

## Влияние гипотермии на интенсивность окислительной модификации белков плазмы крови сусликов

UDC 591.111.05

M.D. ASTAEVA, V.P. ABDULLAEV, N.K. KLICHKHANOV\*

## Influence of Hypothermia on Intensity of Oxidative Modification of Ground Squirrels' Blood Plasma Proteins

Исследовали влияние искусственной гипотермии разной глубины на интенсивность окислительной модификации белков плазмы и активность антиокислительной системы крови сусликов в активный летний период. Показано, что гипотермия при 20 и 10°C по-разному влияет на интенсивность окислительной модификации белков плазмы. При гипотермии, независимо от ее глубины, выявлено повышение устойчивости белков плазмы крови к оксидантам. При низких температурах тела обнаружено существенное повышение активности гидрофильных антиоксидантов в плазме крови, что может играть важную роль в защите белков от окислительного повреждения.

**Ключевые слова:** белки плазмы крови, окислительная модификация, антиокислительная активность, кровь, суслики.

Досліджували вплив штучної гіпотермії різної глибини на інтенсивність окислювальної модифікації білків плазми та активність антиокислювальної системи крові ховрашків в активний літній період. Показано, що гіпотермія при 20 і 10°C по-різному впливає на інтенсивність окислювальної модифікації білків плазми. При гіпотермії, незалежно від її глибини, виявлено підвищення стійкості білків плазми крові до оксидантів. При низьких температурах виявлено істотне підвищення активності гідрофільних антиоксидантів в плазмі крові, що може відігравати важливу роль у захисті білків від окислювального пошкодження.

**Ключові слова:** білки плазми крові, окислювальна модифікація, антиокислювальна активність, кров, ховрашки.

The effect of artificial hypothermia of various depths on intensity of oxidative modification of plasma proteins and activity of antioxidant system of ground squirrel blood during active summer time were studied. It has been shown that hypothermia at 20 and 10°C differently affects the intensity of oxidative modification of plasma proteins. Under hypothermia independently of its depth the increase of protein resistance of blood plasma to oxidants has been revealed. At low temperatures of body the significant increase of hydrophil antioxidants' activity in blood plasma is found that may play an important role in protection of proteins from oxidative damage.

**Key-words:** proteins of blood plasma, oxidative modification, antioxidative activity, blood, ground squirrels.

Стрессорные и экстремальные состояния у млекопитающих стимулируют образование активных форм кислорода (АФК) в тканях, что приводит к окислительному повреждению клеток, перекисно-му окислению липидов, окислительной модификации белков и других макромолекул [6]. Белки, вследствие особенностей их структуры и разнообразия аминокислотных радикалов, особенно чувствительны к повреждающему действию АФК [4].

Зимняя спячка (гибернация) – это закрепленная в ходе эволюции уникальная способность к минимизации жизненных функций организма, позволяющая ряду видов млекопитающих в течение многих месяцев переживать холод, бескормицу, сокращение светлого периода суток [7]. Важным аспектом спячки мелких грызунов является ее прерывистость. Спячка мелких грызунов, например сусликов, состоит из баутов (торпидное состояние), которые могут длиться от нескольких дней до двух недель [13]. Полагают, что в связи с резким изме-

Stress and extreme states in mammals stimulate the formation of reactive oxygen species (ROS) in tissues which result in oxidative damage of cells, lipid peroxidation, oxidative modification of proteins and other macromolecules [6]. Proteins due to peculiarities of their structure and variety of aminoacid radicals, are especially sensitive to damaging action of ROS [4].

Hibernation is a fixed during evolution unique ability to minimize living functions of an organism, enabling variety of mammalian species to survive against cold, lack of fodder and reduction of day light time during many months [7]. The important aspect of small rodents' hibernation is its discontinuity. Hibernation of small rodents, for example ground squirrel, consists of baupts (torpid state), which may last from several days up to two weeks. There is a suggestion that due to a sharp change of perfusion rate the hibernators' tissues are exposed to a risk of ischemic damage and oxidative stress during entering and leaving the torpid state [15]. During entering into a torpid state the heart rate and

Дагестанский государственный университет, г. Махачкала

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Гаджиева, 43а, г. Махачкала, Республика Дагестан, Российская Федерация, 367001; тел.: +7-88722-67-59-15 электронная почта: klich-khan@mail.ru

