

УДК 637.12. 04/07

ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРАМЕТРОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ И КАРБОНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ МОЛОКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА УРБАНИЗИРОВАННОГО РЕГИОНА

Подольникова Ю.А., Высокогорский В.Е., Воронова Т.Д., Лазарева О.Н.
 ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»,
 Омск, e-mail: arhipenkoya@mail.ru

В работе определены показатели свободнорадикального окисления: интенсивность липопероксидации и окислительной модификации белков молока коров из пригородной зоны – (5–15 км от города Омска) и хозяйств, расположенных на удалении на 100–150 км к северу (лесная зона) и югу (степная зона) от промышленного центра. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при отсутствии существенных изменений большинства показателей пероксидации липидов установлены значительные различия среди маркеров окислительной модификации белков. Уровень металлоиндуцированных карбонильных производных алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера молока в пригородной зоне Омска выше на 41% ($p = 0,007$), чем в молоке, полученном в северных районах Омской области. В пригороде выявлено увеличение кетон-динитрофенилгидразонов на 48% ($p = 0,022$) и 47% ($p = 0,001$), альдегид-динитрофенилгидразонов на 29% ($p = 0,043$) и 36% ($p = 0,0004$) и кетон-динитрофенилгидразонов основного характера на 33% ($p = 0,049$) и 56% ($p = 0,0033$) относительно молока южных и северных районов соответственно. Установлено значительное снижение тиоловых групп белков молока пригорода промышленного центра. Полученные результаты указывают на способность белков молока подвергаться окислительной модификации в большей степени под влиянием факторов урбанизации, чем под воздействием природных факторов.

Ключевые слова: окислительная модификация белков, липопероксидация, сульфгидрильные группы, молоко

CHARACTERISTICS OF THE PARAMETERS OF MILK PROTEINS LIPID PEROXIDATION AND CARBONYLATION OF THE CATTLE OF THE URBANIZED REGION

Podolnikova Y.A., Vysokogorskiy V.E., Voronova T.D., Lazareva O.N.
 FGBOU VPO «Omsk Stolypin State Agrarian University», Omsk, e-mail: arhipenkoya@mail.ru

The present paper determines the indices of free-radical oxidation: lipid peroxidation density and protein oxidizing modification of cows' milk taken from the suburban zone (5–15 km from Omsk city) and farms located 100–150 km to the north (forest zone) and the south (steppe zone) from the industrial center. The received results prove that having no essential changes of the majority of the lipid peroxidation indices, significant differences among the markers of oxidizing protein modification were established. The rate of metal carbonyl derivatives of aliphatic aldehyde-dinitrophenylhydrazones of the neutral character of the milk in the suburban zone of Omsk city is 41% ($p = 0,007$) higher than the milk got in northern districts of Omsk region. In the suburb it was revealed that keton-dinitrophenylhydrazones rate is 48% higher ($p = 0,022$) and 47% higher ($p = 0,001$), aldehyde – dinitrophenylhydrazones rate is 29% higher ($p = 0,043$) and 36% higher ($p = 0,004$), and basic keton-dinitrophenylhydrazones rate – 33% higher ($p = 0,049$) and 56% ($p = 0,0033$) in comparison with the milk taken from southern and northern districts relatively. Decrease of thiolic groups of the proteins of the milk taken from the suburb of the industrial center was stated. The given results prove that the proteins can go through oxidizing modification more under urbanization factors than natural ones.

Keywords: protein oxidizing modification, lipid peroxidation, sulfhydryl groups, milk

Окислительный стресс развивается при действии разнообразных факторов, включая производственные, природные, климатические условия [2, 4]. Многие годы главное внимание было уделено исследованию процессов липопероксидации, так как радикал гидроксила способен проникать в гидрофобный липидный слой и вступать во взаимодействие с полиненасыщенными жирными кислотами, в результате этого развивается цепная реакция перекисного окисления липидов, являющаяся важнейшей в процессах повреждения биологических мембран. Широкий спектр методов исследования пероксидации липидов способствовал накоплению многочисленных сведений о повы-

шении уровня продуктов этого процесса при различных воздействиях, многих заболеваниях и интоксикациях [9].

