

*Обзорная статья*

## **Обновление липидного бислоя клеточных мембран при физической нагрузке**

*Бехбутова Г.М., Гасанова А.К.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Азербайджанская Государственная Академия Физической Культуры и Спорта*

**Дата публикации.**

Принято к печати: 1 мая 2018;

Напечатано: 5 июля 2018

© 2018 АГАФКС. Все права защищены.

**Ключевые слова:** мембраны мышечных клеток, физическая нагрузка, перекисное окисление липидов, адаптация

**Аннотация.** В процессе мышечной деятельности значительно активируются в организме перекисные процессы, приводящие к появлению короткоцепочечных альдегидов, типичным представителем которых является малоновый диальдегид. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) рассматривается как постоянно протекающий физиологический процесс, биологическое значение которого состоит в обновлении липидного бислоя клеточных мембран. Существует особая антиоксидантная система, препятствующая чрезмерному развитию свободнорадикальных процессов в организме, в которую входят различные ферменты и низкомолекулярные соединения. Активация ПОЛ приводит к изменению важнейших дезадаптационных механизмов, способствующих развитию утомления и снижения физической работоспособности. При значительной активации в организме перекисных процессов антиоксидантная защита оказывается слабо эффективной. В результате свободнорадикальное окисление оказывает выраженное повреждающее воздействие на биологические мембраны, изменяя их проницаемость, нарушая функционирование различных мембраносвязанных ферментов и рецепторов, инициируя в организме различные патологические процессы.

**Введение.** Развитие перекисного окисления липидов (ПОЛ) при мышечной деятельности зависит от характера выполняемой работы и их направленности. Проведенные исследования показали, что в зоне большой мышечной нагрузки повышается интенсивность ПОЛ в организме, повышается проницаемость мембран для различных субстратов, возрастает активность лактатдегидрогеназы в крови и антиоксидантного мембраносвязанного фермента-пероксидазы, наблюдается появление в моче белка и ацетона. Для предупреждения и подавления свободнорадикального окисления используются экзогенные тиолы растительного происхождения, богатые природными антиоксидантами. Известно, что часть кислорода, поступающего в организм, превращается в свободные радикалы, вызывающие ПОЛ. Окислению подвергается липидный слой биологических мембран. Физические нагрузки приводят к чрезмерному образованию активных форм кислорода и значительному росту скорости ПОЛ. Практически любая нагрузка протекает в условиях повышенного потребления кислорода, а перенасыщение организма (или отдельных органов, или тканей) кислородом способствует появлению свободных радикалов и интенсификации перекисных процессов. В ациклических видах спорта (особенно в спортивных играх и единоборствах) характер мышечной

деятельности резко меняется. Такие изменения сопровождаются несоответствием между продолжающимся повышенным поступлением кислорода и снижением его потребления митохондриями мышечных клеток. Подобное несоответствие вызывает относительную гипероксию в мышечной ткани, что, несомненно, приводит к еще большему образованию свободных радикалов и дальнейшему нарастанию их повреждающего воздействия на биомембраны. К повышению скорости свободнорадикального окисления также приводит ацидоз (повышение кислотности), возникающий у спортсменов вследствие накопления в миоцитах молочной кислоты. И, наконец, приближающиеся к пределу функциональных возможностей физические нагрузки, его высокая мотивированность и эмоциональность позволяют выявить в деятельности спортсменов многие характерные черты стресса. А стресс и, в частности, стрессорные гормоны оказывают значительное влияние на развитие в организме свободнорадикального окисления.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводились на 6-месячных беспородных белых крысах, которые содержались в обычных условиях вивария. Животные произвольно разделялись в 4 группы: нетренированные без нагрузки, нетренированные с нагрузкой, тренированные без нагрузки, тренированные с нагрузкой. Процесс тренировки осуществлялся на барабане с диаметром 44 см путем беговой нагрузки. Нагрузка давалась ежедневно при режиме вращения барабана со скоростью 15 м/мин, в первые дни в течение 10-20 мин, начиная с 3-й недели длительность нагрузки устанавливалась 30 мин. Тренировки продолжались в течение 4-х недель, по 5 дней в неделю. Однократная физическая нагрузка давалась путем бега в барабане со скоростью 15 м/мин в течение 20 мин. Группа животных, не получавших

тренировочные нагрузки, 1 раз в неделю подвергалась бегу в барабане в течение 10 минут для обучения бегу в экспериментальных условиях.