Dagestan State University, Makhachkala, Russia

\* To whom correspondence should be addressed: 43a, Gadgiyev str., Makhachkala, Republic of Dagestan, Russian Federation, 367027; tel.: +7 88722 67 5915; e-mail: klich-khan@mail.ru

нением скорости перфузии ткани гибернаторов подвергаются риску ишемического повреждения и окислительного стресса при входе и выходе из торпидного состояния [15]. При входе в торпидное состояние частота сердечных сокращений и сердечный выброс падают до того, как значительно снизится температура тела. Это приводит к снижению перфузии тканей в тех областях, где скорости биохимических процессов остаются на эутермном уровне. Способность переносить резкие перепады энергетического обмена и интенсивности свободнорадикальных процессов (СРП) в динамике зимней спячки является одним из главных элементов зимней спячки как адаптации [14]. Вместе с тем неизвестно, адаптированы ли гибернаторы к изменению интенсивности метаболизма вне периода зимней спячки.

Цель работы – исследовать содержание окислительно-модифицированных белков и активность антиокислительной системы крови сусликов при искусственной гипотермии различной глубины в период их летнего бодрствования.

### Материалы и методы

Исследования проводили на малых сусликах *Spermophilus pygmaeus* Pall. с массой тела 250–300 г. До опытов животные находились в условиях вивария на стандартном пищевом рационе. Для изучения влияния гипотермии сусликов подвергали охлаждению в специальных холодных камерах, в рубашках которых циркулировала холодная вода (3–4°C). Температуру тела сусликов снижали равномерно, так что за 55–60 мин она достигала 20°C, а за 90–100 мин – 10°C. Контролем служили бодрствующие летом животные.

Степень окислительной модификации белков (ОМБ) плазмы крови определяли по количеству карбонильных групп, реагирующих с 2,4-динитрофенилгидразином [19]. При этом определяли исходный уровень карбонильных групп, а также их накопление в модельной системе в течение 15 мин при 37°C в присутствии  $10^{-3}$  М  $Fe^{2+}$ ,  $10^{-3}$  М ЭДТА и  $3 \times 10^{-4}$  М  $H_2O_2$ . Содержание карбонильных групп, измеренное при длине волны 370 нм, рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции ( $22000 \text{ л} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  для алифатических динитрофенилгидразинов) и выражали в нмолях на 1 мг белка [19]. Количественное содержание белка в плазме крови определяли биуретовым методом [11]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы определяли в гемолизатах. Об активности СОД судили по ее способности ингибировать процесс восстановления тетразолиевого нитросинего и феназинметосульфата в условиях генерации супероксидного анион-радикала [3]. Активность каталазы определяли по скорости убыли перекиси водорода в среде инкубации, концентрацию переки-

cardiac output go down before the body temperature is significantly reduced. This results in decrease of tissue perfusion in those areas, where the rates of biochemical processes remain at eutermic level. Ability to undergo sharp differences of energy exchange and intensity of free radical processes (FRP) in hibernation dynamics is one of its main adaptation elements [14]. At the same time it is unknown if the hibernators are adapted to metabolism intensity change beyond hibernation period.

The research aim was to study the content of oxidative-modified proteins and activity of antioxidative system of ground squirrel blood under artificial hypothermia of various depths during their summer active period.

### Materials and methods

The researches were carried out in small ground squirrels *Spermophilus pygmaeus* Pall. of 250–300 g. Prior to experiments the animals were under vivarium conditions on a standard diet. For studying the effect of hypothermia the ground squirrels were exposed to cooling in special cold chambers, in the jackets of which cold water circulated (3–4°C). Temperature of ground squirrel's body was decreased evenly with reaching 20°C for 55–60 min, and 10°C for 90–100 min. Summer active animals considered as the control.