Однако в последние годы все больше внимания уделяется окислительной деструкции белков. Проведено большое количество исследований, подтверждающих, что при ряде патологических состояний именно белки, а не липиды и нуклеиновые кислоты являются одним из ранних маркеров окислительного стресса [12]. Одним из проявлений окислительной деструкции белков является повышение карбонильных производных белков. В ранних работах роль окислительной модификации белков (ОМБ) рассматривалась при физиологических

состояниях в тканях, с которыми связаны процессы старения организма. В последующих работах установлено, что карбонильные производные белков при окислительных повреждениях в тканях проявляются раньше и они более стабильны по сравнению с продуктами перекисидации липидов [14].

В предыдущих исследованиях установлено, что содержание некоторых продуктов перекисного окисления липидов изменяется не только в крови, но и в молоке коров при послеродовом эндометрите [3]. Содержание продуктов перекисидации липидов и антиокислительные свойства отличаются также в молоке крупного рогатого скота в разных природно-климатических зонах Омской области [2, 6].

Учитывая изложенное, целью настоящей работы является сравнение параметров интенсивности перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков коровьего молока для оценки интенсивности свободнорадикальных процессов крупного рогатого скота хозяйств, расположенных на различных расстояниях от промышленного центра.

Материалы и методы исследования

Для исследования использовали сырое, нормализованное по массовой доле жира до 2,5%, натуральное молоко, полученное зимой от коров в пригородной зоне – 5–15 километров от города Омска и на удалении на 100–150 километров к северу (лесная зона) и югу (степная зона) от промышленного центра.

Содержание первичных, вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли с помощью экстракционно-спектрометрического метода с разделительной регистрацией липопероксидов в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта молока, полученного с помощью гептан-изопропанольной смеси (1:1 по объёму) [1]. Спектрофотометрию каждой фазы липидного экстракта проводили при трех длинах волн – 220, 232, 278 нм в кварцевых кюветах толщиной 1 см против соответствующего контроля, что позволило установить уровень первичных продуктов (диеновых конъюгатов), вторичных продуктов (кетодиенов и сопряженных триенов) липопероксидации. В гептановую фазу экстрагируются нейтральные липиды, а в изопропанольную фазу переходят фосфолипиды, которые являются важнейшими субстратами перексидации.

Относительное содержание конечных продуктов липопероксидации (шиффовых оснований) определяли по величине оптической плотности гептановых и изопропанольных фаз липидных экстрактов при длине волны 400 нм [8]. Содержание продуктов свободнорадикального окисления липидов выражали в единицах окислительного индекса (е.о.и.): E_{232}/E_{220} – первичные, E_{278}/E_{220} – вторичные, E_{400}/E_{220} – конечные.

Уровень спонтанной и металлкализируемой ОМБ определяли методом, основанным на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных

остатков с 2,4-динитрофенилгидрозином и образованием производных 2,4-динитрофенилгидразона. Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов регистрировали фотометрически при следующих длинах волн: 356, 370, 430 и 530 нм [5]. Количество доступных сульфгидрильных групп молока – оценивали спектрофотометрически с помощью 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты с образованием окрашенного дисульфида [11].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Статистическая значимость межгрупповых различий оценивалась по критерию Манна – Уитни (U). Проверка статистических гипотез проводилась при критическом уровне значимости $p = 0,05$. Результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартиля – Me (Q_1 ; Q_3).

Результаты исследования и их обсуждение

Содержание первичных продуктов липопероксидации (диеновых конъюгатов), как в гептановой, так и в изопропанольной фазе липидного экстракта молока коров существенно не отличалось в различных регионах Омской области. Не обнаружено существенных различий в содержании вторичных продуктов перексидации липидов (кетодиенов и сопряженных триенов) в гептановой фазе молока различных регионов. Однако содержание кетодиенов и сопряженных триенов в изопропанольной фазе липидного экстракта молока, полученного в пригородной зоне города, на 24% ($p = 0,037$) выше, чем в северных районах Омской области (табл. 1).

