

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО  
ОБРАЗОВАНИЯ «ОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ П.А. СТОЛЫПИНА»

На правах рукописи



**ПОДОЛЬНИКОВА ЮЛИЯ АЛЕКСАНДРОВНА**

**ОСОБЕННОСТИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО СТАТУСА МОЛОКА  
КОРОВ УРБАНИЗИРОВАННОЙ ТЕРРИТОРИИ  
(НА ПРИМЕРЕ ОМСКОЙ ОБЛАСТИ)**

Специальность: 03.02.08 – экология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание степени кандидата биологических наук**

Научный руководитель:

Заслуженный работник высшей школы РФ

доктор медицинских наук, профессор

Высокогорский В.Е.

ОМСК - 2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. УРБАНИЗАЦИЯ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ.....	10
1.1 Влияние антропогенных факторов на свободнорадикальные процессы.....	10
1.2 Активные формы кислорода и свободнорадикальные процессы.....	20
1.3 Карбонильные производные белков при окислительном стрессе.....	30
1.3.1 Механизм воздействия АФК на белки и отдельные аминокислоты.....	32
1.3.2 Влияние окислительной деструкции на свойства ферментов.....	39
1.3.3 Биологическая роль окислительной деструкции белков.....	41
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
2.1 Объекты исследования.....	44
2.2. Методы исследования.....	45
2.2.1 Хемилюминесцентный метод анализа.....	45
2.2.2 Биохимические методы исследования.....	49
2.2.3 Статистический анализ полученных данных.....	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	56
3.1. Антиокислительная активность и интенсивность процессов перекиса- ции липидов молока крупного рогатого скота из хозяйств, расположенных на различных расстояниях от промышленного центра.....	56
3.1.1 Антиокислительная активность молока крупного рогатого скота.....	57
3.1.2. Интенсивность процессов липоперекиса- ции молока крупного рогатого скота.....	58
3.2. Интенсивность окислительной модификации белков молока крупного рога- го скота из хозяйств, расположенных на различных расстояниях от промышлен- ного центра.....	64
3.2.1 Уровень карбонилированных производных белков молока в разные	

сезоны года.....	64
3.2.2 Содержание доступных тиоловых групп в различных фракциях молока в зимний и летний сезоны года.....	76
3.2.3 Антиокислительная защита ферментативных компонентов молока в районах с различной степенью урбанизации.....	82
3.3 Сравнительная характеристика свободнорадикальных процессов молока коз зааненской и швейцарской пород и коров черно-пестрой породы.....	85
3.3.1 Антиокислительные свойства козьего и коровьего молока.....	86
3.3.2. Интенсивность процессов липопероксидации козьего и коровьего молока.....	89
3.3.3 Окислительная модификация белков и содержание доступных тиоловых групп в молоке коз и коров.....	94
ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	98
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	117

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

Ухудшение состояния окружающей среды является актуальной проблемой современности. Особенностью индустриально развитых городов является наличие крупных химических, промышленных и энергетических предприятий, а также интенсивное развитие транспортного хозяйства. Большие города являются мощными очагами деградации окружающей природной среды на расстоянии 40-50 км больше, чем их собственный радиус [52, 53, 101]. По данным Левина Ю.М [58] урбанизация ведет к появлению различных заболеваний: нарушений верхних дыхательных путей, поражений сердечно-сосудистой системы, кроветворных органов и многих других.

Однако изменение окружающей среды больших городов отражается как на состоянии здоровья населения, так и на состоянии флоры и фауны их пригородов. Эти воздействия на организм животных отражаются в снижении антиокислительной защиты организма, в развитии окислительного стресса. Активация свободно-радикального окисления может быть вызвана как воздействием различных физических факторов (радиация, ультрафиолетовое, электромагнитное излучение), так и химических факторов (металлы с переменной валентностью, ксенобиотики и т. д.) [85]. Нарушение оксидантного равновесия в тканях животных и людей вызывают такие химические соединения, как формальдегид [166, 247], бензол [177, 197], фенол [183, 205], диоксид серы [186, 200], оксид углерода [180], диоксид азота [112, 209] и взвешенные частицы [193, 195].

По мнению Чупахина Г.Н. [78] выбросы автотранспорта способны привести к понижению водорастворимых антиоксидантов в растениях и деревьях. Увеличение загрязнения пшеницы тяжелыми металлами приводит к повышению активности ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы, пероксидазы, каталазы) в листьях или корнях растений, а уменьшение концентрации загрязняющих веществ способствует снижению активности этих ферментов [66]. Литературные данные об изменении антиоксидантного статуса растений под воздействи-

ем абиотических факторов урбанизированных территорий позволяют предположить нарушения про- и антиоксидантного баланса в организме крупного рогатого скота, в различных тканях животных. Соответственно, нельзя исключить, что воздействие антропогенных факторов сказывается на составных частях и физико-химических свойствах молока.

Молоко является неотъемлемым компонентом питания всех групп населения. Пищевая и биологическая ценность данного продукта обеспечивается, в том числе и антиоксидантными свойствами молока и они являются важными показателями полноценного питания. Следовательно, исследование интенсивности свободнорадикального повреждения компонентов молока, полученного в районах с разной степенью воздействия факторов урбанизации, является актуальным как для оценки экологического состояния региона, так и для характеристики молочных продуктов с определенными качественными свойствами.

#### **Степень разработанности темы исследования**

В работах Лазаревой О.Н. по данным хемилюминесцентного анализа выявлена различная степень подверженности свободнорадикальному окислению различных молочнокислых продуктов [55].

Уровень компонентов антиоксидантной защиты молока и молочных продуктов установлен в работах Горбатовой К.К., Шидловской В.П., Высокогорского В.Е., Лазаревой О.Н., Донской Г.А. [23, 33, 38, 56, 98, 99]. Определены антиоксидантные свойства молочных продуктов в зависимости от технологического режима производства [25, 31, 38]. По данным Веселова П. В. и Игнатъевой Г.В. содержание продуктов пероксидации липидов молока крупного рогатого скота отличаются в разных подзонах лесостепи и зонах Омской области [24, 47]. Однако не установлена причина этих различий, отсутствуют сведения об особенностях показателей свободнорадикальных процессов молока южных (степных), северных (лесных) зон Омской области и пригородных территорий г. Омска, нет данных о состоянии окислительной модификации белков, антиокислительной активности молока урбанизированной территории.

В исследованиях Веселова П. [27] выявлено, что козье молоко в летний период обладает более низкими значениями хемилюминесценции по отношению к коровьему молоку. В то же время, важен вопрос об особенностях свободнорадикальных процессов в молоке коз разных пород, в частности швейцарской и зааненской пород, наиболее распространённых в Омской области.

**Цель исследования:**

Выявить особенности параметров свободнорадикального статуса молока крупного рогатого скота на урбанизированной территории.

**Задачи исследования:**

1. Изучить антиокислительную активность и интенсивность процессов перекисидации липидов молока коров из хозяйств, расположенных на различном расстоянии от промышленного центра.
2. Исследовать интенсивность окислительной модификации белков молока коров из хозяйств, расположенных на различном расстоянии от промышленного центра, в летний и зимний сезоны года.
3. Оценить действие урбанизации на активность ферментов антиоксидантной защиты и содержание сульфгидрильных групп молока коров из хозяйств, расположенных на различном расстоянии от промышленного центра, в летний и зимний сезоны года.
4. Сравнить интенсивность свободнорадикальных процессов молока разных подсемейств полорогих жвачных животных.

**Научная новизна работы**

Оригинальность настоящей работы состоит в том, что на основании исследований получены новые сведения о влиянии промышленного центра на показатели свободнорадикального окисления молока крупного рогатого скота, как в летний, так в и зимний сезоны года.

Молоко, полученное из хозяйств пригородной зоны, обладает меньшей антиокислительной активностью и более высокой активностью процессов липоперекисидации по отношению к молоку из северных и южных районов области, как в летний, так и зимний сезоны года. Результаты спонтанной и индуцированной

окислительной модификации белков молока указывают на более интенсивное карбонилирование белков молока из хозяйств пригорода Омска. Данный факт подтверждается снижением доступных сульфгидрильных групп различных фракций молока, и нарушение активности супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы молока из хозяйств пригорода, что указывает на негативное воздействие урбанизированного региона на интенсивность свободнорадикальных процессов, вызывая снижение антиокислительных свойств молока.

Обнаружено, что в лесостепной зоне области молоко, полученное от коров черно-пестрой породы, обладает более высокой антиокислительной активностью, чем молоко коз зааненской и швейцарской пород. Липиды молока коров черно-пестрой породы наиболее подвержены процессам липопероксидации. Нейтральные липиды в молоке коз зааненской породы в летний сезон менее подвержены окислительной деструкции. Однако, в зимний сезон скорость процессов липопероксидации молока коз данной породы максимальна по отношению к остальным исследуемым образцам молока. Фосфолипиды молока коз швейцарской породы обладают меньшей способностью подвергаться процессам перекисного окисления липидов. Установлено, что белки козьего молока зааненской породы в зимний сезон менее подвержены окислительной модификации.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные в работе данные расширяют имеющиеся представления о воздействии факторов урбанизации на физико-химические свойства молока. Выявлены особенности и уточнены механизмы активации свободнорадикального окисления основных компонентов молока, полученного из разноудаленных от промышленного центра хозяйств. Определение продуктов спонтанной и индуцируемой окислительной модификации белков молока позволяет оценить как фактическую интенсивность свободнорадикального окисления, так и максимальную возможную способность белковых молекул подвергаться окислительной модификации под действием антропогенных факторов. Определяющую роль в снижении антиокислительной активности молока играют нарушения активности антиради-

кальных ферментов и снижение содержания доступных тиоловых групп в различных фракциях молока.

Результаты исследования свидетельствуют о необходимости повышения антиоксидантных свойств рациона кормления животных из хозяйств, расположенных в непосредственной близости от промышленного центра. Показатели свободнорадикального окисления могут служить основой для разработки критериев воздействия антропогенных факторов на антиокислительную активность молока. Полученные данные могут быть использованы для оценки пищевой и биологической ценности молока и молочных продуктов.

### **Апробация работы**

Основные результаты диссертации доложены на VII Международной научно-практической конференции: «Технология и продукты здорового питания» (Саратов, 2013); на V Всероссийской научно-технической конференции с международным участием: «Россия молодая: передовые технологии в промышленность!» (Омск, 12-14 ноября 2013); на городской межвузовской научной конференции: «Свободнорадикальные повреждения тканей и продуктов питания»; на Международной научно-технической конференции молодых ученых, посвященной 95-летию ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П.А. Столыпина: «Современный взгляд на производство продуктов здорового питания» (Омск 2014); на Десятой юбилейной международной конференции: «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Пицунда, Абхазия, 2014).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликованы 9 научных работ из них 3 статьи в изданиях, включенных в перечень изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки и науки РФ для публикации диссертационных материалов.

### **Объем и структура диссертации**

Результаты изложены на 142 страницах, содержит 29 таблиц и 9 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, объектов и методов исследования, результатов исследования, заключения и библиографического списка,

включающего в себя 251 источников литературы, 102 из них на русском языке и 149 иностранных.

## **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. УРБАНИЗАЦИЯ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ**

Одной из современных проблем человечества является проблема ухудшения состояния окружающей среды. Особенностью современных развитых городов является наличие крупных химических, промышленных и энергетических предприятий, а также интенсивное развитие транспортного хозяйства. Большие города являются мощными очагами деградации окружающей природной среды на расстоянии 40-50 км большем, чем их собственный радиус [52, 53, 101]. По данным Левина Ю.М [58] урбанизация ведет к появлению у людей различных нарушений верхних дыхательных путей, кровеносных органов, увеличивается детская заболеваемость.

Однако изменение окружающей среды мегаполисов отражается как на состоянии здоровья населения, так и на состоянии флоры и фауны их пригородов. Эти воздействия на организм животных отражаются в снижении антиокислительной защиты организма и в развитии окислительного стресса. Так как при самых различных воздействиях на организм, стрессовых ситуациях, многочисленных разнообразных заболеваниях наблюдается активация перекисидации липидов и окислительной модификации белков [122, 149], то, вероятно, и ухудшение окружающей среды отразится на показателях свободнорадикального окисления.

### **1.1 Влияние антропогенных факторов на свободнорадикальные процессы**

В современных условиях рост числа больших городов с параллельным увеличением численности населения проживающего в них оказывает непосредственное влияние на абиотические и биотические факторы окружающей среды. Элементы живой природы испытывают повышенное антропогенное воздействие, главным образом связанное с развитием промышленного производства и транспортной нагрузкой. Предприятия выбрасывают в окружающую среду огромное количество токсичных веществ. Город можно представить как сложную систему в виде взаимодействующего сочетания двух subsystems – природной и антропоген-

ной, которая подразделяется на ряд подсистем: природная – на геосистему, гидросистему, аэросистему и биосистему; антропогенная – на производственную, градостроительную и инфраструктурную [52].

Автотранспорт поставляет в природную среду большие массы углеводородов: окиси углерода, бензапирена, углеводородов, альдегидов, сажи, а также соединений тяжелых металлов и других примесей. На территории Российской Федерации объем выбросов в окружающую среду от выхлопных газов автотранспорта составляет более 80% от общего количества антропогенного загрязнения [22].

В последнее время во внешней среде зарегистрировано 4 млн. токсичных веществ, ежегодно их количество возрастает на 6 тысяч [101].

Таким образом, урбанизированные территории на нашей планете выступают как основные очаги антропогенного загрязнения биосферы. Городские жители в 1,5-2 раза чаще, чем жители села страдают сердечно-сосудистыми, легочными, респираторными заболеваниями, а также болезнями центральной нервной системы [52].

Высказано предположение, что неблагоприятная экологическая обстановка способствует развитию рассеянного атеросклероза [74]. В работе [36] выявлено, что распространённость аллергических заболеваний среди детей значительно зависит от загрязнения городов вредными примесями (диоксид азота, пыль, оксид углерода, диоксид серы и другими веществами).

Сокращение продолжительности и снижение качества жизни больных сахарным диабетом вследствие ранней инвалидизации, является не только медицинской, но и социальной проблемой [37]. При диабете происходит повышение продукции активных форм кислорода [45, 69, 148]. В основе клинических проявлений заболевания и развития его осложнений лежит окислительный стресс [5]. При обследовании больных сахарным диабетом 1 типа в г. Улан-Удэ наблюдалось повышение пероксидации липидов по сравнению с больными, проживающими в г. Иркутске. Также у больных, проживающих в г. Улан-Удэ, выявлено повышение концентрации окисленного глутатиона по сравнению с г. Иркутск, который может способствовать активации факторов защиты. Таким образом, установлена разная

степень активации ПОЛ у больных сахарным диабетом I типа проживающих в вышеперечисленных городах. Сосредоточение экологически опасных промышленных производств, способствовали формированию в данных городах неблагоприятной экологической обстановке, которая, по мнению авторов, скорее всего, влияет на метаболические процессы у больных сахарным диабетом [6, 162].

Техногенное загрязнение окружающей среды сказывается на показателях иммунологической реактивности организма и, как следствие, на развитие туберкулеза [35]. При наблюдении больных с впервые выявленным туберкулезом, проживающих на территориях г. Иркутска, г. Ангарска, г. Шелехово, было установлено, что у больных, проживающих в условиях с высоким и очень высоким уровнем загрязнения атмосферы, наблюдалось повышение интенсивности процессов липопероксидации. Система «СРО - АОЗ» находилась в состоянии длительного напряжения [86].

Процессы свободнорадикального окисления и сопряженные с ними процессы оксидантного повреждения генома клеток играют одну из главных ролей в развитии предпатологических и патологических изменений у людей, взаимодействующих с вредными условиями окружающей среды. Пути сопряжения этих процессов могут значительно отличаться от тех, которые наблюдаются в клинике, на фоне многократного увеличения продуктов активной формы кислорода [97].

Под воздействием проникающей радиации активизируются свободнорадикальные процессы и образуются радиотоксины, способные вызывать вторичное повреждение генома. Существует прямое, непосредственное поглощение энергии, и не прямое воздействие радиации на биомолекулу. Непрямое воздействие ионизирующего излучения на биологическую структуру осуществляется свободными радикалами, способствующими образованию высокотоксичных метаболитов различной природы [63]. Возможна обратимая стадия лучевого повреждения молекул путем нейтрализации радикала действием различных антиоксидантов.

Выявлено окислительное воздействие ультрафиолета на стероиды, флавины, порфирины, хиноны, меланин и липидную часть мембран. Происходит чрез-

мерная активация ПОЛ и свободнорадикальная фрагментация липидных компонентов ядерной, лизосомальной, митохондриальной, плазматической мембран.

Электромагнитное излучение СВЧ-диапазона приводит также к интенсификации свободнорадикальных процессов, активации ПОЛ, и дисбалансу в функционировании антиокислительной системы организма [85].

Проникая в организм человека и животных, ксенобиотики подвергаются ряду биохимических превращений, результатом которых является их обезвреживание и выведение из организма. В процессе обезвреживания данных веществ наблюдается увеличение образования свободных радикалов и активных форм кислорода, что приводит к свободнорадикальному окислению белков, липидов и ДНК в организме [85].

При сравнительном изучении влияния окислительного стресса на распространенность гиперхолестеринемии в регионах Оренбургской области [20], характеризующихся различными условиями формирования антропогенной нагрузки, установлено, что в северной зоне наблюдается самый низкий уровень холестеринемии, наибольшая антиоксидантная активность липопротеинов высокой плотности, а также наиболее низкое поступление в организм прооксидантов. Восточная и центральная зона характеризуется наличием гиперхолестеринемии и дислипидотеинемии, составляющими биохимическую основу развития атеросклероза, увеличение интенсивности ПОЛ в липопротеинах очень низкой плотности и липопротеинов низкой плотности и высокий уровень прооксидантной нагрузки [4]. Полученные данные, по мнению авторов, указывают на важную роль загрязнения окружающей среды поллютантами, проявляющих прооксидантное действие в развитии дислипидотеинемии и гиперхолестеринемии.

К неорганическим компонентам, которые влияют на биотическую составляющую и здоровье человека относят тяжелые металлы. Одним из молекулярных механизмов токсического действия тяжелых металлов является генерация АФК путем аутоокисления. Как металлы переменной валентности, так и другие металлы могут привести к развитию окислительного стресса, проявляющегося в накоплении продуктов пероксидации липидов. Кадмий и некоторые другие металлы

могут временно истощать запасы глутатиона и ингибировать ферменты антиоксидантной защиты. Имеются данные об изменении показателей липидного обмена у жителей, проживающих на территориях с различным содержанием тяжелых металлов в среде обитания. Было выявлено, что показатели обмена липидов отличались у жителей, проживающих в г. Оренбурге и в г. Орске. При анализе содержания витаминов А и Е в данных городах, выявлено резкое снижение для населения города Оренбурга по сравнению с г. Орском. По мнению авторов, причиной витаминной недостаточности может являться сверхпродукция кислородных радикалов в условиях повышенной окислительной нагрузки или увеличение интенсивности липопероксидации [71].

Высокую заболеваемость среди детей Великого Устюга связывают с чрезвычайно высоким уровнем канцерогенного риска, причиной которого является наличие в воде и продуктах питания веществ с канцерогенными и эмбриотоксическими свойствами (хром, мышьяк, полихлорированные бифенилы), что подтверждается выраженными дистрофически-подобными изменениями при лазерной корреляционной спектроскопии слюны. Недостаток эссенциальных микроэлементов (селен, медь, цинк), в данном регионе, и избыток токсичных микроэлементов таких как свинец, марганец усугубляют эти процессы [87].

Из литературных данных известно [84], что между рассчитанными показателями, характеризующими канцерогенный и неканцерогенный эффекты, риск развития «окислительного стресса», наличием металлов переменной валентности находящихся в окружающей среде и опытным увеличением интенсивности липопероксидации, снижением антиоксидантной активности, повышения метгемоглобинообразования, существует прямая зависимость. Соответственно, является целесообразным, при оценке антропогенного воздействия на организм учитывать прооксидантные свойства.

Согласно имеющимся литературным данным, возможностью к нарушению оксидантного равновесия тканей животных и людей обладают такие химические соединения как формальдегид [166, 247], бензол [177, 197], фенол [183, 205], диоксид серы [186, 200], оксид углерода [180], диоксид азота [112, 209] и взвешен-

ные частицы [193, 195]. Фенол и бензол вызывают оксидантный стресс за счет энзиматического образования гидрохинонов, способных к редокс-циклическим реакциям. Данные реакции катализируются миелопероксидазой, преимущественно локализованной в костном мозге, это обуславливает лейкопению как один из основных токсических эффектов данных соединений. При ингаляционном воздействии взвешенных частиц верхними дыхательными путями прооксидантный эффект связан с активацией НАДН-оксидазы фагоцитирующих клеток. Механизмы прооксидантного действия диоксида серы, диоксида азота, оксида углерода выяснены недостаточно. Однако формальдегид обладает способностью к неэнзиматическому связыванию тиоловых групп белков и восстановленного глутатиона. Данный факт может использоваться для раннего обнаружения прооксидантного эффекта в тканях и крови. Выявлена достоверная линейная связь между интенсивностью люминолзависимой хемилюминесценции плазмы крови обследованных лиц и уровнем загрязнения воздуха формальдегидом [76].

Изменение соотношения прооксидантной и антиоксидантной систем касаются как стадии срочной и долговременной адаптации, так и состояния дезадаптации; это происходит когда эффективная функциональная система и системный структурный след в ней, характерный для долговременной адаптации не формируются и нарушения гомеостаза сохраняются. Стресс-реакция при этом из звена адаптации превращается в звено патогенеза заболевания, а пероксидация липидов, являющаяся неспецифическим механизмом патологии клеточных мембран усиливается при резистентном адаптогенезе и составляет основу стрессорного повреждения внутренних органов [9, 46, 63, 68]. Интенсивность СРО при воздействии ксенобиотиков и других агентов воспринимается как объективный неспецифический показатель общего состояния метаболических процессов, характеризующий изменения адаптивного состояния организма [43, 77, 93].

При сравнительном исследовании [46] свободнорадикальных процессов у учащихся младшего школьного возраста (8-9 лет) общеобразовательных учреждений г. Мелеуза и с. Зирган Мелеузовского района Республики Башкортостан выявлено в плазме крови городских школьников более интенсивное течение процес-

сов липопероксидации по отношению к сельским учащимся. Это проявляется в повышении диеновых конъюгатов у городских учащихся как в гептановой, так и изопропанольной фазах липидного экстракта, по отношению к сельским школьникам. Аналогичное повышение кетодиенов и сопряженных триенов наблюдаются в изопропанольной фазе липидного экстракта. Параллельно с этим, у детей, проживающих в городе, установлено повышение алифатических кетондинитрофенилгидразонов нейтрального характера по сравнению с сельскими учащимися. По мнению авторов, активация свободнорадикальных процессов у учащихся, проживающих в промышленном центре относительно сельских школьников объясняется повышенной антропогенной экологической нагрузкой, интенсивным воздействием ксенобиотиков на организм городских детей и дефицитом в рационе питания витаминов С, Е, биофлавоноидов, селена, цинка, меди, органических кислот, фосфолипидов и  $\omega$ -3 полиненасыщенных жирных кислот [46].

В литературе имеются данные о влиянии хронического химического загрязнения крупных промышленных центров на состояние репродуктивного здоровья подростков (14-17 лет) на примере г. Ангарска. Усиление процессов липопероксидации при компенсаторном увеличении активности СОД и исчерпанию антиоксидантной защиты путем снижения витаминов  $\alpha$ -токоферола, ретинола, приводит к метаболическим нарушениям, способным привести к эндокринной патологии. У девочек окислительный стресс иллюстрируется активацией системы антиоксидантной защиты проявляющийся в повышении активности ферментативного звена и увеличением концентрации  $\alpha$ -токоферола при достаточном содержании ретинола [92]. Данный факт свидетельствует об уязвимости организма подростков в условиях химического загрязнения окружающей среды.

Определение различными методами интенсивности свободнорадикальных процессов у детей, проживающих в г. Стерлитамаке с развитой химической и нефтехимической промышленностью и поселке Шах-тау, находящегося в 11 км за чертой города имеющего благоприятную экологическую обстановку свидетельствуют, что у жителей г. Стерлитамака в процессе длительного химического загрязнения повышены свободнорадикальные окислительные процессы. Более 1/3

практически здоровых детей, проживающих на территории промышленного центра находятся в состоянии хронического окислительного стресса, приводящего, генерации СР и снижению неспецифической резистентности, приводя тем самым к развитию функциональных отклонений в организме и патологических состояний [93].

Изучение уровня продуктов липопероксидации у детей младшего школьного возраста, проживающих в крупном промышленном городе (г. Нижнекамск), выявлена положительная корреляция между МДА –  $\text{NH}_3$ , МДА –  $\text{NO}_2$ , этаноламин –  $\text{CO}_2$ , этаноламин –  $\text{НСОН}$ , которая не зависит от климатических условий проживания. Следовательно, одной из причин повышения уровня пероксидации липидов у детей является загрязнение воздушного бассейна [8].

При изучении изменения показателей спонтанной и металлкаatalизированной ОМБ у женщин с различным трудовым стажем, работающих в условиях открытых разработок марганецсодержащих руд Жайремского рудника, определено увеличение металлкаatalизированного окисления плазмы крови, а именно альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера в 1,5 раза по отношению к контрольным величинам у лиц со стажем работы более 11 лет, а также увеличение показателей спонтанной окислительной деструкции белков у женщин со стажем более 10 лет. Соответственно, длительность воздействия производственных факторов на организм способствует развитию окислительного стресса [65].

С генерацией АФК связано длительное воздействие низкочастотной вибрации в интервале частот 8-16 Гц, что приводит к изменению активности ферментов супероксиддисмутазы и каталазы мышей. Вибрация с частотой 16 Гц вызывает рост соотношения СОД/КАТ в тканях печени, почек, селезенки и легких. Данный факт обусловлен понижением активности каталазы и может свидетельствовать, по мнению авторов, о развитии гипоксии. Вибрация с частотой 8, 24 Гц сопровождается снижением активности обоих ферментов печени. Данный характер изменения ферментативной деятельности наблюдается в тканях почек на частотах 8, 24, 32 Гц. Повышение каталазной активности при вибрации частотой 32 Гц в тканях печени при неизменной активности СОД может быть объяснено активацией пе-

роксисомальных реакций или других процессов, требующих повышения активности каталазы в клетке [40].

Эксперимент, проводимый на белых половозрелых крысах, которые в течение длительного времени получали компоненты медно-цинковых колчеданных руд, показал, что компоненты руды, поступая в костную ткань, способствуют развитию окислительного стресса, понижая уровень ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной защиты [2].

Воздействие абиотических факторов окружающей среды приводит к нарушению микробиоценоза желудочно-кишечного тракта, что, по мнению авторов, требует проведения направленной коррекции данной составляющей гомеостатической системы организма [75].

Для профилактики комбинированного действия токсичных металлов и ряда органических соединений (бензапирен, фенол и др.) разработан и испытан био-профилактический комплекс, состоящий из глутаминовой кислоты, пектинового энтеросорбента, поливитаминно-минерального препарата «Витрум-Кидс», кальция и витамина С, глицина, метионина и «Йодомарина» [10].

Факторы урбанизации вызывают активизацию свободнорадикальных процессов не только в организме человека и животных, но и в тканях растений.

Повышение уровня загрязнения атмосферного воздуха влияет на изменение активности окислительно-восстановительных ферментов у многих растений, приводит к увеличению активности пероксидазы и снижению активности каталазы. По мнению авторов, это может указывать на низкую адаптивную способность к неблагоприятным условиям среды. Используя полученные данные, появляется возможность регулировать высадку растений в промышленных центрах, обладающих более пластичным ферментативным набором, способным приспособливаться к негативно меняющимся условиям окружающей среды [83].

У древесных растений в условиях городской среды происходит повышение содержания аскорбиновой кислоты в листьях и таннинов в побегах к концу вегетативного периода до 4-10раз. Происходящую реакцию древесных растений в от-

вет на загрязнение среды можно использовать для оценки состояния насаждений и системы оперативного мониторинга среды [13].

Выбросы автотранспорта способны привести к снижению накопления фотосинтетических пигментов и их деструкции, снижению скорости накопления ассимиляторов и, как следствие, понижению водорастворимых антиоксидантов у ели обыкновенной, липы сердцевидной, одуванчика лекарственного и подорожника большого. Выявлена высокая отрицательная корреляционная связь между содержанием кадмия в растениях и их антиоксидантным статусом, а также положительная корреляция между накоплением антоцианов и содержанием кадмия. Накопление антоцианов в вакуолях клетки способно повысить устойчивость растений к действию кадмия [78].

Литературные данные свидетельствуют о способности пшеницы накапливать тяжелые металлы в различных органах растения. При отсутствии внешних морфологических нарушений в пшенице нового поколения на ранней стадии развития, под действием сточных вод, происходит увеличение доли мембранных форм ферментов СОД, ГПО, КАТ по отношению к цитозольным фракциям. Дальнейшее увеличение загрязнения пшеницы тяжелыми металлами приводит к увеличению активности данных ферментов в листьях или корнях растений в зависимости от состава загрязнителей. Уменьшение концентрации загрязняющих веществ способствует снижению активности супероксиддисмутазы, пероксидазы и каталазы [66].