Rate of protein oxidative modification (POM) of blood plasma was determined by the content of carbonyl groups, reacting with dinitrophenyl hydrazine [19]. Herewith the initial level of carbonyl groups and their accumulation in model system for 15 min at 37°C at the presence of  $10^{-3}$  М  $Fe^{2+}$ ,  $10^{-3}$  М EDTA and  $3 \times 10^{-4}$  М  $H_2O_2$  were determined. The content of carbonyl groups was measured at 370 nm wave length using coefficient of molar extinction ( $22.000 \text{ l} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  for aliphatic dinitrophenyl hydrazine) and expressed in nM per 1 mg of protein [19]. Quantitative content of protein in blood plasma was determined by biuret method [11]. Activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase was determined in hemolysates. SOD activity was estimated by its ability to inhibit the reduction process of tetrazolium nitroblue and phenazine methosulfate under conditions of superoxide anion radical generation [3]. Catalase activity was determined by the rate of decrease of hydrogen peroxide content in incubation medium, concentration of hydrogen peroxide was assayed in the reaction with ammonium molybdate [8]. The content of hemoglobin was determined by ammonium method [9]. Antioxidative activity of hydrophilic components was estimated by oxidation kinetics of reduced form of 2,6-dichlorophenol indophenol by oxygen [10]. Statistical processing of the results were carried out with Statistica software program.

### Results and discussion

As Table 1 shows under hypothermia only the insignificant decrease of protein content in blood plasma

си водорода – по реакции с молибдатом аммония [8]. Содержание гемоглобина определяли аммиачным методом [9]. Об антиокислительной активности гидрофильных компонентов судили по кинетике окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом [10]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica.

### Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, при гипотермии наблюдается лишь тенденция к снижению содержания белков в плазме крови. Снижение уровня плазменных белков может быть связано с выходом части мелкодисперсных белков из сосудистого русла и/или с интенсификацией процессов окислительной модификации плазменных белков и их захватом клетками ретикулоэндотелиальной системы.

Анализ одного из маркеров ОМБ [15]: содержания карбонильных групп – показал, что при гипотермии 20°C этот показатель в плазменных белках снижается на 17% по отношению к контролю. Однако при дальнейшем снижении температуры тела (10°C) обнаружено повышение содержания карбонильных групп в белках на 26,8%. Чем же обусловлена интенсификация процессов ОМБ при глубокой гипотермии?

Можно предположить, что повышение содержания окислительно-модифицированных белков в плазме отражает повышение уровня АФК в крови. АФК могут поступать в плазму из тканей, митохондрий эндотелиальных клеток, а также в процессе функционирования СОД эритроцитов и плазмы [17]. Недавно на артериях хвоста мышей установлено, что умеренное холодное воздействие (28°C), в отличие от условий 37°C, приводит к увеличению образования АФК в митохондриях гладкомышечных клеток [12]. Образующиеся при этом АФК способствуют вазоконстрикции сосудов. При глубокой гипотермии вряд ли следует ожидать увеличения образования АФК митохондриями гладкомышечных клеток, поскольку при этом, с одной стороны, резко снижается потребление кислорода, с другой – происходит сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина влево [26], что затрудняет отдачу кислорода тканям.

Возможно, при глубокой гипотермии окислительно-модифицированные белки поступают в плазму крови из тканей. Это предположение подтверждают результаты исследования окисляемости плазменных белков в условиях *in vitro* при генерации АФК средой Фентона. Как оказалось, при гипотермии разной глубины индукция процессов ОМБ внесением в среду инкубации ионов железа и пероксида водорода приводит к снижению содержания в них карбонильных групп в среднем на 17%

is observed. Decrease of plasma protein level may be associated with partial release of low-molecular-weight proteins from bloodstream and/or with intensification of oxidative modification processes of plasma proteins and their capture by the cells of reticuloendothelial system.

Analysis of one of POM markers, the carbonyl groups' content, showed that under hypothermia of 20°C this index measured in plasma proteins decreased down to 17% comparing to the control [15]. However during further decrease of body temperature (10°C) the increase of carbonyl group content in proteins up to 26.8% is observed. What the intensification of POM processes under deep hypothermia is stipulated with?

One may suggest that increase of oxidative-modified proteins in plasma shows the increase of ROS level in blood. ROS may enter into plasma from tissues, mitochondria of endothelial cells and during SOD functioning in erythrocytes and plasma [17]. Recently it was established that in the mice caudal arteries the moderate cold effect (28°C) in contrast to normal temperature of 37°C leads to the increase of ROS formation in mitochondria of smooth muscle cells [12]. ROS forming thereby contributes to vasoconstriction of vessels. Under deep hypothermia the intensification of ROS formation in mitochondria of smooth muscle cell is hardly expected, because on the one hand the oxygen consumption sharply reduces, and on another there is a left shift of oxyhemoglobin dissociation curve [26], reflecting the decrease in oxygen output to tissues.