В отличие от показателей процессов перексидации липидов уровень маркеров ОМБ отличается в различных районах Омской области. Так, содержание алифатических кетон-динитрофенилгидразонов в пригороде Омска значительно ниже в сравнении с пробами молока, полученного в хозяйствах южных и северных районов. (табл. 2). Индуцированная железом ОМБ проявлялась в повышении уровня алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера в пригороде Омска на 41% ($p = 0,007$) в отличие от молока, полученного в северной части Омской области. В пригороде Омска выявлено значительное повышение кетон-динитрофенилгидразонов на 48% ($p = 0,022$) и 47% ($p = 0,001$), альдегид-динитрофенилгидразонов на 29% ($p = 0,043$) и 36% ($p = 0,0004$) и кетон-динитрофенилгидразонов основного характера на 33% ($p = 0,049$) и 56% ($p = 0,0033$) относительно южных и северных районов соответственно. Статистически значимых различий между показателями окислительной деструкции белков между северными и южными районами области не обнаружено.

Таблица 1

Продукты липопероксидации в гептановой и изопропанольной фазе
липидного экстракта молока, Ме (Q₁; Q₃)

Показатель	Гептановая фаза		Изопропанольная фаза	
	Диеновые конъюгаты, е.о.и.	Кетодиены и сопряженные триены, е.о.и.	Диеновые конъюгаты, е.о.и.	Кетодиены и сопряженные триены, е.о.и.
Северные районы <i>n</i> = 10	0,938 (0,882; 0,950)	0,080 (0,069; 0,094)	0,769 (0,588; 0,771)	0,373 (0,343; 0,500)
Южные районы <i>n</i> = 12	1,000 (1,059; 1,000)	0,095 (0,081; 0,103)	0,539 (0,470; 0,720)	0,447 (0,415; 0,601)
Пригород Омска <i>n</i> = 10	1,000 (0,944; 1,125)	0,073 (0,063; 0,094)	0,756 (0,667; 0,811)	0,490* (0,467; 0,568)

Примечание * – статистически значимые отличия от Северных районов, P < 0,05.

Таблица 2

Содержание карбонильных производных белков, Ме (Q₁; Q₃)

Регионы исследования	Карбонильные производные белков (е.о.п. на 1 мг белка)				
	370 нм	356 нм (Fe ²⁺ /H ₂ O ₂)	370 нм (Fe ²⁺ /H ₂ O ₂)	430 нм (Fe ²⁺ /H ₂ O ₂)	530 нм (Fe ²⁺ /H ₂ O ₂)
Северные районы <i>n</i> = 10	0,033 (0,030; 0,048)	0,134 (0,122; 0,139)	0,142 (0,128; 0,143)	0,074 (0,059; 0,077)	0,008 (0,004; 0,009)
Южные районы <i>n</i> = 12	0,070 (0,038; 0,085)	0,133 (0,082; 0,164)	0,137 (0,085; 0,168)	0,081 (0,052; 0,104)	0,012 (0,005; 0,021)
Пригород Омска <i>n</i> = 10	0,004* ^x (0,000; 0,010)	0,229* (0,158; 0,264)	0,266* ^x (0,164; 0,277)	0,115** ^x (0,088; 0,157)	0,018* ^x (0,008; 0,032)

Примечание. * – статистически значимые отличия от северных районов, P < 0,05, ** – статистически значимые отличия от северных районов, P < 0,001, ^x – статистически значимые отличия от южных районов, P < 0,05.

