

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Ильичева А.С., Фомина М.А., 2015  
УДК 577.1+576.3

**СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО КАРБЕНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ  
МЫШЕЧНЫХ ТКАНЕЙ ПРИ ВЫРАЖЕННОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ**

*А.С. Ильичева, М.А. Фомина*

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань

Изучены продукты окислительной модификации белков (ОМБ) в миокарде, скелетной мышце и стенке аорты крыс при выраженной гипергомоцистеинемии, сопровождающейся повышенным образованием свободных радикалов, что ведет к развитию выраженного оксидативного стресса. Обнаружено значительное нарастание содержания в экспериментальной группе динитрофенилгидразонов, преимущественно за счет первичных маркеров окислительного стресса – альдегидных динитрофенилгидразонов (АДНФГ), что позволяет говорить о персистенции фрагментов окислительно поврежденных белков в мышечной ткани. Содержание вторичных маркеров – кетоновых динитрофенилгидразонов (КДНФГ) – также статистически значимо выросло. Показано развитие достаточно интенсивного окислительного повреждения, сопровождающегося дополнительным образованием агрегированных молекул, а также, истощение резервно – адаптационного потенциала всех исследуемых мышечных тканей.

*Ключевые слова:* окислительная модификация белков, гипергомоцистеинемия, динитрофенилгидразоны, сердечная мышца, миокард, сосудистая стенка, резервно – адаптационный потенциал.

Необратимым окислительным повреждением белков, ведущим за собой потерю функции, является их карбонилирование. Накопление карбонильных производных, которые способны вызывать нарушение и/или изменение структуры, функций биомолекул [10], играет важную роль в этиопатогенезе сердечно-сосудистых, нейродегенеративных заболеваний, а также в процессах старения. Активные формы кислорода/азота легко взаимодействуют с белковыми молекулами [11], а, в результате формирования вторичных продуктов оксидативного стресса, белки получают дополнительное окислительное повреждение [8].

Возрастание оксидативного/нитрозативного стресса, возникающего из-за высокой продукции свободных радикалов, впоследствии приводит к снижению антиокси-

дантной защиты клетки, имеющей многоуровневую систему. Последняя выражается в наличии низкомолекулярных внутри- и внеклеточных антиоксидантов, степени активности таких ферментов, как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза [2]. Мощным последствием оксидативного стресса является повреждение структуры нуклеиновых кислот, липидов, белков, нарушения синтеза простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов [4]. Генерируются вторичные активные формы, которые стимулируют развитие некроза или апоптоза клеток [6]. Одним из факторов развития окислительного стресса является повышение концентрации гомоцистеина, основным источником которого является пищевая метионин. Лишаясь метильной группы, S-аденозил метионин превращается в S-аденозилгомоцистеин и

гидролизуясь, превращается в гомоцистеин, обладающий цитотоксичными свойствами.

#### Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 36 гомогенатов мышечных тканей крыс-самцов линии Wistar массой 320 грамм. Экспериментальную гипергомоцистеинемию у крыс осуществляли путем введения растворов метионина в Твин 80 [3] в течение 21 суток с дополнительным добавлением метионина в питьевую воду. В качестве контрольной группы использовались животные, сопоставленные с экспериментальной по полу и массе, получавшие Твин 80 per os в течение 21 дня. Измерение концентрации гомоцистеина в сыворотке крови осуществляли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора Axis Shield (Норвегия). После выведения животного из эксперимента (обескровливание под эфирным рауш-наркозом при сохраненном дыхании и сердцебиении), из навески тканей миокарда, скелетной мышцы и стенки аорты готовили гомогенат. Окислительную модификацию белков (спонтанную и металл-индуцированную) определяли во внелизосомальной фракции по методу R.I. Levine в модификации Е.Е. Дубининой [4]. Продукты окислительного повреждения белков оценивали согласно авторской методики [8], а именно, график спектра ОМБ делился на области видимого света ( $\lambda$  380-790 нм), ультрафиолетового излучения ( $\lambda$  100-400) нм и на сегменты, где регистрировались альдегидные (АДФГ) и кетонные карбонильные производные (КДФГ) нейтрального и основного характера. Результаты исследования выражались в е.о.п/г белка. Содержание белка измеряли по методу Лоури с использованием коммерческого набора Клини Тест-БЛ НПЦ «Эко-сервис», СПб. Резервно-адаптационный потенциал оценивали путем расчета отношения общей площади под кривой динитрофенилгидразонов (ДФГ) при спонтанном окислении к металл-индуцированному, принимая за 100% общее количество ДНФГ. Статистический анализ данных проводили ис-

пользуя программное обеспечение Microsoft Excel и программу Statistika 10. Для каждой выборки определяли медиану (Me), верхний и нижний квартили [Q1; Q3]. Статистическую значимость отличий показателей экспериментальной группы от группы сравнения оценивали по U-критерию Манна-Уитни.

