

УДК 612.35.064:612.766.2

**СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИЕЙ  
И ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИЕЙ БЕЛКА В ПЕЧЕНИ  
В ДИНАМИКЕ ТРИДЦАТИСУТОЧНОЙ ГИПОКИНЕЗИИ**

**Тимофеева Т.Г., Синицкий А.И., Филимонова Т.А., Панков Н.Е.,  
Козочкин Д.А., Деев Р.В.**

*ГБОУ ВПО ЧелГМА Минздравсоцразвития России, Челябинск, e-mail: biochem2009@yandex.ru*

Проведен анализ результатов биохимических исследований ткани печени лабораторных крыс на различных сроках гипокинетического стресса. В исследовании были использованы 1-, 3-, 7-, 10-, и 30-суточные модели гипокинетического стресса. В изученных образцах определены основные параметры перекисного окисления липидов и окислительной модификации белка, активность моноаминоксидазы – Б, как одного из прооксидантных ферментов. Показано, что усиление свободнорадикального окисления в печени при гипокинезии проявляется увеличением содержания конечных продуктов перекисного окисления липидов (Шиффовых оснований), ограничением антиоксидантного резерва ткани, проявлявшегося уменьшением содержания вторичных молекулярных продуктов липопероксидации при индукции Fe<sup>2+</sup>/аскорбат, усилением окислительной модификации белков. Показано, что обнаруженные изменения синхронизированы с приростом активности моноаминоксидазы – Б в органе.

**Ключевые слова:** гипокинезия, свободнорадикальное окисление

**RELATIONSHIP BETWEEN LIPID PEROXIDATION AND OXIDATIVE  
MODIFICATION OF PROTEINS IN LIVER IN THE DYNAMICS  
OF THIRTY – DAY HYPOKINESIA**

**Timofeeva T.G., Sinickij A.I., Filimonova T.A., Pankov N.E., Kozochkin D.A., Deev R.V.**

*Chelyabinsk state medical academy, Chelyabinsk, e-mail: biochem2009@yandex.ru*

The analysis of the biochemical studies results of liver tissue material, taken from laboratory rats at different periods of hypokinetic stress was carried out. The study used a 1-, 3-, 7-, 10- and 30-per diem model of hypokinetic stress. In the investigated samples the main parameters of lipid peroxidation and oxidative modification of proteins the activity of monoamine oxidase-B, one of the prooxidant enzymes were determined. The increased free – radical oxidation in the liver during hypokinesia is shown to be manifested by the increase in the content of the end products of lipid peroxidation (Schiff bases), limited antioxidant tissue reserve, that is characterized by increased oxidative modification of proteins. It is shown that the enhancement of free radical oxidation in hypokinesia is synchronized with the growth of MAO-B activity in the organ.

**Keywords:** hypokinesia, free radical oxidation

В современном обществе, в связи с возрастанием среди населения лиц, у которых профессиональная деятельность сопряжена с низкой двигательной активностью, гипокинезия превратилась в важную медико-социальную проблему. Кроме людей, связанных с малоподвижными профессиями, гипокинетическому воздействию подвержены некоторые категории больных [9].

Длительная гипокинезия является удобной экспериментальной моделью, воспроизводящей сочетание хронического стресса с дистрофией. Как стресс, так и дистрофия характеризуются отчётливыми изменениями со стороны свободнорадикального окисления. Однако данные, касающиеся состояния свободнорадикального окисления при гипокинезии, весьма противоречивы. Так, уровень липопероксидации при гипокинезии, по данным одних авторов, усиливается [8], а по данным других авторов – снижается [3].

Исследования, посвящённые изучению свободнорадикального окисления при гипокинезии, в основном посвящены липопероксидации. Между тем, дистрофия, име-

ющая место при длительной гипокинезии, характеризуется усилением протеолиза. В свою очередь, окисление белков является одной из составляющих убиквитин – зависимого протеолиза. Поэтому представляется правомерным предположение о том, что активация свободнорадикального окисления при гипокинезии проявляется не столько в усилении липопероксидации, сколько в усилении окисления белков. К сожалению, до настоящего времени отсутствуют работы, в которых одновременно исследованы липопероксидация и окисление белков в условиях гипокинезии. Эти звенья свободнорадикального окисления изучаются, как правило, изолированно друг от друга, что существенно затрудняет оценку соотношения процессов.