Анализируя литературные данные можно заключить, что изучение интенсивности свободнорадикальных процессов в молоке может указывать на адаптацию или дезадаптацию организма к условиям обитания животного. Определение продуктов СРО молока позволит перейти к выявлению предрасположенности организма к возникновению заболеваний различной природы, обусловленных негативным воздействием окружающей среды. Результаты исследования в дальнейшем могут использоваться для разработки и внедрения мероприятий, направленных на снижение загрязнения окружающей среды, дадут возможность производителям молока и молочных продуктов использовать данную информацию для

определения качественных характеристик молока-сырья и получаемых молочных продуктов, относящихся к продуктам постоянного потребления населением.

## 1.2 Активные формы кислорода и свободнорадикальные процессы

Основной путь превращений кислорода в организме происходит под действием сложных ферментативных комплексов по 4-х электронному пути с образованием воды и сопровождается генерацией энергии. Другие механизмы превращения кислорода приводят к образованию реакционно-способных соединений. Эти соединения в физиологических концентрациях осуществляют передачу сигналов из внешней и внутренней среды организма через каскад метаболических реакций. Данные соединения обладают высокой реакционной способностью и их называют активные формы кислорода (АФК). К ним относят: супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ) пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), гидроксильный радикал ( $OH^{\cdot}$ ), синглетный кислород ( $^1O_2$ ), окисленные галогены ( $HOCl$ ,  $HOBr$ ,  $HOI$ ), оксид азота ( $NO^{\cdot}$ ), пероксильный ( $RO_2^{\cdot}$ ) и алкоксильный ( $RO^{\cdot}$ ) радикалы, пероксинитрит ( $ONOO^{\cdot}$ ).

В результате постепенного восстановления кислорода происходит образование АФК (рисунок 1.2.1) [64]:

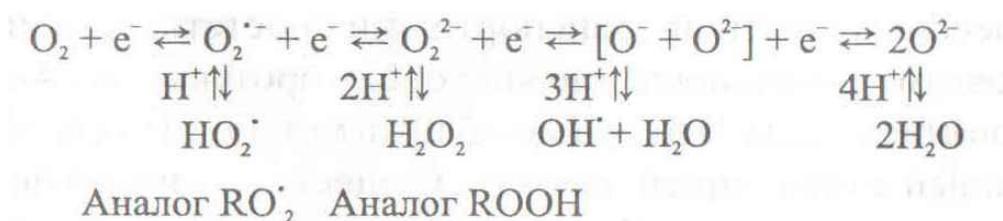


Рисунок 1.2.1 Пути образования активных форм кислорода

Образование супероксидного радикала происходит при одноэлектронном восстановлении кислорода, время жизни анион-радикала составляет  $10^{-6}$ с. Супероксидный анион ( $O_2^{\cdot-}$ ) в физиологических условиях является относительно слабым окислителем, но может выступать донором электронов, восстанавливая целый ряд соединений. Имея заряд, супероксидный радикал плохо проникает через

плазматическую мембрану, данный вариант возможен при взаимодействии с анионно-обменными белками, являющимися трансмембранными переносчиками, регулируя рН и объем клетки [107].

Протонированная форма супероксидного анион-радикала является сильным окислителем, время существования  $10^{-9}$  сек, может взаимодействовать с линолевой, линоленовой и арахидоновой кислотами [42]. В отличие от супероксидного радикала гидроксильный радикал не несет на себе заряд и способен легко проникать через клеточную мембрану [102, 150]. Пероксид водорода является окислителем средней силы, однако в норме, при отсутствии ионов металлов переменной валентности, ферментов, относительно стабилен, легко проходит через мембрану клетки и не выступает в качестве окислителя. Синглетный кислород образуется из триплетного состояния при изменении спина одного из электронов на  $\pi^*$ -орбитали, время существования  $10^{-6}$  сек. Механизм образования синглетного кислорода не достаточно изучен. Известно, что синглетный кислород может образовываться в процессе ферментативных реакций с участием супероксиддисмутазы, пероксидазы, каталазы, липооксигеназы [100, 163, 217]. Чаще всего окислению синглетным кислородом подвергаются тирозиновые остатки белков [182].

Оксид азота легко окисляется и восстанавливается, образуя  $\text{NO}^-$  и  $\text{NO}^+$ , липофильное соединение, не имеющее заряда, легко диффундирует в биологических средах. Окисленные галогены являются мощными токсинами очень реакционно-способными в химическом отношении, при взаимодействии с ними сначала окисляются тиоловые и тиоэфирные группы белков [144]. Генерация АФК может осуществляться ферментативным и неферментативным путем (Таблица 1.2.1):

## Источники активных форм кислорода [144]

Ферментативные	<i>Ксантинооксидаза</i> Гипоксантин + O <sub>2</sub> → Ксантин + O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> + H <sub>2</sub> O
	<i>НАДФН-оксидаза</i> НАДФН + O <sub>2</sub> → НАДФ <sup>+</sup> + O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
	<i>Аминооксидазы</i> R-CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub> → RO-CO + NH <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	<i>Пероксидазы</i> Образование гипогалоидов H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + X <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> → HOX + H <sub>2</sub> O
	<i>НАДН-оксидаза</i> E-Fe <sup>3+</sup> + ROOH → ROH + соединение I соединение I + НАДН → НАД + соединение II соединение II + НАДН → НАД + E-Fe <sup>3+</sup> НАД + O <sub>2</sub> → НАД <sup>+</sup> + O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
	<i>Альдегидоксидаза</i> R-CHO + O <sub>2</sub> → R-COOH + O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
	<i>Дигидрооротатдегидрогеназа</i> Дигидрооротат + НАД + O <sub>2</sub> → НАДН + O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> + оротовая кислота
	Fe <sup>2+</sup> + O <sub>2</sub> → Fe <sup>3+</sup> + O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
	Hb-Fe <sup>2+</sup> + O <sub>2</sub> → Hb-Fe <sup>3+</sup> + O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
	Катехоламины + O <sub>2</sub> → Меланин + O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
Неферментативные	<i>Флавины в восстановленной форме</i> Лейкофлавин + O <sub>2</sub> → Флавиновый семихинон + O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> Коэнзим Q-убихинол (hydroquinone) + O <sub>2</sub> → Коэнзим Q-убихинон (ubiquinone) + O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> Тетрагидроптерин + 2O <sub>2</sub> → Дигидроптерин + 2O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>

В норме АФК являются обычными метаболитами обменных процессов, выполняющими физиологическую роль в метаболизме клетки. Но активная генерация данных форм кислорода способна привести к окислительной деструкции белков, липидов, нуклеиновых кислот [104]. Осуществление контроля уровня содержания АФК происходит благодаря действию многокомпонентной АОС. Функционирование данной системы происходит за счет ферментативных и неферментативных компонентов АОС и направлено на снижение оксидантов благодаря разрушению и связыванию АФК, приводящее к обрыву цепей свободнорадикальных реакций.

К ферментативным компонентам АОС относят супероксиддисмутазу, глутатионпероксидазу, каталазу, фосфолипид-гидропероксид глутатионпероксидазу, селен-независимую глутатион-S-трансферазу, тиол-специфическую пероксидазу, сульфитоксидазу, тиоредоксинредуктазу и ряд других ферментов. Данные антиоксиданты характеризуются высокой специфичностью действия, и направлено против определенных АФК. Главными ферментативными антиоксидантами у

млекопитающих считаются Cu, Zn-СОД, Mn-СОД, глутатионпероксидаза и каталаза [125, 127]. Уровень внутриклеточных ферментов находится под генетическим контролем [69].

**Супероксиддисмутаза** - катализирует реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала в результате, образуя пероксид водорода, тем самым обрывая цепь свободнорадикальных процессов в самом начале. Существует несколько изоферментных форм СОД.

Cu, Zn-СОД состоит из двух одинаковых субъединиц, содержащих в области активного центра по одному атому меди и цинка. Медь участвует в дисмутации супероксидного анион-радикала, цинк в свою очередь способствует стабилизации белковой молекулы. Данный фермент содержится в ядре, цитоплазматическом матриксе, пероксисомах, межмембранном просвете митохондрий клеток эукариот [245, 198].

Mn-СОД содержит в своем составе четыре субъединицы, содержащие в области активного центра ион марганца. Действие фермента направлено на дисмутацию супероксидного анион-радикала, образующегося в процессе тканевого дыхания. Содержится в матриксе митохондрий и хлоропластов у эукариот [73].

Fe-СОД – димер, в области активного центра которого находится железо. Обнаруживается как у прокариот, так и у бактерий и растений.

**Глутатионпероксидаза** – является тетрамером, каждая субъединица содержит по атому селена, связанного с цистеиновыми остатками. В цитозоле локализовано около 70% этого фермента [234]. Из литературных данных известно пять изоферментных форм селенсодержащих ГПО. В молоке найден внеклеточный изофермент [203]. ГПО в качестве субстрата использует восстановленную форму глутатиона и способна расщеплять пероксид водорода и органические гидроперекисные соединения, такие как органические гидроперекиси ПНЖК [142].

**Каталаза** – является гемопротеином, катализирующим расщепление пероксида водорода. В организме человека и животных максимальная концентрация фермента обнаружена в эритроцитах, печени и почках, содержание каталазы в щитовидной железе, мозге и соединительной ткани низкое [1]. Каталазная актив-

ность при физиологических условиях примерно в 10000 раз выше пероксидазной активности. Однако в окисленном состоянии каталаза способна участвовать в окислении спиртов и альдегидов, проявляя пероксидантную активность [69]. Каталаза длительное время сохраняет свою каталитическую активность, практически не требуя энергии активации, способна присоединить четыре молекулы НАДФН, предохраняя тем самым себя от инактивации, и увеличивая каталитическую активность [179].

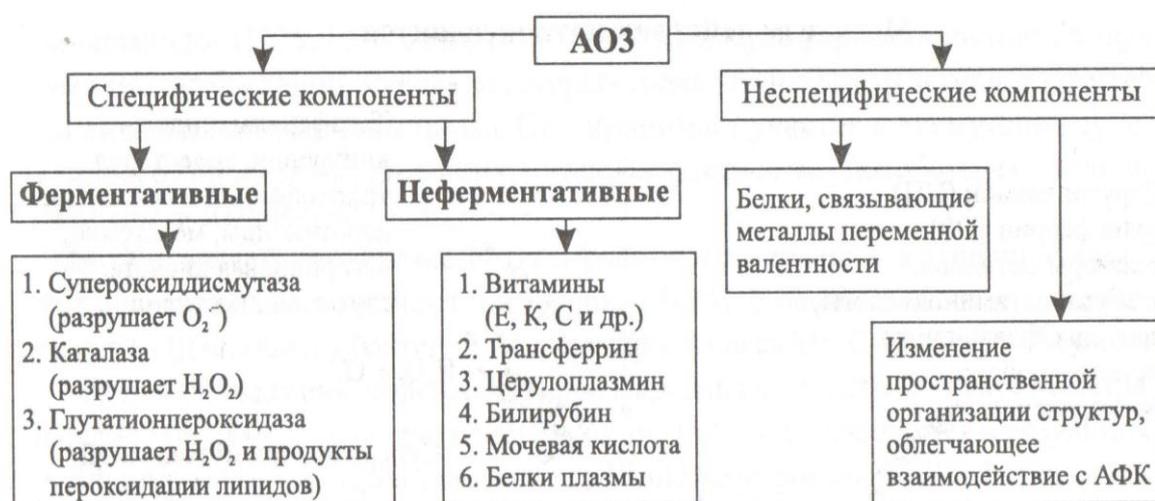


Рисунок 1.2.2 – Ферментативные и неферментативные компоненты антиоксидантной системы [42]

Эффект неферментативной АОЗ определяется действием группы высоко- и низкомолекулярных соединений, обеспечивающих защиту от прооксидантов за счет разной локализации в субклеточных компонентах клетки и во внеклеточной среде. К высокомолекулярным соединениям относят: церулоплазмин, трансферрин, альбумины плазмы, липопротеины высокой плотности, фибриноген, гепарин, цитохром с и др [42].

К неферментативной антиокислительной системе относятся: аскорбиновая кислота, токоферолы, мочевая кислота, билирубин, восстановленная форма глутатиона, эстрогены, флавоноиды, каратиноиды, некоторые аминокислоты [42]. На рисунке 1.2.3 представлен возможный механизм действия компонентов АОЗ.

### Механизм действия антиоксидантов



Рисунок 1.2.3 – Механизм действия основных компонентов антиоксидантной защиты [42]

Из литературных данных известно, что умеренная генерация АФК является необходимым элементом нормального метаболизма клеток всех типов [3, 17, 39, 88]. Классическим представлением защитной роли АФК является их детоксицирующая роль в неспецифическом иммунитете макрофагов и микросомальном окислении различных химических соединений. В процессах фагоцитоза [12, 29, 51, 145] происходит активация бактериями или лектинами фагоцитов, что приводит к активации ферментного комплекса плазматической мембраны НАДФ\*Н-

оксидазы с образованием супероксидного анион-радикала из кислорода [81]. В результате чего происходит стремительное повышение концентрации супероксидного анион-радикала и пероксида водорода в фагоцитирующих клетках с одновременным увеличением потребления кислорода более чем в 20 раз респираторный взрыв [54, 62]. Однако супероксидный анион-радикал обладает не высокой бактерицидной активностью [176], а является инициатором каскада реакций приводящих к образованию более активных форм метаболитов кислорода гидроксильного радикала, пероксинитрита и других соединений. Респираторный взрыв приводит к высвобождению АФК как в фагосомы, так и окружающую среду АФК разрушают бактерии и поврежденные, старые клетки [108].

Передача сигнала внутри клетки осуществляют вторые месенджеры, которыми также могут быть АФК и продукты их метаболизма. АФК индуцируют и подавляют экспрессию многих генов, участвуют в регуляции апоптоза и других процессах рисунок 1.2.4. [42].



Рисунок 1.2.4. Пути воздействия АФК на функциональную активность клеток организма.

Существуют доказательства, что малые концентрации АФК (мкмоль) способны стимулировать рост или усиливать ответ многих клеток млекопитающих, бактерий, дрожжей [42]. Регулируя обмен арахидоновой кислоты, перекись водорода оказывает воздействие на процессы агрегации тромбоцитов через образование тромбоксанов [32, 155], стимулирует секрецию окиси азота и простагландинов [174], регулирует секрецию гистамина и выброс его из тучных клеток [235], участвует в расслаблении гладкой мускулатуры [221], синтезе тиреоидных гормонов [242, 178].

Возможность выступать в качестве вторых мессенджеров у АФК опосредована лиганд-рецепторными взаимодействиями. Лигандами могут являться: инсулин, ангиотизин, паратиреоидный гормон, факторы роста, цитокины [160, 171]. Образование лиганд-рецепторных комплексов приводит к снижению активности отдельных звеньев АОЗ и генерации АФК, которые, в свою очередь, воздействуют на метаболизм клетки [42]. Цитокины стимулируют образование АФК из фибробластов, эпителиальных и эндотелиальных клеток [131, 152] трансформирующего фактора роста  $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1) [239], интерлейкина – 1 [199, 152].

Последнее время появились доказательства о том, что АФК способны действовать самостоятельно через рецептор тирозинкиназ [159]. Трансактивация EGF рецептора связана с фосфорилированием тирозина, осуществляется для многих сигнальных воздействий с участием оксидантов [240]. Воздействие на мезангиальные клетки и фибропласты пероксида водорода индуцирует фосфорилирование тирозина PDGF  $\beta$  рецептора [190].

Имеются данные о влиянии АФК на состояние  $\text{Ca}^{++}$  - каналов и насосов, проявляющееся в высвобождении  $\text{Ca}^{++}$  из внеклеточного пространства в цитоплазму клеток [129, 237]. Переход  $\text{Ca}^{++}$  из саркоплазматического ретикулума скелетной и сердечной мышц основано на непосредственном контакте между  $\text{Ca}^{++}$  - каналами и оксидантами [141, 236].

АФК участвуют в фосфорилировании белков при передаче сигнальной информации. Данный механизм может осуществляться через лиганд-рецепторное взаимодействие, приводящее к активации протеинкиназных реакций и фосфорилированием соответствующих белков или непосредственное воздействие оксидантов на ферменты, участвующие в фосфорилировании/дефосфорилировании [42].

Продукты ПОЛ могут выступать в качестве вторых посредников в процессах, связанных с получением сигнальных молекул в клетке: активация фосфолипазы ФлА<sub>2</sub>, влияние на структуру клеточных мембран и на состояние депо  $\text{Ca}^{++}$ , продукты липопероксидации способствуют поступлению  $\text{Ca}^{++}$  в цитозоль [42].

В физиологических концентрациях оксиданты путем активации сигнальных трансдукционных механизмов, вызывающих модуляцию генной экспрессии, способны модулировать функции белков и их структуру [42]. Оксиданты и антиоксиданты способны преобразовывать редокс-статус цистеиновых остатков факторов транскрипции, что значительно влияет на процесс их связывания с ДНК [213, 103].

Нарушение в организме соотношения прооксидантов и антиоксидантов приводит к окислительному (оксидантному) стрессу (ОС). Причиной развития окислительного стресса является активация свободнорадикальных процессов или дефицит антиоксидантов, нарушения активности ферментативного звена антиокислительной защиты. Соотношение про- и антиоксидантов изменяется в зависимости от состояния организма и воздействия факторов внешней среды. Активация СРО является составной частью общего синдрома адаптации к экстремальным факторам окружающей среды (рисунок. 1.2.5).



Рисунок 1.2.5 Пути изменения СРО и АОЗ в условиях окислительного стресса [42].

Развитие окислительного стресса приводит к повышению уровня цитозольного  $\text{Ca}^{++}$ , что вызывает активацию протеолитических ферментов. Тканевые протеазы воздействуют на окисленные белки, приводя к деградации поврежденных

макромолекул и, как следствие, усилению синтеза новых белков. Освобождение арахидоновой кислоты вызывает генерацию новых АФК, которые способны активировать протеинкиназы и другие биологически активные соединения. При кратковременном увеличении АФК возможно повышение ПОЛ, способствующее изменению проницаемости клеточных мембран, функций ионных каналов и насосов, рецепторов за счет изменения конформации белковых молекул [42].

Интенсификация процессов свободнорадикального окисления вызывает повышение процессов липопероксидации и окислительной деструкции белков и, как следствие, апоптоз и некроз тканей. Окислительный стресс является одним из звеньев при различных патологических состояниях: неврологических и психических поражениях ЦНС, сердечно-сосудистых, бронхолегочных и онкозаболеваниях, химических интоксикациях, приводя к значительным изменениям белков липидов, нуклеиновых кислот, углеводов [42]. Усиление свободнорадикальных процессов является общим для всех этих заболеваний на фоне снижения АОЗ организма. Свободнорадикальное окисление на фоне глубокого окислительного стресса приводит к изменению активности ферментов, путем инактивации в результате окислительной деструкции или окислительного нарушения кодирующих их нуклеиновых кислот и регуляции активности факторов транскрипции [248, 212].

Ферменты антиоксидантной защиты (СОД, ГПО, КАТ) способны сами подвергаться окислению АФК [175]. СОД утилизирует супероксид анион, тем самым предохраняя каталазу от инактивации, уменьшает вероятность образования гидроксильного радикала, который, в свою очередь, инициирует процессы липопероксидации. Однако продукты пероксидации липидов являются ингибиторами ГПО. Каталаза и ГПО защищают СОД от инактивации пероксидом водорода. Ферменты могут подвергаться структурным изменениям. Например, гликирование СОД [143]. Параллельно с этим возможно истощение ферментативных антиоксидантов, которые при обезвреживании СР переходят в неактивное состояние, а также преобразуются в радикальные продукты разной степени токсичности. Высокое содержание витамина С в сером и белом веществе мозга и спинномозговой жидкости в норме, в отсутствие металлов переменной валентности выполняет

роль антиоксиданта, но поражение мозга и повышение активной формы железа приводит к прооксидантному действию аскорбиновой кислоты (стимулирует гидроксильный радикал) [151].

Опытным путем установлено, что ОС при гипероксии способствует нарушению нейротрансмиттерной функции ЦНС [42]. ОС нервной ткани способен привести к увеличению ряда нейродегенеративных заболеваний [246, 249]. Установлено, стресс усиливает скорость гибели нейронов в областях, богатых глутаматергическими нейронами [233].

### **1.3 Карбонильные производные белков при окислительном стрессе**

В последние годы все больше внимания уделяется окислительной деструкции белков. Получено достаточно большое количество убедительных данных, подтверждающих тот факт, что при ряде патологических состояний, прежде всего повреждения белков, а не липидов и нуклеиновых кислот являются одними из ранних маркеров развития окислительного стресса [136].

В первых работах, посвящённых изучению роли окислительной модификации белков (ОМБ) в тканях, она рассматривалась при различных физиологических состояниях, с которыми в дальнейшем связаны процессы старения организма [124]. В последующих работах установлено, что карбонильные производные белков при окислительных повреждениях в тканях проявляются раньше и они более стабильны, так как могут находиться в клетках часами и даже днями, в то время как продукты пероксидации липидов подвергаются детоксикации через несколько минут [134, 147, 214, 219]. Окислительная модификация белков в живых организмах может привести не только к потере каталитической активности и последующей протеолитической деградации белков, но также используется для сигнализации, межклеточной коммуникации и получения информации из внешней среды [59].

Внутриклеточный уровень белков, подвергнутых окислительной деструкции, фактически отражает соотношение между прооксидантной и антиоксидант-

ной системами: скоростью окисления белков и скоростью деградации окисленных белков [42].

Одними из основных ловушек АФК, продуцируемых как в процессе нормальной клеточной жизнедеятельности, так и при воздействии на организм ионизирующего излучения, вредных химических веществ в силу своего строения являются белки. Выяснено, что белки могут улавливать от 50% до 75% свободных радикалов [138, 215, 216]. Под действием АФК происходит нарушение нативной конформации белков с образованием крупных белковых агрегатов или фрагментация белковой молекулы. Влияние гидроксильного радикала наиболее часто вызывает агрегацию белков, а в сочетании с супероксидным радикалом происходит фрагментация молекулы с образованием низкомолекулярных фрагментов [123].

Одним из проявлений окислительной деструкции белков является повышение карбонильных производных белков. Увеличение содержания карбонильных производных является одним из ранних и значимых маркеров окислительного повреждения. Наиболее распространенный метод определения продуктов окисления белков основан на образовании дополнительных карбонильных групп в результате окислительной модификации белков с применением динитрофенилгидрозина [126, 42]. Карбонильные производные белков являются стабильными соединениями, формируемые при участии аминокислотных остатков пролина, лизина, аргинина, треонина с образованием продуктов Михаэля, а также при участии аминокислотных остатков гистидина, лизина и цистеина с продуктами перекисного окисления липидов [146].

Окислительная деструкция белков может происходить под действием продуктов окисления липидов, таких как малоновый диальдегид (МДА) и 4-гидрокси-2-ноненаль (ГНЕ). Эффекты МДА обусловлены наличием двух альдегидных групп в его структуре, позволяющих ему взаимодействовать с аминокислотными группами белков и сшивать их, при этом образуются шиффовы основания. Взаимодействие ГНЕ со свободными аминокислотами и их остатками в составе белков получило название присоединение Михаэля. В ходе реакции ГНЕ с гистидином образуется циклический продукт, являющийся достаточно стабильным и выявля-

ется в составе белков, подвергнутых окислительному стрессу. При взаимодействии с лизином и цистеином также образуются циклические продукты с возможностью дальнейшего превращения до карбонильных групп [158]. Инкубация ферментов с ГНЕ инактивирует их. Обработка фермента 2мМ раствором ГНЕ при 36°C в течение 12ч приводила к модификации 74% - цистеиновых, 50% - гистидиновых и 16% - лизиновых остатков. Субстрат фермента, глицеральдегид-3 фосфат, не влиял на изменение количества остатков цистеина и гистидина, но защищал от модификации один гистидиновый остаток на мономер. Кофермент  $\text{NAD}^+$  не влиял на модификацию лизиновых остатков, но защищал два остатка гистидина и один остаток цистеина [244].

### **1.3.1 Механизм воздействия АФК на белки и отдельные аминокислоты**

При взаимодействии сложных белков с АФК необходимо различать химическую модификацию полипептидной цепи и небелкового компонента. Изменение структуры белковой части может идти по двум направлениям: 1- по месту пептидной связи; 2- окисление боковых частей аминокислотных остатков. Модификация небелковой части больше всего исследована для белков, в состав которых входит негемовое железо, являющееся составной частью FeS – кластеров. При их окислении, ионы металла диссоциируют от белка и происходит потеря его ферментативной активности. К таким ферментам относят: сукцинатдегидрогеназу, фумаразу, изоцитратдегидрогеназу, малатдегидрогеназу. [167, 137, 116].

#### **Механизмы разрыва пептидной связи**

Предполагаемые пути окисления компонентов участвующих в образовании пептидной связи показаны на рисунке 1.3.1.1. Последовательность реакции начинается с извлечения гидроксил-радикалом водородного атома от  $\alpha$ -атома углерода любого из аминокислотных остатков, что приводит к образованию производного алкильного радикала и воды (а). Далее происходит присоединение к алкильному радикалу молекулы кислорода образуя алкилпероксильный радикал (б), реагирующий с протонированным супероксид-анионом ( $\text{HO}_2^\cdot$ ) или  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{H}^+$  (в). Полученный алкилпероксид в дальнейшем может прореагировать либо  $\text{HO}_2^\cdot$  или  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{H}^+$

превращаясь в алкоксирадикал [220]. На данной стадии может произойти или разрыв пептидной связи, или еще одно окисление с участием  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{H}^+$ , либо протонированного пероксида до гидроксилпроизводного пептида (г). Существует вероятность того, что алкил-, пероксил-, и алкоксильные радикалы пептидов могут присоединять атомы водорода из аминокислотных остатков, образуя, таким образом новые радикалы, способные вступать в аналогичные превращения. Два алкильных производных полипептида при недостатке или отсутствии  $\text{O}_2$  могут взаимодействовать между собой, образуя внутри- и/или межпептидные сшивки [59].

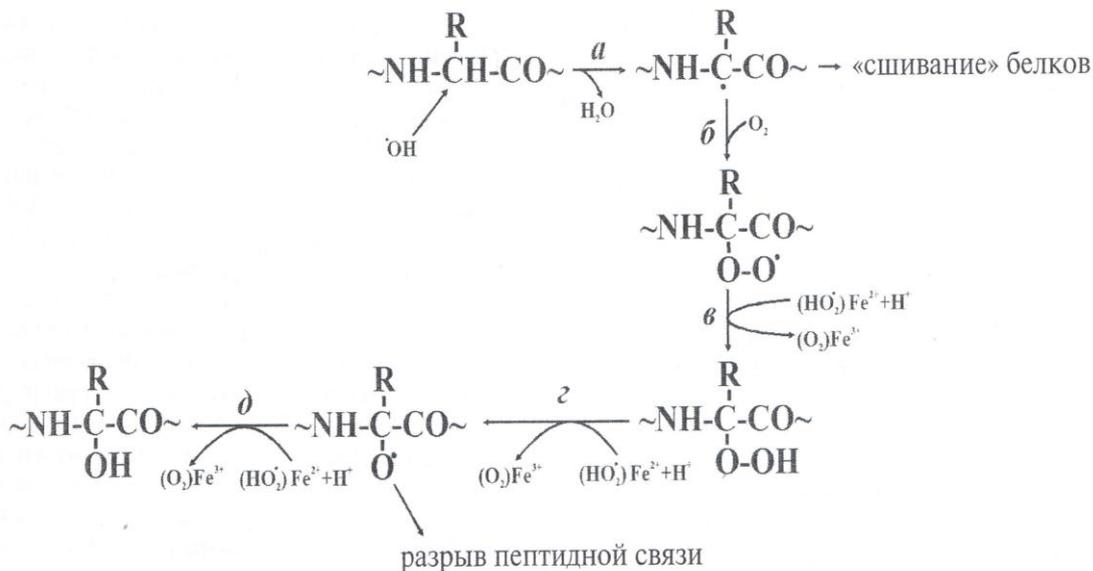


Рисунок 1.3.1.1 Возможные пути окисления пептидной цепи. Цитируется по источнику [223, 224, 228, 241].

По литературным данным описано, по меньшей мере, четыре механизма разрыва пептидной связи, осуществляемого при участии активных форм кислорода: расщепление алкоксильных производных пептидов через  $\alpha$ -амидный путь (а), фрагментация алкоксильных производных пептидов через диамидный путь (б), окисление боковых частей аспарагиновых и глутаминовых остатков (в) и окисление боковой части остатка пролина (г) [113, 228]. По пути (а) (рисунок 1.3.1.2) образуются пептидные фрагменты в области N-терминального конца белка имеющего амидную группировку при C-терминальном конце, а N-терминальный конец пептида со стороны C-конца N- $\alpha$ -кетоацилпроизводного. По механизму (б) происходит образование из N-конца диамида и  $\alpha$ -кетоацильного производного [59].