Perhaps, under deep hypothermia the oxidative-modified proteins enter into blood plasma from tissues. The results of *in vitro* investigation of plasma proteins oxidation during ROS generation with Fenton's medium confirm this suggestion. Under different hypothermia depth the POM processes induction with introduction of iron ion and hydrogen peroxide ion into incubation medium was shown to result in decreasing of carbonyl groups' content by 17% comparing to the control (Table 1). These results testify to an increase of protein resistance of ground squirrels' blood plasma to oxidants under decrease of body temperature.

It should be noted that low inducibility of POM processes of blood plasma has been observed by us in ground squirrels both under deep hibernation and during induced arousal of animals [5]. Thus, independently of season the decrease of ground squirrel body temperature is accompanied by an increase of blood plasma protein resistance to oxidants.

It has been established that metal-catalyzed oxidation of proteins is a site-specific process, involving  $H_2O_2$  and  $Fe^{2+}$  in the area of metal-binding surface of protein [23]. Iron ions are linked to metal-binding surface of protein.  $Fe^{2+}$ -protein complex reacts with  $H_2O_2$  and generates *in situ*  $OH^\bullet$  radical, inducing oxidative modification of aminoacid residue in the area

относительно контроля (табл. 1). Эти результаты свидетельствуют о повышении устойчивости белков плазмы крови сусликов к оксидантам при снижении температуры тела.

Следует отметить, что низкая индуцибельность процессов ОМБ плазмы крови обнаружена нами у сусликов и при глубокой зимней спячке, и в ходе индуцированного пробуждения животных [5]. Таким образом, вне зависимости от сезона года при снижении температуры тела сусликов происходит повышение устойчивости белков плазмы крови к оксидантам.

Установлено, что металл-катализируемое окисление белков – это сайт-специфический процесс, в который вовлекаются  $H_2O_2$  и  $Fe^{2+}$  в области металлсвязывающей поверхности белка [23]. Ионы железа фиксируются на металлсвязывающей поверхности белка. Комплекс  $Fe^{2+}$ -белок реагирует с  $H_2O_2$  и генерирует *in situ* радикал  $OH^\bullet$ , который вызывает окислительную модификацию аминокислотного остатка в области металлсвязывающего участка белка. Это приводит к дезаминированию отдельных аминокислотных остатков, превращению их в карбонилпроизводные, потере белком функциональной активности и увеличению чувствительности к протеолитической деградации. Карбонильные производные образуются в результате металл-катализируемого окисления пролиновых, аргининовых, лизиновых, гистидиновых остатков аминокислот [19]. Ароматические аминокислоты реже входят в состав металлсвязывающей поверхности белков, поэтому они меньше подвергаются воздействию металл-катализируемого окисления [24]. Отсюда следует, что в ходе снижения температуры тела сусликов меняется либо спектр, либо структура присутствующих в плазме белков,

of metal-binding site of protein. This results in deamination of several aminoacid residues, their transformation in carbonyl derivatives, loss of protein functional activity and increase of sensitivity to proteolytic degradation. Carbonyl derivatives are formed in reaction of metal-catalyzed oxidation of proline, arginine, lysine and histidine residues of aminoacids [19]. Aromatic aminoacids are seldom included as a compound of metal-binding surface of proteins, therefore they are less affected by metal-catalyzed oxidation [24]. Therefore during decrease of ground squirrel body temperature either spectrum, or structure of plasma proteins are changed, that results in loss of binding sites for  $Fe^{2+}$  and EDTA- $Fe^{2+}$  complex, used for ROS generation.

FRP intensity is known to depend both on rate of ROS generation, and on activity of antioxidative system, involved of enzymatic and non-enzymatic components [25].

The results of study of various links of blood antioxidant protection were shown in Table 2. It was shown that depending on hypothermia depth the antioxidative activity of plasma, provided by hydrophilic antioxidants increased up to 131% comparing to the control. During hibernation in ground squirrel tissues the content of low-molecular antioxidants is also increased [16,21]. Herewith in ground squirrel blood plasma the content of ascorbic acid is significantly increased (in 2–4 times), that on authors' opinion provides protection for cells of endothelium, surrounding tissues and blood from oxidants ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^\bullet$ ), formed in endothelial cells during arousal and further sleep of animal [16]. Probably, under hypothermia an antioxidative protection is also connected with increasing of ascorbate content in blood plasma.