Уровень работоспособности животных оценивался на основе изменений трех показателей крови под действием физической нагрузки, точнее их молярных отношений – сахар/молочная кислота, сахар/свободные жирные кислоты и молочная кислота/свободные жирные кислоты. Мощность физической нагрузки с вышеуказанными параметрами, применяемой к животным, соответствует субмаксимальной работе с 60-70% максимального потребления кислорода.

Через сутки после окончания тренировочных нагрузок одна группа из нетренированных и одна из тренированных подвергались однократной нагрузке, сразу после этого производилась декапитация всех животных и выделение тканей. Исследовались икроножная мышца (*m.gastronemius*), её белая и красная части, соответственно как быстрый гликолитический и медленный оксидативный типы волокон, сердце и печень.

Определение сульфгидрильных групп

Содержание сульфгидрильных групп определяли по модифицированной методике Lindsey-Sedlak, основанной на методе Ellman (1). Принцип метода заключается в восстановлении 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной) кислоты сульфгидрильными группами с образованием окрашенного в желтый цвет соединения, имеющего максимум поглощения при 412 нм. Содержание сульфгидрильных групп измерялось в 10 % суспензии тканей в 10 мМ натрий-фосфатном буфере с 1 мМ ЭДТА (рН 8,0). Для определения концентрации легкодоступных сульфгидрильных групп (свободные низкомолекулярные тиолы плюс расположенные на поверхности белков SH-группы) к 2,7 мл натрий-фосфатного буфера с ЭДТА (рН 8,0) добавляли 100 мкл

гомогената ткани и 10 мкл реактива Элмана. В случае определения всех (суммарных – легкодоступные плюс скрытые в структуре белков) сульфгидрильных групп в реакционную смесь добавлялась мочевины в конечной концентрации 8 М. На 1-й и 15-й минутах инкубации для легкодоступных и на 1-й и 30-й минутах для суммарных SH-групп измерялись оптические плотности при длине волны 412 нм и по их разнице рассчитывались соответствующие концентрации. Измерения оптической плотности проводились на приборе "Spekol-221". Содержание SH-групп выражали в нмоль/ мг белка.

Определение содержания общего белка.

Количество белка в гомогенатах тканей определяли по методу Бредфорд. Реактив Бредфорда готовили к каждой серии экспериментов: 100 мг кумасси бриллиантового голубого (G250) растворяли в 50 мл этилового спирта, добавляли 100 мл 85% раствора фосфорной кислоты и объем доводили бидистиллированной водой до 1 л. Калибровочную кривую для приготовленного реактива строили на основе растворов бычьего сывороточного альбумина с известными концентрациями. Для определения количества белка к 0,05 мл гомогената исследуемой ткани (10% суспензия) добавляли 2,5 мл реактива Бредфорд. Оптическую плотность полученного окрашенного раствора измеряли на спектрофотометре «Spekol-221» при длине волны 595 нм (не ранее чем через 2 мин и не позже 1 ч). Количество белка в пробе определяли по калибровочной кривой.

Статистическая обработка полученных результатов

Статистическая достоверность сравнений между показателями различных групп (из 5 животных) оценивалась по t-критерию Стьюдента, в некоторых случаях использовался непараметрический U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Результаты обрабатывались при помощи

статистических программ Microsoft Excel (Office-97).

Обсуждение полученных результатов  
Чрезмерная активация ПОЛ оказывает негативное влияние на мышечную деятельность. Так, повышение проницаемости мембран нервных волокон и саркоплазматического ретикулума миоцитов, вызываемое ПОЛ, затрудняет передачу двигательных нервных импульсов и, тем самым, снижает частоту сокращения мышечных волокон. Повреждающее воздействие перекисного окисления воиает на проницаемость мембран для ионов кальция, что приводит к нарушению функции кальциевого насоса и ухудшению релаксационных свойств мышц. При повреждении митохондриальных мембран снижается эффективность окислительного фосфорилирования (тканевого дыхания), что ведет к уменьшению аэробного энергообеспечения мышечной работы. Повышение проницаемости мембран мышечных клеток – сарколеммы – может привести к потере мышечными клетками многих субстратов. Активация ПОЛ при мышечной работе сказывается на возможностях аэробного энергопроизводства, следовательно, на работоспособности спортсмена в целом. Все вышесказанное позволяет считать процессы свободнорадикального окисления липидов биологических мембран важнейшим дезадаптационным фактором, обуславливающим развитие утомления и снижение физической работоспособности. Во время мышечной работы в организме возникают и нарастают разнообразные биохимические и функциональные сдвиги, приводящие, в конечном счете, к снижению физической работоспособности и развитию утомления. Но в результате регулярных тренировок происходит и адаптация организма к нагрузкам. В организме токсическое действие активных форм кислорода предотвращается за счет

