

УДК 577.11:577.151

**ВЛИЯНИЕ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУР НА  
ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ ДЕСТРУКЦИЮ БИОПОЛИМЕРОВ  
И АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ  
КРОЛИКА ЕВРОПЕЙСКОГО (*OGYCTOLAGUS CUNICULUS*)**

**С.С. Тарасов, А.С. Корягин**

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,  
Нижний Новгород

Работа посвящена изучению влияния высоких и низких температур возникающих в естественных условиях среды обитания на уровень окислительной модификации белков (ОМБ) в плазме крови кролика европейского. В виду усиления процессов ОМБ при высокой температуре окружающей среды изучена динамика влияния гипертермии ( $t +40$ ) в искусственных условиях на процессы окислительной модификации белка (ОМБ), перекисного окисления липидов (ПОЛ), динамика активности каталазы и супероксиддисмутазы (СОД).

**Ключевые слова:** гипертермия, экологический фактор, окислительная модификация белков, перекисное окисление липидов, антиоксидантные ферменты, супероксиддисмутаза, каталаза.

**Введение.** Кролик – это типичное гомотермное животное, в норме поддерживающее постоянство температуры тела в пределах 38,5-39,5, которая в летнее время может подниматься до 41°C. Денатурация белков и гибель животного наступает при температуре 44°C (Балакирев, 2007). Таким образом, кролик является достаточно чувствительным млекопитающим к изменению температуры в сторону повышения.

В последние годы на территории России все чаще наблюдаются экстремальные погодные явления, сопровождающиеся в летний период необычно высокими температурами и засухой, причем жара регистрируется не только на юге страны, но и в Центральном, Уральском регионах, в Поволжье и Сибири. Довольно часто температура окружающего воздуха летом в течение продолжительного времени достигает 40°C и более (Маркин и др., 2011).

Основной причиной негативного влияния гипертермии на организм животного является денатурация белка, при этом полная денатурация наступает при повышении температуры от 50° С, а негативное влияние фиксируется при отклонении от нормы на

несколько градусов (Биохимия, 2009). Такое изменение температуры вызывает окислительный стресс (Stocker et al., 1991). Основной механизм стресса лежит в повышенном образовании активных форм кислорода (АФК). Важнейшими АФК считаются: супероксидный радикал  $O^{2-}$ , 2 синглетный кислород  $1 O_2$ , гидроксильный \*ОН и пероксидный \*НО<sub>2</sub> радикалы, перекись водорода Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, пероксидный ион НО<sub>2</sub> – , гипохлорит НСЮ (Владимиров Ю.А, 1998). Основные механизмы генерации АФК связаны с нарушениями функционирования электронно-транспортных цепей митохондрий или микросом, особенно при низкой концентрации АДФ, а также при изменении свойств АФК в свою очередь вызывают окислительную деструкцию биополимеров, в частности окислительную модификацию белков (ОМБ) и перекисное окисление липидов (ПОЛ) (Дубинина, 2006, Донцов и др., 2006).

**Материал и методика.** Объектом исследования послужил кролик европейский (*Oryctolagus cuniculus*) породы советская шиншилла. Данное животное представляет особый интерес с точки зрения изучения влияния гипертермии как важнейшего абиотического фактора, т.к. является одним из самых стенобионтных млекопитающих по отношению к повышению температуры. В качестве материала использовали плазму крови кролика. Межклеточное вещество крови с эколого-биохимической точки зрения представляет важность, т.к. питает все ткани организма, а, следовательно, изменения её биохимического состава под действием фактора среды наиболее чувствительным образом скажутся на всем организме. Основные биохимические показатели, используемые в работе: окислительная модификация белков (ОМБ), перекисное окисление липидов (ПОЛ), активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы.

Эксперимент проводили в 2 этапа: (1) изучали влияния естественной гипер и гипотермии, (2) изучали динамику биохимических показателей под действием искусственной гипертермии в разные временные промежутки.

Изучение влияния высокой и низкой температуры на окислительную деструкцию биополимеров и динамику активности антиоксидантных ферментов проводили при температуре в помещении -40 (гипотермия) и +40 (гипертермия). Забор крови проводили из ушной вены через 12 часов после увеличения или понижения температуры.