Among high-molecular-weight antioxidants the leading place in preserving of antioxidant status of

**Таблица 1.** Содержание белка и карбонильных групп в белках плазмы крови сусликов при гипотермии ( $M \pm m$ ,  $n = 4-5$ )

**Table 1.** Content of protein and carbonyl groups in proteins of ground squirrels' blood plasma under hypothermia ( $M \pm m$ ,  $n = 4-5$ )

Состояние животного Animal state	Белок, г/л Protein, g/l	Исходный уровень карбонильных групп в белках, нмоль/мг белка Initial level of carbonyl group in proteins, nmol/mg of protein	Прирост карбонильных групп в белках за 15 мин в присутствии $Fe^{2+}$ - $H_2O_2$ Formation of carbonyl groups in proteins for 15 min at the presence of $Fe^{2+}$ - $H_2O_2$
Контроль Control	97,5 ± 3,0	2,76 ± 0,19	48,8 ± 1,5
Гипотермия 20°C 20°C hypothermia	93,7 ± 3,3	2,29 ± 0,12	40,4 ± 2,0 p<0,02
Гипотермия 10°C 10°C hypothermia	92,4 ± 2,7	3,50 ± 0,22 p<0,05	40,8 ± 3,0 p<0,02

**Примечание:** p – различия достоверны по отношению к контролю.

**Notes:** p – differences are significant in respect to the control.

в результате чего уменьшается количество мест связывания для  $Fe^{2+}$  и комплекса ЭДТА- $Fe^{2+}$ , используемых для генерирования АФК.

Как известно, интенсивность СРП зависит не только от скорости генерации АФК, но и активности антиокислительной системы, представленной ферментативным и неферментативным звеньями [25].

Результаты исследования различных звеньев антиоксидантной защиты крови приведены в табл. 2. Видно, что независимо от глубины гипотермии антиокислительная активность плазмы, обеспеченная гидрофильными антиоксидантами, возрастает на 131% относительно контроля. При зимней спячке в тканях сусликов также увеличивается содержание низкомолекулярных антиоксидантов [16, 21]. При этом в плазме крови сусликов существенно (в 2–4 раза) повышается содержание аскорбиновой кислоты [16], что, как считают авторы, обеспечивает защиту эндотелиальных клеток, клеток окружающих тканей и крови от оксидантов ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ), образующихся в эндотелиальных клетках, в процессе пробуждения и последующего засыпания животного [16]. Возможно, что и при гипотермии антиоксидантная защита также связана с повышением содержания аскорбата в плазме крови.

Среди высокомолекулярных антиоксидантов ведущую роль в поддержании антиоксидантного статуса эритроцитов и плазмы крови принадлежит СОД, которая осуществляет антирадикальную защиту, а также каталазе, расщепляющей продукт дисмутации супероксидного анион-радикала –  $H_2O_2$  [17]. Исследование СОД эритроцитов показало, что ее активность зависит от температуры тела животного (табл. 2). Снижение температуры тела суслика до  $20^{\circ}C$  повышает активность фермента на 19,4% относительно контроля. Глубокая же гипотермия ( $10^{\circ}C$ ) приводит к снижению активности СОД на 17,8%. В отличие от СОД активность каталазы снижается по мере падения температуры тела животного. При температуре тела  $20^{\circ}C$  ее активность падает на 6,4%, а при  $10^{\circ}C$  – на 19,2% относительно контроля.

