [14]. Использование определения динитрофенилгидразонов при различных длинах волн для оценки уровня карбонильных соединений белков при различных вариантах окислительного стресса привело к затруднению трактовки накопленного обширного материала, перегруженного числовыми значениями. Для унификации трактовки полученного числового материала спектрофотометрического определения карбонильных соединений Фомина М.А. с соавтр. (2014) предложили «Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях» [15]. Этот приём оценки уровня карбонильных соединений белков также изобилует цифровыми значениями и необходимостью спектрофотометрической регистрации значений поглощения в широком диапазоне при различных длинах волн от 230 до 535 нм.

В то же время для практической оценки сохранности биологической ценности продукта необходим более удобный, распространённый и экономически выгодный подход.

С целью обоснования и сокращения диапазона выбранных волн регистрации динитрофенилгидразонов проведён сравнительный корреляционный анализ уровня карбонильных соединений белков молочных продуктов.

Цель исследования – выявить статистически значимые корреляции первичных и вторичных продуктов окислительной модификации молочных белков.

МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА

Данное исследование является фрагментом комплексной работы по изучению окислительной модификации белков молочных продуктов, предназначенных для питания детей раннего возраста. Объектами исследования служили: образцы ультрапастеризованного коровьего молока «Тёма»; образцы ультрапастеризованного козьего молока «Село Зеленое», так как ультрапастеризованное молоко данных видов животных чаще всего используется в качестве молочной основы для

получения адаптированных молочных смесей. Исследованы 6 образцов ультрапастеризованного коровьего молока «Тёма» (ОАО "Юнимилк", Россия, ТУ 10.86.10-076-13605199), 10 образцов молока козьего питьевого цельного ультрапастеризованного отборного «Село Зеленое» (ОАО «Милком», Россия), а также 10 образцов зрелого молока, взятого через 1-6 месяцев после родов у некурящих здоровых матерей, среднего возраста 28 лет, которые рожали в срок и кормили грудью своих детей начиная с первого дня после родов. Все участники были полностью проинформированы о процедуре и дали свое письменное добровольное информированное согласие на участие.

Окислительную модификацию белков молока оценивали по методу Reznick A.Z., Parker L. в модификации Дубининой Е.Е. и соавт. [16, 17], основанному на реакции взаимодействия карбонильных производных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием производных 2,4-динитрофенилгидразона. Спектры поглощения альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ) и кетон-динитрофенилгидразонов (КДНФГ) регистрировали на спектрофотометре UNICO 2800 (United Products & Instruments, США).

Уровень карбонильных производных белков оценивается по двум параметрам: в нативной пробе биологического материала и при индукции *in vitro* окисления белков по реакции Фентона добавлением растворов FeSO_4 и пероксида водорода – металл-катализированное окисление – МКО белков.

После инкубации молока с 10 мМ раствором FeSO_4 и 0,3 мМ H_2O_2 в течение 15 мин при 37 °С определяли интенсивность МКО белков для выявления резервных возможностей антиокислительной системы молока. Так как АДНФГ рассматриваются как первичные, а КДНФГ – вторичные маркёры окислительного стресса [15], то проведён корреляционно-регрессионный анализ их взаимосвязи. Содержание первичных продуктов карбонилизации – АДНФГ – определяли по оптической плотности при длинах волн 230, 254, 270, 280, 356, 428 и 430 нм, а уровень вторичных продуктов – КДНФГ – при длинах 370, 434, 524, 530, 535 нм [15].

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием корреляционно-регрессионного анализа. После определения нормальности распределения сопоставляемых показателей проведён подсчёт коэффициента корреляции Пирсона (r), определён критический уровень значимости (p) [18]. Градация силы корреляции проведена по шкале Чеддока [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При определении значений экстинкции исследуемых продуктов установлено, что показатели кетон-динитрофенилгидразонов при длинах волн 363 нм и 370 нм практически одинаковы, как и при $\lambda = 530$ и 535 нм, поэтому в таблицах представлены данные взаимосвязи только с длинами волн 370 и 535 нм. Анализ корреляций показателей альдегид-динитрофенилгидразонов и кетон-динитрофенилгидразонов ультрапастеризованного коровьего молока «Тёма» при длинах волн, относящихся к ультрафиолетовой части спектра, выявил при спонтанном окислении прямую значимую связь только при длине волны 356 нм (АДНФГ) с маркёром КДНФГ. В видимой части спектра выявлены прямые значимые корреляции в узком участке спектра – при длинах волн, характерных для АДНФГ – 428 и 430 нм и для значений КДНФГ одной волны – 434 нм, соответственно (Табл.1).