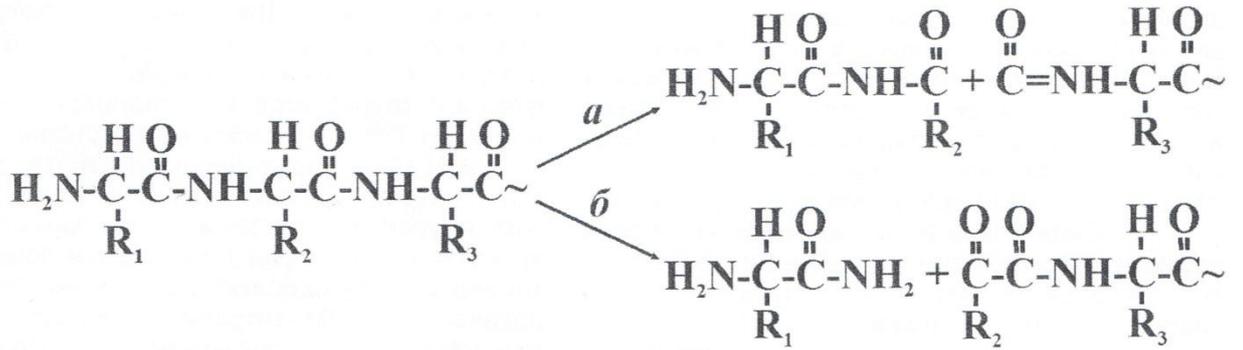


Рисунок 1.3.1.2 Возможные механизмы разрыва пептидной связи окисленных белков. Цитируется по источнику [110].

Существует возможность окисления моноаминодикарбоновых кислот, входящих в состав полипептида с разрывом пептидной связи. Определено, что окисление пролиновых остатков приводит к образованию 2-пирролидиновых производных с дальнейшим превращением в 4-аминобутиловую кислоту, тем самым, приводя к фрагментации белка (рисунок 1.3.1.3) [224]. Возможно к 2-пирролидону могут быть идентифицированы цис- и транс-4-гидроксипролин, пироглутаминовая кислота,  $\gamma$ -глутамилсемиальдегид [164]. Вполне возможно, что образование глутамила из пироглутаминовых остатков является главным путем, ведущим к фрагментации окисленных белков [250]. Глутаминовая кислота, образованная из пироглутаминового осадка, может рассматриваться как основной продукт окисления пролина [164].

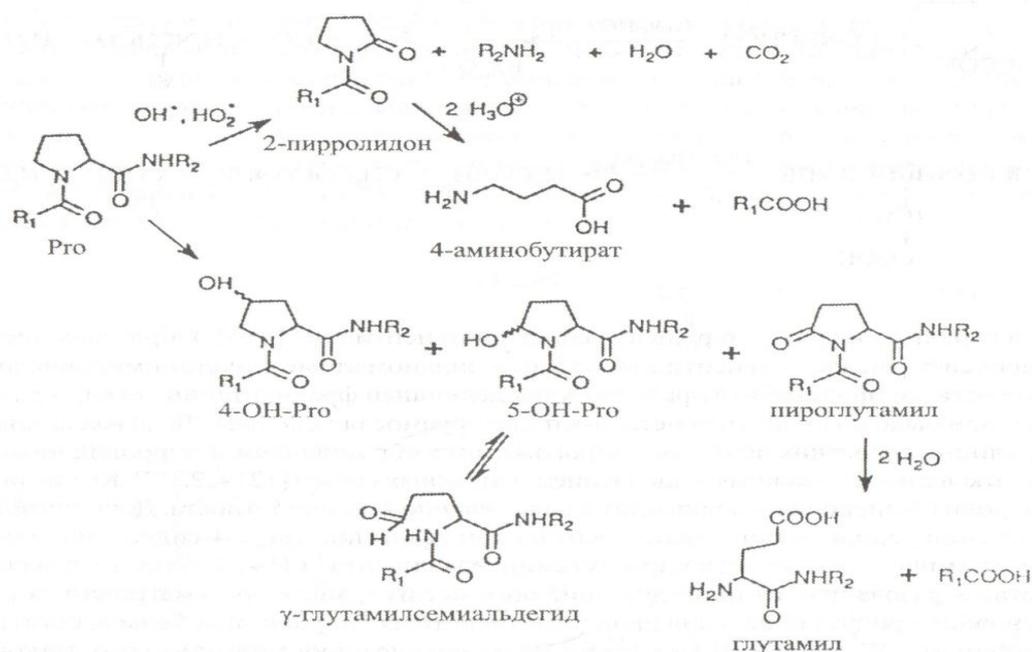


Рисунок 1.3.1.3 Предполагаемый путь разрыва полипептидной цепи в месте локализации пролиновых остатков белка. Цитируется по источнику [232].

Возможен механизм разрыва пептидной связи в месте локализации остатка аспарагиновой и глутаминовой кислоты путем отщепления гидроксильным радикалом атома водорода от  $\gamma$ -атома углерода глутаминового или аспарагинового остатка белка. Далее происходит ряд превращений, аналогичных приведенным на рисунке 1.3.1.1.

Ионы железа, при различных патологических состояниях, высвобождающиеся из клеточных депо, могут выступать донорами электронов и интенсифицировать свободнорадикальные процессы.

### Особенности окисления отдельных аминокислотных остатков белков

Подвергаться окислению гидроксильными радикалами могут практически все аминокислотные остатки полипептидов. Однако не во всех случаях определена природа образуемых при этом продуктов. В таблице 1.3.1.1 приведены данные по окислению АФК аминокислотных остатков в составе белков. Наиболее чувствительны к окислению остатки ароматических аминокислот с развитой системой двойных связей. В процессе окисления тирозина и фенилаланина образуются

соединения: 3,4-дигидроксипроизводные, моно- и дигидроскипроизводные, которые в дальнейшем могут подвергаться окислению и восстановлению, тем самым генерируя АФК. Образуемые при окислении тирозина радикалы могут взаимодействовать между собой с превращением в дитирозины, это может приводить к внутри- и межмолекулярным сшивкам пептидов. Следовательно, наличие 2,2'-бифенильных производных считается надежным маркером повреждения белков индуцированных АФК [210]. При воздействии активными формами азота и хлора на тирозиновые остатки белка происходит образование нитро- и хлорпроизводных соответственно. Триптофан высокочувствителен к процессу радиолиза белков, который приводит к образованию формилкинуруенилов и 3-гидроксикинуруенилов. Под воздействием  $\text{OH}^\bullet$  индольное кольцо триптофана подвергается гидроксилированию в 2, 4, 5, 6 и 7 положениях с последующим разрывом пятичленной структуры и образованием конечных продуктов нерадикальной природы [106, 161]. При УФ-излучении, в присутствии озона,  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{H}^+$ , и пероксинитрита возможно превращение триптофана в кинуруенин и N-формилкинуруенин. Окисление белков митохондрий, сердечной мышцы в первую очередь связано с окислением триптофановых остатков до N-формилкинуруенина [188]. Особенно чувствительны к активным АФК, генерированным в системах, в состав которых входят катионы переменной валентности, остатки гистидина, лизина и аргинина, так как названные остатки аминокислот чаще всего находятся в местах связывания ионов металлов с переменной валентностью [113, 228]. Окисление лизина, гистидина, пролина ведет к образованию альдегидных и кетонных производных, а глутаминовой и аспарагиновой кислот к разрыву полипептидной цепи с образованием пирувильной группы из N-концевой аминокислоты. В присутствии  $\text{OH}^\bullet$  лейцин в аэробных условиях способен окисляться с получением нестабильных 4-,5-гидропероксилейцинов, 5-гидроксилейцина [222]. Под воздействием  $\gamma$ -радиации на лейцин-содержащие пептиды остаток лейцина превращается в 3-, 4- и 5-моногидроксилейцин производные [231].

## Продукты окисления аминокислотных остатков белков

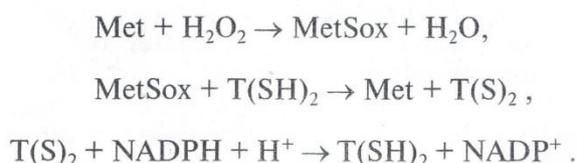
Остаток	Продукты
Фенилаланин	2,3-дигидрокси-фенилаланин, 2-, 3-, и 4-гидроксифенилаланин
Тирозин	3,4-дигидроксифенилаланин, дитирозин (2,2 <sup>1</sup> - бифенил-производные), 3- нитротирозин, хлортирозин
Триптофан	Кинуренин, 3-гидроксикинуренин, гидропирилиндол, оксииндол, N-формил-L-кинуренин, 3-гидоксилкинуренин
Гистидин	2-оксогистидин, 4-ОН-глутамат, аспарагин, аспарат
Лизин	2-аминоадипиновый полуальдегид
Аргинин	Глутаминовый полуальдегид
Пролин	Глутаминовый полуальдегид
Треонин	2-амино-3-кетобутиловая кислота
Глутаминовая кислота	Пировиноградная кислота
Аспарагиновая кислота	Пировиноградная кислота
Лейцин	4-,5-гидропероксидлейцины, 5-гидроксилейцин, 3-, 4-, 5- моногидроксилейцин производные
Валин	3-, 4-гидропероксидвалины, 3-,4-гидроксивалины, 4-гидроксивалин
Цистеин	Нитрозотиолы, тиоловые радикалы, цистин, конъюгаты с глутатионом
Метионин	Метионинсульфоксид, метионинсульфон

Цитируется: модифицировано из [42, 223, 224]

Валин в присутствии гидроксильного радикала может дать нестабильные 3-, 4- гидропероксивалины и 3-, 4-гидроксивалины. В зависимости от условий реакции образуются и другие продукты, например, 4-гидроксивалин. [114, 135].

В белках аминокислотные остатки метионина и цистеина легко подвергаются окислению всеми активными формами кислорода, азота, серы и хлора. При окислении цистеинового остатка происходит цепь последовательных реакций, образуются производные сульфеновой, сульффиновой и сульфоновой кислот. Окисленные формы данных кислот под действием специальных ферментных систем могут быть восстановлены и могут функционировать в качестве антиоксидантов клетки. Сульфеновые производные могут подвергаться дальнейшему окислению до сульффиновых либо образовывать смешанные эфиры с глутатионом или цистеином. Данный факт способен препятствовать дальнейшему необратимому окислению серы. Сульфеновые производные могут восстанавливаться до цистеина ферментативным (под действием тиолтрансферазы-глутаредоксина) или неферментативным (при обработке дитиотрейтолом) путем.

Также могут подвергаться обратимому окислению остатки метионина с образованием метионинсульфоксида (MetSox) и метионинсульфона. Метионинсульфоксид способен под действием фермента метионинсульфоксидредуктазы восстанавливаться до метионина [168]:



#### Рисунок 1.3.1.4 Восстановление метионинсульфоксида до метионина

Аминокислотные остатки метионина могут окисляться не только  $\text{H}_2\text{O}_2$ , но и другими окислителями. Реакция восстановления тиоредоксина катализируется тиоредоксинредуктазой. Окислительная деструкция метиониновых остатков способствует повышению гидрофобности пептида, тем самым делая их чувствительнее к фрагментации под действием мультикаталитической протеазы [229].

### 1.3.2 Влияние окислительной деструкции на свойства ферментов

Ферменты подвергаются воздействию АФК, которые вызывают изменение их регуляторных свойств или инактивацию. Степень деструкции фермента зависит от природы обоих участников реакции, наличия ингибиторов и активаторов. Более 20 лет докторами Э. Стадтманом и Р. Левиным и их коллегами (Национальные институты здоровья, США) изучали химические принципы и возможные функциональные последствия взаимодействия ферментов с АФК на примере глутаминсинтетазы (ГС), полученной из *Escherichia coli* [230]. Это является хорошей платформой для систематического анализа влияния на фермент. Установлено, что внутриклеточная деградация ГС происходит в две стадии [130, 165, 169, 226, 243]: на первой стадии происходит окислительная деструкция, которая приводит к инактивации фермента; на второй стадии, фермент гидролизуется специфической для него протеазой [207]. Окисление осуществлялось  $H_2O_2$ , аскорбатом и дитиотрейтолом в присутствии ионов железа [169]. Скорость окисления ГС зависит от доступности субстрата и степени аденилирования фермента, это позволяет точно контролировать количество АФК. Опытным путем установлено, что достаточно окисления лишь одного из шестнадцати остатков гистидина в мономере для инактивации ГС. Содержание остатков цистеина, метионина, фенилаланина, триптофана и тирозина не изменялось. Было выяснено, что именно катионсвязывающий участок в полипептиде является мишенью для атаки свободных радикалов [165]. Свободнорадикальное окисление, происходящее в присутствии определенной концентрации ионов металлов переменной валентностью, приводит к образованию пептидных фрагментов с четко воспроизводимой структурой. При определении аминокислотной последовательности полученных фрагментов была выявлена первичная структура Met-His-Cys-His-Met, где подвергся окислению именно гистидин [130]. В процессе окисления изменяются физико-химические свойства фермента, происходит повышение гидрофобности белка/фермента, который в дальнейшем может подвергаться протеолитической деградации [165]. Воздействие на глутаминсинтетазу свободных радикалов приводит также к потере остатков гистидина, изменению активного центра, изоэлектрической точки, силы меж-

субъединичных взаимодействий и снижению термостабильности [132, 204]. Установлено, что в процессе окисления His269 превращается в аспарагин, а Arg344 – в  $\gamma$ -глутамилполуальдегид [121]. Инактивация ГС может осуществляться обработкой пероксинитритом, вызывающим нитрование остатков тирозина, и превращением метионина в метионинсульфоксид [194]. Нитрование при воздействии Fe-ЭДТА носит более случайный характер, деструкция пяти-шести остатков тирозина на субъединицу необходимо для имитации превращения аденилированной формы ГС в аделированную. Обработка ГС, полученной из *Escherichia coli*, алкилпероксидными радикалами и алкилпероксидами приводит к потере остатков метионина, тирозина, триптофана, гистидина и, как следствие, полной инактивации фермента, фрагментации полипептида, а также образованию высокомолекулярных агрегатов [173]. Под действием АФК могут быть инактивированы лактатдегидрогеназа, каталаза, щелочная фосфатаза, глутаминдегидрогеназа и ряд других ферментов [184, 225]. Значительная часть ферментов выполняет свои каталитические функции благодаря наличию в их составе небелковых компонентов. Чувствительная к действию  $O_2^-$  фумараза, в условиях окислительного стресса заменяет конститутивную форму на молекулярную, которая не содержит Fe,S-кластера [156]. Бубник В. и его коллеги выявили, что дегидрогеназы 2-оксикислот также чувствительны к воздействию свободных радикалов [117, 118].

Особое внимание следует уделить окислительной деструкции митохондриальных ферментов, например:  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназам и глутаматдегидрогеназам. В состав  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы входит необходимый для проявления ферментативной активности остаток липоевой кислоты. Опытным путем установлено, что ГНЕ и  $H_2O_2$  воздействуя на липоат инактивировали данный фермент [117, 118, 185]. Действие свободных радикалов может привести к инактивации дыхательных комплексов I и IV электронно-транспортной цепи [172, 185].

### **1.3.3 Биологическая роль окислительной деструкции белков**

Свободнорадикальная модификация, постоянно протекающая в организме, играет важную роль в обмене белков. Накопление карбонилированных производ-

ных рассматривается как один из факторов регуляции синтеза и распада белков, активации мультикаталитических протеаз, избирательно разрушающих окисленные белки. Данный факт можно рассматривать как проявление вторичной АОЗ в тканях [191, 201, 202, 218]. В исследованиях [153, 211] было доказано, что нейтральные протеазы обладают высокой чувствительностью по отношению к белкам, подвергнутым окислительной деструкции, и окисленные формы очищенных белков деградируют быстрее, чем их нативные аналоги под действием различных протеаз. В ряде исследований выявлено, что окислительная деструкция приводит к увеличению гидрофобности белков и повышению скорости их деградации [139, 192]. Из вышеперечисленного, можно сделать вывод о том, что деградация белков у эукариот и прокариот связана с их денатурацией, увеличением гидрофобных радикалов у аминокислотных остатков и повышенной протеолитической чувствительностью белков. На начальных стадиях свободнорадикальной модификации происходит увеличение гидрофобности и денатурации. На следующем этапе происходит дальнейшее возрастание гидрофобности и денатурации с параллельным увеличением протеолитической чувствительности окисленных белков. При средней степени окислительной деструкции белков усиление их деградации является нормальной функцией внутриклеточной протеолитической системы. В то же время, наоборот, неспособность к деградации продуктов свободнорадикальной модификации при их интенсивной деструкции связана с различными патологическими состояниями. В анаэробных условиях при глубокой степени окисления может снижаться протеолитическая чувствительность окисленных белков, что происходит по причине образования дополнительных сшивок и выраженной агрегации. В присутствии высоких концентраций кислорода фрагментация происходит быстрее, чем образование ковалентных сшивок [128, 157, 201].

Существует другая точка зрения, по которой изменение вторичной структуры белка приводит к повышению протеолитической чувствительности. Определена корреляционная зависимость между конформационными изменениями, вызванными окислением очищенной РНКазы А, ковалентными модификациями

аминокислотных остатков и протеолитической чувствительностью за счет 20S протеасомы [154]. Протеасомная система является главной внутриклеточной деградирующей системой окисленных белков. Мультикаталитический протеасомный комплекс, представленный АТФ независимой 19-20S и АТФ-стимулируемой-26S формами в клетках млекопитающих, который при состоянии ОС узнает и селективно деградирует окисленные поврежденные субстраты [140]. Таким образом, селективный протеолиз может предотвратить накопление в клетке белков, подвергшихся свободнорадикальной модификации. Нарушение сбалансированности окислительной деструкции белков и их протеолиза может привести к образованию агрегатов при увеличении гидрофобных взаимодействий и дополнительных ковалентных сшивок между молекулами и являться одним из маркеров повреждения в тканях.

Определение окислительной деструкции белков стало новым направлением для оценки интенсивности окислительного стресса. Выяснение именно их окислительной модификации может служить надежным маркером интенсивности протекания окислительных процессов. На основании того, что белки выполняют специфические биологические функции можно регистрировать не только образование продуктов свободнорадикальной модификации, но и изменение функций белков. Анализ продуктов окислительной деструкции белков может дать информацию о типе оксидантов, участвующих в процессе окисления [111, 120, 206]. При некоторых состояниях организмов выявлена достоверная активация ОМБ.

В процессе старения особое значение приобретает окислительный стресс, так как независимо от состояния антиоксидантной системы и изменения условий внешней среды обитания пожилых людей и в опытах на старых животных он носит прогрессирующий характер. В эритроцитах, полученных у пожилых людей, увеличена концентрация карбонильных производных белков и снижена активность аспаратаминотрансферазы (КФ 2.6.1.1) и фосфоглицераткиназы (КФ 2.7.2.3) В фибробластах доноров в возрасте от 10 до 80 лет отмечен рост скорости образования карбонильных группировок окисленных белков в зависимости от

возраста. Обнаружено увеличение продуктов свободнорадикальной модификации белков в скелетных мышцах у людей пожилого возраста (66-85 лет) [227].

С процессами окислительной модификации белков связывают развитие катаракты при сахарном диабете и старении [170, 189]. По мнению авторов [105] окислительная деструкция аминокислотных остатков тирозина и метионина является показателем того, что диабет сам по себе не вызывает повреждение экстрацеллюлярного матрикса. Наблюдается повышение интенсивности ОМБ при болезнях, связанных с возрастом, к ним относят болезни Альцгеймера и Паркинсона [133, 187]. Окисление иммуноглобулинов синовиальной жидкости вызывает их агрегацию, что можно связать с развитием ревматоидного артрита [208].

В условиях *in vitro* выявлено, что свободнорадикальная модификация может изменять каталитические и регуляторные свойства белков, включая полную их инактивацию. Исследование характера и динамики продуктов ОМБ может иметь прогностическое значение при большом количестве заболеваний человека и животных и использоваться для профилактики и лечения многих заболеваний.

Анализируя литературные данные можно заключить, что влияние различных физических и химических факторов антропогенного характера, а также пищевая и биологическая ценность рациона кормления способны привести к нарушению окислительного равновесия в тканях животных. Однако недостаточно данных о влиянии факторов урбанизации на интенсивность свободнорадикальных процессов компонентов молока. Соответственно вышеизложенные литературные данные позволяют считать актуальным и целесообразным изучение воздействия факторов урбанизации на интенсивность свободнорадикальных процессов молока крупного рогатого скота, как для оценки экологического состояния региона, так и для разработки рекомендации к коррекции рациона кормления животных, с целью снижения окислительных процессов в молоке-сырье.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объекты исследования

Экспериментальные исследования проводились в лаборатории кафедры продуктов питания и пищевой биотехнологии ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П.А. Столыпина. В качестве объектов исследования выбрано сырое натуральное молоко, нормализованное по массовой доле жира до 2,5%.

С целью выяснения роли климатических факторов исследовали натуральное коровье молоко, полученное от коров черно-пестрой породы в лесной, степной и лесостепной зон Омской области в разные сезоны года: летний (июль - август) и зимний (конец января - февраль).

Для определения значения воздействий антропогенных факторов изучали натуральное молоко коров черно-пестрой породы из пригородных хозяйств промышленного центра (10-20 км) и хозяйств, расположенных на расстоянии не менее 150 км к югу (Русско-Поляский и Павлоградский районы) и северу (Седелниковский и Большереченский районы) от промышленного центра.

Выяснение фактора породы животных проводилось при сравнении показателей натурального козьего молока швейцарской породы и натурального козьего молока зааненской породы с молоком коров черно-пестрой породы.

## 2.2 Методы исследования

### 2.2.1 Хемилюминесцентный метод анализа

Характерной особенностью СРО является накопление в ходе реакций свободных радикалов, рекомбинация которых сопровождается образованием возбужденных состояний молекул с последующим высвечиванием кванта света хемилюминесценции (ХЛ) [50].

Измерение хемилюминесценции в молочных продуктах в присутствии двухвалентного железа ( $\text{Fe}^{2+}$ ) является методом оценки состояния свободнорадикального окисления компонентов [80].

Таким образом, процесс окисления компонентов с образованием перекисных соединений сопровождается хемилюминесценцией, измерение которой может служить методом изучения процесса переокисления [16].

Хемилюминесцентный анализ является одним из наиболее современных методов исследования антиоксидантной активности антиоксидантов [48].

Достоинствами хемилюминесцентного метода изучения перекисного окисления являются его относительная простота, быстрота проведения анализа, возможность использования водных растворов и небольшого количества материала. Кроме того, метод позволяет регистрировать кинетику процесса окисления [48, 50].

В данной работе была применена железоиндуцированная люминолзависимая хемилюминесценция. Регистрацию свечения проводили с помощью прибора хемилюминомера ХЛ-003 (совместная разработка БГМУ и УГАТУ), по методике модифицированной Веселовым П.В., Высокогорским В.Е. [14, 15, 95] с использованием люминола.

**Методика определения.** Молочные продукты добавляли к фосфатному буферу в соотношении 1:1. Состав буфера: 2,72 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7,82 г  $\text{KCl}$  на 1 литр дистиллированной воды. Величину рН полученного раствора доводили до рН 7,5 титрованием насыщенным раствором КОН. В кюветную камеру прибора помеща-

ли 20 мл полученного разведения. Свечение индуцировали добавлением 1 мл 50 мМ раствора  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ускоряющего процессы свободнорадикального перекисного окисления липидов. Для усиления интенсивности свечения, вызванного образованием свободных радикалов, использовали 2 мл рабочего раствора люминола ( $10^{-5}$  М). Рабочий раствор люминола получают введением 0,5 мл маточного раствора люминола в 500мл физиологического раствора. Маточный раствор люминола ( $10^{-2}$  М) готовят на диметилсульфоксиде из расчета на 10мл диметилсульфоксида 17,7 мг люминола [95]. Интенсивность хемилюминесценции характеризует способность различных субстратов подвергаться СРО. Запись хемилюминесценции проводили в течении 10 мин при включенном термостате ( $t = 37$  °С) и быстром перемешивании.

Типичная кинетика ХЛ при реакции цепного окисления липидов, инициированная добавлением к исследуемой системе солей двухвалентного железа включает в себя ряд последовательных стадий. Непосредственно после добавления ионов  $\text{Fe}^{2+}$  наблюдается **быстрая вспышка свечения**, связанная с бурным образованием радикалов  $\text{RO}_2'$  и  $\text{R}'$  при разложении гидроперекисей ионами  $\text{Fe}^{2+}$ . Стадия сменяется фазой угнетения свечения, которая обусловлена антиоксидантными свойствами  $\text{Fe}^{2+}$  при высоких концентрациях. При снижении концентрации  $\text{Fe}^{2+}$  ниже критического значения ионы  $\text{Fe}^{2+}$  начинают работать, как прооксиданты за счет реакции разветвления цепей в результате развивается **медленная вспышка свечения**, она затухает после полного окисления  $\text{Fe}^{2+}$  до  $\text{Fe}^{3+}$ . Амплитуда медленной вспышки (максимальная светимость), нарастает постепенно, затем выходит на максимум и через некоторое время снижается до стационарного уровня свечения (отражает способность липидов к перекисному окислению, т.е. максимально возможную интенсивность СРО после введения  $\text{Fe}^{2+}$ ) [16, 80].

Параметрами кривой ХЛ также являются:

**Светосумма** – определяется как площадь под кривой ХЛ от начала нарастания амплитуды медленной вспышки до достижения ею максимума, оценивает число боковых цепей разветвления, то есть, сколько на 1 ион  $\text{Fe}^{2+}$  приходится

образовавшихся перекисных радикалов [80]. Светосумму свечения выражают в условных единицах ( $1 \text{ у.е.} = 3,06 \cdot 10^5$  квантов в 1с) [50].

**Спонтанная светимость** - определяет уровень содержания свободных радикалов без добавления иницирующих веществ. Светимость обусловлена взаимодействием перекисных радикалов и свидетельствует о наличии свободнорадикальных процессов [48].

Антиокислительную активность молока и кисломолочных продуктов определяли по угнетению хемилюминесценции модельной системы, генерирующей активные формы кислорода.

Если показания хемилюминесценции при добавлении молока и кисломолочных продуктов ниже, чем в контрольной пробе, то исследуемый продукт или молоко обладает антиоксидантными свойствами. Антиоксидантная активность выражается в %% угнетения светосуммы хемилюминесценции по отношению к контролю.

В принципе любая методика определения антиокислительной активности какого-либо индивидуального ингибитора свободнорадикальных реакций, смеси их или биологических жидкостей основывается на использовании некоей модельной системы, которая включает в себя по крайней мере 2 компонента: механизм генерации определенного сорта свободных радикалов и систему их детектирования. Введение в такую модельную систему перехватчика свободных радикалов или веществ, влияющих на концентрацию или состояние ионов-катализаторов, приведет к уменьшению концентрации свободных радикалов или катализаторов, что отразится на параметрах детектирующей системы [48].

В модельной системе, созданной на основе куриных эмбрионов, высока интенсивность реакции перекисного окисления липидов, при добавлении ионов железа усиливается окисление ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав желточных липопротеидов, что согласно данным [82] сопровождается излучением квантов света, который регистрируется хемилюминомером. Суспензия липопротеинов желтка яиц, как модельная система, отличается от других

липидсодержащих систем доступностью получения, высокой стабильностью и относительно хорошей окисляемостью.

**Методика определения общей антиокислительной активности молока и молочных продуктов в модельной системе их желточных липопротеинов.**

Общую антиокислительную активность исследуемого молока определяли хемиллюминесцентным методом по Г.И. Клебанову [49, 50]

В качестве модельной системы использовали липиды, полученные из куриного желтка, содержащего липопротеиновые комплексы, сходные с липидами крови. Желток смешивали с фосфатным буфером в соотношении 1:5, гомогенизировали, доводили содержание белка до 1 мг на мл дальнейшим разведением (в среднем 25 мл полученного гомогената на 1 литр буфера). Отбирали 20 мл и вводили 0,2 мл исследуемого продукта, после чего в модельную систему добавляли 2 мл рабочего раствора люминола ( $10^{-5}$  М). Хемиллюминесценцию индуцировали добавлением 1 мл 50мМ раствора сернокислого железа при постоянном перемешивании, что приводит к окислению ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов; развивается хемиллюминесценция, по интенсивности которой судят о процессах перекисного окисления липидов.

Результаты экспериментов на модельной системе определяли по степени изменения ХЛ в присутствии объектов и пересчитывали в %% от свечения контроля по формуле:

$$AOA = S_{\text{контр}} - S_{\text{продукт}} / S_{\text{контр}} * 100, \quad (2.2.1.1)$$

где АОА – антиокислительная активность молочного продукта, %;

$S_{\text{контр}}$  – светосумма ХЛ липидов куриного желтка, у.е.;

$S_{\text{продукт}}$  – светосумма ХЛ липидов куриного желтка с исследуемым продуктом, у.е.

## 2.2.2 Биохимические методы анализа

### Определение продуктов свободнорадикального окисления липидов

Процесс липопероксидации является важной причиной накопления клеточных дефектов. Основным субстратом СРО являются полиненасыщенные цепи жирных кислот, входящих в состав клеточных мембран, а также нейтральных липидов. Их атака кислородными радикалами приводит к образованию гидрофобных радикалов, взаимодействующих друг с другом [72].

Определение продуктов свободнорадикального окисления проводили с помощью экстракционно-спектрофотометрического метода с отдельной регистрацией липопероксидов в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта молока по методике модифицированной Волчегорским И. А. и др., [21, 60]. Данный метод основан на феномене перегруппировки двойных связей в диеновые конъюгаты при переокислении ПНЖК [21, 149].