#### Результаты и их обсуждение

При сопоставлении результатов ОМБ миокарда контрольной и испытуемых групп, получили статистически значимое нарастание альдегидных, кетонных динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера.

Исходя из данных таблицы 1 видно, что содержание АДФГ (первичных маркеров окислительного стресса) [7], значительно превышает содержание КДФГ. Это позволяет предположить персистенцию фрагментов окислительно поврежденных белков в мышечной ткани.

Аналогичная картина наблюдается при сравнении результатов ОМБ скелетной мышцы и сосудистой стенки экспериментальной и контрольной групп. Здесь также ярко просматривается тенденция к нарастанию уровня динитрофенилгидразонов (рис. 2, 3). Содержание первичных маркеров окислительного стресса – АДФГ – значительно превалирует над КДФГ (табл. 2, 3), уровень которых также статистически значимо вырос. Содержание КДФГ сердечной и скелетных мышц выросло менее выражено, но также статистически значимо.

В таблице 4 представлено соотношение динитрофенилгидразонов различных типов в контрольной и экспериментальной группах. Доля АДФГ контрольной группы оказалась выше, той же доли при ГГЦ, а вот доля КДФГ, как вторичного маркера окислительного стресса, оказалась выше в экспериментальной выборке по отношению к группе сравнения, что доказывает развитие достаточно интенсивного окислительного повреждения, сопровождающегося дополнительным образованием агрегированных окисленных молекул [7].

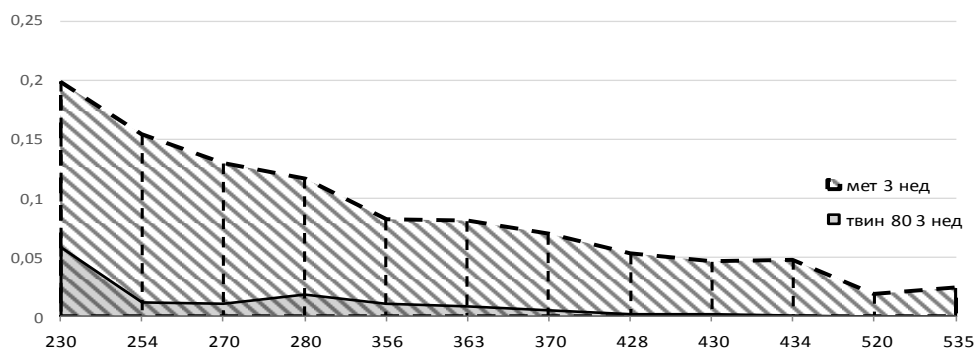


Рис. 1. Спектры поглощения продуктов ОМБ миокарда

Таблица 1

*Площади под кривой компонентов спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков миокарда (е.о.п/г белка, Me[Q1;Q3])*

	S АДНФГ нейтр. M[Q1;Q3]	S КДНФГ нейтр. M[Q1;Q3]	САДНФГ осн. M[Q1;Q3]	СКДНФГ осн. M[Q1;Q3]	S общая M[Q1;Q3]
Контрольная группа n=6	1,86 [1,50; 5,33]	0,39 [0,24; 0,55]	0,22 [0,04;0,35]	0,018 [0,004; 0,1]	2,32 [2,19; 5,42]
Экспериментальная группа n=6	16,12* [11,46;16,53]	4,06* [3,03;4,41]	3,30* [3,04;3,76]	0,51* [0,45;0,68]	22,84* [19,96;24,1]

Примечание: \* -статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05)