На рис. 1 приведены скаттерограммы для подтверждения статистически значимой прямой корреляции высокой силы между показателями первичных маркёров (АДНФГ) и вторичных маркёров (КДНФГ) карбонильных производных при длинах волн 356/370 нм в условиях спонтанного окисления белков ультрапастеризованного коровьего молока «Тёма», козьего и грудного молока.

При железе-индуцированном образовании пероксида водорода установлены аналогичные корреляции между АДНФГ и КДНФГ, как и при спонтанном окислении (Табл. 2).

При исследовании показателей козьего молока, как и коровьего, в ультрафиолетовой части спектра с маркёром КДНФГ (370 нм) установлена прямая значимая корреляция с показателем АДНФГ (356 нм). Однако в отличие от коровьего молока среди показателей спонтанного окисления выявлена обратная значимая зависимость между АДНФГ (280 нм) и КДНФГ (370 нм). Значительно отличаются показатели козьего молока от данных коровьего и по данным корреляций видимой части спектра. Установлена прямая значимая корреляция между всеми изученными показателями альдегид-динитрофенилгидразонов и кетон-динитрофенилгидразонов, кроме показателей при длинах волн 430 нм и 535 нм, когда наблюдается статистически несущественная связь. При активации окислительных процессов под влиянием ионов железа, как и при спонтанном окислении, выявлена прямая сильная связь между показателями альдегид-динитрофенилгидразонов и кетон-динитрофенилгидразонов

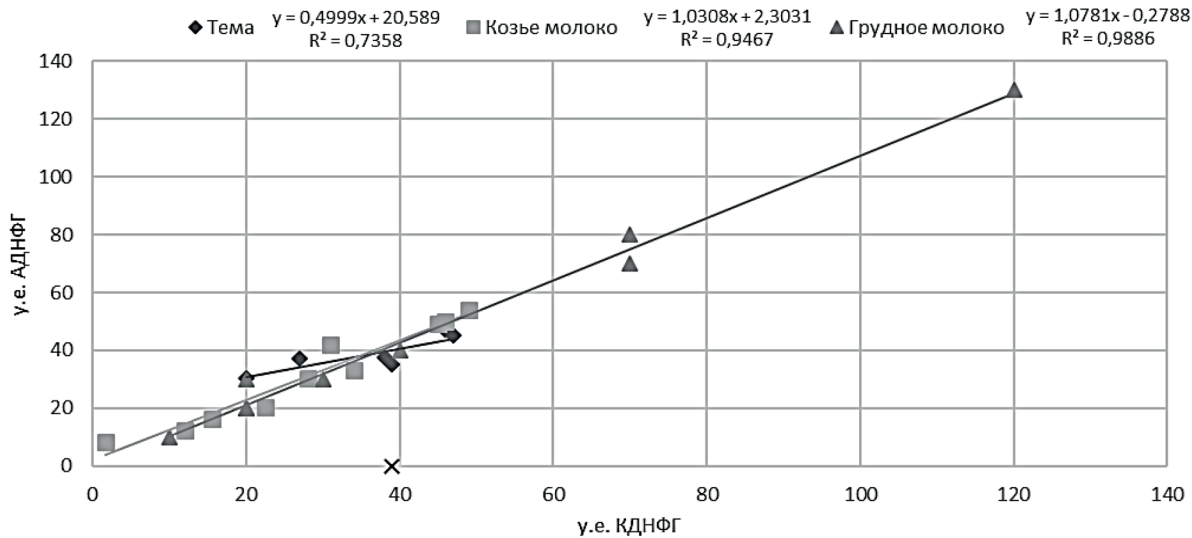


Рис. 1. Зависимость между показателями АДНФГ и КДНФГ при длинах волн 356/370 нм (спонтанное окисление)

Таблица 1

Коэффициенты корреляции (r) содержания карбо-
нильных производных белков молока при спонтанном
окислении