**Методика определения.** К 0,5 мл исследуемого молока добавляли 5 мл гептан – изопропанолового спирта (1:1), в течение 20 мин встряхивали в закрытых пробирках. Экстракт, освобожденный от белкового преципитата центрифугированием, разбавляли 5 мл смеси гептан – изопропанола (3:7) и смешивали с 2 мл водного раствора соляной кислоты (рН 2). Через 30 мин осторожно декантировали верхнюю (гептановую) фазу и добавляли 1 см<sup>3</sup> сухого NaCl к нижней (водно-спиртовой) фазе. Еще через полчаса декантировали освобожденную от воды изопропанольную фазу экстракта. Спектрофотометрию каждой фазы липидного экстракта проводили, при трех длинах волн – 220, 232, 278 нм в кварцевых кюветах толщиной 1 см против соответствующего оптического контроля. В гептановой фазе определяли продукты пероксидации нейтральных липидов, а в изопропанольной фазе – фосфолипидов [21].

Результаты выражали в единицах индексов окисления:  $E_{232}/E_{220}$  – относительное содержание первичных продуктов окисления,  $E_{278}/E_{220}$  – относительное содержание вторичных продуктов окисления.

Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов молока проводили по модифицированной Львовской Е.И. (1991) методике [60].

Продукты СРО, а именно содержащие карбонильные группы, способны взаимодействовать со свободными аминогруппами различных веществ (фосфолипидов, аминлипидов, белков и др.) с образованием соединений типа шиффовых оснований.

Общеизвестным подходом к определению конечных продуктов ПОЛ является флюоресцентная детекция этих соединений. Вместе с тем известно, что в области 401-404 нм находится изобестическая точка этих соединений, которая не зависит от вида изомеров [60].

Содержание конечных продуктов СРО определяли по величине оптической плотности гептановых и изопропанольных фаз липидных экстрактов при 400 нм. Относительное содержание шиффовых оснований рассчитывали по отношению поглощения при 400 нм к оптической плотности при 220 нм ( $E_{400}/E_{220}$ ). Последняя величина является функцией содержания изолированных двойных связей в экстрагированных липидах, которые являются субстратами СРО.

### **Определение уровня карбонилированных производных белков**

При исследовании свободнорадикальных процессов установлено, что АФК, взаимодействуя с основными компонентами клеток, способны подвергать окислительной деструкции не только липиды, а также белки и нуклеиновые кислоты [85].

Наиболее распространенный и легко обнаруживаемый тип повреждения белков – образование карбонильных групп при окислении аминокислот. Свободные радикалы атакуют белки по всей длине полипептидной цепи, нарушая не только первичную, но и вторичную, и третичную структуру белков, что приводит к агрегации или фрагментации белковой молекулы [67, 238].

Метод оценки окислительной модификации белков основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразоном метод Reznick A.Z. & Parker L. в модификации Дубининой Е.Е. [41].

#### **Методика определения спонтанной окислительной модификации белков молока.**

Для исследования образцов молока использовали трех кратное разведение.

При регистрации окислительной модификации белков проводили предварительно их осаждение с помощью 20%-ного раствора ТХУ кислоты. Для этого на каждую пробу готовили 2 пробирки – опытную и контрольную в каждую из них вносили по 0,2 мл исследуемого образца и 1,8 мл 20% ТХУ кислоты, в опытные пробирки добавляли по 2 мл 0,1 М 2,4-ДНФГ, растворенного в 2 М HCL, а в контрольные – 2 мл 2М HCL без 2,4-ДНФГ. Инкубацию осуществляли при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем пробы центрифугировали 10 мин со скоростью 3000 об/мин.

Надосадочную жидкость сливали, осадок трижды промывали смесью этанол-этилацетат (1:1) для экстракции липидов и 2,4-ДНФГ, который не прореагировал с карбонильными группами окисленных белков. Отмытый осадок подсушивали с целью удаления остатков этанол-этилацетата. К подсушенному осадку добавляли по 5 мл 8М мочевины и выдерживали 5 мин в кипящей бане до полного растворения осадка.

Замеры оптической плотности обеих проб (опытной и контрольной) против дистиллированной воды производились при длинах волн: 274, 356, 370, 430, 530 нм в кварцевых кюветах с толщиной оптического слоя 1 см. Затем производим умножение на коэффициент разведения.

#### **Методика индуцированной окислительной модификации белков молока**

Для исследования образцов молока использовали трех кратное разведение.

При регистрации окислительной модификации белков проводили предварительно их осаждение с помощью 20%-ного раствора ТХУ кислоты. Для этого на каждую пробу готовили 2 пробирки – опытную и контрольную в каждую из них вносили по 0,2 мл исследуемого образца, затем в контрольную пробу до инкубации добавляли 1,8 мл 20% ТХУ кислоты. В опытных пробирках перед добавлением 1,8 мл 20% ТХУ проводили инкубацию пробы путем добавления  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в конечной концентрации 10 мМ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  в конечной концентрации 0,3 мМ и трис- HCl (pH=7,4) затем выдерживали в течение 15 минут при 37°C затем добавляли 1,8 мл 20% ТХУ кислоты. В опытные пробирки добавляли по 2 мл 0,1 М 2,4-ДНФГ, растворенного в 2 М HCL, а в контрольные – 2 мл 2М HCL без 2,4-ДНФГ. Инкубацию осуществляли при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем пробы центрифугировали 10 мин со скоростью 3000 об/мин.

Надосадочную жидкость сливали, осадок трижды промывали смесью этанол-этилацетат (1:1) для экстракции липидов и 2,4-ДНФГ, который не прореагировал с карбонильными группами окисленных белков. Отмытый осадок подсушивали с целью удаления остатков этанол-этилацетата. К подсушенному осадку добавляли по 5 мл 8М мочевины и выдерживали 5 мин в кипящей бане до полного растворения осадка.

Замеры оптической плотности обеих проб (опытной и контрольной) против дистиллированной воды производились при длинах волн: 274, 356, 370, 430, 530 нм в кварцевых кюветах с толщиной оптического слоя 1 см. Затем производим умножение на коэффициент разведения.

### **Определение доступных сульфгидрильных групп в различных фракциях молока.**

Определение количества доступных сульфгидрильных групп основано на их взаимодействии с 5,5'-дителиобис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБ) с образованием окрашенного дисульфида. Определение проводили по модифицированной

методике Веревкиной и др. [89]. Принцип действия основан на взаимодействии 5,5'-дителио-2-нитробензойной кислоты со свободными SH-группами белков в результате этой реакции протекающей при pH=8 происходит освобождение тио-нитрофенильного аниона (ТНФА). Количество образовавшихся ТНФА прямо пропорционально количеству свободных SH-групп белков прореагировавших с ДТНБ. Коэффициент молярной экстинкции ТНФА при длине волны 412 нм равен 11400.

### **Методика определения доступных сульфгидрильных групп в молоке и молочной сыворотке**

В пробу (конечный объем 10 мл) вносили 3 мл белкового раствора, 2 мл 0,2 М фосфатного буфера (pH 8) и 5 мл дистиллированной воды (проба а). Белковый раствор молока готовили путем разведения молока 1:100 дистиллированной водой. Белковый раствор сыворотки - супернатант после внесения лимонной кислоты – до pH 4,6 и центрифугирования в течение 15 мин затем производим разведение полученного супернатанта 1:3 дистиллированной водой.

Из пробы а, отбирают 3 мл и добавляют к ним микропипеткой 0,02 мл реактива Элмана. После чего проба подвергается перемешиванию, и развивается желтая окраска. Через 3 минуты оптическую плотность проб измеряют на спектрофотометре при длине волны 412 нм. Таким образом, определяются быстореагирующие сульфгидрильные группы белковых растворов. Измерение величин оптической плотности опытной пробы производят против контрольной пробы, в которую вместо реактива Элмана добавлено 0,02 мл воды.

Содержание тиоловых групп находят по формуле:

$$C_0 = \frac{A}{\epsilon} * D \quad (2.2.1.2)$$

$C_0$  - искомая концентрация SH-групп (моль/л);

$A$  – прирост оптической плотности опытной пробы за время достаточное для завершения реакции;

$\epsilon$  – коэффициент молярной экстинкции ТНФА ( $\epsilon=11400$ );

$D$  – фактор разведения;

### Методика определения доступных небелковых сульфгидрильных групп

В пробу вносят 3 мл безбелкового надосадка молока раствора, 2 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 8) и 5 мл дистиллированной воды (проба а).

Приготовление безбелкового надосадка молока: к 25 мл молока, добавляют 2 мл 12% ТХУ кислоты с целью осаждения белков молока. Пробы тщательно перемешивали и после 5 минутного стояния при комнатной температуре центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин, после чего фильтровали полученный супернатант через бумажный фильтр. Полученный раствор должен быть прозрачным и бесцветным. К 6 мл супернатанта добавляли 4 мл 0,3М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин.

Из пробы а, отбирают 3 мл и добавляют к ним микропипеткой 0,02 мл реактива Элмана. После чего проба подвергается перемешиванию, и развивается желтая окраска. Через 3 минуты оптическую плотность проб измеряют на спектрофотометре при длине волны 412 нм. Таким образом, определяются быстрореагирующие сульфгидрильные группы белковых растворов. Измерение величин оптической плотности опытной пробы производят против контрольной пробы, в которую вместо реактива Элмана добавлено 0,02 мл воды.

Содержание тиоловых групп находят по формуле:

$$C_o = \frac{A}{\epsilon} * D \quad (2.2.1.3)$$

$C_o$ - искомая концентрация SH-групп (моль/л);

$A$  – прирост оптической плотности опытной пробы за время достаточное для завершения реакции;

$\epsilon$  – коэффициент молярной экстинкции ТНФА ( $\epsilon=11400$ );

$D$  – фактор разведения;

### **Определение активности супероксиддисмутазы**

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) в молоке животных по величине ингибирования реакции восстановления 2-(4-йодфенил) – 3-(4-нитрофенол)- 5 – фенилтеразолиумхлорида в присутствии супероксидного радикала генерируемого реакцией ксантина с ксантинооксидазой. Исследования проведены на биохимическом анализаторе «ScreenMaster» производства фирмы «Hospitex» с использованием набора реактивов «RANDOX» (Великобритания). Для определения использовалось обезжиренное молоко, разведенное в 3 раза дистиллированной водой. Определение проводилось при длине волны 340 нм.

### **Определение активности глутатионпероксидазы**

Активность глутатионпероксидазы (ГП) определяли по способности окислять глутатион при помощи гидроперекиси кумина. Исследования проведены на биохимическом анализаторе «ScreenMaster» производства фирмы «Hospitex» с использованием набора реактивов «RANDOX» (Великобритания). Для определения использовалось обезжиренное молоко, разведенное в 2 раза дистиллированной водой. Определение проводилось при длине волны 505 нм.

#### **2.2.3 Статистический анализ полученных данных**

Проверка на соответствие выборок нормальному закону распределения проводилась по критерию Шапиро—Уилки с помощью пакета прикладных программ «Statistika 6,0»[79]. Выборки не подчинялись нормальному закону распределения, поэтому полученные результаты представлены в таблицах в виде медианы  $Me$ , верхнего и нижнего квартилей  $Q_1—Q_3$ . Достоверность различий выборок оценивали с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни (U). Проверка статистических гипотез проводилась при критическом уровне значимости  $p=0,05$ .

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### **3.1. Антиокислительная активность и интенсивность процессов перекисидации липидов молока крупного рогатого скота хозяйств, расположенных на различных расстояниях от промышленного центра**

Интенсивность свободнорадикальных процессов молока и молочных продуктов зависит от многих факторов, таких как сезон года заготавливаемого молока, вида молочного продукта и технологического режима его производства [25, 31, 57].

В предыдущих исследованиях [31] при изучении влияния технологических процессов на интенсивность свободнорадикального окисления выявлено, что молоко произведенное методом микрофльтрации даже в процессе хранения обладает более низким уровнем свободнорадикальных процессов, по сравнению с молоком, изготовленным традиционным способом. Творог, выработанный методом ультрафльтрации, характеризуется более сильной антиокислительной способностью и меньшим уровнем радикального окисления по отношению к продукту, выработанному традиционным (кислотная коагуляция) способом [25]. Применение определенных заквасочных культур способствует снижению концентрации веществ, способных подвергаться свободнорадикальному окислению и накоплению антиокислительных веществ [26].

Литературные данные последних лет указывают [61, 91, 115], что неблагоприятные условия внешней среды, нарушения технологии содержания и неполноценное кормление способны привести к нарушению метаболического и гормонального статуса животных. Снижение низкомолекулярных антиоксидантов организма в результате нейтрализации АФК и недостаток их в рационе при таких условиях приводят к снижению активности системы антиоксидантной защиты организма, и сопровождаются усилением процессов свободнорадикального окисления, вызывая развитие различных заболеваний [5, 71, 87, 97].

Установлены существенные отличия антиоксидантной активности молока крупного рогатого скота разных подзон лесостепи Омской области [24]. Выявле-

но, что молоко-сырье, полученное из северной подзоны области обладает более интенсивной антиокислительной активностью по сравнению с молоком из южной подзоны.

Однако влияние промышленного центра на антиокислительную активность молока достаточно не исследовано и представляет интерес для дальнейших экспериментов.

### **3.1.1 Антиокислительная активность молока крупного рогатого скота**

Для определения влияния факторов урбанизации нами исследованы пробы молока, полученного зимой от коров в пригородной зоне - 5-15 километров от города Омска и на удалении не менее 100-150 километров к северу и югу от промышленного центра.

Антиокислительная активность молока обусловлена наличием ферментов (супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, каталазы, ксантиноксидазы и др.) нативного и микробного происхождения, обеспечивающих обезвреживание продуктов свободнорадикального окисления. Значительную роль в обеспечении антиоксидантной защиты играют также низкомолекулярные соединения: токоферолы, ретинол, аскорбиновая кислота, лактоферрин, мочева кислота [98, 99].

Интегративным показателем антиокислительной способности является изменение светосуммы хемилюминесценции при добавлении исследуемого молока к модельной системе, полученной из липопротеинов куриного желтка.

В таблице 3.1.1 приведены показатели антиокислительной активности в % снижения значений светосуммы хемилюминесценции при добавлении исследуемого молока, принимая за 100% данные модельной системы.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что антиокислительная активность молока-сырья, полученного на различном расстоянии от города имеет некоторые отличия. В молоке, полученном от хозяйств пригородной зоны - она ниже на 12% и 9%, чем в южных и северных районах соответственно. Существенных различий между показателями антиокислительной активности в северных и южных районах области не выявлено.

Таблица 3.1.1

Антиокислительная активность молока, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Показатель	Северные районы (n=7)	Южные районы (n=9)	Пригород Омска (n=9)
Снижение светосуммы в %	70,44 (67,20; 75,31)	72,61 (64,17; 77,36)	63,92* <sup>x</sup> (51,65; 64,4)

Примечание. \* - статистически значимые отличия от северных районов,  $P < 0,05$ , <sup>x</sup> – статистически значимые отличия от южных районов,  $P < 0,05$

Возможно, данный факт объясняется тем, что хозяйства пригородной зоны расположены на расстоянии не более 50 километров от города и подвержены различным воздействиям техногенных факторов внешней среды, снижающих антиоксидантную активность молока данной зоны.

### 3.1.2. Интенсивность процессов липопероксидации молока крупного рогатого скота

Для оценки интенсивности свободнорадикальных процессов необходимо оценить степень подверженности молока процессам пероксидации липидов в зависимости от воздействия факторов урбанизации. Основным показателем свободнорадикального окисления липидов является образование в полиненасыщенных жирных кислотах сопряженных связей, в результате чего происходит появление первичных молекулярных продуктов - диеновых конъюгатов и вторичных продуктов триеновых конъюгатов. Продукты пероксидации липидов имеющие в составе карбонильные группы, взаимодействующие со свободными аминокеттогруппами фосфолипидов, белков, аминокислот и других соединений с образованием конечных продуктов окисления липидов – основания Шиффа [11, 18].

Содержание первичных, вторичных и конечных продуктов пероксидации липидов определяли с помощью экстракционно-спектрометрического метода с

раздельной регистрацией липопероксидов в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта молока [21, 60].

Относительное содержание шиффовых оснований определяли в соответствии с рекомендациями Львовской Е.И. и др. (1991) [60]. Содержание продуктов свободнорадикального окисления липидов выражали в единицах индекса окисления  $E_{232}\backslash E_{220}$  - первичные,  $E_{278}\backslash E_{220}$  - вторичные,  $E_{400}\backslash E_{220}$  – конечные.

Относительное содержание продуктов липопероксидации молока в зимний период года представлены в таблицах 3.1.2.1 и 3.1.2.2.

Полученные данные свидетельствуют о различном содержании продуктов пероксидации липидов молока в зависимости от расположения относительно промышленного центра как в зимний так и летний периоды года.

Таблица 3.1.2.1

Относительное содержание продуктов липопероксидации в гептановой фазе липидного экстракта молока в зимний период года, Ме ( $Q_1$ ;  $Q_3$ )

Показатель Районы исследования	Гептановая фаза е.о.и.		
	Диеновые конъюгаты	Кетодиены и сопряженные триены	Шиффовые основания
Северные n=10	0,94 (0,88;0,95)	0,08 (0,07; 0,09)	0,006 (0,003;0,008)
Южные n=12	1,00 (0,94;1,00)	0,10 (0,08;0,10)	0,005 (0,003;0,006)
Пригород Омска n=10	1,00 (0,94; 1,13)	0,07 (0,06;0,09)	0,008 <sup>x</sup> (0,007;0,010)

Примечание. <sup>x</sup> - статистически значимые отличия от южных районов,  $P < 0,05$ ;

Увеличение уровня конечных продуктов липопероксидации молока, полученного в пригородной зоне города по отношению к другим районам области как в гептановой так и изопропанольной фазах липидного экстракта свидетельствует о более интенсивном течении перекисного окисления липидов молока в этом рай-

оне в зимний период года. В зимний период, содержание первичных (диеновых конъюгатов) и вторичных (кетодиенов и сопряженных триенов) продуктов липопероксидации в гептановой фазе липидного экстракта молока коров существенно не отличалось в различных районах Омской области. Содержание конечных продуктов пероксидации липидов оснований Шиффа в гептановой фазе липидного экстракта молока из хозяйств пригорода Омска на 37,5% ( $P=0,017$ ) выше по сравнению с южными районами области. Известно, что в гептан экстрагируются эфиры высших жирных кислот и спиртов, а в изопропанол – фосфолипиды [21]. Повышение уровня конечных продуктов пероксидации липидов в гептановой фазе липидного экстракта молока свидетельствует о более интенсивном нарушении нативной структуры нейтральных липидов в молоке пригородной зоны Омска по отношению к южным районам области.

Таблица 3.1.2.2

Относительное содержание продуктов липопероксидации в изопропанольной фазе липидного экстракта в зимний период года, Me ( $Q_1$ ;  $Q_3$ )

Показатель Регионы исследования	Изопропанольная фаза е.о.и.		
	Диеновые конъюгаты	Кетодиены и сопряженные триены	Шиффовые основания
Северные n=10	0,77 (0,59;0,77)	0,37 (0,34;0,50)	0,008 (0,007;0,011)
Южные n=12	0,54 (0,47; 0,72)	0,45 (0,42;0,60)	0,007 (0,006;0,010)
Пригород Омска n=10	0,76 (0,67;0,81)	0,49* (0,47;0,57)	0,025* <sup>xx</sup> (0,015;0,033)

Примечание. \* - статистически значимые отличия от северных районов,  $P<0,05$ ;<sup>xx</sup>

- статистически значимые отличия от южных районов,  $P<0,001$ ;

В изопропанольной фазе липидного экстракта молока в зимний период года наблюдались значительные различия содержания вторичных и конечных продук-

тов липопероксидации. Уровень кетодиенов и сопряженных триенов в пригородной зоне города, на 24% ( $p=0,037$ ) выше, чем в северных районах Омской области. В то же время зарегистрировано существенное повышение оснований Шиффа в молоке из хозяйств пригорода на 68% ( $P=0,004$ ) и 72% ( $P<0,001$ ) выше по сравнению с северными и южными районами соответственно.

Результаты содержания продуктов пероксидации липидов молока в летний период года представлены в таблицах 3.1.2.3 и 3.1.2.4.

Таблица 3.1.2.3

Относительное содержание продуктов липопероксидации в гептановой фазе липидного экстракта молока в летний период года, Me ( $Q_1$ ;  $Q_3$ )

Показатель Районы исследования	Гептановая фаза е.о.и.		
	Диеновые конъюгаты	Кетодиены и со- пряженные три- ены	Шиффовые основания
Северные n=10	0,94 (0,90; 0,94)	0,14 (0,13; 0,14)	0,004 (0,003; 0,010)
Южные n=10	1,00 (0,91; 1,00)	0,13 (0,12; 0,13)	0,009 (0,008; 0,012)
Пригород Омска n=10	0,98* (0,95; 1,16)	0,19 <sup>*x</sup> (0,13; 0,21)	0,009 (0,007; 0,009)

Примечание. \* - статистически значимые отличия от северных районов,  $P<0,05$ ; <sup>x</sup> - статистически значимые отличия от южных районов,  $P<0,05$ ;

В летний период, наблюдались существенные изменения содержания кетодиенов и сопряженных триенов в гептановой фазе липидного экстракта (таблица 3.1.2.1.3): их содержание в молоке, полученном в непосредственной близости от промышленного центра, на 26% ( $P=0,04$ ) и 32% ( $P=0,02$ ) выше по сравнению с северными и южными районам области соответственно. Повышался уровень диеновых конъюгатов в данной фазе липидного экстракта в пригороде на 4,2% ( $P=0,003$ ) относительно северных районов области.

Содержание диеновых конъюгатов в изопропанольной фазе липидного экстракта в молоке из хозяйств северных районов на 9,5% выше по сравнению с пригородом. Однако уровень вторичных продуктов липопероксидации молока, полученного из хозяйств пригорода Омска, на 20% ( $P=0,010$ ) и 34% ( $P=0,047$ ) выше по сравнению с молоком из южных и северных районов области. Данный факт свидетельствует о более интенсивном окислении фосфолипидов молока, полученного в пригороде Омска в летний период года.

Таблица 3.1.2.4

Относительное содержание продуктов липопероксидации в изопропанольной фазе липидного экстракта молока в летний период года, Me ( $Q_1$ ;  $Q_3$ )

Показатель Районы исследования	Изопропанольная фаза е.о.и.		
	Диеновые конъюгаты	Кетодиены и сопряженные триены	Шиффовые основания
Северные n=10	0,63 (0,62; 0,71)	0,23 (0,23; 0,33)	0,009 (0,009; 0,011)
Южные n=12	0,61 (0,56; 0,70)	0,28 (0,24; 0,33)	0,010 (0,007; 0,010)
Пригород Омска n=10	0,57** (0,48; 0,66)	0,35* <sup>x</sup> (0,26; 0,37)	0,008 (0,007; 0,009)

Примечание.\*- статистически значимые отличия от северных районов ( $P<0,05$ ), \*\* -  $P<0,001$ ; <sup>x</sup> - статистически значимые отличия от южных районов ( $P<0,05$ );

Отсутствие значимых изменений содержания оснований Шиффа в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта исследуемых проб молока в летний период года, возможно, объясняется более богатым антиоксидантами пастбищным рационом кормления животных в данный период.

Существенных различий продуктов ПОЛ молока между северными и южными районами, как в зимний, так и летний период года выявлено не было. Воз-

можно, это объясняется удаленностью от промышленного центра и как следствие меньшим поступлением из внешней среды прооксидантов антропогенного характера [20].

Анализируя полученные данные в зимний и летний периоды года, можно сделать вывод о том, что липиды молока коров, полученного из хозяйств находящихся в непосредственной близости от промышленного центра, легче подвергаются процессам ПОЛ. В зимний период года фосфолипиды молока, полученного в пригородной зоне, сильнее подвержены процессам перекисного окисления относительно летнего периода. Данный факт можно объяснить недостатком витаминов и минеральных веществ [87] в рационе кормления в этот период года.

Следует заметить, что в летний период года наблюдается более интенсивное течение свободнорадикального окисления нейтральных липидов молока, проявляющееся в повышенном содержании кетодиенов и сопряженных триенов в гептановой фазе липидного экстракта. Это можно объяснить сезонными изменениями состава молочного жира [34]. Летний период характеризуется повышенным содержанием ненасыщенных жирных кислот в липидах молока, которые легче подвергаются окислению.

Полученные данные о содержании продуктов пероксидации липидов в молоке, полученном от разноудаленных от промышленного центра хозяйств, позволяют выделить хозяйства пригорода на расстоянии 5-15 км от города, как район с наиболее интенсивным перекисным окислением липидов молока.

### **3.2. Интенсивность окислительной модификации белков молока крупного рогатого скота хозяйств, расположенных на различных расстояниях от промышленного центра**

#### **3.2.1 Уровень карбонилированных производных белков молока в разные сезоны года**

Свободнорадикальному окислению способны подвергаться не только липиды, но и белки. С целью определения степени воздействия антропогенных факторов на окислительные процессы молока нами определены показатели спонтанной и металлкаatalизируемой ОМБ спектрофотометрическим методом. Определено содержание ранних альдегид-динитрофенилгидразонов при длине волны – 274 нм, альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера – 356нм, кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера – 370нм, альдегид-динитрофенилгидразонов основного характера – 430нм, кетон-динитрофенилгидразонов основного характера – 530нм, позволяя полнее охарактеризовать степень воздействия свободнорадикального окисления в летний и зимний периоды года.

Результаты содержания продуктов спонтанной и металлкаatalизированной окислительной деструкции белков молока разных районов области в летний период года приведены в таблицах 3.2.1.1 и 3.2.1.2.

Уровень спонтанной ОМБ молока отличается в разных районах Омской области. Содержание альдегид-динитрофенилгидразонов (274 нм) - ранних маркеров окислительной деструкции белков – по данным Иванова В.В. с соавтр. [19] в молоке, полученном от молочных хозяйств пригорода г. Омска, выше на 15,6 % ( $P=0,01$ ) и на 16 % ( $P=0,02$ ), кетон-динитрофенилгидразонов основного характера на 36,4 % ( $P=0,02$ ) и на 42,4 % ( $P=0,003$ ) относительно северных и южных районах области, соответственно. Отсутствие изменений между показателями ОМБ молока в северных и южных районах области, возможно, объясняется наличием богатого антиоксидантами рациона кормления в данный период года и менее интенсивным воздействием негативных факторов окружающей среды.

Таблица 3.2.1.1

Содержание карбонильных производных белков молока в летний период года,  
Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Длина волны	Районы исследования		
	Северные n=10	Южные n=12	Пригород Омска n=10
	<b>Спонтанная окислительная модификация белков (е.о.п. на 1 мл молока)</b>		
274 нм	4,50 (3,95; 4,87)	4,47 (3,10; 5,10)	5,33 <sup>*x</sup> (4,90; 5,64)
356 нм	2,97 (2,43; 3,42)	2,95 (2,59; 3,64)	2,57 (2,49; 2,91)
370 нм	2,82 (2,25; 3,12)	2,58 (1,83; 3,40)	2,46 (2,31; 2,70)
430 нм	2,34 (1,95; 2,64)	2,34 (1,41; 3,01)	2,19 (1,89; 2,43)
530 нм	0,21 (0,19; 0,28)	0,19 (0,15; 0,21)	0,33 <sup>*x</sup> (0,26; 0,37)

Примечание: \* - статистически значимые различия от северных районов; <sup>x</sup> - статистически значимые различия от южных районов, P<0,05;

Аналогично увеличению продуктов спонтанной ОМБ молока из хозяйств пригорода, происходит повышение ее металлкаatalизируемых показателей, ранних маркеров окислительной деструкции белков (274нм) на 15% (P=0,031) и 39%

( $P < 0,001$ ) относительно северных и южных районов области так и более поздних альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера на 38% ( $P = 0,001$ ) относительно южных районов. В молоке коров из хозяйств пригорода Омска выявлено значительное повышение и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера на 40% ( $P = 0,002$ ) по сравнению с южными районами, альдегид-динитрофенилгидразонов основного характера на 30 % ( $P = 0,030$ ) и 47% ( $P = 0,001$ ) относительно северных и южных районов области, а также кетон-динитрофенилгидразонов основного характера на 58% ( $P = 0,007$ ) по отношению к северным районам области. Повышение содержания продуктов стимулированной окислительной деструкции белков в непосредственной близости промышленного центра при всех указанных длинах волн свидетельствует о более интенсивном течении свободнорадикальных процессов в данном районе.

Выявлены некоторые отличия в показателях индуцируемой окислительной модификации белков при сравнении молока хозяйств северного и южного районов в летний период. Так, если содержание ранних альдегидфенилгидразонов в северных районах области выше на 28% ( $P < 0,001$ ), то уровень поздних кетон-динитрофенилпроизводных основного характера на 48% ( $P = 0,014$ ) ниже по отношению к южным районам. Полученные данные могут свидетельствовать о разной способности молока этих районов подвергаться окислительной деструкции.