функционирования систем антиоксидантной защиты. В норме сохраняется равновесие между окислительными (прооксидантными) и антиоксидантными системами. Антиоксидантная система защиты представлена ферментными и неферментативными компонентами. Ферменты антиоксидантной системы: супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза (глутатионпероксидаза), глутатионредуктаза. Наиболее активны эти ферменты в печени, почках и надпочечниках. Супероксиддисмутаза превращает супероксидные анионы в пероксид водорода:  $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ .

Супероксиддисмутаза является мощным ингибитором свободнорадикального окисления в организме, защищающим биополимеры (белки, нуклеиновые кислоты и др.) от окислительной деструкции. Супероксиддисмутаза – индуцируемый фермент, т.е. синтез его увеличивается, если в клетках активируется ПОЛ.

Каталаза является гемопротеином и катализирует реакцию разложения пероксида водорода:  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ . В клетках каталаза локализована в пероксисомах, где образуется наибольшее количество пероксида водорода, а также в лейкоцитах, где она защищает клетки от последствий «респираторного взрыва». Глутатионпероксидаза – важнейший фермент, обеспечивающий инактивацию пероксида водорода и пероксидных радикалов. Он катализирует восстановление пероксидов при участии трипептида глутатиона. SH-группа глутатиона служит донором электронов и, окисляясь образует дисульфидную форму глутатиона:  $H_2O_2 + 2HS-глутатион \rightarrow 2H_2O + глутатион-S-S-глутатион$ . Окисленный глутатион восстанавливается

глутатионредуктазой:  $глутатион-S-S-глутатион + НАДФН + H^+ \rightarrow 2 HS-глутатион + НАДФ$ . Глутатионпероксидаза в качестве кофермента использует селен. При его

недостатке активность антиоксидантной защиты снижается.

**Результаты.** Неферментативные антиоксиданты: 1) Природные водорастворимые антиоксиданты (витамин С; карнозин; таурин; восстановленные тиолы, содержащие SH-группы; цистеин; HS-КоА; белки, содержащие селен). Витамин С участвует в ингибировании ПОЛ с помощью двух механизмов. Во-первых, он восстанавливает окисленную форму витамина Е и поддерживает необходимую концентрацию этого антиоксиданта в мембранах клеток. Во вторых, витамин С взаимодействует как восстановитель с водорастворимыми активными формами кислорода и инактивирует их. 2) Липофильные низкомолекулярные антиоксиданты, локализованные в мембранах клеток (витамин Е;  $\beta$ -каротин; КоQ; нафтахиноны). Витамин Е – наиболее распространенный антиоксидант в природе, способен инактивировать свободные радикалы непосредственно в гидрофобном слое мембран и тем самым предотвращать развитие цепи перекисного окисления.  $\beta$ -каротин, предшественник витамина А, также ингибирует ПОЛ. Уменьшение содержания этого антиоксиданта в тканях приводит к тому, что продукты ПОЛ начинают производить вместо физиологического патологический эффект. Растительная диета, обогащенная витаминами Е, С, каротиноидами, уменьшает риск развития атеросклероза и заболеваний сердечно-сосудистой системы, обладает антиканцерогенным действием. Действие этих витаминов связано с ингибированием ПОЛ и кислородных радикалов и, следовательно, с поддержанием нормальной структуры компонентов клеток.