λ , нм	Коровье молоко	Козье молоко	Грудное молоко
АДНФГ(uv) и КДНФГ (uv)			
254/370	- 0,468 (p=0,367)	- 0,612 (p=0,065)	0,752 (p=0,015)
270/370	- 0,735 (p=0,119)	-0,520 (p=0,129)	0,680 (p=0,034)
280/370	- 0,160 (p=0,767)	-0,756 (p=0,014)	0,719 (p=0,022)
356/370	0,856 (p=0,045)	0,965 (p=0,00002)	0,994 (p=0,0001)
АДНФГ(vs) и КДНФГ (vs)			
428/434	0,926 (p=0,010)	0,932 (p=0,0002)	0,973 (p=0,00001)
428/524	-0,160 (p=0,767)	0,679 (p=0,034)	0,852 (p=0,002)
428/535	0,028 (p=0,959)	0,635 (p=0,053)	0,633 (p=0,054)
430/434	0,975 (p=0,002)	0,935 (p=0,0001)	0,993 (p=0,000001)
430/524	0,242 (p=0,652)	0,660 (p=0,042)	0,914 (p=0,0004)
430/535	0,079 (p=0,885)	0,616 (p=0,062)	0,760 (p=0,013)

Примечание: АДНФГ – альдегиддинитрофенилгидразоны; КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны; uv – ультрафиолетовая область спектра; vs – видимая область спектра; p – критический уровень значимости коэффициента корреляции

Таблица 2

Коэффициенты корреляции (r) содержания карбо-
нильных производных белков молока при металл-ка-
тализируемом окислении

λ , нм	Коровье молоко	Козье молоко	Грудное молоко
АДНФГ(uv) и КДНФГ (uv)			
254/370	0,028 (p=0,959)	- 0,405 (p=0,251)	0,687 (p=0,0317)
270/370	0,376 (p=0,477)	-0,043 (p=0,906)	0,541 (p=0,111)
280/370	0,057 (p=0,916)	0,254 (p=0,481)	0,593 (p=0,076)
356/370	0,928 (p=0,015)	0,985 (p=0,000001)	0,926 (p=0,0002)
АДНФГ(vs) и КДНФГ (vs)			
428/434	0,883 (p=0,033)	0,927 (p=0,0002)	0,984 (p=0,000001)
428/524	-0,092 (p=0,865)	-0,018 (p=0,960)	0,570 (p=0,090)
428/535	-0,294 (p=0,582)	-0,139 (p=0,703)	0,534 (p=0,117)
430/434	0,962 (p=0,006)	0,994 (p=0,000001)	0,983 (p=0,000001)
430/524	-0,198 (p=0,713)	- 0,027 (p=0,941)	0,567 (p=0,092)
430/535	-0,351 (p=0,508)	-0,150 (p=0,681)	0,533 (p=0,118)

Примечание: Обозначения аналогичны таблице 1

при длинах волн 356 нм и 370 нм и в видимой ча-
сти спектра при $\lambda = 428$ нм и 430 нм по отношению
к данным при $\lambda = 434$ нм.

В отличие от проб ультрапастеризованно-
го молока при анализе корреляций показателей