Содержание металлкаatalизированных карбонильных производных белков молока  
в летний период года, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Длина волны	Районы исследования		
	Северные n=10	Южные n=12	Пригород Омска n=10
	<b>Индукцируемая окислительная модификация белков (е.о.п. на 1 мл молока)</b>		
274 нм (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	6,98 (6,91; 7,45)	5,03 <sup>**</sup> (4,56; 5,60)	8,18 <sup>*xx</sup> (7,80; 9,80)
356 нм (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	6,30 (4,65; 7,83)	4,84 (4,50; 5,37)	7,86 <sup>x</sup> (7,59; 8,47)
370 нм (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	6,55 (5,04; 7,83)	4,83 (4,38; 5,58)	8,08 <sup>x</sup> (7,14; 8,95)
430 нм (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3,76 (3,00; 4,62)	3,76 (2,85; 4,52)	5,23 <sup>*x</sup> (4,55; 5,66)
530 нм (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0,25 (0,21; 0,42)	0,48* (0,40; 0,51)	0,59* (0,39; 0,63)

Примечание: \* - статистически значимые различия от северных районов, P<0,05;  
<sup>x</sup> - статистически значимые различия от южных районов, P<0,05; <sup>xx</sup> - статистически значимые различия от южных районов, P<0,001;

Оценивая степень окислительной деструкции белков в летний период года, выявили достоверное повышение продуктов спонтанной и металлкаatalизированной ОМБ молока, полученного из хозяйств в пригородной зоне по отношению к более отдаленным от города районам. Уровень спонтанной ОМБ в пригороде проявляется в повышении как ранних маркеров окисления белков альдегиддинитрофенилгидразонов (274 нм), так и более поздних кетондинитрофенилгидразонов основного характера. Данный факт свидетельствует о

более высоком окислительном потенциале организма животных в пригородной зоне промышленного центра. Повышение показателей металлкаatalизированной окислительной деструкции молока крупного рогатого скота пригородной зоны по отношению к другим районам области наблюдается при всех исследуемых длинах волн. Это свидетельствует о большей подверженности окислительной деструкции белков молока от хозяйств пригородной зоны под действием неблагоприятных факторов внешней среды и как следствие более низкой антиоксидантной способностью молока данного района.

Можно предположить, что изменение составных частей молока и рациона кормления животных в зимний период года способны привести к изменению интенсивности окислительной деструкции белков. Для этого проведено исследование ОМБ в зимний период.

Данные о содержании продуктов окислительной модификации белков молока разных районов области в зимний период представлены в таблицах 3.2.1.3 и 3.2.1.4.

Содержание продуктов спонтанной ОМБ молока выражается в повышении уровня альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера в северных районах на 35% ( $P=0,009$ ), кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера на 36% ( $P=0,035$ ) относительно молока, полученного от хозяйств, расположенных в пригородной зоне Омска. Установлено понижение уровня альдегид-динитрофенилгидразонов основного характера в молоке из хозяйств пригорода на 42% ( $P=0,014$ ) и 48% ( $P<0,001$ ) по отношению к южным и северным районам соответственно.

Однако, показатели металлкаatalизируемой ОМБ молока проявлялись существенным повышением в пригороде Омска уровня как ранних алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера (274нм) на 36% ( $P<0,001$ ) и 39% ( $P<0,001$ ), кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера на 44% ( $P=0,036$ ) и 45% ( $P=0,001$ ), так и кетон-динитрофенилгидразонов основного характера на 25% ( $P=0,007$ ) и 37% ( $P<0,001$ ) относительно южных и северных районов области соответственно.

Таблица 3.2.1.3

Содержание карбонильных производных белков молока в зимний период года, Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Длина волны	Районы исследования		
	Северные n=10	Южные n=10	Пригород Омска n=17
	<b>Спонтанная окислительная модификация белков (е.о.п. на 1 мл молока)</b>		
274 нм	5,70 (5,10; 6,70)	4,85 (4,65; 5,85)	5,95 (5,70; 6,20)
356 нм	2,34 (1,93; 2,42)	2,39 (1,26; 2,78)	1,52* (1,12; 2,22)
370 нм	2,25 (1,72; 2,78)	2,34 (1,20; 2,70)	1,44* (1,12; 2,19)
430 нм	1,93 (1,54; 2,18)	1,72 (1,22; 2,33)	1,01** <sup>x</sup> (0,56; 1,12)
530 нм	0,24 (0,15; 0,29)	0,21 (0,14; 0,24)	0,16 (0,12; 0,23)

Примечание: \* - статистически значимые различия от северных районов, P<0,05;  
\*\* - статистически значимые различия от северных районов, P<0,001; <sup>x</sup> - статистически значимые различия от южных районов, P<0,05;

Содержание более поздних алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера в молоке из пригорода Омска на 44% (P=0,014), альдегид-динитрофенилгидразонов основного характера на 38% (P=0,001) выше относительно северных районов области.

Статистически значимые различия между показателями металлкаatalизированной окислительной деструкции белков северных и южных районов области проявляются повышением кетон-динитрофенилгидразонов основного характера в молоке крупного рогатого скота южных районов на 16% ( $P=0,021$ ) относительно северных районов области

Таблица 3.2.1.4

Содержание металлкаatalизированных карбонильных производных белков молока в зимний период года, Me ( $Q_1$ ;  $Q_3$ )

Длина волны	Районы исследования		
	Северные n=10	Южные n=10	Пригород Омска n=17
	<b>Индукцируемая окислительная модификация белков (е.о.п. на 1 мл молока)</b>		
274 нм ( $Fe^{2+}/H_2O_2$ )	6,00 (5,60; 6,60)	6,25 (5,20; 7,60)	9,80 <sup>**xx</sup> (9,30;10,40)
356 нм ( $Fe^{2+}/H_2O_2$ )	3,48 (3,42; 3,51)	3,57 (2,61; 5,30)	6,18 <sup>*</sup> (4,05;6,93)
370 нм ( $Fe^{2+}/H_2O_2$ )	3,60 (3,51; 3,66)	3,65 (2,70;5,39)	6,57 <sup>*x</sup> (5,10;8,46)
430 нм ( $Fe^{2+}/H_2O_2$ )	2,04 (1,53; 2,16)	2,16 (1,68; 3,35)	3,27 <sup>**</sup> (2,64; 3,57)
530 нм ( $Fe^{2+}/H_2O_2$ )	0,32 (0,29;0,34)	0,38 <sup>*</sup> (0,34;0,45)	0,51 <sup>**x</sup> (0,47;0,58)

Примечание: \* - статистически значимые различия от северных районов,  $P<0,05$ ; \*\* - статистически значимые различия от северных районов,  $P<0,001$ ; <sup>x</sup> - статистически значимые различия от южных районов,  $P<0,05$ ; <sup>xx</sup> - статистически значимые различия от южных районов,  $P<0,001$ ;

Сравнивая данные ОМБ молока северных и южных районов области, удалось обнаружить, что молоко южных районов больше подвержено окислительной деструкции относительно молока, полученного в северных районах.

Таким образом, анализируя результаты окислительной деструкции белков молока можно выделить зону наиболее подверженную окислительной деструкции – пригород Омска, и наименее подверженную данному процессу – северные районы области.

Полученные данные дают возможность более полноценно охарактеризовать степень влияния антропогенных факторов на интенсивность свободнорадикальных процессов молока и отдельных его компонентов в частности.

При пересчете данных на грамм белка содержание продуктов спонтанной и металлкатализированной ОМБ молока различается в разных районах Омской области. Результаты содержания продуктов окислительной деструкции белков молока на грамм белка в исследуемых районах области в летний и зимний период года представлены в таблицах 3.2.1.5 - 3.2.1.8.

Уровень спонтанной окислительной деструкции белков молока проявляется увеличением альдегид-динитрофенилгидразонов (274 нм) в пригороде на 20% ( $P=0,001$ ) и 29% ( $P=0,003$ ) относительно северных и южных районов области. Обнаружено повышение кетон-динитрофенилгидразонов основного характера являющихся маркерами поздней деструкции белков в пригороде на 38% ( $P=0,007$ ) и 51% ( $P<0,001$ ) относительно северных и южных районов соответственно. Выявлены различия в ОМБ молока северных и южных районах области. В северных районах уровень кетон-динитрофенилгидразонов основного характера на 20% ( $P=0,015$ ) выше по отношению к южным районам.

Содержание карбонильных производных белков молока в летний период года,  
Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Длина волны	Районы исследования		
	Северные n=10	Южные n=10	Пригород Омска n=10
<b>Спонтанная окислительная модификация белков (е.о.п /г белка)</b>			
274 нм	134,91 (116,77; 160,57)	119,16 (99,45; 145,83)	168,71 <sup>*x</sup> (164,43; 187,07)
356 нм	87,62 (71,69; 117,07)	74,64 (72,79; 100,75)	84,34 (80,61; 89,80)
370 нм	84,43 (70,59; 109,76)	68,13 (52,14; 90,43)	79,16 (74,79; 86,73)
430 нм	66,48 (59,17; 72,12)	59,56 (54,40; 80,05)	69,81 (66,91; 76,53)
530 нм	6,29 (5,93;8,28)	5,05 <sup>*</sup> (4,27; 6,02)	10,23 <sup>*xx</sup> (7,91; 12,04)

Примечание: \* - статистически значимые различия от северных районов, P<0,05;  
<sup>x</sup> - статистически значимые различия от южных районов, P<0,05; <sup>xx</sup> - статистически значимые различия от южных районов, P<0,001;

Результаты металкатализируемой ОМБ свидетельствуют о повышении альдегид-динитрофенилгидразонов (274 нм) в молоке пригорода на 12% (P=0,042) и 51% (P<0,001) в сравнении с пробами молока из хозяйств северных и южных районов.

Таблица 3.2.1.6

Содержание металлкаatalизируемых карбонильных производных белков молока в летний период года, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Длина волны	Районы исследования		
	Северные n=10	Южные n=10	Пригород Омска n=10
<b>Индукцируемая окислительная модификация белков (е.о.п / г белка)</b>			
274 нм (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	232,10 (204,44; 238,75)	130,29** (125,00; 149,33)	265,07** <sup>xx</sup> (234,69; 298,66)
356 нм (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	183,09 (177,57; 218,88)	127,84* (116,91; 149,22)	260,96** <sup>xx</sup> (230,45; 288,10)
370 нм (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	192,74 (186,65; 214,45)	126,14* (118,38; 146,46)	256,17** <sup>xx</sup> (213,49; 304,42)
430 нм (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	116,32 (110,26; 143,12)	94,73* (77,81; 120,74)	151,11** <sup>xx</sup> (134,9; 186,62)
530 нм (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	8,42 (7,05; 10,74)	12,95* (10,24; 13,83)	19,6* (10,80; 21,43)

Примечание: \* - статистически значимые различия от северных районов, P<0,05; \*\* - статистически значимые различия от северных районов, P<0,001; <sup>xx</sup> - статистически значимые различия от южных районов, P<0,001;

В молоке из хозяйств пригорода обнаружено увеличение уровня алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера на 30% (P=0,042) и на 51% (P<0,001), кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера на 25% (P=0,041) и на 50% (P<0,001), а также альдегид-динитрофенилгидразонов основного характера на 23% (P=0,022) и на 37%

( $P < 0,001$ ) по сравнению с северными и южными районами соответственно. Содержание кетон-динитрофенилгидразонов основного характера в молоке из пригорода повышено на 57% ( $P = 0,003$ ) относительно северных районов.

Таблица 3.2.1.7

Содержание карбонильных производных белков молока в зимний период года,  
Me ( $Q_1$ ;  $Q_3$ )

Длина волны	Районы исследования		
	Северные n=10	Южные n=12	Пригород Омска n=17
<b>Спонтанная окислительная модификация белков (е.о.п./г белка)</b>			
274 нм	208,28 (196,43; 237,99)	169,00* (137,61; 189,06)	195,44 <sup>x</sup> (189,71; 225,81)
356 нм	87,97 (77,10; 95,65)	76,30 (62,93; 90,15)	62,35* (45,77; 75,24)
370 нм	98,38 (78,21; 117,80)	77,74 (59,57; 85,39)	58,20* (45,81; 72,03)
430 нм	68,93 (59,46; 86,17)	53,42* (50,91; 74,60)	38,17** <sup>xx</sup> (28,01; 43,36)
530 нм	8,89 (7,21; 10,36)	6,33* (5,43; 7,73)	6,50* (5,91; 7,46)

Примечание: \* - статистически значимые различия от северных районов,  $P < 0,05$ ; \*\* - статистически значимые различия от северных районов,  $P < 0,001$ ; <sup>x</sup> - статистически значимые различия от южных районов,  $P < 0,05$ ; <sup>xx</sup> - статистически значимые различия от южных районов,  $P < 0,001$ ;

В молоке из северных районах увеличено содержание альдегид-динитрофенилгидразонов (274 нм) на 44% ( $P < 0,001$ ), альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера на 30% ( $P = 0,015$ ), кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера на 35% ( $P = 0,011$ ), альдегид-

динитрофенилгидразонов основного характера на 19% ( $P=0,019$ ) относительно южных районов. Содержание же кетон-динитрофенилгидразонов основного характера в молоке коров южных районов на 35% ( $P=0,035$ ) выше по сравнению с северными районами.

Таблица 3.2.1.8

Содержание металлкаatalизируемых карбонильных производных белков молока в зимний период года, Me ( $Q_1; Q_3$ )

Длина волны	Районы исследования		
	Северные n=12	Южные n=12	Пригород Омска n=11
<b>Индукцируемая окислительная модификация белков (е.о.п /г белка)</b>			
274 нм (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	238,14 (216,22; 241,53)	244,11 (191,44; 262,16)	363,28** <sup>xx</sup> (315,11; 438,6)
356 нм (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	138,74 (134,36; 146,27)	163,85 (134,30; 181,46)	228,89** (177,17; 254,03)
370 нм (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	142,47 (127,50; 143,48)	155,94 (136,90; 176,71)	250,42* <sup>x</sup> (164,06; 275,57)
430 нм (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	73,91 (59,07; 77,14)	80,57 (51,38, 88,19)	137,89** <sup>xx</sup> (115,31; 178,87)
530 нм (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	12,46 (11,20; 14,35)	12,29 (11,62; 15,63)	18,65** <sup>x</sup> (17,24; 22,81)

Примечание: \* - статистически значимые различия от северных районов,  $P<0,05$ ; \*\* - статистически значимые различия от северных районов,  $P<0,001$ ; <sup>x</sup> - статистически значимые различия от южных районов,  $P<0,05$ ; <sup>xx</sup> - статистически значимые различия от южных районов,  $P<0,001$ ;

Показатели спонтанной окислительной модификации белков молока в зимний период определяется понижением в пригородной зоне альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера на 29% ( $P=0,005$ ), кетон-

динитрофенилгидразонов нейтрального характера на 38% ( $P < 0,001$ ) относительно северных районов, а также альдегид-динитрофенилгидразонов основного характера на 29% ( $P < 0,001$ ) и 45% ( $P < 0,001$ ) по отношению к южным и северным районам соответственно.

В пригороде наблюдается повышение содержания индуцированных железом продуктов окислительной деструкции белков в зимний период при всех исследуемых длинах волн по отношению к северным и южным районам области.

Полученные результаты свидетельствуют о более интенсивном карбонилировании белков молока в пригороде Омска как в летний так и зимний периоды года. Возможно, данный факт объясняется наличием различных крупных промышленных предприятий, выбросов автотранспорта и других потенциально опасных объектов, находящихся в непосредственной близости от исследуемых хозяйств пригородной зоны. Загрязнения этих объектов негативно влияют как на здоровье населения крупных городов [53], так и на окружающие его организмы [44]. Проникая в организм человека и животных, химические вещества подвергаются ряду биохимических превращений результатом которых является их обезвреживание и выведение из организма. В процессе обезвреживания данных веществ наблюдается повышение образования свободных радикалов и активных форм кислорода, приводящее к свободнорадикальному окислению белков, липидов и ДНК в организме [85].

### **3.2.2 Содержание тиоловых групп в различных фракциях молока в зимний и летний сезоны года**

Соотношение белковых фракций в молоке зависит от многих факторов: породы животного, рациона кормления, стадии лактации, возраста и условий содержания животного. Фракционный состав белков молока является важным критерием, определяющим его свойства.

Одними из естественных антиоксидантов молока и молочных продуктов, замедляющими свободнорадикальное окисление являются соединения содержа-

щие в своем составе сульфгидрильные группы. К этим соединения относятся белки, пептиды и свободные аминокислоты. Эти соединения выполняют свою антиоксидантную функцию за счет подвижного атома водорода, нейтрализуя гидроксильные радикалы [33, 34].

Казеин молока имеет в своем составе по две тиоловые группы у молекулы  $\alpha_{s2}$  – казеина, и  $\chi$  – казеина, а молекула  $\beta$  – лактоглобулина содержит одну сульфгидрильную группу [90]. Доступность SH – групп зависит от разных факторов, таких как фракционный состав белков, степени технологического воздействия, вида молочного продукта [25, 56]. С целью определения содержания данных антиоксидантов в районах с различной степенью урбанизации было определено содержание доступных сульфгидрильных групп в молоке-сырье, молочной сыворотке и безбелковом надосадке молока в зимний и летний периоды года. Полученные результаты приведены в таблицах 3.2.2.1 и 3.2.2.2.

Анализируя результаты летнего периода, существенных различий по содержанию тиоловых групп в молоке-сырье и белках молока не выявлено. Определено достоверное снижение показателей доступных тиоловых групп пригородной зоны как в молочной сыворотке на 32% ( $P < 0,001$ ) и 33% ( $P < 0,001$ ), так и безбелковом надосадке молока на 12,1% ( $P = 0,005$ ) и 12,4% ( $P = 0,017$ ) по отношению к северным и южным районам.

Снижение доступных сульфгидрильных групп в молоке коров из хозяйств пригорода Омска подтверждают данные о более интенсивном окислении белков и липидов в летний период года.

Таблица 3.2.2.1

Содержание доступных сульфгидрильных групп в молоке из разных районов Омской области в летний период года, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Показатель мкмоль/л	Летний период года		
	Северные районы n=10	Южные районы n=10	Пригород Омска n=10
SH-группы молока	1412,86 (1089,08; 1530,59)	1412,86 (1353,99; 1707,20)	1324,55 (1236,25; 1648,33)
SH-группы белков молока	1050,85 (727,07; 1274,53)	1165,63 (1036,13; 1415,82)	1068,49 (962,53; 1501,10)
SH-группы сыво- ротки	397,33 (367,90; 441,48)	404,69 (375,26; 438,47)	272,24** <sup>xx</sup> (220,74; 32,74)
SH- группы в без- белковом надосадке молока	291, 38 (273,72; 362,01)	292,38 (264,89; 309,03)	256,06* <sup>x</sup> (185,42; 273,72)

Примечание: \* - статистически значимые различия от северных районов, P<0,05; \*\* - статистически значимые различия от северных районов, P<0,001; <sup>x</sup> - статистически значимые различия от южных районов, P<0,05; <sup>xx</sup> - статистически значимые различия от южных районов, P<0,001;

Результаты, полученные в зимний период, свидетельствуют о различном содержании восстановленных SH-групп в исследуемых фракциях молока. В молоке, полученном в пригороде Омска, выявлено снижение уровня доступных сульфгидрильных групп белков молока на 32% (P=0,025) и 26% (P=0,007) относительно образцов, полученных в южных и северных районах соответственно. Аналогично уменьшается содержание сульфгидрильных групп цельного молока на 13% (P=0,013) и 15% (P=0,014) относительно вышеуказанных районов. Суще-

ственных различий содержания доступных SH-групп в сыворотке молока, а также свободных тиоловых групп безбелкового фильтрата не выявлено.

Таблица 3.2.2.2

Содержание доступных сульфгидрильных групп молока в разных районах Омской области в зимний период года, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Показатель мкмоль/л	Зимний период года		
	Северные районы n=10	Южные районы n=10	Пригород Омска n=10
SH-группы молока	676,03 (618,23; 706,32)	660,29 (618,11; 706,34)	577,09* <sup>x</sup> (383,19; 615,03)
SH-группы белков молока	504,19 (472,23; 580,45)	548,75 (508,15; 600,13)	373,11* <sup>x</sup> (316,13; 462,13)
SH-группы сыво- ротки	322,13 (313,14; 331,26)	268,74 (225,12; 416,24)	265,18 (252,00; 327,28)
SH- группы в без- белковом надосад- ке молока	126,12 (115,21; 146,14)	110,65 (106,11; 132,41)	115,11 (86,36; 190,34)

Примечание: \* - статистически значимые различия от северных районов, P<0,05;<sup>x</sup> - статистически значимые различия от южных районов, P<0,05;

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 возможно данными о том, что  $\alpha$ -казеин ( $\alpha_{s1}$  и  $\alpha_{s2}$ -казеин) и  $\beta$ -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 [119]

Сравнивая данные северных и южных районов области, достоверных различий не выявлено как в летний, так и зимний периоды года.

Содержание доступных тиоловых групп в разные периоды года в пересчете на грамм белка представлены в таблице 3.2.2.3.

Таблица 3.2.2.3

Содержание доступных сульфгидрильных групп молока в разных районах Омской области, Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Показатель мкмоль/г	Северные районы n=10	Южные районы n=10	Пригород Омска n=10
<b>Летний период года</b>			
SH-группы молока	43,34 (32,61; 48,89)	36,01 (35,41; 49,2)	40,23 (38,07; 51,03)
SH-группы белков молока	32,24 (21,77; 39,80)	29,21 (27,20; 40,80)	33,46 (31,02; 43,38)
SH-группы сыво- ротки	11,98 (10,54; 12,73)	10,81 (9,59; 12,65)	9,50 (8,77; 10,38) P=0,002 P <sub>1</sub> =0,023
SH- группы в без- белковом надосад- ке молока	9,33 (8,28; 10,71)	8,28 (6,49; 8,40)	7,35 (6,70; 7,59) P=0,038
<b>Зимний период года</b>			
SH-группы молока	27,92 (23,87; 28,65)	20,48 (19,11; 25,75) P=0,314	19,78 (16,79; 23,01) P=0,014
SH-группы белков молока	21,37 (18,23; 22,94)	17,18 (16,34; 20,09) P=0,014	13,87 (12,09; 17,34) P=0,0007 P <sub>1</sub> =0,044
SH-группы сыво- ротки	12,59 (11,67; 12,79)	9,09 (7,21; 14,31)	10,36 (9,22; 11,58)
SH- группы в без- белковом надосад- ке молока	4,99 (4,12; 5,64)	3,63 (3,25; 4,80) P=0,048	3,64 (2,81; 5,12)

Примечание: Примечание: P - статистически значимые различия от северных районов, P<0,05; P<sub>1</sub>- статистически значимые различия от южных районов, P<0,05;

При пересчете полученных данных о содержании сульфгидрильных групп в различных фракциях молока на белок произошла коррекция некоторых результатов. В летний период, установлено снижение на пригородной территории содержания сульфгидрильных групп в безбелковой надсадке молока на 21% ( $P=0,038$ ) только в сравнении с показателями северных районов области. Результаты, полученные в зимний период года, свидетельствуют о понижении тиоловых групп молока из хозяйств пригорода на 29% ( $P=0,014$ ) по отношению к северным территориям области. Выявлены значительные различия сульфгидрильных групп между северными и южными районами области. Содержание SH – групп белков молока и безбелковой надсадке молока в северных районах на 20% ( $P=0,014$ ) и на 27% ( $P=0,048$ ) выше по сравнению с южными районами области.

### **3.2.3 Антиокислительная защита ферментативных компонентов молока в районах с различной степенью урбанизации**

К компонентам молока, обуславливающим антиоксидантную активность, относят ферменты нативного и микробного происхождения. К ним относят супероксиддисмутазу продуцируемую бифидо- и молочнокислыми бактериями. Данный фермент катализирует реакцию дисмутации, благодаря восстановлению супероксидных радикалов, предотвращая окисление компонентов молока. В сыром коровьем молоке значительная роль в проявлении АОА принадлежит глутатионпероксидазе, которая катализирует взаимодействие восстановленного глутатиона с пероксидом водорода и другими пероксидами [98, 99].

В таблицах 3.2.3.1 и 3.2.3.2 представлены результаты об активности СОД и ГПО молока при различной удаленности от промышленного центра.

При определении активности данных ферментов в молоке, полученном в хозяйствах, расположенных на различном расстоянии от промышленного центра, выявлены следующие отличия.

Активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы молока в летний период года, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Районы исследования	Летний период года	
	Супероксиддисмутаза СОД/л	Глутатионпероксидаза МЕ/л
Северные n=10	2035 (1800; 2200)	50,5 (42,6; 59,5)
Южные n=10	2500* (2160; 2900)	45,65 (44,2; 54,4)
Пригород Омска n=10	1690* <sup>x</sup> (1500; 1800)	41,95 (37,7; 48,5)

Примечание: \* - статистически значимые различия от северных районов,  $P < 0,05$ ;  
<sup>x</sup> - статистически значимые различия от южных районов,  $P < 0,05$ ;

Активность СОД молока, полученного в пригороде в летний период снижается на 17% ( $P=0,035$ ) и 32,5% ( $P < 0,001$ ) относительно северных и южных районов. Активность фермента в северных и южных районах различна. В молоке коров из южных районов активность СОД на 19% ( $P=0,018$ ) выше по отношению к северным районам. Статистически значимых различий между показателями активности ГПО молока не обнаружено.

В зимний период активность СОД в молоке коров из пригорода и южных районов на 44% ( $P < 0,001$ ) и 43% ( $P=0,025$ ) выше относительно северных районов. Однако активность ГПО молока из хозяйств пригорода на 41% ( $P=0,004$ ) и 47% ( $P < 0,001$ ) ниже относительно южных и северных районов области.

Это может отражать более интенсивные проявления окислительного стресса у животных из пригородной зоны Омска в зимний период года, когда рацион кормления содержит меньше антиоксидантов и сильнее подвергается негативным

воздействиям окружающей среды. Различий активности ГПО между северными и южными районами выявлено не было.

Таблица 3.2.3.2

Активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы молока в зимний период года, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Район исследования	Зимний период года	
	Супероксиддисмутаза СОД/л	Глутатионпероксидаза МЕ/л
Северные n=10	1205 (1040;1450)	42,25 (30,0; 47,2)
Южные n=10	2145** (1770;2500)	37,8 (32,90; 43,8)
Пригород Омска n=10	2100* (1250; 2300)	22,2** <sup>x</sup> (13,8;29,1)

Примечание: \*\* - статистически значимые различия от северных районов, P<0,001;  
<sup>x</sup>- статистически значимые различия от южных районов, P<0,05;

В таблице 3.2.3.3 представлены результаты об активности СОД и ГПО молока при различной удаленности от промышленного центра в пересчете на грамм белка.

Пересчет данных по активности ферментов антиоксидантной защиты молока на белок произошла коррекция некоторых результатов. По результатам летнего периода в молоке из пригорода установлено снижение активности супероксиддисмутаза на 21% (P=0,009) по сравнению с южными районами. В северных районах выявлено повышение активности ГПО молока на 22% (P=0,043) и на 26% (P=0,009) по сравнению с южными районами и пригородом соответственно.

Зимний период характеризуется снижением активности ГПО в молоке из хозяйств пригорода на 43% (P<0,001) и на 32% (P=0,020) по сравнению с север-

ными и южными районами. В северных районах выявлено понижение активности СОД молока по сравнению с южными районами области.

Таблица 3.2.3.3

Активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы молока в разные периоды года, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Районы исследования	Летний период года	
	Супероксиддисмутаза СОД/г белка	Глутатионпероксидаза МЕ/г белка
Северные n=10	62,49 (54,89; 67,45)	1,65 (1,43; 1,78)
Южные n=10	69,8 (65,6; 81,42) P=0,165	1,29 (1,19; 1,55) P=0,043
Пригород Омска n=10	49,57 (44,09; 60,4) P=0,218 P <sub>1</sub> =0,009	1,23 (1,14; 1,40) P=0,009 P <sub>1</sub> =0,529
Зимний период года		
Северные n=10	49,58 (37,32; 55,98)	1,60 (1,25; 1,69)
Южные n=10	67,93 (53,81; 85,31) P=0,014	1,32 (1,06; 1,49) P=0,085
Пригород Омска n=10	68,49 (38,11; 88,89) P=0,133 P <sub>1</sub> =0,960	0,90 (0,47; 1,134) P<0,001 P <sub>1</sub> =0,020

Примечание: P - статистически значимые различия от северных районов, P<0,05;

P<sub>1</sub>- статистически значимые различия от южных районов, P<0,05;

### 3.3 Сравнительная характеристика свободнорадикальных процессов молока коз зааненской и швейцарской пород и коров черно-пестрой породы

Молоко обладает высокими пищевыми свойствами, обусловленными его компонентным составом. Состав молока разных пород животных имеет определенные отличия [33, 34]. Например, козье молоко обладает иным фракционным составом белков относительно коровьего молока. Содержание  $\alpha_{s1}$  - казеина в козьем молоке в 2 раза меньше, а  $\beta$  - казеина в 2,3 раза выше, чем в коровьем, что способствует образованию более мягкого сгустка, легко перевариваемого в желудке человека [181]. Содержание лактозы в козьем молоке немного ниже (4,1% против 4,7%) в молоке коров. Этот факт важно учитывать людям, страдающим непереносимостью лактозы. Значительно различаются между собой по химическому составу и соотношению компонентов молочного жира коровье и козье молоко. Особенностью козьего молока является относительно малый размер жировых глобул, составляющий 2 мкм, относительно коровьего молока (21-31 мкм), что обеспечивает более легкую усвояемость молочного жира козьего молока, а также высокий уровень насыщенных жирных кислот с короткой и средней длиной цепи [196]. Существуют противоречивые данные о содержании субстратов свободнорадикального окисления, полиненасыщенных кислот, в молоке коз: по данным одних авторов оно ниже [70], а по другим данным не отличается или несколько выше [96, 251]. Уровень антиоксидантов от которого зависит степень окислительных процессов компонентов молока коз несколько выше, чем коровьем молоке. Так в козьем молоке содержание ретинола, аскорбиновой кислоты выше при одинаковом уровне токоферола [70].