Активность антиоксидантных ферментов связана с интенсивностью СРП. Показано, что активация антиокислительных ферментов эритроцитов является первой реакцией организма на увеличение

**Таблица 2.** Активность компонентов антиоксидантной защиты эритроцитов и плазмы крови сусликов при искусственной гипотермии ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

**Table 2.** Activity of components of antioxidant protection of erythrocytes and ground squirrels' blood plasma under artificial hypothermia ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Состояние животного Animal state	АОА гидрофильных компонентов, % AOA of hydrophil components, %	СОД, усл. ед/мг Hb SOD, u/mg Hb	Каталаза, мкмоль $H_2O_2$ /мг Hb/мин Catalase, $\mu mol H_2O_2$ /mg Hb/min
Контроль Control	13,00 $\pm$ 0,70	2,58 $\pm$ 0,064	37,34 $\pm$ 0,24
Гипотермия $20^{\circ}C$ $20^{\circ}C$ hypothermia	30,03 $\pm$ 0,80 $p < 0,01$	3,08 $\pm$ 0,042 $p < 0,05$	34,94 $\pm$ 0,47 $p < 0,05$
Гипотермия $10^{\circ}C$ $10^{\circ}C$ hypothermia	30,06 $\pm$ 2,96 $p < 0,01$	2,12 $\pm$ 0,055 $p < 0,05$	30,18 $\pm$ 0,75 $p < 0,05$

**Примечание:**  $p$  – различия достоверны по отношению к контролю; АОА – антиоксидантная активность.

**Notes:**  $p$  – differences are significant in respect to the control; AOA – antioxidant activity.

erythrocytes and blood plasma belongs to SOD, implementing antiradical protection, as well as to catalase, deconjugating dismutation product of superoxide anion-radical,  $H_2O_2$  [17]. Study of erythrocyte SOD has shown that its activity depends on animal body temperature (Table 2). Reduction of ground squirrel's body temperature down to  $20^{\circ}C$  increases the enzyme activity to 19.4% in respect to the control. But deep hypothermia ( $10^{\circ}C$ ) results in SOD activity decrease down to 17.8%. In contrast to SOD, the catalase activity is reduced with the decrease of animal body temperature. At body temperature of  $20^{\circ}C$  its activity decreases down to 6.4%, and at  $10^{\circ}C$  – down to 19.2% in respect to control.

Activity of antioxidant enzymes is associated with FRP intensity. It has been shown, that activation of antioxidant enzymes of erythrocytes is the first response of organism to an increase of intensity of ROS formation [1]. SOD is unique antiradical enzyme. Therefore, one may suggest that increase of its activity under  $20^{\circ}C$  hypothermia reflects intensification, and a decrease does an inhibition of ROS formation processes. Data about glutathione, cysteine and other SH-containing substances significantly increase the activation of SOD are of interest [18].

Moreover, it is known that accumulation of ROS and toxic peroxidation products (peroxides of fatty acids, aldehydes, ketones and other products) leads to an inactivation of SOD and catalase [20]. Exposure of erythrocytes in the medium with  $H_2O_2$  inhibits SOD activity in concentration dependent mode [22]. Adding the reduced glutathione and unitiol to homogenates of hypothermal ( $20^{\circ}C$ ) rat brain significantly increased

интенсивности образования АФК [1]. СОД является единственным антирадикальным ферментом. Поэтому можно предположить, что повышение ее активности при гипотермии 20°C отражает интенсификацию, а понижение – ингибирование процессов образования АФК. Представляют интерес данные о том, что глутатион, цистеин и другие SH-содержащие соединения значительно повышают активность СОД [18].

Вместе с тем известно, что накопление АФК и токсических перекисных продуктов (перекисей жирных кислот, альдегидов, кетонов и прочих продуктов) вызывает подавление активности СОД и каталазы [20]. Экспозиция эритроцитов в среде с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> концентрационнозависимо инактивирует СОД [22]. Добавление восстановленного глутатиона и унитиола к гомогенатам мозга гипотермированных (20°C) крыс существенно повышало активность СОД [2]. Связано ли снижение активности СОД и каталазы эритроцитов при глубокой гипотермии с их окислительной модификацией или это есть результат понижающей регуляции ферментов пока сказать сложно.

### Выводы

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что у активных в летний период сусликов в ходе снижения температуры тела белки плазмы крови проявляют устойчивость к окислительной модификации. В их защите при гипотермии 20°C важную роль играют как гидрофильные антиоксиданты плазмы, так и антиоксидантные ферменты эритроцитов, при гипотермии 10°C – в основном гидрофильные антиоксиданты плазмы.