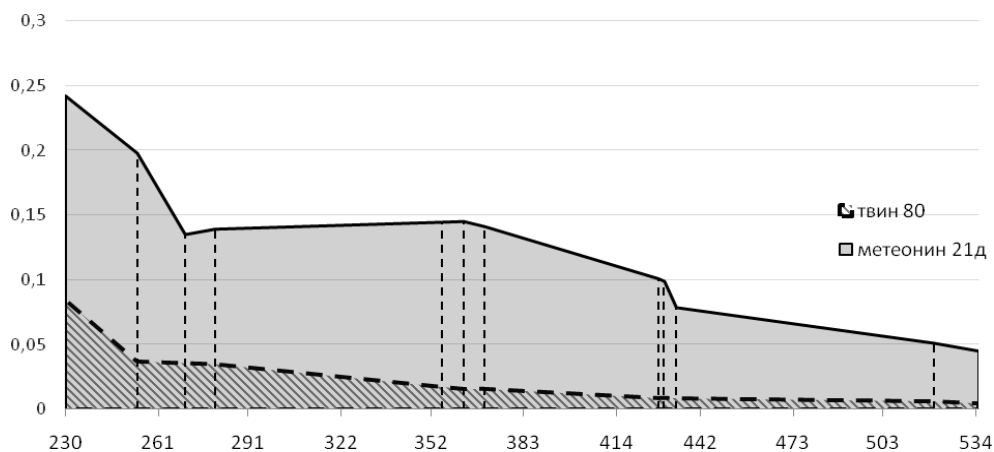


Рис. 2. Спектры поглощения продуктов ОМБ скелетной мышцы

Таблица 2

*Площади под кривой компонентов спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков скелетной мышцы (е.о.п/г белка, Me[Q1;Q3])*

	S АДНФГ нейтр. M[Q1;Q3]	S КДНФГ нейтр. M[Q1;Q3]	SAДНФГ осн. M[Q1;Q3]	SKДНФГ осн. M[Q1;Q3]	S общая M[Q1;Q3]
Контрольная группа n=6	4,66 [3,62; 6,44]	0,84 [0,67; 0,96]	0,75 [0,50; 0,95]	0,13 [0,07; 0,2]	6,39 [4,75; 8,07]
Экспериментальная группа n=6	20,3 * [17,64; 27,14]	7,51 * [7,5; 9,15]	8,33 * [7,96;9,12]	0,93 * [0,91; 1,75]	37,83* [35,22;40,96]

Примечание: \* -статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05)

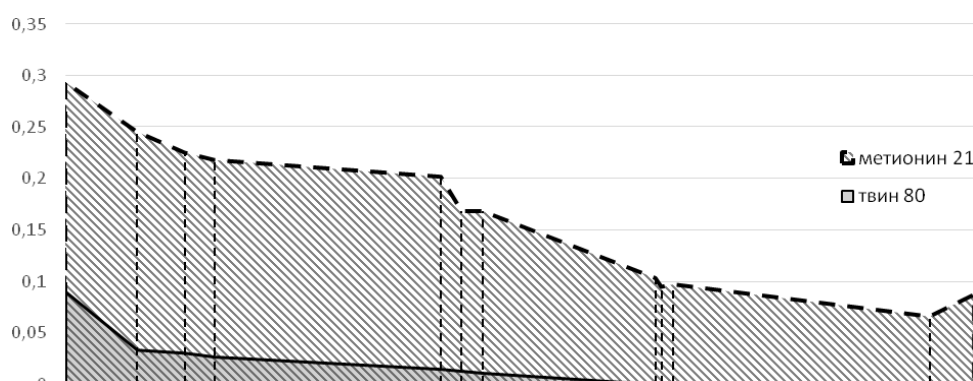


Рис. 3. Спектры поглощения продуктов ОМБ стенки сосуда

Таблица 3

*Площади под кривой компонентов спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков сосудистой стенки (е.о.п/г белка, Me[Q1;Q3])*

	SAДНФГ нейтр	SKДНФГ нейтр	SAДНФГ осн.	SKДНФГ осн.	Собщая
Контрольная группа n=6	3,616 [2,46; 6,15]	0,83 [0,4; 0,88]	1,19 [0,93; 1,37]	0,2 [0,1; 0,27]	6,02 [5,95; 7,65]
Экспериментальная группа n=6	28,02 * [26,02; 51,85]	14,3* [7,84; 15,93]	10,28 * [7,76;15,45]	1,74* [1,53; 2,84]	73,03* [43,15;119,1]

Примечание: \* -статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05)

Оценивая резервно-адаптационный потенциал мышечных тканей (рис. 4, 5, 6), мы наблюдаем увеличение доли спонтанного окисления (Собщ) в металл – индуцирован-

ном (Собщ инд), что подтверждает выраженное снижение антиоксидантной защиты в экспериментальной группе по сравнению с контрольной выборкой.