Учитывая вышеизложенное, можно предположить, что различия химического состава козьего и коровьего молока могут влиять на интенсивность свободнорадикальных процессов и антиокислительную активность данных видов молока.

### 3.3.1 Антиокислительные свойства козьего и коровьего молока

В литературе имеются публикации [23, 27] о том, что в летний период года молоко коз обладает более высокими антиокислительными свойствами а также повышенным содержанием витамина С и доступных тиоловых групп по сравнению с молоком полученным от коров. Для выяснения воздействия климатических условий, породы животного, особенностей рациона нами проведено определение антиоксидантных свойств коровьего и козьего молока определенных пород в зимний период года.

Для исследования использовали полученное в лесостепной зоне натуральное молоко коров черно-пестрой породы и коз швейцарской и зааненской пород.

Результаты антиокислительной активности молока коз швейцарской и зааненской пород и коровьего молока черно-пестрой породы в зимний период года представлены в таблице 3.3.1

Таблица 3.3.1

Антиокислительная активность козьего и коровьего молока в зимний период,  
Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Показатель	Молоко коров черно-пестрой породы n=10	Молоко коз швейцарской породы n=10	Молоко коз зааненской породы n=10
Снижение светосуммы в %	76,58 (69,63; 81,63)	62,34* (60,34; 64,69)	64,68* (56,59; 64, 84)

Примечание: \* - статистически значимые различия от черно-пестрой породы, P<0,05;

Антиокислительную активность определяли по способности угнетать хемилюминесценцию модельной системы, полученной из желточных липопротеинов куриного желтка по Г.К. Клебанову (1998), и выражали % от угнетения светосуммы ХЛ модельной системы.

Полученные результаты свидетельствуют о различной степени антиокислительной активности в молоке животных исследуемых пород. Антиокислительная активность коровьего молока на 16% ( $P=0,003$ ) и на 19% ( $P=0,005$ ) выше относительно козьего молока зааненской и швейцарской пород. Существенных различий между показателями антиокислительной активности молока коз вышеуказанных пород не выявлено.

С целью установления интенсивности свободнорадикального окисления определены параметры  $Fe^{2+}$  - индуцированной люминолзависимой хемилюминесценции: светосумма, спонтанная светимость, амплитуда быстрой и медленной вспышки таблица 3.3.2.

Сравнение параметров хемилюминесценции коровьего и козьего молока зааненской породы выявило, что спонтанная светимость козьего молока данной породы на 51% ( $P=0,02$ ) больше, чем коровьего молока черно-пестрой породы. Данный факт указывает на то, что даже без внешнего источника свободнорадикального окисления в молоке зааненской породы окислительные процессы происходят интенсивнее. Аналогично в молоке коз зааненской породы: амплитуда медленной вспышки (максимальная светимость) на 31% ( $P=0,02$ ) выше, чем в коровьем молоке.

Полученные данные могут свидетельствовать о меньшем содержании веществ в зимний период, способных препятствовать свободнорадикальным процессам. При сравнении показателей хемилюминесценции козьего молока швейцарской породы и коровьего молока значительных отклонений выявлено не было.

Не установлено существенных изменений между исследуемыми показателями козьего молока вышеуказанных пород. Это может указывать на одинаковую способность козьего молока обеих пород подвергаться и противостоять окислительным процессам.

Показатели хемилюминесценции натурального коровьего и козьего молока в зимний период, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>2</sub>)

Породы	Светосумма, Усл.ед.*мин	Спонтанная светимость, Усл.ед.	Вспышка, Усл.ед	Максимальная светимость Усл.ед
Коровы черно-пестрой породы n=10	14,77 (12,82; 18,53)	2,30 (1,8; 2,46)	4,50 (3,52; 4,92)	2,85 (2,21; 3,37)
Козы швейцарской породы n=10	16,45 (14,4; 21,05)	2,46 (2,13; 4,06)	4,53 (3,42; 5,3)	2,66 (2,29; 3,73)
Козы зааненской породы n=10	19,84 (25,73; 33,86)	3,48* (3,19; 4,1) P=0,02	6,10 (4,19; 8,78)	3,75* (3,38; 5,98) P=0,02

Примечание: \* - статистически значимые различия от черно-пестрой породы, P<0,05;

Анализируя полученные в зимний период результаты, можно сделать заключение о том, что более высокой АОА обладает коровье молоко черно-пестрой породы по отношению к исследуемым образцам козьего молока. Интенсивность свободнорадикальных процессов козьего молока зааненской породы значительно выше, чем в коровьем молоке.

### 3.3.2. Интенсивность процессов липопероксидации козьего и коровьего молока

Учитывая различия в структуре и составе молочного жира коровьего и козьего молока и сезонные изменения его жирокислотного состава, вызывает интерес насколько липиды данных видов молока способны подвергаться процессам липопероксидации. Для этого определены первичные (диеновые конъюгаты) вторичные (кетодиены и сопряженные триены) и конечные (основания Шиффа) продукты пероксидации липидов. Результаты о содержании продуктов липопероксидации в молоке коров черно-пестрой породы и коз швейцарской и зааненской пород в летний и зимний периоды года представлены в таблицах 3.3.2.1-3.3.2.4

Данные, полученные в летний период, свидетельствуют о снижении уровня вторичных продуктов пероксидации липидов козьего молока зааненской породы в гептановой фазе на 36% ( $P=0,030$ ) и на 40% ( $P=0,043$ ) по отношению к козьему молоку швейцарской и коровьему молоку черно-пестрой породы. Это свидетельствует о меньшей интенсивности окисления нейтральных липидов в молоке коз зааненской породы в летний период.

Значительных изменений первичных и конечных продуктов как в гептановой, так и изопропанольной фазе липидного экстракта не выявлено. Однако, выявлено снижение содержания вторичных продуктов липопероксидации в изопропанольной фазе липидного экстракта в молоке коз швейцарской породы на 30% ( $P=0,020$ ) относительно коровьего молока. Следовательно, фосфолипиды коровьего молока сильнее подвержены перекисному окислению в данный период года.

Определение продуктов перекисного окисления липидов в зимний период выявило, что содержание первичных и вторичных продуктов липопероксидации в гептановой фазе липидного экстракта козьего молока зааненской и швейцарской пород не выявило существенных отличий от показателей коровьего молока.

Относительное содержание продуктов ПОЛ в гептановой фазе липидного экстракта молока, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Молоко	Гептановая фаза (е.о.и.)		
	Диеновые конъюгаты	Кетодиены и сопряженные триены	Шиффовые основания
	Летний период		
Коров черно-пестрой породы (n=10)	0,97 (0,94; 1,11)	0,113 (0,089; 0,121)	0,0005 (0,0000; 0,0020)
Коз швейцарской породы (n=10)	0,94 (0,93; 1,01)	0,107 (0,100; 0,120)	0,0141 (0,0000; 0,0632)
Коз зааненской породы (n=10)	1,06 (0,89; 1,18)	0,068 <sup>*x</sup> (0,028; 0,105)	0,0021 (0,0000; 0,0102)

Примечание: \* - статистически значимые различия от молока коров черно-пестрой породы,  $P < 0,05$ ; <sup>x</sup> - статистически значимые различия от молока коз швейцарской породы,  $P < 0,05$ ;

Однако содержание конечных продуктов липопероксидации в гептановой фазе липидного экстракта свидетельствуют о некотором повышении шиффовых оснований козьего молока зааненской породы по сравнению с коровьим и козьим молоком швейцарской породы, что может быть обусловлено более интенсивными процессами липопероксидации в молоке коз зааненской породы.

Содержание кетодиенов и сопряженных триенов в изопропанольной фазе липидного экстракта козьего молока швейцарской породы на 30% ( $P = 0,048$ ) ниже чем в коровьем молоке.

В изопропанольной фазе, содержащей фосфолипиды, уровень шиффовых оснований не повышался во всех видах молока, что указывает на одинаковую скорость липопероксидации.

Таблица 3.3.2.2

Относительное содержание продуктов ПОЛ молока в изопропанольной фазе липидного экстракта, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Молоко	Изопропанольная фаза (е.о.и.)		
	Диеновые конъюгаты	Кетодиены и сопряженные триены	Шиффовые основания
	Летний период		
Коров черно-пестрой породы (n=10)	0,52 (0,38; 0,84)	0,46 (0,36; 0,57)	0,003 (0,000; 0,008)
Коз швейцарской породы (n=10)	0,55 (0,50; 0,79)	0,32* (0,32; 0,44)	0,000 (0,000; 0,009)
Коз зааненской породы (n=10)	0,67 (0,47; 0,78)	0,33 (0,30; 0,48)	0,000 (0,000; 0,008)

Примечание: \* - статистически значимые различия от молока коров черно-пестрой породы, P<0,05;

Полученные результаты свидетельствуют о различной интенсивности процессов пероксидации липидов молока исследуемых пород животных. Нейтральные липиды в молоке коз зааненской породы в летний период менее подвержены окислительной деструкции.

Относительное содержание продуктов ПОЛ молока в гептановой фазе липидного экстракта, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Молоко	Гептановая фаза (е.о.и.)		
	Диеновые конъюгаты	Кетодиены и сопряженные триены	Шиффовые основания
	Зимний период		
Коров черно-пестрой породы (n=10)	0,90 (0,70; 0,94)	0,14 (0,10; 0,34)	0,000 (0,000; 0,001)
Коз швейцарской породы (n=10)	0,89 (0,860; 0,95)	0,13 (0,100; 0,140)	0,000 (0,000 0,020)
Коз зааненской породы (n=10)	0,93 (0,89; 1,07)	0,08 (0,06; 0,58)	0,035 <sup>**x</sup> (0,004; 0,030)

Примечание: <sup>\*\*</sup> - статистически значимые различия от молока коров черно-пестрой породы, P<0,001; <sup>x</sup> - статистически значимые различия от молока коз швейцарской породы, P<0,05;

Тем не менее, в зимний период скорость процессов липопероксидации молока коз данной породы максимальна по отношению к остальным исследуемым образцам молока.

Липиды молока коров черно-пестрой породы наиболее подвержено процессам липопероксидации. В молоке коз швейцарской породы выявлено значительное снижение вторичных продуктов пероксидации липидов в изопропанольной фазе липидного экстракта, как в зимний, так и летний периоды года.

Относительное содержание продуктов ПОЛ молока в изопропанольной фазе  
липидного экстракта, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Молоко	Изопропанольная фаза (е.о.и.)		
	Диеновые конъюгаты	Кетодиены и сопряженные триены	Шиффовые основания
	Зимний период		
Коров черно-пестрой породы (n=10)	0,48 (0,35; 0,54)	0,46 (0,38; 0,59)	0,004 (0; 0,04)
Коз швейцарской породы (n=10)	0,45 (0,4; 0,54)	0,32* (0,25; 0,32)	0,0002 (0; 0,018)
Коз зааненской породы (n=10)	0,70 (0; 1,35)	0,73 (0,00; 0,93)	0,000 (0;000 0,014)

Примечание: \* - статистически значимые различия от молока коров черно-пестрой породы, P<0,05;

Это свидетельствует о меньшей подверженности фосфолипидов данного вида молока процессам ПОЛ.

### 3.3.3 Окислительная модификация белков и содержание доступных тиоловых групп в молоке коз и коров

Для наиболее полной оценки степени свободнорадикального повреждения молока исследуемых пород животных нами определены показатели окислительной модификации белков молока и содержание доступных сульфгидрильных

групп в молоке, молочной сыворотке и безбелковом надосадке молока в летний и зимний периоды года. Результаты проведенных исследований представлены в таблицах 3.3.7 и 3.3.8.

Таблица 3.3.7

Содержание ОМБ и доступных сульфгидрильных групп коровьего и козьего молока, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>2</sub>)

Показатель	Молоко коров черно-пестрой породы n=10	Молоко коз швейцарской породы n=10	Молоко коз зааненской породы n=10
	<b>Летний период</b>		
ОМБ е.о.п./мл (370 нм)	2,23 (1,26; 3,84)	2,14 (1,43; 4,58)	3,32 (1,74; 4,07)
SH группы молока (ммоль/л)	1,676 (1,647; 1,911)	1,661 (1,382; 1,794)	1,647 (1,323; 1,882)
SH группы белков молока (ммоль/л)	1,554 (1,491; 1,788)	1,387 (1,010; 1,684)	1,497 (1,155; 1,788)
SH группы сыво- ротки (ммоль/л)	0,352 (0,279; 0,390)	0,350 (0,309; 0,397)	0,264* (0,232; 0,324) P=0,047
SH- группы в без- белковом надосадке молока (ммоль/л)	0,176 (0,122; 0,191)	0,231* (0,198; 0,300) P=0,007	0,181 (0,154; 0,228)

Примечание: \* - статистически значимые различия от молока коров черно-пестрой породы, P<0,05;

При сравнении параметров окислительной деструкции белков молока исследуемых пород животных в летний период достоверных отличий выявлено не

было. Это можно объяснить повышенным содержанием в молоке витаминов-антиоксидантов в рационе кормления животных в данный период.

Содержание доступных тиоловых групп в молоке и белках молока не отличается во всех исследуемых образцах. Однако установлено снижение количества доступных сульфгидрильных групп в сыворотке молока коз зааненской породы на 25% ( $P=0,047$ ) по отношению к сыворотке коровьего молока. Меньшее содержание доступных SH-групп в сыворотке козьего молока зааненской породы по сравнению с другими исследуемыми образцами, возможно, за счет сниженного содержания  $\beta$ -лактоглобулина и альбумина сыворотки крови. Именно эти фракции содержат больше аминокислотных остатков цистеина[34, 94].

Значительных изменений при сравнении тиоловых групп сыворотки козьего молока швейцарской породы и коровьего молока не выявлено. Выявлено повышение содержания свободных сульфгидрильных групп в безбелковой надосадке козьего молока швейцарской породы на 24% ( $P=0,007$ ) относительно коровьего молока черно-пестрой породы.

Определение продуктов окислительной модификации белков в исследуемых образцах молока в зимний период выявило значительное снижение содержания карбонильных производных в молоке коз зааненской породы на 20% ( $P=0,03$ ) и на 31% ( $P=0,05$ ) относительно коровьего и козьего молока швейцарской породы.

Содержание доступных сульфгидрильных групп в молоке коз зааненской породы на 26% ( $P=0,035$ ) выше по отношению к коровьему молоку черно-пестрой породы. Наименьшее количество доступных SH-групп содержится в белках молока коров черно-пестрой породы. Содержание тиоловых групп в козьем молоке швейцарской породы существенно не отличается от содержания таковых в коровьем молоке ( $P=0,74$ ). Наибольшее количество сульфгидрильных групп содержится в белках молока коз зааненской породы; их количество на 30,7% больше ( $P=0,01$ ), чем в коровьем молоке и на 20,5% ( $P=0,04$ ) больше, чем в козьем швейцарской породы.

Содержание ОМБ и доступных сульфгидрильных групп коровьего и козьего молока, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>2</sub>)

Показатель	Молоко коров черно-пестрой породы n=10	Молоко коз швейцарской породы n=10	Молоко коз зааненской породы n=10
	<b>Зимний период</b>		
ОМБ е.о.п./мл (370 нм)	4,6 (1,1; 6,0)	2,6 (1,6; 4,0)	1,4 (0,95; 1,5)* <sup>x</sup>
SH группы молока (ммоль/л)	0,662 (0,479;0,931)	0,727 (0,363;0,818)	0,899* (0,608; 0,931)
SH группы белков молока (ммоль/л)	0,508 (0,392;0,614)	0,504 (0,255;0,683)	0,748* <sup>x</sup> (0,608; 0,931)
SH группы сыво- ротки (ммоль/л)	0,305 (0,190; 0,480)	0,255 (0,170; 0,310)	0,212* (0,180; 0,290)
SH- группы в без- белковом надосад- ке молока (ммоль/л)	0,106 (0,084; 0,135)	0,180* (0,132;0,240)	0,143* (0,105;0,285)

Примечание: \* - статистически значимые различия от молока коров черно-пестрой породы, P<0,05; <sup>x</sup>- статистически значимые различия от молока коз швейцарской породы, P<0,05;

Увеличение содержания тиоловых групп в козьем молоке может быть обусловлено различным количественным содержанием белков молока и особенностями их фракционного состава. Возможно, что в козьем молоке зааненской по-

роды содержится больше  $\alpha_{s2}$  – казеина и  $\kappa$ -казеина, которые содержат SH-группы у остатка цистеина (по два остатка каждая фракция) [34, 94]. Повышенное содержание тиоловых групп в белках молока коз зааненской породы объясняет минимальную степень окислительной деструкции белков молока коз данной породы.

Существенных различий между содержанием тиоловых групп в сыворотке козьего молока швейцарской породы и коровьего молока в проведенных нами исследованиях не выявлено. Однако, количество доступных сульфгидрильных групп в сыворотке козьего молока зааненской породы на 32,2% ниже ( $P=0,04$ ) по сравнению с сывороткой коровьего молока. Так как содержание доступных сульфгидрильных групп в сыворотке козьего молока швейцарской и зааненской пород достоверно не отличаются ( $P=0,841$ ), можно предположить, что фракционный состав сывороточных белков козьего молока данных пород относительно одинаков. Установлено снижение доступных тиоловых групп в безбелковом надосадке молока коров черно-пестрой породы на 26% и на 41% по сравнению с молоком коз зааненской и швейцарской пород.

В зимний период установлено повышение свободных тиоловых групп в козьем молоке в сравнении с коровьим, что может быть обусловлено увеличенным содержанием свободных серосодержащих аминокислот и пептидов. Таким образом, если содержание сульфгидрильных групп в молоке коз швейцарской породы больше в свободной форме, то в молоке коз зааненской породы содержание сульфгидрильных групп увеличено в большей степени за счёт SH-групп белков молока и в меньшей степени за счёт свободных SH-групп в сравнении с коровьим молоком.

## ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Негативное воздействие антропогенных факторов на окружающую среду в настоящее время приобрело глобальный характер. Промышленные предприятия и автотранспорт осуществляют выброс в окружающую среду большого количества химических веществ, оказывающих токсическое действие на представителей животного и растительного мира [7]. Установлено, что воздействие техногенного загрязнения окружающей среды на живые организмы и недостаточное содержание антиоксидантов в рационе кормления приводит к повышению в них интенсивности свободнорадикальных процессов [20, 46, 76]. Повышение свободнорадикального окисления сопровождается увеличением АФК, оказывающих повреждающее действие на компоненты клеток – белки, липиды, нуклеиновые кислоты. Окислительный стресс как результат дисбаланса про- и антиоксидантов способствует у людей приобретению целого ряда различных поражений верхних дыхательных путей, кроветворных органов, онкологических заболеваний [37]. Существуют данные о том, что показатели ОМБ при послеродовом эндометрите изменяются не только в крови, но и в молоке крупного рогатого скота [28]. По результатам Веселова П.В. (2010) на антиокислительную активность и степень свободнорадикального окисления оказывает влияние время года, особенности рациона кормления и ряд других экологических факторов среды [14].

В нашей работе для выявления интенсивности воздействия факторов урбанизации на интенсивность свободнорадикального окисления в молоке крупного рогатого скота использован ряд биохимических методов анализа и статистическая обработка данных. К данным методам относится определение продуктов перексидации липидов, спонтанной и металлкаatalизированной окислительной модификации белков, хемилюминесцентный анализ, определение уровня доступных сульфгидрильных групп в молоке, белках молока, молочной сыворотке, в безбелковой надосадочной жидкости и активности супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы. Определение данных биохимических параметров позволит наиболее полно оценить степень влияния антропогенных факторов на антиоксидантную ак-

тивность молока и как следствие интенсивность свободнорадикального окисления основных его компонентов.

Для выполнения поставленной цели нами в зимний период проведено определение антиокислительной активности молока коров черно-пестрой породы, полученного в пригородной зоне и на удалении не менее 100-150 км к северу и югу от промышленного центра с использованием модельной системы, состоящей из липопротеинов куриного желтка. Результаты исследования выражали в процентах снижения значений светосуммы хемилюминесценции при добавлении исследуемого молока, принимая за 100% данные модельной системы. Полученные данные свидетельствуют о том, что антиокислительная активность в молоке, полученном из хозяйств пригородной зоны ниже на 12% и 9%, чем в южных и северных районах соответственно. Между показателями антиокислительной активности молока из хозяйств северных и южных районов области значительных различий выявлено не было. Данный факт, возможно, объясняется тем, что хозяйства пригородной зоны расположены на расстоянии не более 20 километров от города и сильнее подвержены различным воздействиям техногенных факторов внешней среды, снижающих антиоксидантную активность молока в данных хозяйствах.

Для уточнения степени окислительной деструкции компонентов молока определены продукты липопероксидации и окислительной модификации исследуемых проб в летний и зимний период года. Определение первичных, вторичных и конечных продуктов пероксидации липидов проведено с использованием экстракционно-спектрометрического метода с отдельной регистрацией липопероксидов в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта исследуемых проб молока, так как известно, что в гептан экстрагируются нейтральные липиды, а в изопропанольную фазу липидного экстракта - фосфолипиды. Полученные результаты свидетельствуют о различном содержании продуктов липопероксидации молока в зависимости от расположения хозяйств относительно промышленного центра как в зимний, так и летний периоды года. В зимний период, содержание конечных продуктов пероксидации липидов оснований Шиффа в гептановой фазе липидного экстракта молока хозяйств в пригороде Омска на 37,5% ( $P=0,017$ ) вы-

ше по сравнению с южными районами области. Данный факт свидетельствует о более интенсивном нарушении нативной структуры нейтральных липидов в молоке хозяйств пригородной зоны Омска по отношению к южным районам области.

В изопропанольной фазе липидного экстракта молока в зимний период года наблюдались значительные различия в содержании вторичных и конечных продуктов липопероксидации. Уровень кетодиенов и сопряженных триенов молока хозяйств пригородной зоны города на 24% ( $p=0,037$ ) выше, чем в северных районах Омской области. В то же время зарегистрировано существенное повышение оснований Шиффа в молоке из хозяйств пригорода на 68% ( $P=0,004$ ) и 72% ( $P<0,001$ ) по сравнению с молоком северных и южных районов соответственно.

Увеличение уровня конечных продуктов липопероксидации молока, полученного в пригородной зоне города по отношению к другим районам области как в гептановой, так и изопропанольной фазах липидного экстракта свидетельствует о более интенсивном течении перекисного окисления липидов молока в этом регионе в исследуемый период года.

В летний период, наблюдались существенные изменения кетодиенов и сопряженных триенов гептановой фазе липидного экстракта: их содержание в молоке, полученном в непосредственной близости от промышленного центра на 26% ( $P=0,04$ ) и 32% ( $P=0,02$ ) выше по отношению к северным и южным районам области соответственно. Уровень диеновых конъюгатов в данной фазе липидного экстракта молока в пригороде на 4,2% ( $P=0,003$ ) относительно северных районов области.

Содержание диеновых конъюгатов в изопропанольной фазе липидного экстракта в молоке северных районах на 9,5% выше по сравнению с пригородом. Однако уровень вторичных продуктов липопероксидации молока, полученного от хозяйств пригорода Омска на 20% ( $P=0,010$ ) и 34% ( $P=0,047$ ) выше по сравнению с молоком из южных и северных районов области. Данный факт свидетельствует о более интенсивном окислении фосфолипидов молока, полученного в пригороде Омска в летний период года.

Отсутствие значимых изменений содержания оснований Шиффа в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта молока в летний период года, возможно, объясняется более богатым антиоксидантами пастбищным рационом кормления животных в данный период.

Существенных различий продуктов ПОЛ между северными и южными районами, как в зимний, так и летний период года выявлено не было. Возможно, это объясняется удаленностью от промышленного центра и как следствие меньшим поступлением из внешней среды прооксидантов антропогенного характера [20].

Анализируя полученные данные о содержании продуктов липопероксидации в зимний и летний периоды года, можно сделать вывод о том, что липиды молока, полученного из хозяйств, находящихся в непосредственной близости от промышленного центра, легче подвергаются процессам ПОЛ. В зимний период года фосфолипиды молока, полученного в пригородной зоне сильнее подвержены процессам перекисного окисления относительно летнего периода. Данный факт можно объяснить недостатком витаминов и минеральных веществ [87] в рационе кормления в данный период года.

Следует заметить, что в летний период года наблюдается более интенсивное свободнорадикальное окисление нейтральных липидов, проявляющееся в повышенном содержании кетодиенов и сопряженных триенов в гептановой фазе липидного экстракта. Это можно объяснить сезонными изменениями состава молочного жира [34]. Летний период характеризуется повышенным содержанием ненасыщенных жирных кислот в липидах молока, которые легче подвергаются окислению.

Данные о содержании продуктов пероксидации липидов в молоке, полученном в разноудаленных хозяйствах от промышленного центра, позволяют выделить хозяйства пригорода, находящихся на расстоянии от 5 до 15 км от города, как зону с наиболее интенсивным перекисным окислением липидов молока рупного рогатого скота.

Уровень спонтанной окислительной ОМБ определяли методом, основанным на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-

динитрофенилгидразином и образованием производных 2,4-динитрофенилгидразона. Оценку металлкатализируемого окисления белков молока проводили по содержанию карбонилированных белков при индуцировании свободнорадикального окисления системой  $Fe^{2+}/H_2O_2$ . Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов регистрировали спектрофотометрически при следующих длинах волн: 274, 356, 370, 430 и 530 нм [30].

Предполагая о том, что изменение составных частей молока и рациона кормления животных в разные периоды года способны привести к изменению интенсивности окислительной деструкции белков молока, данное исследование проведено как в летний, так и зимний периоды года.

Уровень спонтанной ОМБ молока отличается в разных районах Омской области. Содержание альдегид-динитрофенилгидразонов (274 нм) - ранних маркеров окислительной деструкции белков, в молоке, полученном от хозяйств пригорода г. Омска на 15,6 % ( $P=0,01$ ) и 16 % ( $P=0,02$ ), кетон-динитрофенилгидразонов основного характера на 36,4 % ( $P=0,02$ ) и 42,4 % ( $P=0,003$ ) выше относительно северных и южных районов области, соответственно. Отсутствие изменений между показателями ОМБ молока в северных и южных районах области, возможно, объясняется наличием богатого антиоксидантами рациона кормления в данный период года и менее интенсивным воздействием негативных факторов окружающей среды.

Аналогично увеличению продуктов спонтанной ОМБ молока в пригороде происходит повышение ее металлкатализируемых показателей: ранних маркеров окислительной деструкции белков (274 нм) на 15% ( $P=0,031$ ) и 39% ( $P<0,001$ ) относительно северных и южных районов области, так и более поздних альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера на 38% ( $P=0,001$ ) относительно южных районов. В молоке из хозяйств пригорода Омска выявлено значительное повышение и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера на 40% ( $P=0,002$ ) по отношению к южным районам, альдегид-динитрофенилгидразонов основного характера на 30 % ( $P=0,030$ ) и 47% ( $P=0,001$ ) относительно северных и южных районов области, а также кетон-динитрофенилгидразонов основного ха-

рактера на 58% ( $P=0,007$ ) относительно северных районов области. Повышение содержания продуктов стимулированной окислительной деструкции белков молока в непосредственной близости промышленного центра при всех указанных длинах волн свидетельствует о более интенсивном течении свободнорадикальных процессов в молоке данного района.

Выявлены некоторые отличия в показателях индуцируемой окислительной модификации белков при сравнении молока хозяйств северного и южного районов в летний период. Так если содержание ранних альдегидфенилгидразонов в молоке северных районов области выше на 28% ( $P<0,001$ ), то уровень поздних кетон-динитрофенилпроизводных основного характера на 48% ( $P=0,014$ ) ниже по отношению к южным районам. Полученные данные, могут свидетельствовать о разной способности молока этих районов подвергаться окислительной деструкции.

Оценивая степень окислительной деструкции белков в летний период года, выявили достоверное повышение продуктов спонтанной и металлкатализируемой ОМБ молока, полученного от хозяйств в пригородной зоне по отношению к более отдаленным от города районам. Уровень спонтанной ОМБ молока в пригороде проявляется повышением как ранних маркеров окисления белков - альдегид-динитрофенилгидразонов (274 нм) так и более поздних кетон-динитрофенилгидразонов основного характера. Данный факт свидетельствует о более высоком окислительном потенциале организма животных в пригородной зоне промышленного центра. Повышение показателей металлкатализируемой окислительной деструкции молока крупного рогатого скота пригородной зоны по отношению к другим районам области наблюдается при всех исследуемых длинах волн. Это свидетельствует о большей подверженности окислительной деструкции белков молока из хозяйств пригородной зоны под действием неблагоприятных факторов внешней среды и как следствие более низкой антиоксидантной способностью молока данного района.