Искусственную гипертермию проходили в помещении, в котором постоянно поддерживалась температура +40. Забор крови у животных осуществляли через 1,6,12 и 24 часа.

Окислительную модификацию белков изучали по уровню основных и нейтральных альдегидных и кетонных групп аминокислот,

которые прореагировали с 2,4-ДНФГ, регистрируемые на спектрофотометре при разных длинах волн (Дубинина и др., 1995). Общий белок определяли биуретовым методом (Мельников, 1987).

Переокисное окисление липидов оценивали по уровню образовавшихся диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) (Стальная, 1997).

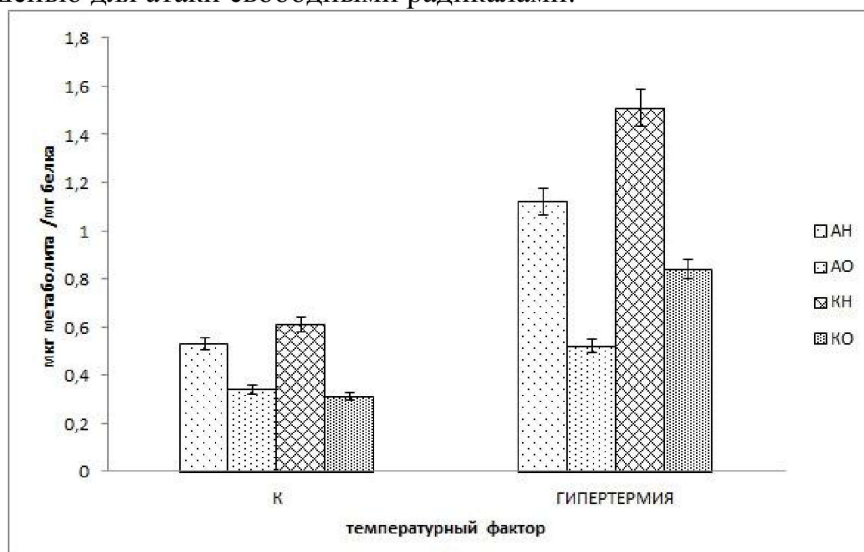
Активность супероксиддисмутазы проводили по методике, основанной на способности СОД конкурировать с нитросиним тетразолом за супероксидные анион-радикалы, образующие в результате аэробного взаимодействия НАДН с феназинметасульфатом (Дубинина и др., 1983). Каталазу регистрировали методом, основанном на способности данного фермента разлагать перекись водорода с образованием воды. Активность определяли по снижению количества пероксида в пробе, определяемого по уменьшению экстинкции пробы (Patterson et al., 1984).

Статистическую обработку полученных результатов производили с помощью программы Microsoft Excel 2003 и Биостатистика вер. 4.03 методами параметрической статистики, включающей определение средней арифметической (M) и стандартного отклонения. Достоверность различий оценивали по t критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони. Уровень значимости достоверности различий – 95% (Гланц, 1999).

**Результаты и обсуждение.** В жаркие дни температура воздуха фиксировалась на уровне +40°C и выше и держалась более 12 часов в сутки. В стаде из 50 взрослых кроликов, клетки которых были помещены на улицу, зафиксировано 5 летальных исходов за сезон (около 2-х месяцев). В связи с этим нам выпал шанс исследовать влияние естественной гипертермии +40°C на ОМБ плазмы крови кролика.