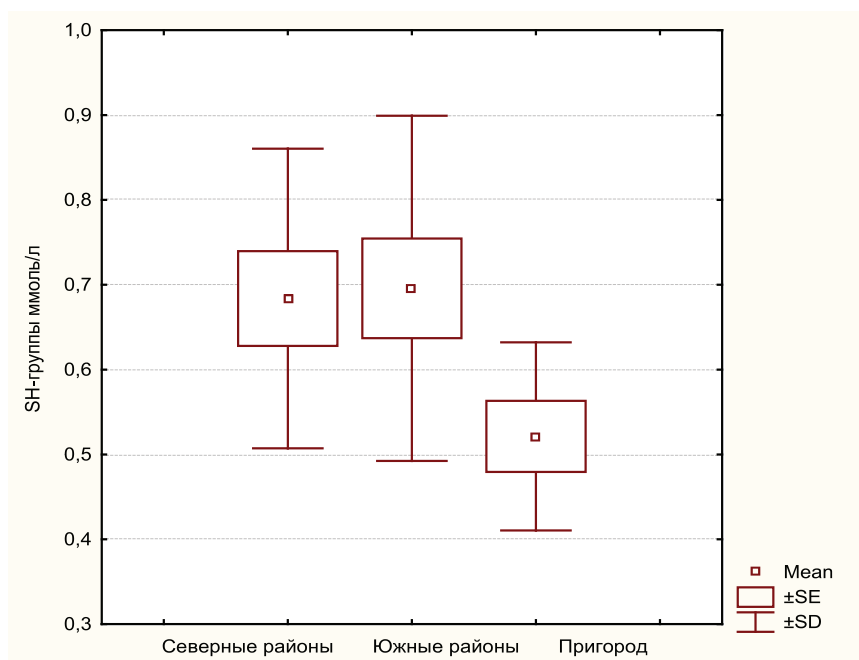


Рис. 1. Содержание доступных сульфгидрильных групп в молоке разных климато-географических зон Омской области (ммоль/л)

Различия в окислительной модификации белков проявляются и в содержании восстановленных сульфгидрильных групп. В молоке, полученном в пригороде Омска, обнаружено снижение уровня доступных тиоловых групп белков молока на 29 и 26% относительно образцов, полученных в северных и южных районах соответствен-

но. Аналогично уменьшается содержание сульфгидрильных групп цельного молока на 11% и 15% относительно вышеуказанных районов (рис. 1, 2). При этом не выявлено существенных различий содержания доступных SH-групп в сыворотке молока, а также свободных тиоловых групп безбелкового фильтрата.

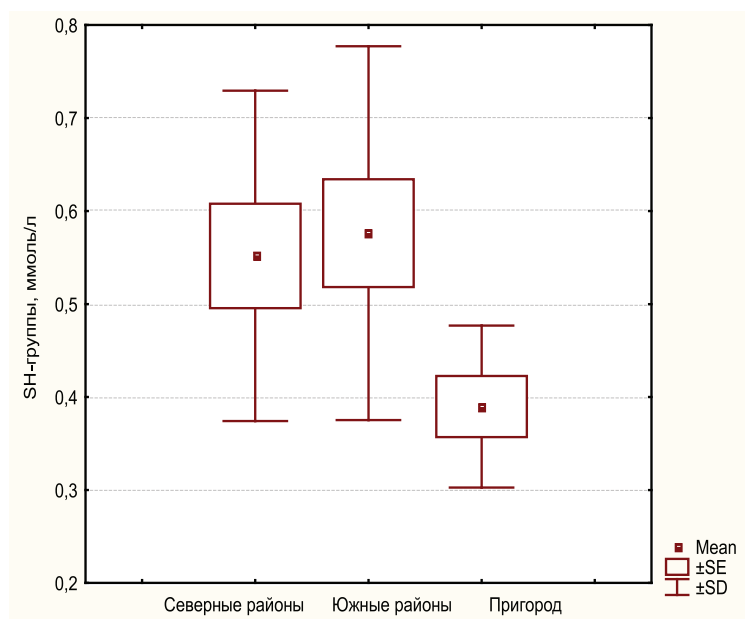


Рис. 2. Содержание доступных сульфгидрильных групп в белках молока разных климато-географических зон Омской области (ммоль/л)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что значительных отличий в интенсивности пероксидации липидов молока в разных климато-географических зонах Омской области не обнаружено, что подтверждается ранее полученными данными об отсутствии различий антиокислительной активности молока северных и южных зон Омской области [10]. Только уровень кетодиенов и сопряженных триенов существенно выше в молоке коров пригородной зоны в изопропанольной фазе экстракта, содержащей преимущественно фосфолипиды, наиболее легко подвергающиеся пероксидации [11]. При отсутствии существенных изменений большинства показателей пероксидации липидов значительные изменения установлены среди маркёров окислительной модификации белков, что подтверждает указание [14] о большей чувствительности уровня карбонилирования белков в сравнении с показателями СРО липидов. Способность белков подвергаться окислительной модификации подтверждается дан-