Содержание продуктов спонтанной ОМБ в зимний период выражается повышением уровня альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера в

северных районах на 35% ( $P=0,009$ ), кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера на 36% ( $P=0,035$ ) относительно молока, полученного из хозяйств, расположенных в пригородной зоне Омска. Установлено понижение уровня альдегид-динитрофенилгидразонов основного характера в молоке из хозяйств пригорода на 42% ( $P=0,014$ ) и 48% ( $P<0,001$ ) по отношению к южным и северным районам соответственно.

Однако, показатели металлкаatalизируемой ОМБ молока проявлялись существенным повышением в пригороде Омска уровня как ранних алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера (274нм) на 36% ( $P<0,001$ ) и 39% ( $P<0,001$ ), кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера на 44% ( $P=0,036$ ) и 45% ( $P=0,001$ ), так и кетон-динитрофенилгидразонов основного характера на 25% ( $P=0,007$ ) и 37% ( $P<0,001$ ) относительно южных и северных районов области соответственно.

Содержание более поздних алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера в молоке их хозяйств пригорода Омска на 44% ( $P=0,014$ ), альдегид-динитрофенилгидразонов основного характера на 38 % ( $P=0,001$ ) выше относительно северных районов области.

Статистически значимые различия между показателями металлкаatalизированной окислительной деструкции белков молока из северных и южных районов области проявляется повышением кетон-динитрофенилгидразонов основного характера в молоке крупного рогатого скота южных районов на 16% ( $P=0,021$ ) относительно северных районов области. Сравнивая данные ОМБ молока северных и южных районов области, удалось обнаружить, что молоко южных районов больше подвержено ОМБ молока коров относительно молока полученного в северных районах.

Таким образом, анализируя результаты окислительной деструкции белков молока можно выделить зону наиболее подверженную окислительной деструкции – пригород Омска, и наименее подверженную данному процессу – северные районы области.

Полученные результаты свидетельствуют о более интенсивном карбонилировании белков молока хозяйств пригорода Омска, как в летний, так и в зимний периоды года. Возможно, данный факт объясняется наличием различных крупных промышленных предприятий, выбросов автотранспорта и других потенциально опасных объектов находящихся в непосредственной близости от исследуемых хозяйств пригородной зоны.

Для определения компонентов антиоксидантной системы молока, полученного на различном расстоянии от промышленного центра, нами определено содержание доступных SH-групп по модифицированной методике[89] в молоке, сыворотке (супернатант после внесения лимонной кислоты – рН 4,6 и центрифугирования в течение 15 мин) и свободных доступных сульфгидрильных группах, полученных путем осаждения всех белков молока. Количество сульфгидрильных групп определяли с помощью ДТНБ.

В летний период определено достоверное снижение показателей доступных тиоловых групп пригородной зоны как в молочной сыворотке на 32% ( $P < 0,001$ ) и 33% ( $P < 0,001$ ), так и безбелковом надосадке молока на 12,1% ( $P = 0,005$ ) и 12,4% ( $P = 0,017$ ) по отношению к северным и южным районам. Снижение доступных сульфгидрильных групп в исследуемых фракциях молока из пригорода подтверждают данные о более интенсивном окислении белков и липидов в летний период года.

Результаты, полученные в зимний период, свидетельствуют о различном содержании восстановленных SH-групп в исследуемых фракциях молока. В молоке, полученном в хозяйствах пригорода Омска, выявлено снижение уровня доступных сульфгидрильных групп белков молока на 32% ( $P = 0,025$ ) и 26% ( $P = 0,007$ ) относительно образцов, полученных в южных и северных районах, соответственно. Аналогично уменьшается содержание сульфгидрильных групп цельного молока на 13% ( $P = 0,013$ ) и 15% ( $P = 0,014$ ) относительно вышеуказанных районов. Существенных различий содержания доступных SH-групп в сыворотке молока, а также свободных тиоловых групп безбелкового фильтрата не выявлено.

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 возможно данными о том, что  $\alpha$ -казеин ( $\alpha_{s1}$  и  $\alpha_{s2}$ -казеин) и  $\beta$ -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 [119]

Сравнивая данные о содержании тиоловых групп в исследуемых фракциях молока из северных и южных районов области достоверных различий не выявлено, как в летний, так и зимний период года.

К компонентам молока, обуславливающим антиоксидантную активность, относят ферменты нативного и микробного происхождения. К ним относят супероксиддисмутазу и глутатионпероксидазу.

При определении активности данных ферментов в молоке, полученном в хозяйствах расположенных на различном расстоянии от промышленного центра, выявлены следующие отличия. Активность СОД молока, полученного в пригороде в летний период снижается на 17% ( $P=0,035$ ) и 32,5% ( $P<0,001$ ) относительно северных и южных районов города. Активность фермента в северных и южных районах различна. В молоке из хозяйств южных районов активность СОД на 19% ( $P=0,018$ ) выше по отношению к северным районам. Статистически значимых различий между показателями активности ГПО молока не обнаружено.

В зимний период активность СОД в молоке пригорода и южных районов на 44% ( $P<0,001$ ) и 43% ( $P=0,025$ ) выше относительно северных районов. Повышение активности СОД можно рассматривать как адаптивную реакцию на повышенное образование супероксидного аниона при развитии окислительного стресса. Однако активность другого фермента антиоксидантной защиты - ГПО молока хозяйств пригорода на 41% ( $P=0,004$ ) и 47% ( $P<0,001$ ) ниже относительно южных и северных районов области. Снижение активности глутатионпероксидазы может быть вызвано дефицитом глутатиона в молоке хозяйств пригорода. Различий активности ГПО молока между северными и южными районами выявлено не было.

Это может быть вызвано одинаковой скоростью образования обезвреживаемых данными ферментами радикалов в вышеуказанных районах.

Анализируя результаты комплекса исследований по определению степени воздействия факторов урбанизации на антиокислительную активность и интенсивность свободнорадикальных процессов молока, полученного на различном удалении от промышленного центра, можно сделать заключение о том, что молоко, полученное в пригородной зоне, обладает самой низкой антиокислительной активностью и в большей степени подвержено процессам окислительной деструкции липидов и белков, как в летний, так и зимний период года. Эти результаты подтверждаются значительным снижением уровня доступных тиоловых групп в молочной сыворотке и безбелковом надосадке молока в летний период, а также в молоке и белках молока в зимний период года. Нарушение тиол-дисульфидного обмена, уменьшение тиоловых групп в безбелковом надосадке молока, уровень которых отражает содержание глутатиона, вероятно приводит к снижению активности ГПО молока в пригородной зоне по отношению к северным и районам области в зимний период года.

Учитывая различия молока коров и коз по компонентному и химическому составу можно предположить, что эти отличия могут повлиять на интенсивность свободнорадикальных процессов и антиокислительную активность данных видов молока.

В литературе имеются данные, [27, 33] о том, что в летний период года молоко коз обладает более высокими антиокислительными свойствами по сравнению с коровьим молоком. Для выяснения воздействия климатических условий, породы животного, особенностей рациона нами проведено определение антиоксидантных свойств коровьего и козьего молока определенных пород в зимний период года.

Объектами исследования являлись полученное в лесостепной зоне натуральное молоко коров черно-пестрой породы и коз швейцарской и зааненской пород.

Полученные результаты свидетельствуют о степени антиокислительной активности в молоке животных исследуемых пород. Антиокислительная активность коровьего молока на 16% ( $P=0,003$ ) и на 19% ( $P=0,005$ ) выше относительно козьего молока зааненской и швейцарской пород. Существенных различий между показателями антиокислительной активности молока коз вышеуказанных пород не выявлено.

Для установления интенсивности свободнорадикального окисления определены параметры  $Fe^{2+}$  - индуцированной люминолзависимой хемиллюминесценции: светосумма, спонтанная светимость, амплитуда быстрой и медленной вспышки.

При сравнении параметров хемиллюминесценции коровьего и козьего молока зааненской породы выявлено, что спонтанная светимость козьего молока данной породы на 51% ( $P=0,02$ ) больше, чем коровьего молока черно-пестрой породы. Данный факт указывает на то, что даже без внешнего источника свободнорадикального окисления в молоке зааненской породы окислительные процессы происходят интенсивнее. Аналогично амплитуда медленной вспышки (максимальная светимость) на 31% ( $P=0,02$ ) молока коз зааненской породы выше, чем в коровьем молоке. Полученные данные могут свидетельствовать о меньшем содержании веществ в зимний период, способных препятствовать свободнорадикальным процессам. При сравнении показателей хемиллюминесценции козьего молока швейцарской породы и коровьего молока значительных отклонений выявлено не было. Не установлено существенных изменений между исследуемыми показателями козьего молока вышеуказанных пород. Это может указывать на одинаковую способность козьего молока обеих пород противостоять окислительным процессам.

Анализируя результаты, полученные в зимний период, можно сделать заключение о более высокой АОА коровьего молока черно-пестрой породы по отношению к исследуемым образцам козьего молока. Интенсивность свободнорадикальных процессов козьего молока зааненской породы значительно выше, чем молока коров.

Учитывая различия в структуре и составе молочного жира коровьего и козьего молока и сезонные изменения его жирокислотного состава, вызывает интерес, насколько липиды данных видов молока способны подвергаться процессам липопероксидации. Для этого определены первичные вторичные и конечные продукты пероксидации липидов.

Данные полученные в летний период свидетельствуют о снижении уровня вторичных продуктов пероксидации липидов козьего молока зааненской породы в гептановой фазе на 36% ( $P=0,030$ ) и на 40% ( $P=0,043$ ) по отношению к козьему молоку швейцарской и коровьему молоку черно-пестрой породы. Это свидетельствует о меньшей интенсивности окисления нейтральных липидов в молоке коз зааненской породы в летний период.

Значительных изменений первичных и конечных продуктов как в гептановой, так и изопропанольной фазах липидного экстракта молока не выявлено. Однако выявлено снижение содержания вторичных продуктов липопероксидации в изопропанольной фазе липидного экстракта в молоке коз швейцарской породы на 30% ( $P=0,020$ ) относительно коровьего молока. Следовательно, фосфолипиды коровьего молока сильнее подвержены перекисному окислению в данный период года.

Определение продуктов перекисного окисления липидов в зимний период выявило, что содержание первичных и вторичных продуктов липопероксидации в гептановой фазе липидного экстракта козьего молока зааненской и швейцарской пород не выявило существенных отличий от показателей коровьего молока.

Однако содержание конечных продуктов липопероксидации в гептановой фазе липидного экстракта свидетельствуют о некотором повышении шиффовых оснований козьего молока зааненской породы по сравнению с коровьим и козьим молоком швейцарской породы, что может быть обусловлено более интенсивным процессом липопероксидации в молоке коз зааненской породы. Содержание кетодиенов и сопряженных триенов в изопропанольной фазе липидного экстракта козьего молока швейцарской породы на 30% ( $P=0,048$ ) ниже чем в коровьем молоке. В изопропанольной фазе, содержащей фосфолипиды, уровень шиффовых

оснований не повышался во всех видах молока, что указывает на одинаковую скорость липопероксидации.

Полученные результаты свидетельствуют, о различной интенсивности процессов пероксидации липидов молока исследуемых пород животных. Нейтральные липиды в молоке коз зааненской породы в летний период менее подвержены окислительной деструкции. Тем не менее, в зимний период скорость процессов липопероксидации молока коз данной породы максимальна по отношению к остальным исследуемым образцам молока. Этот факт подтверждает данные о снижении антиокислительной активности молока коз зааненской породы.

Липиды молока коров черно-пестрой породы наиболее подвержены процессам липопероксидации в летний период. В молоке коз швейцарской породы выявлено значительное снижение вторичных продуктов пероксидации липидов в изопропанольной фазе липидного экстракта, как в зимний, так и летний периоды года. Это свидетельствует о меньшей подверженности фосфолипидов молока процессам ПОЛ.

Для наиболее полной оценки степени свободнорадикального повреждения молока исследуемых пород животных нами определены показатели окислительной модификации белков молока и содержание доступных сульфгидрильных групп в молоке, молочной сыворотке и безбелковом надосадке молока в летний и зимний периоды года.

При сравнении параметров окислительной деструкции белков молока исследуемых пород животных в летний период достоверных отличий выявлено не было. Это можно объяснить повышенным содержанием в молоке витаминов-антиоксидантов в рационе кормления животных в данный период.

Содержание доступных тиоловых групп в молоке и белках молока не отличается во всех исследуемых образцах. Однако установлено снижение количества доступных сульфгидрильных групп в сыворотке молока коз зааненской породы на 25% ( $P=0,047$ ) по отношению к сыворотке коровьего молока. Меньшее содержание доступных SH-групп в сыворотке козьего молока зааненской породы по сравнению с другими исследуемыми образцами, возможно, за счет сниженного со-

держания  $\beta$ -лактоглобулина и альбумина сыворотки крови. Именно эти фракции содержат аминокислотные остатки цистеина[34, 94]. Значительных изменений при сравнении тиоловых групп сыворотки козьего молока швейцарской породы и коровьего молока не выявлено. Установлено повышение содержания свободных сульфгидрильных групп в безбелковом надосадке козьего молока швейцарской породы на 24% ( $P=0,007$ ) относительно коровьего молока черно-пестрой породы.

Определение продуктов окислительной модификации белков исследуемых образцов молока в зимний период выявило значительное снижение содержания карбонильных производных в молоке коз зааненской породы на 20% ( $P=0,03$ ) и на 31% ( $P=0,05$ ) относительно коровьего и козьего молока швейцарской породы.

Полученные данные о содержании доступных сульфгидрильных групп, свидетельствуют о том, что в молоке коз зааненской породы содержится на 26% ( $P=0,035$ ) выше по отношению к коровьему молоку черно-пестрой породы. Наименьшее количество доступных SH-групп содержится в белках молока коров черно-пестрой породы. Содержание тиоловых групп в козьем молоке швейцарской породы существенно не отличается от содержания таковых в коровьем молоке ( $P=0,74$ ). Наибольшее количество сульфгидрильных групп содержится в белках козьего молока зааненской породы; их количество на 30,7% больше ( $P=0,01$ ), чем в коровьем молоке и на 20,5% ( $P=0,04$ ) больше, чем в козьем швейцарской породы. Увеличение содержания тиоловых групп в козьем молоке, может быть обусловлено различным количественным содержанием белков молока и особенностями их фракционного состава. Возможно, что в козьем молоке зааненской породы содержится больше  $\alpha_{s2}$  – казеина и  $\kappa$ -казеина, которые содержат SH-группы у остатка цистеина (по два остатка каждая фракция)[34, 94]. Повышенное содержание тиоловых групп в белках молока коз зааненской породы объясняет минимальную степень окислительной деструкции белков молока коз данной породы.

Существенных различий между содержанием тиоловых групп в сыворотке козьего швейцарской породы и коровьего молока в проведенных нами исследованиях не выявлено. Однако, количество доступных сульфгидрильных групп в сы-

воротке козьего молока зааненской породы на 32,2% ниже ( $P=0,04$ ) по сравнению с сывороткой коровьего молока. Так как содержание доступных сульфгидрильных групп в сыворотке козьего молока швейцарской и зааненской пород достоверно не отличаются ( $P=0,841$ ), можно предположить, что фракционный состав сывороточных белков козьего молока данных пород относительно одинаков.

В зимний период установлено повышение свободных тиоловых групп в козьем молоке в сравнении с коровьим, что может быть обусловлено увеличенным содержанием свободных серосодержащих аминокислот и пептидов. Таким образом, если содержание сульфгидрильных групп в молоке коз швейцарской породы больше в свободной форме, то в молоке коз зааненской породы содержание сульфгидрильных групп увеличено в большей степени за счёт SH-групп белков молока и в меньшей степени за счёт свободных SH-групп в сравнении с коровьим молоком.

Результаты исследования, полученные в летний период свидетельствуют большей подверженности коровьего молока черно-пестрой породы процессам липопероксидации при одинаковой интенсивности окислительной деструкции белков. Полученные данные подтверждают результаты предыдущих исследований [23, 27] о меньшей антиокислительной активности коровьего молока в летний период года.

Результаты зимнего периода свидетельствуют о том, что коровье молоко черно-пестрой породы обладает более сильной антиокислительной активностью по сравнению с молоком коз обеих пород. Выявлено повышение интенсивности окисления нейтральных липидов в молоке коз зааненской породы относительно коровьего молока черно-пестрой породы и козьего швейцарской породы. Однако в козьем молоке зааненской породы выявлено снижение показателей окислительной модификации белков относительно вышеуказанных пород. В свою очередь, фосфолипиды молока коз швейцарской породы менее подвержены процессам пероксидации липидов.

Таким образом, антиокислительная активность, показатели хемилюминесценции, уровень продуктов липопероксидации и окислительной модификации

белков исследуемых образцов молока свидетельствуют о существенных отличиях показателей свободнорадикального окисления молока крупного рогатого скота урбанизированного региона Омской области и коз разных пород.

На основании реализованных в данной работе задач сформулированы следующие выводы:

1. Антиокислительная активность молока коров из хозяйств, расположенных в пригородной зоне Омской области, в зимний период ниже на 12% ( $P=0,04$ ) и 9% ( $P=0,02$ ), чем в южных и северных районах. Снижение антиокислительной активности сопровождается увеличением интенсивности процессов липопероксидации в молоке коров из хозяйств пригорода Омска относительно молока коров, из хозяйств области, отдалённых от промышленного центра.
2. Воздействие комплекса факторов урбанизированных территорий выражается повышением уровня продуктов металлкаatalизируемой окислительной деструкции белков молока коров из хозяйств пригородной зоны при всех исследуемых длинах волн в летний и зимний период года. В летний период в молоке коров из хозяйств пригородной зоны относительно северных и южных районов области увеличено содержание ранних продуктов спонтанной окислительной модификации белков молока на 15,6 % ( $P=0,01$ ) и 16 % ( $P=0,02$ ), а более поздних продуктов - кетондинитрофенилгидразонов основного характера на 36,4 % ( $P=0,02$ ) и 42,4 % ( $P=0,003$ ), соответственно.
3. Содержание сульфгидрильных групп в молоке коров, полученном от хозяйств, расположенных на расстоянии не менее 150 км от промышленного центра подтверждают данные о большей интенсивности окислительной деструкции в молоке коров из хозяйств пригородной зоны. Данные летнего периода указывают на снижение в молоке коров из пригородной зоны содержания тиоловых групп, как в молочной сыворотке на 32% ( $P<0,001$ ) и 33% ( $P<0,001$ ), так и в безбелковой надосадочной жидкости молока на 12,1% ( $P=0,005$ ) и 12,4% ( $P=0,017$ ) по отношению к северным и южным районам. В зимний период выявлено снижение уровня доступных сульфгидрильных групп белков молока на 32% ( $P=0,025$ ) и 26% ( $P=0,007$ ) и содержание сульфгидрильных групп цельного молока на 13%

( $P=0,013$ ) и 15% ( $P=0,014$ ) относительно образцов полученных в южных и северных районах соответственно. Активность ферментов антиокислительной защиты снижена в молоке коров из хозяйств пригородной зоны Омска, активность СОД снижена в летний период, а активность ГПО в зимний период относительно молока из хозяйств вышеуказанных районов.

4. Антиокислительная активность молока коз зааненской породы и швейцарской породы ниже в сравнении с молоком коров черно-пестрой породы в зимний период. Козье молоко характеризуется меньшей интенсивностью процессов липопероксидации в летний период года, а в зимний период интенсивность окисления нейтральных липидов в молоке коз зааненской породы повышена относительно молока коз швейцарской породы и молока коров черно-пестрой породы. Фосфолипиды молока коз швейцарской породы менее подвержены процессам пероксидации липидов относительно молока коров черно-пестрой породы в летний и зимний периоды года.

### **Практические рекомендации**

1. По результатам исследования, при стойловом содержании крупного рогатого скота, рекомендуется на пригородной территории области использование повышенного содержания антиоксидантов в рационе кормления.
2. Для оценки качества молока крупного рогатого скота необходимо включать исследование показателей свободнорадикального окисления: продуктов липопероксидации и окислительной модификации белков молока.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

**АОА** – антиокислительная активность

**АФК** – активные формы кислорода

**ГПО** – глутатионпероксидаза

**ДТНБ** - 5,5<sup>\</sup> - дитиобис-2-нитробензойная кислота

**КАТ** - каталаза

**ОМБ** – окислительная модификация белков молока

**ОС** – окислительный стресс

**ПОЛ** – перекисное окисление липидов

**СОД** – супероксиддисмутаза

**СР** – свободные радикалы

**СРО** –свободнорадикальное окисление

**ХЛ** – хемилюминесценция

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абрамова Ж. И. Человек и противоокислительные свойства / Ж. И. Абрамова, Г. И. Оксенгендлер. – Л.: Наука, 1985. – 230 с.
2. Активация свободно-радикальных процессов – основной механизм ототоксического действия компонентов медно-цинковых колчеданных руд / Ф.Х. Камилов [и др.] // Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии : десятая юбилейная междунар. конф. – Пицунда, 2014. – С. 23.
3. Антиоксидантная защита организма при старении и некоторых патологических состояниях с ним связанных / А. А. Подколзин [и др.] // Клинич. геронтологии. – 2001. – №3-4. – С. 50–58.
4. Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / А. И. Арчаков, Ю. А. Владимиров. – М. : Наука, 1972. – 142с.
5. Балаболкин М. И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета / М. И. Балаболкин, Е. М. Клебанова // Проблемы эндокринологии. – 2000. – №6. – С. 29–34.
6. Бардымова Т. П. Перекисное окисление липидов, антиоксидантная система у больных сахарным диабетом и факторы внешней среды / Т. П. Бардымова, Л. И. Колесникова, М. И. Долгих // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – №1 (47). – С. 116–119.
7. Безруков М. Е. Оценка комбинированных эффектов загрязняющих веществ более чем двухкомпонентного раствора / М. Е. Безруков // Экологические проблемы промышленных городов : сб. науч. тр. по материалам 6-ой Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Саратов, 2013. – Ч. 1. – С. 14–16.
8. Биктемирова Р. Г. Сравнительный анализ многофункциональных показателей у детей младшего школьного возраста проживающих в крупном промышленном городе / Р. Г. Биктемирова, А. Р. Мухамедиева // Вестн. Том. гос. педагог. ун-та. – 2007. – №2–3(9-10). – С. 26-34

9. Биленко М. Б. Ишемические и реперфузионные повреждения органов: молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения / М. Б. Биленко. – М.: Мед. лит., 1989. – 368 с.
10. Биологическая профилактика комбинированного действия токсических металлов и органических веществ / Т. Д. Дегтярева [и др.] // Гигиена и санитария. – 2007. – №3. – С. 37–40.
11. Биофизика, т. 18 // Проблемы анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов. – М., 1986. – С. 95-96.
12. Болевич С. Б. Генерация активных форм кислорода лейкоцитами крови, перекисное окисление липидов и антипероксидазная защита у больных бронхиальной астмой / С. Б. Болевич // Терапевт. арх. – 1998. – №3. – С.54–57.
13. Бухарина И. Л. Характеристика элементов антиоксидантной системы адаптации древесных растений в условиях городской среды / И. Л. Бухарина // Вестн. Гос ун-та дружбы народов. Сер. экология и безопасность жизнедеятельности. – 2008. – №2. – С. 5–13.
14. Веселов П.В. Характеристика антиоксидантных свойств молока из разных эколого-географических подзон лесостепи Омской области : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.08 / Веселов Павел Владимирович. – Омск, 2010. – 24 с.
15. Владимиров Ю. А. Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях / Ю. А. Владимиров // Сорос. образоват. журн.. – 2001. – Т.7. – №1 – С. 16–2.
16. Владимиров Ю. А. Свечение, сопровождающее биохимические реакции / Ю. А. Владимиров // Сорос. образоват. журн. – 1999. – №6. – С. 25–32.
17. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю. А. Владимиров // Сорос. бщеобразоват. журн. – 2000. – Т.6, №12. – С.13–19.
18. Владимиров Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. – М. : Наука, 1972. – 142с.
19. Влияние аллоксана на систему глутатиона и окислительную модификацию белков в адипоцитах при экспериментальном диабете / В. В. Иванов [и др.] // Бюл. сиб. медицины. – 2011. – №3. – С. 44–47.

20. Влияние окислительного стресса на распространенность гиперхолестеринемий в условиях промышленного города / В. М. Боев [и др.] // Гигиена и санитария. – 2007. – №1. – С. 21–25.
21. 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.
22. Вронский В. А. Прикладная экология / В. А. Вронский. – Ростов н/Д.: Феликс, 2006. – 512 с.
23. Высокогорский В. Е. Антиоксидантная активность коровьего и козьего молока / В. Е. Высокогорский, П. В. Веселов // Молоч. пром-сть. – 2009. – №7. – С. 86.
24. Высокогорский В. Е. Антиокислительные свойства молока в разных зонах Омской области / В. Е. Высокогорский, Т. Д. Воронова, П. В. Веселов // Молоч. пром-сть. – 2009. – №10. – С.73–74.
25. Высокогорский В. Е. Антиоксидантные свойства творога / В. Е. Высокогорский, Г. В. Игнатьева // Молоч. пром-сть. – 2012. – №1. – С. 74–75.
26. Высокогорский В. Е. Влияние заквасок на антиокислительные свойства молока / В. Е. Высокогорский, Н. В. Стрельчик, Г. В. Игнатьева // Молоч. пром-сть. – 2011. – №4. – С. 28–29.
27. Высокогорский В. Е. Оценка антиокислительных свойств козьего и коровьего молока / В. Е. Высокогорский, П. В. Веселов // Вопр. питания. – 2010. – Т 79, №1. – С. 56–58.
28. Высокогорский В. Е. Пероксидация липидов и окислительная модификация белков молока и крови коров, больных послеродовым эндометритом / В. Е. Высокогорский, Т. Д. Воронова, Н. А. Погорелова // Фундамент. исслед. – 2014. – №3. – С. 81–85.
29. Высокогорский В. Е. Сигнальные функции свободных радикалов / В. Е. Высокогорский, А. В. Индутный, Д. Е. Быков // Ом. науч. вестн. – 2006. – №3(37). – С. 108–113.

30. Высокогорский В. Е. Сравнительная оценка показателей окислительной модификации белков молока крупного рогатого скота хозяйств различных эколого-географических зон Омской области / В. Е. Высокогорский, Ю. А. Подольникова, О. Н. Лазарева // *Фундамент. исслед.* – 2014. – №12, ч. 4. – С. 760–764.
31. Высокогорский В. Е. Хемилюминесцентный анализ пастеризованного молока / В. Е. Высокогорский, Г. В. Игнатьева // *Пищевая пром-сть.* – 2012. – №10. – С. 34–35.
32. Гамалей И. А. Перекись водорода как сигнальная молекула / И. А. Гамалей, И. В. Клубин // *Цитология.* – 1996. – Т.38, №12. – С. 1233–1247.
33. Горбатова К. К. Биохимия молока и молочных продуктов / К. К. Горбатова. – 3-е изд., перераб. и доп. – СПб. : ГИОРД, 2004. – 320 с. – ISBN 5-901065-48-4.
34. Горбатова К. К. Химия и физика молока / К. К. Горбатова. – СПб. : ГИОРД, 2003. – 288 с. – ISBN 5-901065-55-7.
35. Гринцова Н. А. Влияние экологических факторов на состояние иммунологической реактивности детей, инфицированных микробактериями туберкулеза / Н. А. Гринцова // *Проблемы туберкулеза.* – 2005. – №9. – С. 27–31.
36. Даутов Ф. Ф. Влияние загрязнений атмосферного воздуха на аллергическую заболеваемость детей в крупном промышленном городе / Ф. Ф. Даутов, Р. Ф. Хакимова, Н. З. Юсупова // *Гигиена и санитария.* – 2007. – №2. – С. 10-12.
37. Дедов И. И. Сахарный диабет / И. И. Дедов, М. В. Шестакова. – М.: Наука, 2003. – 445 с.
38. Донская Г. А. Антиоксидантные свойства молочной сыворотки / Г. А. Донская, Е. В. Захарова // *Молоч. пром-сть.* – 2010. – №9. – С. 72–73.
39. Донцов В. И. Фундаментальные механизмы геропротекции / В. И. Донцов, В. Н. Кутько, А. А. Подколзин. – М.: Биоинформсервис, 2002. – 464 с.
40. Доценко О. И. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах и некоторых тканях мышечной ткани в условиях низкочастотной вибрации / О. И.

Доценко, В. А. Доценко, А. М. Мищенко // Физика живого. – 2010. – Т. 18, №1 – С. 107–113.

41. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов // Вопр. медицин. химии. – 1995. – № 1. – С. 24–26.

42. Дубинина Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клиничко-биохимические аспекты / Е. Е. Дубинина. – СПб. : Мед. пресса, 2006. – 397с.

43. Егорова Н. Н. Критериальная оценка окислительно-антиокислительных процессов биосред организма в гигиенической диагностике химических факторов / Н. Н. Егорова // Гигиена и санитария. – 2006. – №5. – С. 81–83.

44. Ефремова С. Ю. Экологический мониторинг загрязнения почв / С. Ю. Ефремова, Т. А. Шариков, О. В. Лукьянец // Изв. Пензен. гос. пед. ун-та им. В. Г. Белинского. – 2011. – № 25. – С. 568–571.