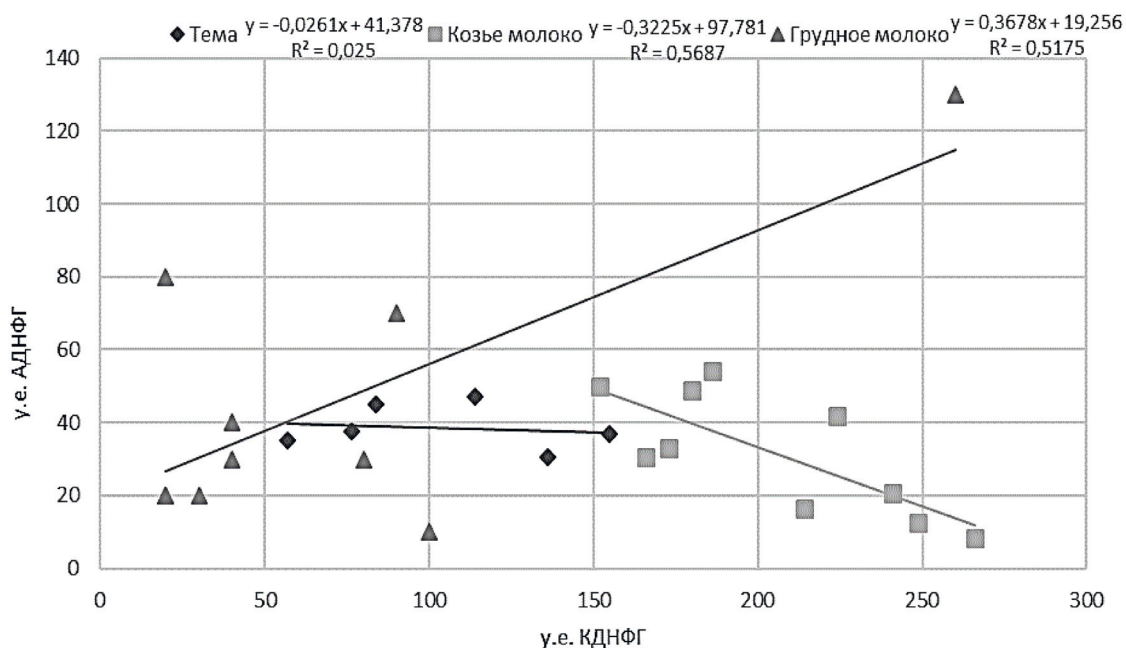


Рис. 2. Зависимость между показателями АДНФГ И КДФГ при длинах волн 280/370 нм (спонтанное окисление)

грудного молока на всех длинах волн как ультрафиолетовой части, так и видимой части спектра выявлены значимые прямые корреляции между маркерами альдегид-динитрофенилгидразонов и кетон-динитрофенилгидразонов. Причём наиболее выраженные взаимосвязи наблюдаются, как и в пробах коровьего и козьего молока, при 356 (АДНФГ) и 370 нм (КДФГ) ультрафиолетовой части и при длинах волн 428, 430 нм – маркеров АДНФГ и маркера КДФГ (434 нм) видимой части спектра. Эти значимые корреляции повторяются и в условиях металл-катализируемой активации окислительных процессов.

Высокие значения коэффициентов корреляции значений уровня различных динитрофенилгидразонов совпадают с указаниями на то, что оптимальным диапазоном светопоглощения для определения содержания карбонильных производных белков являются длины волн в интервале 360 – 390 нм [20-21].

На рис. 2 отражены результаты, установленной при спонтанном окислении статистически значимой обратной высокой связи показателей АДНФГ и КДФГ белков козьего молока в противоположность данным грудного молока и отсутствию значимой корреляции белков коровьего молока при длинах 280/370 нм.

Значительные отличия корреляционных зависимостей исследуемых образцов молока и молочных продуктов безусловно вызваны, в первую

очередь, различиями белкового состава и особенностями антиокислительной системы. В то же время нельзя исключить влияние технологических факторов (повышенная температура, увеличенный контакт с кислородом, воздействие ионов металлов и т.д.) на снижение антиокислительной защиты исследуемого материала.

Статистическая значимость корреляционной зависимости при определенных длин волн (при которых наблюдаются максимальные значения коэффициента корреляции) позволяют рекомендовать использовать эти данные для дополнительной оценки биологической ценности молочных продуктов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование корреляционно-регрессионного анализа для выявления взаимосвязи уровня альдегид-динитрофенилгидразонов (первичные маркеры окислительного повреждения) и кетон-динитрофенилгидразонов (вторичные маркеры) позволило выявить различные значения коэффициента корреляции в пробах ультрапастеризованного молока коров, коз и грудного молока.

При спонтанном окислении белков ультрапастеризованного молока установлены сильные прямые корреляции между альдегид-динитрофенилгидразонами и кетон-динитрофенилгидразонами при длинах волн 356 и 370 нм в ультрафиолетовой части спектра и при длинах волн 428, 430 нм с показателями при 434 нм видимого

спектра. Показатели молока коз при спонтанном окислении отличаются от данных коровьего молока выявлением сильной обратной корреляции между значениями при $\lambda = 280$ и 370 нм в ультрафиолетовой области спектра и сильных прямых взаимосвязей во всех исследуемых корреляциях видимой части спектра, исключая длины волн при 430 и 535 нм. В отличие от показателей пастеризованного молока коров и коз, коэффициент Пирсона грудного молока при спонтанном окислении указывает на сильную прямую корреляцию между альдегид-динитрофенилгидразонами и кетон-динитрофенилгидразонами по данным на всех исследуемых волн как в ультрафиолетовой, так и в видимой части спектра. При активации окисления ионами железа значительно снизилось значение корреляций, но сохранилась статистическая значимость между показателями при близких значениях волн, при которых регистрируются как альдегид-динитрофенилгидразоны, так и кетон-динитрофенилгидразоны.