В результате исследования было установлено: высокая температура окружающей среды через 12 часов воздействия существенно увеличивает концентрацию продуктов, образовавшихся в результате ОМБ (рис. 1). При этом продукты ОМБ нейтрального характера показали более резкое изменение в сторону увеличения концентрации по отношению к контролю, алифатические альдегид-денитрофенилгидразоны нейтрального характера увеличились на 100%, а алифатические кетон-денитрофенилгидразоны нейтрального характера – на 120 % ( $P \leq 0,05$ ). Изменение концентрации продуктов ОМБ основного характера показало следующую динамику: алифатические альдегид-денитрофенилгидразоны основного характера увеличились на 60 %, алифатические кетон-денитрофенилгидразоны основного характера – на 130%. Таким образом, суммарное изменение концентрации продуктов, образовавшихся в процессе ОМБ, более чем

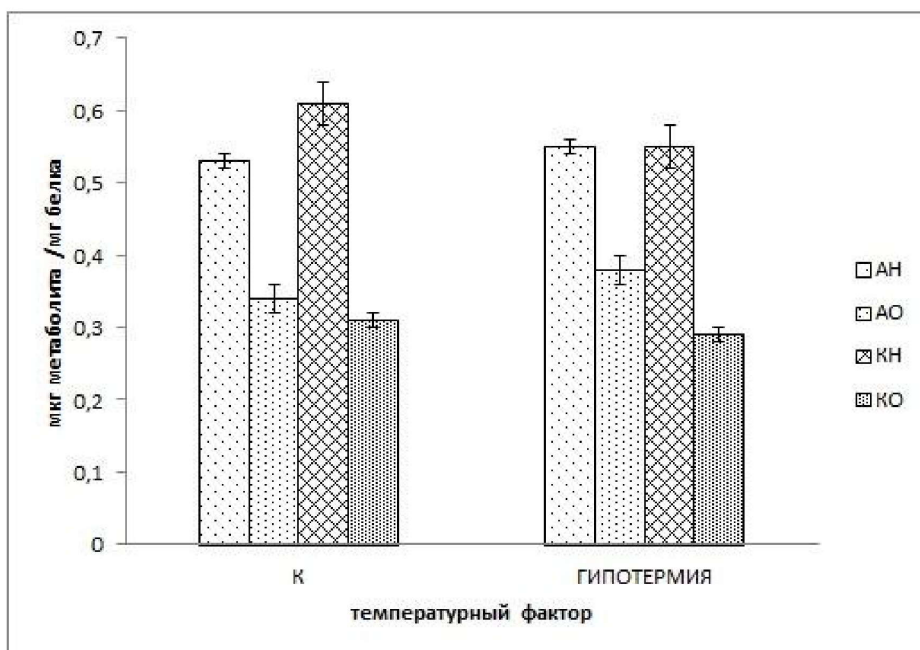
на 100% по отношению к контролю свидетельствуют о существенном усилении окислительной деструкции данного полимера. Усиление окислительных процессов в результате гипертермии может быть вызвано в связи с учащением физиологических показателей частоты дыхания и сердцебиения, что в свою очередь усиливает и метаболические процессы, одним из которых является АФК, которые усилили окисление белковых молекул. Другая причина – усиление деструктивных процессов и общая денатурация белков под действием высоких температур, изменение конформации белковой молекулы, что освобождает аминокислотные группы, которые становятся лёгкой мишенью для атаки свободными радикалами.



Р и с . 1 . Влияние естественной гипертермии ( $t +40$ ) на количество продуктов образовавшихся в процессе ОМБ плазмы крови кролика: АН - алифатические альдегид-денитрофенилгидразоны нейтрального характера АО - алифатические альдегид-денитрофенилгидразоны основного характера КН - алифатические кетон-денитрофенилгидразоны нейтрального характера КО - алифатические кетон-денитрофенилгидразоны основного характера

Аналогичный эксперимент при естественных низких температурах, в зимний период, в аномально холодные дни  $t - 40^{\circ}\text{C}$  статистически значимых изменений ОМБ не выявил (рис 2.), что свидетельствует о высокой гипотермической толерантности кролика.