Таблица 4

*Соотношение маркеров окислительного стресса мышечных тканей*

	Миокард		Скелетная мышца		Стенка сосуда	
	Контроль	ГГЦ	Контроль	ГГЦ	Контроль	ГГЦ
КДФНГ	16%	19%	15%	23%	19%	31%
АДФНГ	84%	81%	85%	77%	81%	69%

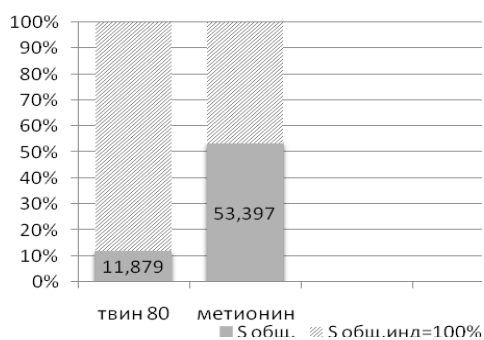


Рис. 4. Резервно-адаптационный потенциал миокарда

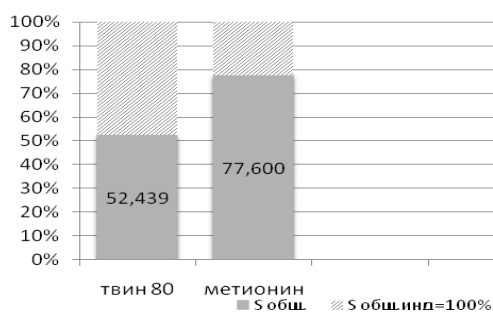


Рис. 5. Резервно-адаптационный потенциал скелетной мышцы

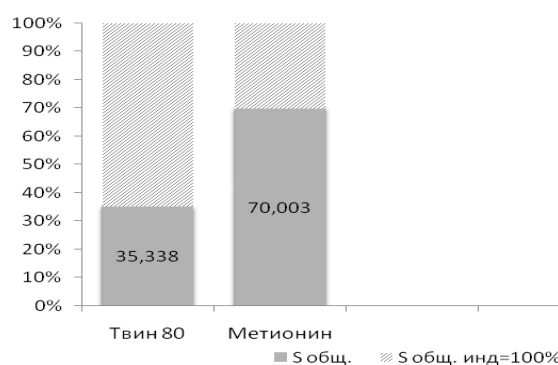


Рис. 6. Резервно-адаптационный потенциал стенки сосуда

По-видимому, гомоцистеин при высоких концентрациях способен окисляться, формируя смешанные дисульфиды [13]. В результате этого образуются свободные радикалы, представленные супероксидом кислорода и перекисью водорода, что приводит к дополнительному образованию активных кислородных радикалов (АКР), что и ведет к развитию оксидативного стресса. Цитотоксическое действие гомоцистеина может приводить к нарушению функций различных органелл клетки, а также нарушению процессов транскрипции и трансляции нуклеиновых кислот [14]. К примеру, митохондриальная дисфункция приводит к повышенному супероксидобразованию [5], в результате увеличивается вероятность повреждения мышечных тканей свободными радикалами. Это влечет за собой повышенное окисление миоглобина [12], дискоординацию связывания  $Ca^{2+}$  с тропонином и стимулирования взаимодействия с другими сократительными белками, приводящего к ослаблению сократительной способности миокарда. Выраженная гипергомоцистеинемия напрямую связана с некрозом или апоптозом мышечных клеток за счет активации фактора транскрипции NF –  $\kappa$ B [1], с накоплением окислительно модифицированных белков в клетке или вне ее. Выраженная гипергомоцистеинемия приводит к так называемому порочному кругу, а именно, уменьшению протеолиза с одновременным накоплением окислительно-поврежденных белков.