Статистическая значимость прямой корреляционной связи высокого уровня силы при $356/370$ нм карбонильных производных белков всех исследуемых молочных продуктов при спонтанном окислении подтверждает возможность использования этого показателя для характеристики биологической ценности молочных продуктов. Противоположное направление корреляционной связи высокой силы при $280/370$ нм при окислении карбонильных производных белков различных продуктов требует дальнейшего уточнения для выявления их функциональной зависимости. Полученные результаты свидетельствуют, что корреляционный анализ уровня карбонильных производных может служить дополнительным критерием биологической ценности белков молочных продуктов, так как процесс образования карбонильных производных существенно влияет на аминокислотный состав. Выявление определенных длин волн при которых наблюдаются максимальные значения коэффициента корреляции позволяют рекомендовать использовать эти данные для дополнительной оценки биологической ценности молочных продуктов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ //

REFERENCES

1. Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньшикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин. – Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2017. – 284 с. // Menshikova E.B. Oxidative stress, pathological conditions and diseases / E.B. Menshikov, N.K. Zenkov, V.Z. Lankin. – Novosibirsk: Siberian University Publishing House, 2017. – P. 284.
2. Fedorova M. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies / M. Fedorova, R. C. Bol-lineni, R. Hoffmann // Mass spectrometry reviews. – 2014. – Vol. 33. – No. 2. – P. 79-97.
3. Akagawa M. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches / M. Akagawa // Free Radical Research. – 2021. – Vol. 55. – No 4. – P. 307-320.
4. Esteves M. Malondialdehyde interferes with the formation and detection of primary carbonyls in oxidized proteins / M. Esteves, P. Padilla, L. Carvalho, L. Martin, A. Carrapiso, J. Delgado // Redox Biology. – 2019. – Vol. 26. – P. 101277.
5. Stadtman E.R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins under the action of free radicals / E.R. Stadtman, R.L. Levin // Amino Acids. – 2003. – Vol. 25. – No. 3. – P. 207-218.
6. Akagawa M. Formation of α -amino adipic and γ glutamic semialdehydes in proteins by the Maillard reaction / M. Akagawa, D. Sasaki, Y. Kurota, K. Suyama // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2005. – Vol. 1043. – No. 1. – P. 129-134.
7. Esteves M. Protein carbonyls in meat products: a review / M. Esteves // Meat Science. – 2011. – Vol. 89. – No. 3. – P. 259-279.
8. Hellwig M. Analysis of protein oxidation in food and feed products / M. Hellwig // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2020. – Vol. 68. – No. 46. – P. 12870-12885.
9. Luna C. Oxidative damage to food and human serum proteins: Radical-mediated oxidation vs. glyco-oxidation / C. Luna, M. Estevez // Food Chemistry. – 2018. – Vol. 267. – P. 111-118.
10. Wang Z. Effects of malondialdehyde as a byproduct of lipid oxidation on protein oxidation in rabbit meat / Z. Wang, Z. He, A.M. Emara, X. Gan, H. Li // Food Chemistry. – 2019. – Vol. 288. – P. 405-412.
11. Levine R.L. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shaltiel, E.R. Stadtman // Methods in enzymology. Academic Press. – 1990. – Vol. 186. – P. 464-478.
12. Белоногов Р.Н. Изменение содержания продуктов окислительной модификации белков и липидов в опухолевой ткани на разных стадиях рака легкого / Р.Н. Белоногов, Н.М. Титова,

А. А. Савченко // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2009. – Т. 147. – № 5. – С. 562-563. // Belonogov R.N. Changes in the content of products of oxidative modification of proteins and lipids in tumor tissue at different stages of lung cancer / R.N. Belonogov, N.M. Titova, A. A. Savchenko // Byul. experim. biology and medicine. – 2009. – Vol. 147. – No. 5. – P. 562-563.