При гипокинезии в условиях усиления катаболических процессов в скелетных мышцах, миокарде, сосудистом русле и костной ткани, важную роль в поддержании энергетических и пластических резервов организма играет печень [4], которая принимает участие в общих реакциях компенсаторно-приспособительного характера [7, 10, 6].

Поэтому целью исследования являлась оценка липопероксидации и окислительной модификации белка в ткани печени на различных сроках (1, 3, 7, 10 и 30 суток) гипокинезии.

### Материалы и методы исследования

Гипокинетический стресс моделировали путём помещения крыс в специальные клетки – пеналы, ограничивающие подвижность животных при свободном доступе к пище и воде. Применялись 1(ГК1)-, 3(ГК3)-, 7(ГК7)-, 10(ГК10)-, 30(ГК30) – суточные модели гипокинетического стресса. Исследование проведено на 70 беспородных лабораторных крысах.

Содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали спектрофотометрически в липидном экстракте исследуемых тканей по методике Волчегорского И.А. и соавт. [1]. Определение конечных продуктов перекисного окисления липидов, а также интенсивности аскорбат-индуцированного ПОЛ производилось спектрофотометрическим методом Львовской Е.И. [5]. Окислительную модификацию белков оценивали по уровню образования динитрофе-

нилгидразонов по методу Дубининой Е.Е. [2]. Определение активности моноаминоксидазы – Б производили, используя метод Волчегорского И.А. и соавт. [1]. Результаты обрабатывались общепринятыми методами вариационной статистики и выражались в виде среднеарифметической ( $M$ ) и её стандартной ошибки ( $m$ ). Применялись критерии непараметрической статистики: Манна–Уитни ( $U$ ), Колмогорова–Смирнова ( $\lambda$ ) и Вальда–Вольфовица ( $WW$ ). Для обработки результатов исследования использован пакет прикладных программ Statistica 6.0 for Windows.

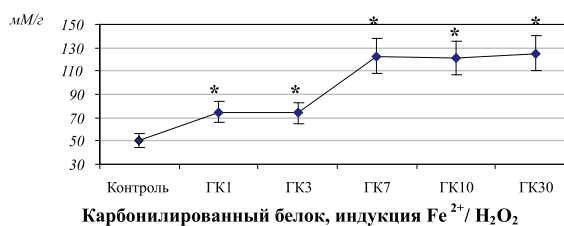
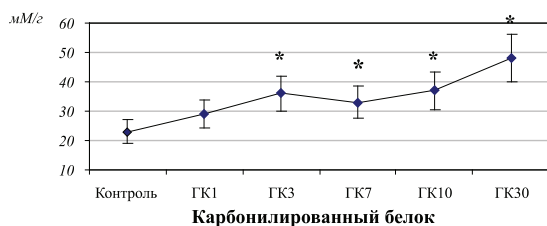
### Результаты исследования и их обсуждение

В печени при ГК 1 происходит снижение содержания белка (с 17% в контрольной группе до 12,6% в группе ГК1,  $n = 7$ ,  $p = 0,02U$ ) при одновременном увеличении уровня карбонилирования белков в ответ на индукцию  $Fe^{+2}/H_2O_2$  (рисунок). При этом отсутствуют статистически значимые изменения содержания молекулярных продуктов ПОЛ (таблица).

Содержание молекулярных продуктов ПОЛ и активность MAO – Б в печени при гипокинезии

Показатель	1 Контроль ( $n = 6$ )	2 Гипокинезия 1 сутки ( $n = 9$ )	3 Гипокинезия 3 суток ( $n = 9$ )	4 Гипокинезия 7 суток ( $n = 10$ )	5 Гипокинезия 10 суток ( $n = 10$ )	6 Гипокинезия 30 суток ( $n = 6$ )
ШО [г]	0,005 ± 0,002	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,009 $P_{1,4} = 0,02U$	0,05 ± 0,02 $P_{1,5} = 0,008U$	0,06 ± 0,02 $P_{1,5} = 0,008U$
ДК [и]	0,78 ± 0,02	0,82 ± 0,03	0,80 ± 0,01 $P_{2,3} = 0,01WW$	0,81 ± 0,01	0,80 ± 0,006	0,79 ± 0,01
КДнСТ [и] (индукция $Fe^{2+}$ /аскорбат)	2,86 ± 0,23	2,54 ± 0,36	1,75 ± 0,31 $P_{1,3} = 0,04U$	1,88 ± 0,28 $P_{1,4} = 0,02U$	2,08 ± 0,18 $P_{1,5} = 0,03U$	1,42 ± 0,16 $P_{1,6} = 0,005U$ $P_{5,6} = 0,04U$
MAO-Б нМ/г белка/мин	814,27 ± 258,65	1348,82 ± 383,76	2894,47 ± 732,78 $P_{1,4} = 0,04U$	1911,81 ± 284,4 $P_{1,4} = 0,02U$	929,95 ± 157,7 $P_{4,5} = 0,005U$	3009,55 ± 885,1 $P_{1,6} = 0,04U$ $P_{5,6} = 0,03U$