### Литература

1. *Верболович В.П., Подгорный Ю.К., Подгорная Л.М.* Показатели резистентности эритроцитов человека к окислительному стрессу // Вопросы мед. химии.– 1989.– Т. 35, №5. – С. 35–39.
2. *Гасангаджиева А.Г.* Антиоксидантная активность тканей адаптированных к холоду крыс при гипотермии и самоогревании: Дис. ... канд. биол. наук. – Махачкала, 1999.– 145 с.
3. *Дубинина Е.Е.* Активность и свойства супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека в онтогенезе // Укр. биохим. журн.– 1988.– Т. 66, №3.– С. 20–24.
4. *Дубинина Е.Е.* Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. Жизнь и смерть, созидание и разрушение.– СПб, 2006.– 400 с.
5. *Дубровская М.Д., Кличханов Н.К.* Индуцированное пробуждение сусликов от зимней спячки и интенсивность окислительной модификации плазменных белков // Рос. физиол. журн.– 2004.– Т. 90, №8.– С. 190.
6. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б.* Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологические аспекты.– М.: Наука. Интерпериодика, 2001.– 340 с.
7. *Калабухов Н.И.* Спячка млекопитающих.– М.: Наука, 1985.– 264 с.

SOD activity [2]. Until now it has been difficult to say if decrease of erythrocyte SOD and catalase activity under deep hypothermia is associated with their oxidative modification or whether it is a result of down-regulation of enzymes.

### Conclusions

Thus, our finding suggest, that in ground squirrels in active summer time the blood plasma proteins manifest the resistance to oxidative modification during a decrease in body temperature. An important role in their protection under 20°C hypothermia is played by both hydrophilic antioxidants of plasma, and antioxidative enzymes of erythrocytes, and under 10°C hypothermia these are mainly plasma antioxidants.

### References

1. *Verbolovich V.P., Podgornyy Yu.K., Podgornaya L.M.* Indices of resistance of human erythrocytes to oxidative process// *Voprosy Med. Khimii.*– 1989.– Vol. 35, N5.– P. 35–39.
2. *Gasangazhieva A.G.* Antioxidative activity of adapted to cold rats' tissues under hypothermia and spontaneous heating: Thesis of Doctor of Biol. Sci.– Makhachkala, 1999.– 145 p.
3. *Dubinina E.E.* Activity and properties of superoxide dismutase of human blood erythrocytes and plasma in ontogenesis// *Ukr. Biokhim. Zhurn.*– 1988.– Vol. 66, N3.– P. 20–24.
4. *Dubinina E.E.* Products of oxygen metabolism in functional activity of cells. Life and death, creation and destruction.– St. Petersburg, 2006.– 400 p.
5. *Dubrovskaya M.D., Klichkhanov N.K.* Induced waking of ground squirrels from hibernation and intensity of oxidative modification of plasma proteins// *Ros. Fiziol. Zhurnl.*– 2004.– Vol. 90, N8.– P. 190.
6. *Zenkov N.K., Lankin V.Z., Menshikova E.B.* Oxidative stress: Biochemical and pathophysiological aspects.– Moscow: Nauka, Interperiodika, 2001.– 340 p.
7. *Kalabukhov N.I.* Hibernation of mammals.– Moscow: Nauka, 1985.– 264 p.
8. *Korolyuk M.A., Ivanova L.N., Mayorova I.G., Tokarev V.E.* Method of catalase activity determining// *Lab. Delo.*– 1988.– N1.– P. 16–19.
9. *Lopatina N.I., Geronimus A.L., Tremestova E.P.* Determining of fetal hemoglobin in blood with PhEC// *Lab. Delo.*– 1976.– N6.– P. 328–331.
10. *Semenov V.L., Yarosh A.M.* Determining method of antioxidative activity of biological material // *Ukr. Biokhim. Zhurn.*– 1985.– Vol. 57, N3.– P. 50–52.
11. *Skoups P.* Methods of protein purification.– Moscow: Mir, 1985.– 358 p.
12. *Bailey S.R., Mitra S., Flavahan S., Flavahan N.A.* Reactive oxygen species from smooth muscle mitochondria initiate cold-induced constriction of cutaneous arteries // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*– 2005.– Vol. 289.– P. H243–H250.
13. *Buck C.L., Barnes B.M.* Effects of ambient temperature on metabolic rate, respiratory quotient, and torpor in an arctic hibernation // *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.*– 2000.– Vol. 279.– P. R255–R262.
14. *Carey H.V., Andrews M.T., Martin S.L.* Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature // *Physiol. Rev.*– 2003.– Vol. 83.– P. 1153–1181.
15. *Dalle-Donne I., Ross R., Guistarini D. et al.* Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress // *Clinica Chimica Acta.*– 2003.– Vol. 329.– P. 23–38.