13. Rajesh M. Determination of Carbonyl Group Content in Plasma Proteins as a Useful Marker to Assess Impairment in Antioxidant Defense in Patients with Eales' Disease/ M. Rajesh, S. Konerirajapuram, C. Karunakaran et al. // Indian Journal of Ophthalmology. – 2004. – Vol. 52. – No. 2. – P. 139-144.

14. Jones L.A. Spectrophotometric Studies of Some 2,4-Dinitrophenylhydrazones / L.A. Jones, J.C. Holmes, R.B. Seligman // Analytical Chemistry. – 1956. – Vol. 28. – No 2. – P. 191-198.

15. Фомина М.А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина. – ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава. Рязань: РИО РязГМУ, 2014. – 60 с. // Fomina M.A. Method of complex assessment of the content of products of oxidative modification of proteins in tissues and biological fluids: methodological recommendations / M.A. Fomina, Yu. V. Abalenikhina. – Ryazan State Medical University of the Ministry of Health.- Ryazan: RIO Ryazan State Medical University, 2014. – P. 60.

16. Reznick A.Z. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay / A.Z. Reznick, L. Packer // Methods Enzymol. – 1994. – Vol. 233. – P. 357-363.

17. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов, И. Г. Поротов // Вопр. мед. Химии. – 1995. – Т. 41. – №1. – С. 24-26. // Dubinina E.E. Oxidative modification of human serum proteins, a method for its determination / E.E. Dubinina, С.О. Burmistrov, D.A. Khodov, I. G. Porotov // Vopr. med. Chemistry. – 1995. – Т. 41. – №1. – P. 24-26.

18. Гржибовский А.М. Корреляционный анализ данных с использованием программного обеспечения Statistica и SPSS / А.М. Гржибовский, С.В. Иванов, М.А. Горбатова // Наука и Здравоохранение. – 2017. – №1. – С. 7-36. // Grzhibovskij A.M. Korreljacionnyj analiz dannyh s ispol'zovaniem programmnogo obespechenija Statistica i SPSS / A.M. Grzhibovskij, S.V. Ivanov, M.A. Gorbatoва // Nauka i Zdravoohranenie. – 2017. – №1. – P. 7-36.

19. Кадочникова Е.И. Статистический анализ пространственных данных / Е.И. Кадочникова, Ю.А. Варламова. – Казань: Издательство Казанского университета, 2023. – 140 с. // Kadochnikova E.I. Statistical analysis of spatial data / E.I. Kadochnikova, Yu.A. Varlamova. – Kazan: Kazan University Press. – 2023. – P. 140.

20. Castegna A. Protein Carbonyl Levels - An Assessment of Protein Oxidation Apoptosis Methods in Pharmacology and Toxicology / A. Castegna, J. Drake, C. Pocernich, D. A. Butterfield // Methods in Biological Oxidative Stress. – 2003. – P. 161-168.

21. Butterfield D. A. Brain protein oxidation in agerelated neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins / D.A. Butterfield, J. Kanski // Mech. Ageing Dev. – 2001. – No. 122. – P. 945-962.

ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина»

Высокогорский Валерий Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры продуктов питания и пищевой биотехнологии

E-mail: ve.vysokogorskiy@omgau.org

Коновалов Сергей Александрович, кандидат технических наук, доцент, зав. кафедрой продуктов питания и пищевой биотехнологии

E-mail: sa.konovarov@omgau.org

Подольникова Юлия Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры продуктов питания и пищевой биотехнологии

E-mail: yua.podolnikova@omgau.org

Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin

Vysokogorskiy Valery E. PhD., DSci, Full Professor of the Department of Foodstuffs and Food Biotechnology

E-mail: ve.vysokogorskiy@omgau.org

Konovarov Sergey A., PhD., associate professor, Head of the Department of Foodstuffs and Food Biotechnology

E-mail: sa.konovarov@omgau.org

Podolnikova Yuliya A., PhD in Biological sciences, Associate Professor at of the Department of Foodstuffs and Food Biotechnology

E-mail: yua.podolnikova@omgau.org

Розенфельд Юлия Геннадьевна ассистент кафедры продуктов питания и пищевой биотехнологии

E-mail: yug.rozenfeld06.06.01@omgau.org

Воронежский государственный университет

Беланова Наталья Анатольевна, кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии