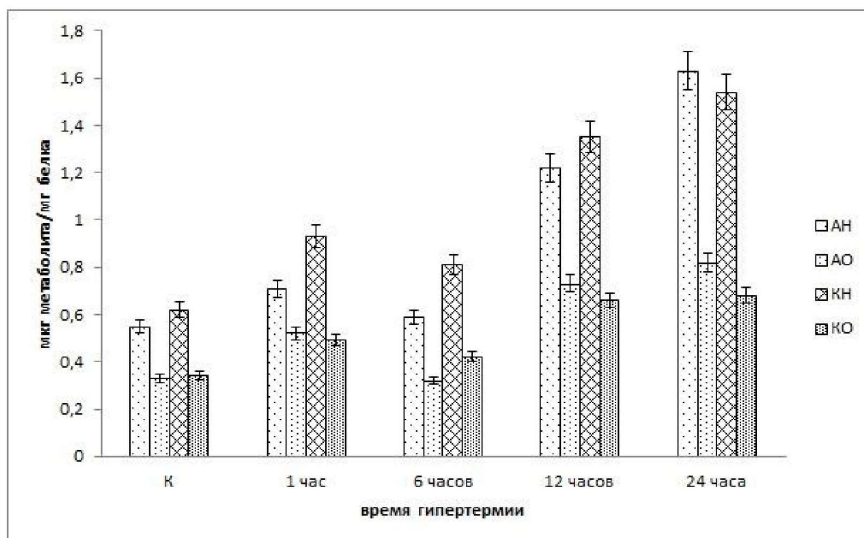
В связи с отсутствием реакции ОМБ на гипотермическое воздействие и существенного изменения ОМБ в условиях естественной гипертермии было решено исследовать деструктивные процессы при искусственной направленной гипертермии в зависимости от времени воздействия.



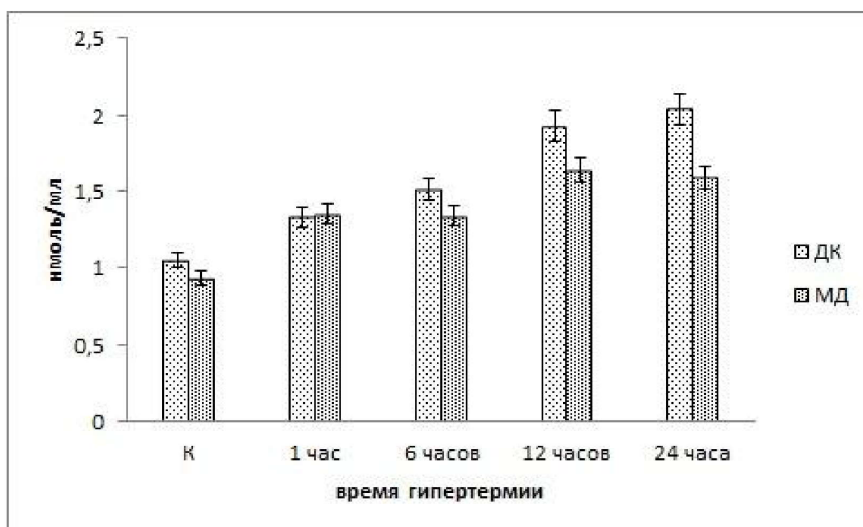
Р и с . 2 . Влияние естественной гипотермии ( $t -40$ ) на количество продуктов образовавшихся в процессе ОМБ плазмы крови кролика (обозначения см. рис.1).

В результате эксперимента было установлена зависимость времени гипертермического воздействия на процессы окислительной деструкции биополимеров и антиоксидантных ферментов (рис. 3-5).

Так, под действием искусственной гипертермии в первый час наблюдается усиление процессов ОМБ, что проявляется в увеличении концентрации продуктов прореагировавших с 2,4-ДФГ, на шестой час зафиксировано статистически значимое снижение продуктов ОМБ в плазме крови кролика ( $P \leq 0,05$ ). Через 12 часов воздействия высокими температурами на животных наблюдается увеличение продуктов ОМБ с динамикой сходной с аналогичным естественным гипертермическим воздействием; суммарное увеличение продуктов ОМБ оказалось на 100% выше контроля. При 24-часовом воздействии резкой динамики в изменении концентрации продуктов ОМБ не наблюдается; статистически значимо зафиксировано изменение нейтральных продуктов окисления. Максимальный процент изменения показали алифатические альдегид-денитрофенилгидразоны нейтрального характера, статистически значимое изменение концентрации основных продуктов ОМБ не зафиксировано ( $P \geq 0,05$ ).