8. *Королюк М.А., Иванова Л.Н., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* Метод определения активности каталазы // Лаб. дело.– 1988.– №1.– С. 16–19.
9. *Лопатина Н.И., Геронимус А.Л., Трестова Е.П.* Определение фетального гемоглобина в крови с помощью ФЭКа // Лаб. дело.– 1976.– №6.– С. 328–331.
10. *Семенов В.Л., Ярош А.М.* Метод определения антиокислительной активности биологического материала // Укр. биохим. журн.– 1985.– Т. 57, №3.– С.50–52.
11. *Скоулс Р.* Методы очистки белков.– М.: Мир, 1985.– 358 с.
12. *Bailey S.R., Mitra S., Flavahan S., Flavahan N.A.* Reactive oxygen species from smooth muscle mitochondria initiate cold-induced constriction of cutaneous arteries // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*– 2005.– Vol. 289.– P. H243–H250.
13. *Buck C.L., Barnes B.M.* Effects of ambient temperature on metabolic rate, respiratory quotient, and torpor in an arctic hibernation // *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.*– 2000.– Vol. 279.– P. R255–R262.
14. *Carey H.V., Andrews M.T., Martin S.L.* Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature // *Physiol. Rev.*– 2003.– Vol. 83.– P. 1153–1181.
15. *Dalle-Donne I., Ross R., Guistarini D. et al.* Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress // *Clinica Chimica Acta.*– 2003.– Vol. 329.– P. 23–38.
16. *Drew K.L., Osborne P.A., Frerichs K.U. et al.* Ascorbate and glutathione regulation in hibernating ground squirrels // *Brain Research.*– 1999.– Vol. 851.– P. 1–8.
17. *Halliwell B., Clement M.V., Long L.H.* Hydrogen peroxide in the human body // *FEBS Letters.*– 2000.– Vol. 486.– P. 10–13.
18. *Hoshino T., Ohta V., Joshigino J.* The effect of sulfhydryl compounds on the catalytic activity of Cu, Zn-superoxide dismutase purified from rat liver // *Experientia.*– 1985.– Vol. 41, N11.– P. 1416–1419.
19. *Levine R.L., Garland D., Oliver C.N. et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins // *Methods in Enzymol.*– 1990.– Vol. 186.– P. 464–478.
20. *Lievre V., Becuwe P., Bianchi A. et al.* Intracellular generation of free radicals and modifications of detoxifying enzymes in cultured neurons from the developing rat forebrain in response to transient hypoxia // *Neuroscience.*– 2001.– Vol. 105, N2.– P. 287–297.
21. *Okamoto I., Kayano T., Hanaya T. et al.* Up-regulation of an extracellular superoxide dismutase-like activity in hibernating hamsters subjected to oxidative stress in mid- to late arousal from torpor // *Comp. Biochem. Physiol.*– 2006.– Part C 144.– P. 47–56.
22. *Salo D.C., Pacifici R.E., Lin S.W., Giulivi C., Davies K.J.A.* Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation // *J. Biol. Chem.*– 1990.– Vol. 265, N20.– P. 11919–11927.
23. *Stadtman E.R.* Metal ion – catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences // *Free Radic. Biol. Med.*– 1990.– Vol. 9.– P. 315–325.
24. *Stadtman E.R.* Role of oxidized amino acids in protein breakdown and stability // *Methods Enzymol.*– 1995.– Vol. 258.– P. 379–393.
25. *Young I.S., Woodside J.V.* Antioxidants in health and disease // *J. Clin. Pathol.*– 2001.– Vol. 54.– P. 178–186.
26. *Zinchuk V.V., Dorokhina L.V., Maltsev A.N.* Prooxidant-antioxidant balance in rats under hypothermia combined with modified hemoglobin-oxygen affinity // *J. Thermal Biol.*– 2002.– Vol. 27.– P. 345–352.

*Accepted in 25.03.2009*

*Поступила 25.03.2009*