**Примечания:** ДК – диеновые конъюгаты (первичные продукты ПОЛ), КД и СТ – кетодиены и сопряженные триены (вторичные продукты ПОЛ); ШО – шиффовы основания (конечные продукты ПОЛ) буквенные подындексы [г] и [и] обозначают продукты ПОЛ, извлекаемые соответственно гептановой и изопропанольной фазами липидного экстракта; U – критерий Манна–Уитни. MAO-Б – моноаминоксидаза – Б.



Окислительная модификация белков печени при гипокинетическом стрессе:

\* – статистически значимые отличия от показателей контрольной группы,  $P < 0,05$ .

При статистической обработке использован критерий Манна – Уитни U

При ГК3 отмечается повышение содержания изопропанол-растворимых диеновых конъюгатов при одновременном снижении содержания кетодиенов и сопряженных триенов в ответ на индукцию. Одновременно наблюдается увеличение содержания кар-

бонилированных белков. Снижение уровня  $Fe^{+2}$ /аскорбат-индуцированного ПОЛ свидетельствует об уменьшении резервов для переокисления в органе. Это обстоятельство создает благоприятный фон для атаки свободными радикалами белковых молекул.

Усиление свободнорадикального окисления при ГК3 синхронизировано с трёхкратным приростом активности MAO-B в органе (см. таблицу). Известно, что этот фермент может усиливать окислительный стресс за счёт генерации  $H_2O_2$ , являющегося копродуктом реакции окислительного дезаминирования [1].

При ГК7 сохраняется сниженный уровень кетодиенов и сопряжённых триенов при индукции ( $Fe^{+2}$ /аскорбат), что свидетельствует о снижении резервов для липопероксидации. Повышенный уровень гептан-растворимых Шиффовых оснований на этом фоне свидетельствует о высокой интенсификации ПОЛ и низкой эффективности антиоксидантной защиты. Характерные для гипокинезии дистрофические процессы в органе проявляются в виде снижения содержания общего белка (до 8,2% в группе ГК7,  $n = 10$ ,  $P = 0,002U$ ). При этом увеличивается интенсивность карбонилирования белков при индукции  $Fe^{+2}/H_2O_2$ .

Для данного временного интервала гипокинетического стресса характерно временное ограничение карбонилирования белков на базальном уровне, что, скорее всего, является компенсаторной реакцией, направленной на ограничение протеолиза в печени. Однако уровень окислительной модификации белка по-прежнему превышает контрольные значения. Интересно отметить, что и при ГК7 также наблюдался повышенный уровень активности MAO-B в печени. Выявлена обратная корреляционная зависимость между активностью MAO-B и содержанием гептан-растворимых Шиффовых оснований ( $R_s = -0,82$ ,  $p = 0,02$ ,  $n = 7$ ), и прямая корреляционная зависимость между активностью MAO-B и содержанием изопропанол-растворимых Шиффовых оснований ( $R_s = 0,93$ ,  $p = 0,002$ ,  $n = 7$ ). При этом обнаружена обратная корреляционная зависимость между активностью MAO-B и содержанием вторичных изопропанол-растворимых продуктов ПОЛ при индукции ( $R_s = -0,86$ ,  $p = 0,01$ ,  $n = 7$ ), а также между активностью MAO-B и содержанием карбонилированных белков при индукции ( $R_s = -0,78$ ,  $p = 0,04$ ,  $n = 7$ ).