Воронежский филиал ФГБОУ ВО «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова»

Полянский Константин Константинович – доктор технических наук, профессор, кафедры управления социально-экономическими системами и бизнес процессами; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Воронежский государственный университет инженерных технологий"

Rosenfeld Yulia G., Assistant Professor of the Department of Food and Food Biotechnology, E-mail: yug.rozenfeld06.06.01@omgau.org

Voronezh State University

Belanova Natalia A., PhD, Assistant professor of Analytical Chemistry Department

Voronezh branch of the Plekhanov Russian University of Economics

Polyansky Konstantin K., PhD., DSci., Full Professor, Management of Socio-Economic Systems and Business Processes department; Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "Voronezh State University of Engineering Technologies" (FSBEI HE "VSUET")

CORRELATION ANALYSIS OF THE CONTENT OF CARBONYL DERIVATIVES OF PROTEINS IN ULTRAPASTERIZED MILK

Yu.A. Podolnikova¹, Yu.G. Rosenfeld¹, V.E. Vysokogorskiy¹, S.A. Konovalov¹, N.A. Belanova² K.K. Polyansky^{3,4}

¹Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk

²Voronezh State University

³Voronezh branch of the Russian Economic University named after G.V. Plekhanov

⁴Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "Voronezh State University of Engineering Technologies" (FSBEI HE "VSUET")

Abstract. One of the most common types of protein damage is oxidative modification, which can be found in both living tissues and food products. The most common post-translational modification of proteins is the formation of carbonyl derivatives, which can be detected using 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH). The resulting interaction products of carbonyl derivatives are recorded in a wide range of wavelengths in both the ultraviolet and visible parts of the spectrum, from 230 to 535 nm, with maximum absorption of aldehyde derivatives at certain wavelengths and maximum absorption of ketones at other wavelengths [14]. Given the specific differences in these carbonyl derivatives in the mechanism of oxidative modification of proteins, it is advisable to investigate the significant correlations between primary and secondary products of oxidative modification of milk proteins.

The objects of the study were samples of ultra-pasteurized cow's milk «Tema»; samples of ultra-pasteurized goat's milk «Selo Zelenoye»; and samples of mature milk taken 1-6 months after childbirth from healthy middle-aged mothers. The oxidative modification of milk proteins was evaluated using a method based on the reaction of carboxylic derivatives of amino acid residues with 2,4-dinitrophenylhydrazine to form 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives, which were then analyzed using a UNICO 2800 spectrophotometer (USA) at wavelengths ranging from 230 to 535 nm. To assess the maximum possible level of oxidative modification of the studied material, the level of carbonyl derivatives was determined after in vitro oxidation induction by the Fenton reaction, using solutions of FeSO₄ and hydrogen peroxide – metal-catalyzed oxidation (MCO) of proteins.

The use of correlation and regression analysis to identify the relationship between the levels of aldehyde-dinitrophenylhydrazones (primary markers of oxidative damage) and ketone-dinitrophenylhydrazones (secondary markers) allowed us to identify different correlation coefficients in samples of ultra-pasteurized milk from cows, goats, and breast milk.

During the spontaneous oxidation of proteins in ultra-pasteurized milk, strong direct correlations were established between aldehyde-dinitrophenylhydrazones and ketone-dinitrophenylhydrazones at wavelengths of 356 and 370 nm in the ultraviolet part of the spectrum and at wavelengths of 428 and 430 nm in the visible spectrum. The spontaneous oxidation of goat's milk differs from that of cow's milk in that it shows a strong inverse correlation between the values at 280 and 370 nm. In contrast to the values of pasteurized cow and goat milk, the Pearson coefficient of spontaneous oxidation of breast milk shows a strong direct correlation between the values of aldehyde-dinitrophenylhydrazones and ketone-dinitrophenylhydrazones at all wavelengths studied in both the ultraviolet and visible regions of the spectrum. When oxidation was activated by iron ions, the number of significant strong correlations decreased significantly, but statistical significance remained between the values at similar wavelengths, where both aldehyde-dinitrophenylhydrazones and ketone-dinitrophenylhydrazones were detected.

Keywords: spectrophotometry, oxidative modification of proteins, protein glycation, metal-catalyzed oxidation, carbonyl derivatives, correlation coefficient, and ultra-pasteurized milk.