Адаптация мышц к физическим нагрузкам, по всей вероятности происходит при непосредственном участии системы антиоксидантной защиты (2, 3). Опираясь на результаты наших исследований, в которых изучались и были

выявлены особенности процесса ПОЛ и активность некоторых антиоксидантных ферментов в органах при действии физических нагрузок (4, 5, 6). Показано, что физические нагрузки обуславливают усиление продукции АФК (активных форм кислорода) и модификацию течения ПОЛ, которые выражаются в адаптивных изменениях уровня ПОЛ и в активности ферментов антиоксидантной защиты, а характер изменений про- и антиоксидантных показателей в мышцах зависит от типа энергообеспечения. Уровень ПОЛ тесно связан с содержанием эндогенных тиолов в тканях. SH-содержащие соединения в первую очередь подвергаются окислению под действием продуктов ПОЛ, тем самым предохраняя от окисления другие SH-группы, представляющие собой сумму свободных низкомолекулярных тиолов (глутатион и др.) и находящихся на поверхности белков SH-групп (измеряемое содержание тиолов мы будем называть общим цитозольным), в белой, красной скелетных мышцах, сердечной мышце и печени у крыс под воздействием хронических и острых физических нагрузок (7). Результаты экспериментов по измерению содержания сульфгидрильных групп для контрольных нетренированных и тренированных в течение 4-х недель хроническими физическими нагрузками показали, что распределение концентрации общих цитозольных SH-групп неравномерно по изучаемым тканям. В скелетных мышцах и других органах регулярные физические нагрузки приводят к адаптивным изменениям уровня ПОЛ в состоянии покоя и в результате появляется тканеспецифичная реакция на однократную нагрузку. Снижение уровня общих цитозольных тиолов в покоящихся скелетных мышцах при длительных тренировочных нагрузках согласуется с низкими уровнями продуктов ПОЛ в этих же мышцах. Отсутствие изменений в содержании тиолов в сердечной мышце согласуется с повышенным по

отношению к нетренированным животным уровнем продуктов ПОЛ. Поскольку печень является основным местом синтеза циркулирующего глутатиона из эндогенных или поступающих извне аминокислот, увеличение содержания тиолов в печени в результате тренировок можно отнести в счет глутатионового составляющего. Уменьшение содержания цитозольных тиолов в белой мышце и печени под действием однократной нагрузки является свидетельством ускорения продукции АФК и других свободных радикалов при интенсивной мышечной работе. В оксидативной красной мышце увеличение содержания тиолов может происходить за счет более интенсивного извлечения глутатиона из плазмы. Практическая неизменность содержания цитозольных тиолов в сердечной мышце при действии физических нагрузок, по-видимому, отражает сохранение уровня общей восстановительной способности миокарда как жизненно важной структуры при высокой двигательной активности. Таким образом, в наших исследованиях мы находим подтверждение участия антиоксидантных элементов скелетных мышц и других органов в адаптивных процессах, связанных с регулярными физическими упражнениями, на уровне общей редуцирующей способности клетки, наравне с ферментной защитой от оксидантных соединений. Тиоловые антиоксидантные показатели претерпевают тканеспецифичные адаптивные изменения, которые чувствительны также и к особенностям энергетического метаболизма, и облегчают защиту органов от повреждающего действия окислительного стресса, развиваемого при интенсивных физических упражнениях.

## Литература

1. Алиев С.А., Агаева С.Е. Динамика тиолового содержания и продуктов перекисного окисления липидов в структурах мозга у крыс при голодании. Актуальные проблемы науки и образования, 2012, с. 12-16.
2. Alessio Н.М., Goldfarb А.Н.(1988) Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise:adaptive response to training. J. Appl. Physiol., v. 64 (4), p.1333-1336.
3. Clarkson P.M., Thompson H.S. (2000) Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? Am. J. Clin. Nutr., v. 72 (suppl), p.637–646.
4. Керимова А.К., Гаджиев А.М. (2004). Влияние физических нагрузок на уровень перекисного окисления липидов в скелетных мышцах. Актуальные проблемы физиологии и биохимии, v. 30, 256-264.
5. Керимова А.К., Гаджиев А.М. (2005) Адаптивная реакция глутатион-зависимых антиоксидантных ферментов при действии физических нагрузок.Современные проблемы сравнительной физиологии и биохимии. Материалы 3-го Съезда Азербайджанского физиологического общества. Сборникстатей Баку: Елм, с. 345-354.
6. Гаджиев А.М., Керимова А.К., Оксидативные аспекты адаптации мышц к физическим нагрузкам. Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды. Челябинск, 2006.
7. Sedlak J., Lindsey R. (1968). Estimation of Total, Protein-Bound and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. Analit. Biochem., v. 25: p.192-205.