ными о том, что α -казеин (α_{s1} и α_{s2} -казеин) и β -казеин сильнее подвержены окислительной деструкции за счет более активного карбонилирования триптофана, метионина и гистидина, входящих в состав данных фракций белков по отношению к сывороточным белкам молока [13]. Вероятно, этим фактом можно объяснить отсутствие различий в содержании сульфгидрильных групп сыворотки молока и, в противоположность этому, значительные изменения их уровня в цельном молоке и особенно в содержании белковых тиоловых групп.

Отсутствие различий между показателями свободнорадикального окисления липидов и окислительной модификации белков северных районов (лесная зона) и южных районов (степная зона) в зимний период может быть объяснено отсутствием различий корма в этот период. В то же время значительные различия показателей СРО молока хозяйств пригорода промышленного центра могут быть обусловлены антропогенными факторами, нарушающими равновесие экосистемы [7].

Заключение

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о большей чувствительности показателей окислительной модификации белков в сравнении с маркерами перекисидации липидов, что позволяет их использовать для выяснения воздействия на организм различных факторов внешней среды.

Повышение уровня металлоиндуцированной ОМБ и значительное снижение тиоловых групп белков молока пригорода промышленного центра указывает на повышенную способность белков молока подвергаться окислительной модификации под влиянием экологических факторов. Определение уровня ОМБ может быть использовано как компонент экофизиологического скрининга.

Список литературы

1. Волчегорский И.А. Сопоставление подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов, Б.Г. Яровинский // *Вопр. мед. химии.* – 1989. – № 1. – С. 127–131.
2. Высокогорский В.Е. Антиокислительные свойства молока в различных зонах Омской области / В.Е. Высокогорский, Т.Д. Воронова, П.В. Веселов // *Молочная промышленность.* – 2009. – № 10. – С. 73–74.
3. Высокогорский В.Е. Перекисидация липидов и окислительная модификация белков молока и крови коров, больных послеродовым эндометритом / В.Е. Высокогорский, Т.Д. Воронова, Н.А. Погорелова // *Фундаментальные исследования.* – 2014. – № 3. – С. 81–85.
4. Высокогорский В.Е. Хемилюминесцентный анализ пастеризованного молока / В.Е. Высокогорский, Г.В. Игнатъева // *Пищевая промышленность.* – 2012. – № 10. – С. 34–36.
5. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов. // *Вопросы медицинской химии.* – 1995. – № 1. – С. 24–26.
6. Игнатъева Г.В. Содержание липопероксидов натурального молока сырья различных природно-климатических зон Омской области // *Молочная промышленность Сибири: VII Специализированный конгресс.* – Барнаул, 2012. – С. 77–79.
7. Копылова Р.Т. Антропогенное загрязнение окружающей среды. Экологические проблемы промышленных городов // *Сборник научных трудов по материалам 6-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием.* – Саратов, 2013. – Ч. 1. – С. 67–69.
8. Львовская Е.И. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов / Е.И. Львовская, И.А. Волчегорский, С.Е. Шемяков // *Вопросы медицинской химии.* – 1991. – № 4 – С. 92–93.
9. Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, И.А. Бондарь, В.А. Труфакин. – Новосибирск: АРТА, 2008.
10. Подольникова Ю.А. Хемилюминесцентный анализ антиокислительной активности молока разных эколого-географических зон Омской области / Ю.А. Подольникова, Н.А. Погорелова, В.Е. Высокогорский // *Технология и продукты здорового питания. Материалы VII Международной научно-практической конференции.* – Саратов, 2013. – С. 87–88.
11. Современные методы в биохимии; под ред. академика АМН СССР В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977.
12. Caraceni P. Proteins but not nucleic acids are molecular targets for the free radical attack during reoxygenation of rat hepa-

cytes / P. Caraceni, N. De Maria, H.S. Ryu, A. Colantoni, L. Roberts, M.L. Maitd, Q. Pye, M. Bernardi, D.H. Van Thiel, R.A. Floyd // *Free Radic. Biol. Med.* – 1997. – Vol. 2, № 23. – P. 339–344.