Р и с . 3 . Влияние искусственной гипертермии на содержание продуктов ОМБ в плазме крови кролика в зависимости от времени воздействия (обозначения см. рис.1)

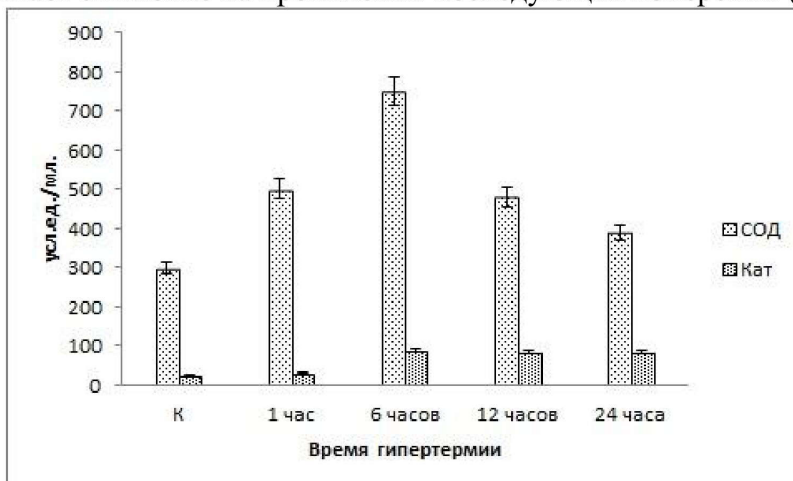


Р и с . 4 . Влияние искусственной гипертермии на содержание продуктов ПОЛ в плазме крови кролика в зависимости от времени воздействия: ДК – диеновые конъюгаты, МД – малоновый диальдегид

Анализируя концентрации продуктов ПОЛ в плазме крови кролика, можно сказать, что в первый час искусственного гипертермического воздействия наблюдается увеличение, как ДК, так и МДА (рис. 4). При этом концентрация МДА показала более резкую динамику изменения, чем ДК, однако на 6 час воздействия

концентрация МДА практически не изменилась; незначительное увеличение наблюдалось и по ДК. На 12 и 24 час воздействия зафиксировано усиление процессов ПОЛ. Так, виден статистически значимый рост концентрации как ДК и МДА, как по отношению к 6 часовому воздействию, так и по отношению к контролю. Анализируя процесс ПОЛ при искусственной гипертермии можно сказать, что концентрация ДК увеличивается примерно на 100%, а МДА – на 60% по отношению к контролю. Таким образом, процессы ПОЛ, проходящие в организме кролика, полностью совпадают и подтверждают аналогичные процессы ОМБ, хотя и показывают менее резкую динамику.

У животных, подверженных гипертермии, наблюдается увеличение активности СОД с 1-го по 6 час воздействия фактором, на 12 час зафиксирован спад активности СОД на 30% по отношению к предыдущему измерению, однако он остается выше контроля на 40%. Через 24 часа фиксируется снижение активности СОД на 10 % по отношению к предыдущему измерению, ( $P \leq 0,05$ ). Скорость активности каталазы возрастает на 6 час воздействия фактором и не показывает снижение на протяжении последующих измерений (рис. 5).



Р и с . 5 . Влияние искусственной гипертермии на активность антиоксидантных ферментов в плазме крови кролика в зависимости от времени воздействия: СОД – супероксиддисмутаза, Кат – каталаза

Сопоставляя изученные биохимические показатели и динамику их изменения под действие абиотического фактора, гипертермии можно заключить, что наиболее ярко выражены динамика изменения продуктов ОМБ, а так же изменение активности СОД и каталазы. Активность каталазы возрастает в 1 час действия гипертермией и усиливается на 6 час. Вероятно, начавшиеся физиологические и

биохимические изменения в организме сигнализируют об опасности окислительного взрыва, на что организм начинает активно вырабатывать антиоксидантные ферменты. Отставание активности каталазы и существенно низкой активностью по сравнению с СОД может быть связано с специфичностью её действия, а именно расщеплением перекиси водорода, концентрация которой вероятно ниже, чем остальных АФК, а так же неспецифичности данного фермента для межклеточного вещества. Более резкое усиление процессов ОМБ по сравнению с ПОЛ можно объяснить пространственной конфигурацией белков, которые существенно подвержены температурной дестабилизации, нежели липиды, а так же тем что, именно белковые молекулы улавливают основную массу АФК (Дубинина, 2006).