При ГК10, по сравнению с ГК7, наблюдалось усугубление интенсификации свободнорадикального окисления. Так, при повышенном уровне изопропанол-растворимых кетодиенов и сопряжённых триенов в ответ на индукцию  $Fe^{+2}$ /аскорбат отмечено увеличение содержания гептан-растворимых Шиффовых оснований (см. таблицу). В этот же период снижение содержания белка (до 9,6% в группе ГК10,  $n = 10$ ,  $p = 0,01U$ ) не компенсируется умень-

шением уровня окислительной деструкции белков. При ГК10 отмечено увеличение базального уровня карбонилирования белков на фоне повышения уровня карбонилирования протеинов при индукции  $Fe^{+2}/H_2O_2$  и нормализации активности MAO-B. Вероятно, фермент стал одной из мишеней «карбонильного стресса», что позволило ограничить процесс свободнорадикального окисления.

В условиях ГК30 сохраняются все признаки усиления свободнорадикального окисления, которые наблюдались на более ранних этапах хронического стресса. Также сохранялся сниженным уровень изопропанол-растворимых кетодиенов и сопряжённых триенов при индукции ( $Fe^{+2}$ /аскорбат). Сохраняется на высоком уровне и количество неполярных Шиффовых оснований. Кроме того, на фоне сниженного содержания белка (8,5% в группе ГК30,  $n = 6$ ,  $p = 0,005U$ ) в органе оставался повышенным уровень  $Fe^{+2}/H_2O_2$  – индуцированного карбонилирования протеинов и увеличенным базальный уровень окислительной модификации белков. При этом в органе вновь повысилась активность MAO-B, что может быть связано с увеличением её экспрессии или со снижением уровня эндогенных ингибиторов активности MAO. Выявлена прямая корреляционная зависимость между активностью MAO-B и содержанием вторичных, а также конечных гептан-растворимых продуктов ПОЛ ( $R_s = 0,90$ ,  $p = 0,04$ ,  $n = 5$ ;  $R_k = 1,00$ ,  $p = 0,01$ ,  $n = 5$ ; соответственно).

### Выводы

1. На третьи сутки гипокинезии в печени наблюдается увеличение содержания карбонилированных белков на фоне общего снижения содержания общего белка в органе. Эта тенденция сохраняется и на более поздних сроках воздействия.

2. Начиная с седьмых суток гипокинезии, в печени происходит увеличение содержания гептан-растворимых Шиффовых оснований. Эта тенденция сохраняется и на более поздних сроках воздействия.

3. Ограничение антиоксидантной активности в печени проявляется в снижении количества полярных продуктов ПОЛ в ответ на индукцию в изопропанольном экстракте ткани, начиная с третьих суток гипокинезии.

4. Активация свободнорадикального окисления в печени при гипокинезии имеет отчетливую зависимость от активности MAO-B.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №11-04-01378-а и №10-04-96091-п\_урал\_a.*

**Список литературы**

1. Волчегорский И.А. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адапционных реакций организма. – Челябинск, 2000. – 167 с.
2. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов и др. // *Вопр. мед. химии.* – 1995. – № 41. – С. 24–26.
3. Камскова Ю.Г. Изменение антиоксидантного статуса и уровня ПОЛ в крови и печени в динамике 30-суточной гипокинезии // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2001. – №10. – С. 387–389.
4. Коваленко Е.А., Гуровский Н.Н.: *Гипокинезия* // Медицина. – М., 1980.
5. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов / Е.И. Львовская, И.А. Волчегорский, С.Е. Шемяков, Р.И. Лифшиц // *Вопр. мед. химии.* – 1991. – №4. – С. 92–94.
6. Панин Л.Е. *Биохимические механизмы стресса.* – Новосибирск: Изд-во «Наука», 1983.
7. Привес М.Г. Некоторые итоги и перспективы космической анатомии сосудистой системы: *Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии.* – 1971. – №61, II. – С. 5–16.
8. Сазонтова Т.Г. Индукция HSPs и ферментов антиоксидантной защиты при активации свободнорадикального окисления на ранних этапах гипокинезии / Т.Г. Сазонтова Н.А. Анчишкина, Ю.В. Архипенко // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2007. – Т. 143, №4. – С. 378–382.
9. Тигранян Р.А. Стресс и его значение для организма. – М.: Наука, 1988. – 176 с.
10. Федоров И.В. Обмен веществ при гиподинамии. *Проблемы космической биологии.* – М.: Из-во «Наука», 1982.

**Рецензенты:**

Львовская Е.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой биохимии Уральского государственного университета физической культуры, г. Челябинск;

Цейликман О.Б., д.м.н., профессор, профессор кафедры адаптивной физической культуры и медико-биологической подготовки ФГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный университет», г. Челябинск.

Работа поступила в редакцию 19.12.2011.