13. Dalsgaard T.K. Changes in Structures of Milk Proteins upon Photo-oxidation / T.K. Dalsgaard, D. Otzen, J.H. Nielsen, L.B. Larsen // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – № 26. – P. 10968–10976.

14. Friguet B. Protein degradation bu the proteasome and its implications in aging. / B. Friguet, A.L. Bulteau, N. Chondrogianni, M. Conconi. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2000. – Vol. 908. – P. 143–154.

References

1. Volchegorskiy I.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G., *Voprosy med.khimii*, 1989, no. 1, pp. 127–131.
2. Vysokogorskiy V.E., Voronova T.D., Veselov P.V., *Molochnaya promyshlennost*, 2009, no. 10, pp. 73–74.
3. Vysokogorskiy V.E., Voronova T.D., Pogorelova N.A., *Fundamental'nye issledovaniya*, 2014, no. 3, pp. 81–85.
4. Vysokogorskiy V.E., Ignatieva G.V., Pishhevaya promyshlennost'. 2012, no. 10, pp. 34–36.
5. Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Khodov D.A., *Voprosy med.khimii*, 1995, no. 1, pp. 24–26.
6. Ignatieva G.V., «Molochnaja promyshlennost' Sibiri. VII Specializirovannyj kongress» («Dairy products industry of Siberia. VII Specialized Congress»). Barnaul, 2012, pp. 77–79.
7. Kopylova R.T., *Sbornik nauchnyh trudov po materialam 6-j Vserossijskoj nauchno-prakticheskoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem* (Collection of research papers under the materials of VI All-Russian Scientific and Practical Conference of international concern). Saratov, 2013, part. 1, pp. 67–69.
8. Lvovskaya E.I., Volchegorskiy I.A., Shemyakov S.E., // *Voprosy med.khimii*, 1991, no.4, pp. 92–93.
9. Menshchikova E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z., Bondar I.A., Trufakin V.A., *Okislitel'nyj stress: Patologicheskie sostojaniya i zabolevaniya* (Oxidizing stress: pathological conditions and diseases). Novosibirsk, ARTA, 2008.
10. Podolnikova Yu.A., Pogorelova N.A., Vysokogorskiy V.E., *Tehnologija i produkty zdorovogo pitaniya. Materialy VII Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii.* (Technology and products of healthy eating. Materials of VII International Scientific and Practical Conference). Saratov, 2013, pp. 87–88.
11. *Sovremennye metody v biokhimii.* [pod red. akademika AMN SSSR Orehovicha V.N.] (Modern methods of biochemistry. [edited by V.N. Orekhovich, academician, member of the Academy of Medical Sciences of the USSR]) Moscow, Medicine. 1977.
12. Caraceni P. Proteins but not nucleic acids are molecular targets for the free radical attack during reoxygenation of rat hepatocytes. / P. Caraceni, N. De Maria, H.S. Ryu, A. Colantoni, L. Roberts, M.L. Maitd, Q. Pye, M. Bernardi, D.H. Van Thiel, R.A. Floyd // *Free Radic. Biol. Med.* 1997. Vol. 2, no. 23. pp. 339–344.
13. Dalsgaard T.K. Changes in Structures of Milk Proteins upon Photo-oxidation. / T.K. Dalsgaard, D. Otzen, J.H. Nielsen, L.B. Larsen // *J. Agric. Food Chem.* 2007. no. 26. pp. 10968–10976.
14. Friguet B. Protein degradation bu the proteasome and its implications in aging. / B. Friguet, A.L. Bulteau, N. Chondrogianni, M. Conconi. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2000. Vol 908. pp. 143–154.

Рецензенты:

Григорьев А.И., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой экологии и природопользования, ФГБОУ ВПО «Омский государственный педагогический университет» Минобрнауки РФ, г. Омск;

Степанова И.П., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой химии, ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, г. Омск.

Работа поступила в редакцию 23.09.2014.