#### Выводы

1. Выраженная гипергомоцистеинемия сопровождается статистически значимым нарастанием содержания динитрофенилгидразонов, преимущественно за счет альдегидных производных.
2. Данная модель показывает развитие достаточно интенсивного окислительного повреждения, что сопровождается дополнительным образованием агрегированных окисленных молекул и истощением резервно – адаптационного потенциала мышечных тканей.

#### Литература

1. Глебов А.Н. Роль кислородосвязывающих свойств крови в развитии окислительного стресса, индуцированного липополисахаридом [Текст] / А.Н. Глебов, Е.В. Шульга, В.В. Зинчук. – Гродно, 2011. – 216 с.
2. Кравченко Ю.В. Исследование системы антиокислительной защиты в условиях алиментарно индуцированного окислительного стресса [Текст] / Ю.В. Кравченко, Г.Ю. Мальцев, А.В. Васильев // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 50, № 5. – С. 477-483.
3. Медведев, Д.В. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс [Текст] / Д.В. Медведев, В.И. Звягина, М.А. Фомина // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2014. – №4. – С. 42-46.
4. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения [Текст] / Е.Е. Дубинина [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, №1. – С. 24-26.
5. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболелания [Текст] / Е.Б. Меньщикова [и др.]. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.
6. Паунова С.С. Апоптоз- физиология и патология (обзор литературы) [Текст] / С.С. Паунова // Нефрология и диализ. – 2004. – №2. – С. 132-136.
7. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях [Текст] / Ю.И. Губский [и др.] // Современные проблемы токсикологии. – 2005. – Т. 8, №3. – С. 20-27.
8. Фомина М.А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях [Текст] / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина; ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России. – Рязань, 2014. – 60 с.
9. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease [Text] / Isabella Dalle-Donne [et al.] // Clinical Chemistry. – 2006. – Vol. 52, №4. – P. 601-623.

10. Advanced glycationend products. Sparking the development of diabetic vascular injury [Text] / A. Goldin [et al.] // Circulation. – 2006. – Vol. 14. – P. 597-605.
11. Čolak E. New markers of oxidative damage to macromolecules [Text] / E. Čolak // JMB. – 2008. – P. 1-16.
12. Hydrogen peroxide plays a key role in the oxidation reaction of myoglobin by molecular oxygen – A computer simulation [Text] / T. Wasawa [et al.] // Biophys. J. – 1992. – Vol. 63. – P. 544-550.
13. Lentz S.R. Homocysteine: Is it a clinical important cardiovascular risk factor? [Text] / S.R. Lentz, W.G. Haynes // Clev.Clin. J. Med. – 2004. – Vol. 71. – P. 729-734.
14. Weisfeldt M.L. Oxygen-derived free radicals and myocardial ischemic injury [Text] / M.L. Weisfeldt, J.L. Zweier, J.T. Flaherty // Heart Dis. – 1988. – № 3. – P. 60–72.

#### OXIDATIVE CARBONYLATION OF PROTEINS IN MUSCLE TISSUES WITH PRONOUNCED HYPERHOMOCYSTEINEMIA

*A.S. Ilicheva, M.A. Fomina*

**Oxidative modification of proteins (OMP) in myocardium, skeletal muscle and aortic wall in rats with pronounced hyperhomocysteinemia accompanied by increased formation of free radicals, which follows to developing of oxidative stress, was found. Significant increasing content of dinitrophenylhydrazones principal at the expense of primary markers of oxidative stress (ADNPH) in experimental group was detected. It enable us to speak about persistence fragments of oxidatively damaged proteins in muscle tissue. Content of secondary markers (KDNPH) also increased. Development of intensive oxidative damage accompanied by additional formation of aggregated molecules and also weakness of reserve -adaptative potential all investigated muscle tissues were shown.**

**Keywords:** *oxidative modification of proteins (OMP), hyperhomocysteinemia, dinitrophenylhydrazones, cardiac muscle, vessel, wall of blood vessel, myocardium, reserve-adaptative potential.*

Ильичева А.С. – ассист. кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань, зав. КДЛ ГБУЗ МО «КЦРБ».  
E-mail: sergan52006@rambler.ru

Фомина М.А. – к.м.н., доц. кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.  
E-mail: marya.fom@yandex.ru