**Выводы:** 1. Гипертермия – как важнейший абиотический фактор среды, в естественных условиях, существенно, статистически значимо ( $P \leq 0,05$ ) усиливает окислительную модификацию белков в плазме крови кролика.

2. Окислительная модификация белка и перекисное окисление липидов показывают постепенную динамику усиления деструктивных процессов в плазме крови кролика; при этом зафиксированы точки активного сопротивления данным процессам на уровне 6-часового воздействия.

3. Динамика активности супероксиддисмутазы и каталазы показывает существенное усиление активности в районе 6 часового воздействия гипертермией, что свидетельствует об активном сопротивлении организма к действию гипертермического фактора среды.

### **Список литературы**

- Балакирев Н.А., Тинаева Е.А., Тинаев Н.И., Шумилина Н.Н.* 2007. Кролиководство. М.: КолосС. 232 с.
- Биохимия.* 2009. под редакцией Е.С. Северина, М. 768 с.
- Владимиров Ю.А.* 1998. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестн. РАМН. № 7. С. 43-51.
- Гланц С.* 1999. Медико-биологическая статистика М.: Практика. 459 с.
- Донцов В.И., Крутько В.Н., Мрикаев Б.М., Уханов С.В.* 2006. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении // Труды ИСА РАН. Т. 19.
- Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф.* 1983. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // Клиническая лабораторная диагностика. №10. С. 30-33.
- Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г.* 1995. Окислительные модификации белков сыворотки крови человека, метод



- ее определения // Вопросы медицинской химии. Вып. 41. № 1. С. 24-26.
- Дубинина Е.Е. 2006. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. СПб. 396 с.
- Маркин Ю.В, Спиридонов Д.Н., Полунина С.В. 2011. Тепловой стресс: теория и практика // Птица и птице продукты. № 3. С. 37-40.
- Мельников В.В. 1987. Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина. 367 с.
- Стальная И.Д. 1997. Метод определения малонового диальдегида / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. М. С. 66-68.
- Patterson B. D., Paune L. A., Chen Yi-Zhu, Graham P. 1984. An inhibitor of catalase induced by cold in chilling-sensitive plants // Plant Physiology. V.76. № 4 P. 1014-1018.
- Stocker R., Frei B. 1991. Endogenous antioxidant defences in human blood plasma // Sies H. ed. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. London: Academic Press. P .213-243

**THE IMPACT OF EXTREME TEMPERATURES ON THE  
OXIDATIVE DEGRADATION OF THE BIOPOLIMER AND  
ANTIOXIDANT ENZYMES IN EPY BLOOD PLASMA OF  
EUROPEAN RABBIT (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*)**

**S.S. Tarasov, A.S. Koryagin**

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod

We studied the effect of the natural high and low temperature on the level of oxidative modification of proteins (OMP) in the blood plasma of the European rabbit. In view of the enhancement of OMB processes at high ambient temperatures, we also studied the dynamics of the influence of hyperthermia (t +40) under artificial conditions on the processes of oxidative modification of protein (OMB), lipid peroxidation (LPO), dynamics of catalase and superoxide dismutase (SOD) activity.

**Keywords:** *hyperthermia, environmental factor, oxidative modification of proteins, lipid peroxidation, antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase.*

*Об авторах:*

ТАРАСОВ Сергей Сергеевич – аспирант кафедры биохимии и физиологии ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» 603022, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, e-mail: tarasov\_ss@mail.ru

КОРЯГИН Александр Сергеевич – доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и физиологии, ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», 603022, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

Тарасов С.С. Влияние экстремальных температур на окислительную деструкцию биополимеров и антиокислительные ферменты в плазме крови кролика европейского (*Oryctolagus cuniculus*) / С.С. Тарасов, А.С. Корягин // Вестн. ТвГУ. Сер.: Биология и экология. 2017. № 1. С. 76-85.