45. Зенков Н. К. Окислительный стресс / Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, Е. Б. Меньщикова. – М.: Наука/Интерпериодика, 2001. – 323 с.

46. Интенсивность свободнорадикального окисления белков и липидов плазмы крови у городских и сельских школьников младшего возраста (на примере Мелеузовского р-на респ. Башкортостан) / И. В. Головатских [и др.] // Медицин. вестн. Башкортостана. – 2014. – Т.1. – С.52–56.

47. Игнатъева Г.В. Содержание липопероксидов натурального молока-сырья различных природно-климатических зон Омской области / Г.В. Игнатъева // Сборник тезисов «Молочная промышленность Сибири. VII Специализированный конгресс». – Барнаул. – 2012. – С.77-79.

48. Клебанов Г. И. Антиоксиданты. Антиоксидантная активность: методы исслед. / Г. И. Клебанов // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2006. – №2. – С. 108–117.

49. Клебанов Г.И. Оценка антиокислительных свойств плазмы крови с применением желточных липопротеидов / Г.И. Клебанов, И.В. Бабенкова, Ю.О. Теселкин // Лабораторное дело. 1988. №5. С.59-62.

50. Клебанов Г. И. Хемилюминесцентный метод исследования перекисного окисления липидов / Г. И. Клебанов, В. П. Аристова, Л. С. Толстухина // Труды / Всесоюз. науч.-исслед. ин-т медицин. и медико-техн. информ.– М., 1976. – Вып. 42 : Совершенствование методов анализа молока и молочных продуктов. – С. 48–53.

51. Коган А. Х. Фагоцитзависимые кислородные свободно-радикальные механизмы аутоагрессии в патогенезе внутренних болезней / А. Х. Коган // Вестн. Рос. акад. мед. наук. – 1999. – №2. – С. 3–10.

52. Комарова Н. Г. Изменение городской среды в урбанизированном мире / Н. Г. Комарова // Экологические проблемы промышленных городов : сб. науч. тр. по материалам 6-ой Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Саратов, 2013. – Ч. 1. – С. 64–67.

53. Копылова Р. Т. Антропогенное загрязнение окружающей среды / Р. Т. Копылова // Экологические проблемы промышленных городов : сб. науч. тр. по материалам 6-ой Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Саратов, 2013. – Ч. 1. – С. 67–69.

54. Кулинский В. И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В. И. Кулинский // Сорос. общеобразоват. журн. – 1999. – №1. – С. 2–7.

55. Лазарева О. Н. Интенсивность свободнорадикальных процессов молока и молочных продуктов по данным хемилюминесцентного анализа / О. Н. Лазарева, В. Е. Высокогорский, Т. Д. Воронова // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2010. – №3. – С.19–21.

56. Лазарева О. Н. Роль сульфгидрильных групп в формировании антиокислительных свойств молока и кисломолочных продуктов / О. Н. Лазарева, В. Е. Высокогорский // Биотехнологические системы как один из инструментов реализации «Государственной программы развития сельского хозяйства и регулиро-

вания рынков сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия на 2008-2012 годы» : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 5-летию со дня основания фак. биотехнологии, товароведения и экспертизы товаров. – Пос. Персиановский : ДонГАУ, 2008. – С. 97–100.

57. Лазарева О. Н. Влияние водных экстрактов из растительного сырья на окислительные свойства молочных продуктов. / О. Н. Лазарева, В. Е. Высокогорский, Т. Д. Воронова // Труды Кубанского государственного университета. – 2008. – №2 (11). – С. 182–186.

58. Левин Ю.М. Лечение, оздоровление, профилактика в условиях кризиса экологии организма. – М.: Просвещение, 2005. – 231с.

59. Луцак В. И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма : (обзор) / В. И. Луцак // Биохимия. – 2007. – Т. 72, вып. 8. – С. 995–1017.

60. Львовская Е. И. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов. / Е. И. Львовская, И. А. Волчегорский, С. Е. Шемяков // Вопр. мед. химии. – 1991. – №4. – С. 92–93.

61. Майстров В. И. Антиоксидантно-антирадикальная и тиол-дисульфидная системы племенных бычков под влиянием комплекса биологически активных веществ / В. И. Майстров, В. П. Галочкина, Н. С. Шевелев // Сельскохозяйственная биология. – 2006. – №2 – С. 64–68.

62. Маянский А.Н. Очерки о нейторфиле и макрофаге / А.Н. Маянский, Д.Н. Маянский. – Новосибирск: Наука – 264 с

63. Меерсон Ф. З. Адаптационная медицина: концепция долговременной адаптации / Ф. З. Меерсон. – М.: Дело, 1993. – 138с.

64. Метелица Д. И. Активация кислорода ферментными системами / Д. И. Метелица. – М. : Наука. 1982. – 254 с.

65. Мукашева М. А. Окислительная модификация белков как ранний индикатор повреждения клеток при длительном воздействии производственных факторов / М. А. Мукашева, Г. М. Тыкежанова // Междунар. журн. прикладных и фундаментальных исслед. – 2012. – № 2. – С. 78–79.

66. Мурзаева С. В. Накопление тяжелых металлов и активность антиоксидантных ферментов в пшенице при воздействии сточных вод / С. В. Мурзаева // Изв. Науч. центра Рос. акад. наук. – 2002. – №2. Т.4. – С.260 – 269.
67. Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация) / Е. Е. Дубинина [и др.] // Вопр. мед. химии. – 2000. – №4. – С. 398–409.
68. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания / Е. Б. Меньщикова [и др.]. – Новосибирск: Арта, 2008. – 284 с.
69. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова [и др.]. – М.: Слово, 2006. – 556 с.
70. Особенности состава козьего молока как компонента продуктов питания / С. В. Симоненко [и др.] // Труды / Брян. гос. ун-т. – 2009. – Т4, ч1: Биохимия. – С. 109–116.
71. Оценка состояния метаболического статуса работающего населения, проживающего в условиях промышленного города / С. И. Красиков [и др.] // Интеллект. Инновации. Инвестиции. – 2010. – №1. – С. 85–91.
72. Плацер З. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов / З. Плацер, М. Видлакова, Л. Кужела // Чехословац. мед. обозрение. – 1970. – Т.1. – №1. – С. 30–41.
73. Поберезкина Н. Б. Биологическая роль супероксиддисмутазы / Н. Б. Поберезкина, Л. Ф. Осинская // Украин. биохим. журн. – 1989. – Т.61, N2. – С.14–27.
74. Посвалюк Н. Э. Рассеянный склероз как индикатор экологического неблагополучия / Н. Э. Посвалюк, С. З. Савин // Успехи современ. естествознания. – 2004. – №12. – С. 75-76.
75. Проблема гигиенической диагностики эндоэкологического статуса на основе дисбиотических явлений / М. П. Захарченко [и др.] // Гигиена и санитария. – 2004. – №6. – С. 50–52.

76. Разработка подходов к использованию показателей оксидантного равновесия организма для оценки рисков здоровью от загрязнений атмосферного воздуха / Л. В. Хрипач [и др.] // Гигиена и санитария. – 2006. – №5. – С. 37–41.
77. Ракитский В. Н. Методические подходы к оценке окислительного стресса при воздействии антропогенных факторов внешней среды / В. Н. Ракитский, Т. В. Юдина // Гигиена и санитария. – 2006. – №5. – С. 28–30.
78. Реакция пигментной и антиоксидантной систем растений на загрязнение окружающей среды г. Калининграда выбросами автотранспорта / Г. Н. Чупахина [и др.] // Вестн. Гос. ун-та. Сер. биология. – 2012. – №2(18). – С. 171–185.
79. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных: применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
80. Регистрация хемилюминесценции составных частей сыворотки крови в присутствии двухвалентного железа / Ю. М. Лопухин [и др.] // Бюл. эксперимент. биологии. – 1983. – Т.95, №2. – С. 61–63.
81. Ройт А. Иммунология : пер. с англ. / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. – М.: Мир, 2000. – 592с.
82. Рыжикова М. А. Применение хемилюминесцентного метода для исследования антиоксидантной активности водных экстрактов из растительного сырья / М. А. Рыжикова, В. О. Рыжикова // Вопр. питания. – 2006. – №2. – С. 22–26.
83. Сарбаева Е. В. Изменение активности железосодержащих оксидаз у декоративных растений в условиях урбанизированной среды / Е. В. Сарбаева, О. Л. Воскресенская // Вестн. Гос. ун-та дружбы народов. Сер. экология и безопасность жизнедеятельности. – 2008. – №4. – С. 70–76.
84. Свободнорадикальное окисление в оценке риска здоровья / М. В. Боев [и др.] // Гигиена и санитария. – 2006. – №5. – С. 19–20.
85. Свободнорадикальное окисление и старение / В. Х. Хавинсон [и др.]. – СПб : Наука, 2003. – 327 с.

86. Семечкина В. С. Процессы липопероксидации у больных туберкулезом на территориях экологического риска / В. С. Семечкина, О. А. Воробьева, А. В. Кочкин // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – №2 (78). – С. 215–219.
87. Система мероприятий по предупреждению и уменьшению возникновения экологически зависимых заболеваний / В. Г. Маймулов [и др.] // Гигиена и санитария. – 2007. – №6. – С. 14–16.
88. Скулачев В. П. Кислород в живой клетке: добро и зло / В. П. Скулачев // Сорос. общеобразоват. журн. – 1996. – №3. – С.1–8.
89. Современные методы в биохимии. Под редакцией академика АМН СССР Ореховича В. Н.- М.: Медицина.- 1977.- 391с.
90. Состав и свойства молока как сырья для молочной промышленности : справочник / сост. Н. Ю. Алексеева [и др.] ; под ред. Я. И. Костина. – М. : Агропромиздат, 1986. – 239 с.
91. Состояние пероксидного окисления и системы антиоксидантной защиты у коров при патологическом течении послеродового периода и бесплодии / Г. Н. Блинецова [и др.] // Современные проблемы диагностики, лечения и профилактики инфекционных болезней животных и птиц : сб. науч. тр. – Екатеринбург, 2008. – С. 38–48.
92. Состояние репродуктивного здоровья, процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы у подростков, проживающих в крупном промышленном центре Ангарск / Л. И. Колесникова [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2005. – №5 (3). – С. 42–47.
93. Соцкова В. А. Показатели свободно-радикального окисления и антиоксидантной защиты как маркеры адаптационной реакции детей при действии химических загрязнителей атмосферного воздуха / В. А. Соцкова, Ф. Х. Камилов // Вестн. гос. ун-та. – 2007. – №9. – С. 166–169.
94. Твердохлеб Г. В. Химия и физика молока и молочных продуктов / Г. В. Твердохлеб, Р. И. Раманаускас. – М. : Дели принт, 2006. – 360 с. – ISBN 5 - 94343-114-4.

95. Хемилюминесцентные методы оценки функционального состояния животных: Методические рекомендации. М.: Издательская группа «БДЦ - пресс», 2005. 40с.
96. Химический состав пищевых продуктов : справочник / под ред. Скурихина, И. М., М. Н. Волгарева. – М.: Агропромиздат. – 1987. – Кн. 2. – 600 с.
97. Хрипач Л. В. Роль свободнорадикального окисления в повреждении генома факторами окружающей среды / Л. В. Хрипач, Ю. А. Ревазова, Ю. А. Рахманин // Гигиена и санитария. – 2004. – №6. – С. 16–18.
98. Шидловская В. П. Антиоксидантная активность ферментов / В. П. Шидловская, Е. А. Юрова // Молоч. пром-сть. – 2011. – № 12. – С. 48–49.
99. Шидловская В. П. Антиоксиданты молока и их роль в оценке его качества / В. П. Шидловская, Е. А. Юрова // Молоч. пром-сть. – 2010. – № 2. – С. 24–27.
100. Шинкаренко Н. В., Алесковский В. Б. Химические свойства синглетного молекулярного кислорода и значение его в биологических системах / Н. В. Шинкаренко, В. Б. Алесковский // Успехи химии. – 1982. – Т.51, N5. – С.713–735.
101. Экология человека в системе современного научного знания и глобальные проблемы человечества / Н. А. Агаджанян [др.] // Вестн. Рос. ун-т дружбы народов. Сер. социология. – 2002. – №1. – С. 74–94.
102. Янковский О. Ю. Токсичность кислорода и биологические системы. Эволюционные, экологические и медико-биологические аспекты / О. Ю. Янковский. – СПб.: Игра, 2000. – 294 с.
- \*\*\*
103. Activator protein 1 (AP-1) – and nuclear factor kB (NF-kB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis / T.-C. Hsu [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – V.28, N9. – P.1338–1348.
104. Active oxygen species play a role in mediating platelet aggregation and cyclic flow variations in severely stenosed and endothelium-injured coronary arteries / S. K. Yao [et al.] // Circ. Res. – 1993. – V.73, N5. – P. 952–967.

105. Age-dependent increase in ortho-tyrosine and methionine sulfoxide in human skin collagen is not accelerated in diabetes. Evidence against a generalized increase in oxidative stress diabetes / M. C. Wells-Knecht [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1997. – №100. – P. 839–846.
106. Albani J. R. Motions of tryptophan residues in sialylated human alpha 1-acid glycoprotein / J. R. Albani // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1996. – V.1291, N3. – P. 215–220.
107. Alper S. L. The band 3-related anion exchanged (AE) gene family / S. L. Alper // *Annu. Rev. Physiol.* – 1991. – V.53. – P. 549–564.
108. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro / A. Vazquez-Torres // *Journal of Experimental Medicine.* – 2000. – V.192. – P. 227–236.
109. Bauer V. Reactive oxygen species as mediators of tissue protection and injury / V. Bauer, F. Bauer // *Gen. Physiol. Biophys.* – 1999. – V.18. – P.7–14.
110. Berlett B. S. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress / B. S. Berlett, E. R. Stadtman // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V.272, N33. – P. 20313–20316.
111. Berliner J. A. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis / J. A. Berliner, J. W. Heinecke // *Free Radic. Biol. Med.* – 1996. – V.20, N5. – P. 707–727.
112. Biochemical changes in humans upon exposure to nitrogen dioxide while at rest / S. Chaney [et.al.] // *Arch. Environ. Hlth.* – 1981. – Vol. 36, N 2. – P. 53–58.
113. Biochemistry and pathology of radicalmediated protein oxidation / R. T. Dean [et al.] // *Biochem. J.* – 1997. – №324. – P.1–18.
114. Biological fare of amino acid, peptide, and protein hydroperoxides / S. Fu [et al.] // *Biochem. J.* – 1995. – V.311 (Pt. 3). – P.821–827.
115. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and katalase in blood / L. Guemouri [et al.] // *Clin Chem.* – 1991. – №37. – P. 1932 – 1937.
116. Brown R. S. Detection of a [3Fe-4S] cluster intermediate of cytosolic aconitase in yeast expressing iron regulatory protein 1: insights into the mechanism of Fe-S

cluster cycling / R. S. Brown, W. E. Walden // *J. Biol. Chem.* – 2002. – №277. – P.7246–7254.

117. Bunik V. I. Inactivation of the 2-oxo acid dehydrogenase complexes upon generation of intrinsic radical species / V. I. Bunik, C. Sievers, // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – №269. – P. 5004–5015.

118. Bunik V. I. 2-Oxo acid dehydrogenase complexes in redox regulation: Role of the lipoate residues and thioredoxin / V. I. Bunik // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – №270. – P. 1036–1042.

119. Changes in Structures of Milk Proteins upon Photo-oxidation. / T. K. Dalsgaard [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – № 26. – P. 10968-10976.

120. Chemistry, physiology and pathology of free radicals / L. Bergendi [et al.] // *Life Sci.* – 1999. – V.65, N18/19. – P. 1865–1874.

121. Climent I. Oxidation of the active site of glutamine synthetase: conversion of Arginine-344 to gamma-glutamyl semialdehyde / I. Climent, R. L. Levine // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1991. – № 289. – P. 371–375.

122. Davies K. J. A. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes / K. J. A. Davies, A. L. Goldberg // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V.262, N17. – P. 8220–8226.

123. Davies K. J. Protein damage and degradation by oxygen radicals : III. Modification of secondary and tertiary structure / K. J. Davies, M. E. Delsignore // *J Biol Chem.* – 1987. – V.15, №20 (262). – P.9908–9913.

124. Davies K. J. A. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells / K. J. A. Davies, A. L. Goldberg // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V.262, N17. – P. 8227–8234.

125. Del Rio L. A. A new cellular function for peroxisomes related to oxygen free radicals? / L. A. Del Rio, L. M. Sandalino, J. M. Palma // *Experientia (Basel).* – 1990. – Vol.46. – P.989 – 992.

126. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. and Shacter, E. / R. L. Levine [et al.] // *Methods Mol. Biol.* –2000. – № 99. – P.15–24.

127. Dhaunsi G. S. Peroxisomal participation in the cellular response to the oxidative stress of endotoxin / G. S. Dhaunsi, I. Singh, C. D. Hanevold // *Mol. Cell. Biochem.* – 1993. – Vol. 126. – P. 25–35.

128. *Drosophila* small cytoplasmic 19S ribonucleoprotein is homologous to the rat multicatalytic proteinase / P.-E. Falkenburg [et al.] // *Nature.* – 1988. – V.331, N6152. – P.190–192.

129. Elliott S. J. Effect of oxidant stress on calcium signaling in vascular endothelial cells / S. J. Elliott, J. G. Meszaros, W. P. Schilling // *Free Radic. Biol. Med.* – 1992. – V.13, N6. – P.635–650.

130. Farber J. M. Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation. Probable cation binding site in glutamine synthetase / J. M. Farber, R. L. Levine // *J. Biol. Chem.* – 1986. – №261. – P. 4574–4578.

131. Finkel T. Oxygen radicals and signaling / T. Finkel // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1998. – V.10, N2. – P. 248–253.

132. Fisher M. T. Oxidative modification of *Escherichia coli* glutamine synthetase . Decreases in the thermodynamic stability of protein structure and specific changes in the active site conformation / M. T. Fisher, E. R. Stadtman // *J. Biol. Chem.* – 1992. – № 267. – P. 1872– 1880.

133. Floor E. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay / E. Floor, M. G. Wetzel // *J. Neurochem.* – 1998. – №70. – P. 268–275.

134. Free oxygen radicals contribute to platelet aggregation and cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured canine coronary arteries / H. Ikeda [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 1994. – V.24, N7. – P. 1749–1756.

135. Fu S. L. Structural identification of valine hydroperoxides and hydroxides on radical-damaged amino acids, peptide, and protein molecules / S. L. Fu [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 1995. – V.19, N3. – P. 281–292.

136. Caraceni P. Proteins but not nucleic acids are molecular targets for the free radical attack during reoxygenation of rat hepatocytes. / P. Caraceni [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 1997. – Vol. 2, № 23. – P. 339–344.
137. Gardner P. R. Superoxide Sensitivity of the *Escherichia coli* Aconitase / P. R. Gardner, I. Fridovich // J. Biol. Chem. – 1991. – №266. – P. 19328–19333.
138. Gebicki J. M. Protein hydroperoxides as new reactive oxygen species / J. M. Gebicki // Redox Rep. – 1997. – V.3, N2. – P. 99–110.
139. George P. The reaction between metmyoglobin and hydrogen peroxide / P. George, D. H. Irvine // Biochem. J. – 953. – V.55, N2. – P. 230–236.
140. Giulivi C. Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by (the 19S) proteasome / C. Giulivi, K. J. A. Davies // J. Biol. Chem. – 1993. – V.268, N12. – P. 8752–8759.
141. Glutathione is a cofactor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated stimulation of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup>-release in cardiac myocytes / Y. J. Suzuki [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 1998. – V.24, N2. – P. 318–325.
142. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals / E. Pigeolet [et al.] // Mech. Ageing Dev. – 1990. – V.51, N3. – P. 283–297.
143. Glycated Cu, Zn-superoxide dismutase in rat lenses: evidence for the presence of fragmentation in vivo / Kawamura N. [et al.] // VIII Biennial Meeting International Society for Free Radical Research. Barcelona – Spain. 1-5 October. – Barcelona, 1996. – P. 51.
144. Gotoh N. Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and related compounds as measured by chemiluminescence / N. Gotoh, E. Nike // Biochim. Biophys. Acta. – 1992. – Vol. 282. – P. 183–184.
145. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ensures macrophage survival and generation of the superoxide anion: a study using a monocytic-differentiated HL60 subline / M. Ujihara [et al.] // Free radic. Boil. Med. – 2001. – V. 31, N11. – P.1396–1404.

146. Grimsrud P. A. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes / P. A. Grimsrud, T.J., Griffin, D.A., Bernlohr // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – №283. – P.21837-21841.
147. Grune T. Reduced 4 – hydroxynonenal regradation in hearts of spontaneously hypertensive rats during normoxia and postischemic reperfusion / T. Grune [et al.] // *Cell Biochem. Funct.* – 1994. – V.12, N2. – P. 143–147;
148. Haffner S. M. Clinical relevance of the oxidative stress concept / S. M. Haffner // *Metabolism*. – 2000. – Vol. 2, Suppl. – P. 30–34.
149. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence / B. Halliwell // *The Lancet*. – 1994. – Vol. 344, №4. – P.195–202.
150. Halliwell B. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress / B. Halliwell // *Environ. Health Perspect.* – 1994. – V.102, Suppl. 10. – P. 5–12.
151. Halliwell B. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview / B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge // *Methods Enzymol.* – 1990. – V.186. – P.1–85.
152. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor-alpha / B. Meier [et al.] // *Biochem. J.* – 1989. – V.263, N2. – P. 539–545.
153. Hunt J. V. Hydroperoxide-mediated fragmentation of proteins / J. V. Hunt, J. A. Simpson, R. T. Dean // *Biochem. J.* – 1988. – V.250, N1. – P. 87–93.
154. Hydrogen peroxide-induced structural alterations of RNase A. / P. Lasch [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V.276, N12. – P. 9492–9502.
155. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation / P. Pignatelli [et al.] // *Blood*. – 1998. – V.91, N2. – P. 484–490.
156. Induction of the soxRS regulon of *Escherichia coli* by superoxide / S. I. Liochev [et al.] // *J. Boil. Chem.* – 1999. – № 274. – P. 9479–9481.

157. Identity of the 19S «prosome» particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome) / A.-P. Arrigo [et al.] // *Nature*. – 1988. – V.331, N6152. – P.192–194.
158. Immunochemical Detection of 4 – Hydroxy-2-Nonenal-Specific Epitopes / K. Uchida [et. al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1993. – № 90. – P. 8742–8746.
159. Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of UV-induced signal transduction / S. Grob [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V.274, N37. – P. 26378–26386.
160. Interleukin-1 $\beta$  induction of c-fos and collagenase expression in particular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species / Y.Y. Lo // *J. Cell. Biochem.* – 1998. – V.69, N1. – P.19–29.
161. Josimovic L. J. Radiation-induced decomposition of tryptophan in the presence of oxygen / L. J. Josimovic, I. Jankovic, S. V. Jovanovic // *Radiat. Phys. Chem.* – 1993. – V.41, N6. – P.835–841.
162. Kan H. The association of daily diabetes mortality and outdoor air pollution in Shanghai, China / H. Kan, J. Jia, B. Chen // *J. Environ Health*. – 2004. – Vol. 67, №3. – P. 21–26.
163. Kanofsky J. R. Singlet oxygen production by soybean lipoxygenase isozymes / J. R. Kanofsky, B. Axelrod // *J. Biol. Chem.* – 1986. – V.261. – P. 1099 –1104.
164. Kato Y. Oxidative fragmentation of collagen and prolyl peptide by Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Conversion of proline residue to 2-pyrrolidone / Y. Kato, K. Uchida, S. Kawakishi // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V267, N33. – P. 23646 –23651.
165. Kim K. Nonenzymatic cleavage of proteins by reactive oxygen species generated by dithiothreitol and iron / K. Kim, S. G. Rhee, E. R. Stadtman // *J. Biol. Chem.* – 1985. – № 260. – P. 15394–15397.
166. Ku R. H. Relationships between formaldehyde metabolism and toxicity and glutathione concentrations in isolated rat hepatocytes / R. H. Ku, R. E. Billings // *Chem. Biol. Interact.* – 1984. – Vol. 51, N1. – P.25–36.

167. Kuo C. F.  $\alpha$ ,  $\beta$ -Dihydroxyisovalerate dehydratase: a superoxide-sensitive enzyme / C. F. Kuo, Mashino T., and Fridovich, I. // *J. Biol. Chem.*, 1987. – №262. – P. 4724–727.
168. Levine R. L. Oxidation of methionine in proteins: Roles in antioxidant defense and cellular regulation / R. L. Levine, J. Moskovitz, E. R. Stadtman // *IUBMB Life*. – 2000. – № 50. –P. 301–307.
169. Levine R. L. Oxidative modification of glutamine synthetase. Inactivation is due to loss of one histidine residue / R. L. Levine // *J. Boil. Chem.* – 1983. – №258. – P. 11823–11827.
170. Lens proteasome shows enhanced rates of degradation of hydroxyl radical modified alpha-crystallin / K. Murakami [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 1990. – №8. – P. 217–222.
171. Lo Y.Y. Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes / Y. Y. Lo, T. F. Cruz // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270, N20. – P. 11727–11730.
172. Lucas D. T. Declines in mitochondrial respiration during cardiac reperfusion: age-dependent inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase / D. T. Lucas, L. I. Zweda // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. – 1999. – № 96. – P. 6689–6693.
173. Ma Y.-S. Oxidative modification of glutamine synthetase by 2,2<sup>\</sup>axobis (2-amidino-propane) dihydrochloride / Y.-S. Ma, C.-C. Chao, E. R. Stadtman // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1999. – № 363. – P.129–134.
174. Madge L .A. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modulates basal and histamine-stimulated nitric-oxide release in human umbilical vein endothelial cells: Stimulation of NO sunthase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is inhibited by L-NAME and removal of extracellular calcium / L. A. Madge, A. R. Baydoun // *J. Physiol.* – 1994. – V.475. – P. 65–66.
175. Mates J. M. Antioxidant enzymes and human diseases / J. M. Mates, C. Perez-Gomez, I. Nunez de Castro // *Clin. Biochem.* – 1999. – V.32, N8. – P. 595– 603.
176. McCord J. M. Superoxide radical: controversies, contradictions, and paradoxes / J. M. McCord // *Proc. Soc. Exptl. And Med.* – 1995. – V.209 (2). – P.112–117.

177. Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue / B. I. Yoon [et al.] // *Environ. Hlth Perspect.* – 2003. – Vol. 111, N11. – P.1411–1420.
178. Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroloid plasma membrane / C. Dupuy // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V.266, N6. – P. 3739–3743.
179. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry / H. N. Kirkman [et al.] // *J. Biol, Chem.* – 1999. – Vol. 399. – P. 96 –102.
180. Mild carbon monoxide exposure impairs the developing auditory system of the rat / D. S. Webber [et. al.] // *J. Neurosci. Res.* – 2005. – Vol. 80, N5. – P.620–633.
181. Miutra H. Possible exploitation of milk protein genetic polymorphisms to improve dairy traits in sheep and goats: a review / H. Miutra, J. J. Bosnjak, C. Tripaldi // *Small Rumin. Res.* – 1998. – Vol. 27. – P. 185–195.
182. Murcia M. A. Antioxidant activity of resveratrol compared with common food additives / M. A. Murcia, M. Martinez-Tome // *J. Food Prot.* – 2001. – Vol.64. – P. 379–384.
183. Myeloperoxidase-catalyzed redox cycling of phenol promotes lipid peroxidation and thiol oxidation in HL-60 cells / R. Goldman [et.al.] // *Free Rad. Biol. Med.* – 1999. – Vol. 27, N9-10. – P.1050–1063.
184. Nelson S. R. Copper plus ascorbate inactivates lactate dehydrogenase. Are oxygen radicals involved? / S. R. Nelson, T. L. Pazdernik, F. E. Samson // *Proc. West. Pharmacol. Soc.* – 1992. – №35. – P. 37–41.
185. Nulton-Percon A. C. Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide / A. C. Nulton-Percon, L. I. Szweda // *J. Boil. Chem.* – 2001. – №276. – P. 23357 – 23361.
186. Oxidative damage of sulfur dioxide inhalation on lungs and hearts of mice / Z. Meng [et.al.] // *Environ. Res.* – 2003. – Vol. 93, N3. – P. 285–292.
187. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: An apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra / Z. I. Alam [et al.] // *J. Neurochem.* – 1997. – № 69. –P.1326–1329.

188. Oxidative post-translational modification of tryptophan residues in cardiac mitochondrial proteins / S. W. Taylor [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V.278, N.22. – P.19587–19590.
189. Oxidative stress and age-related cataract / S. Ottonello [et al.] // *Ophthalmologica.* – 2000. – №214. – P.78–85.
190. Oxidative stress induces tyrosine phosphorylation of PDGF  $\alpha$  and  $\beta$ -receptors and pp60c-src in mesangial cells / M. Gonzalez-Rubio [et al.] // *Kidney Int.* – 1996. – V.50, N1. – P.164–173.
191. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery / U. Pantke [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – V.27, №9/10. – P. 1080–1086.
192. Pacifici R. E. Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome / R. E. Pacifici, Y. Kono, K. J. A. Davies // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V.268. – P.15405–15411.
193. Particulate air pollution and the blood / A. Seaton [et al.] // *Thorax.* – 1999. – Vol. 54, N 11. – P. 1027–1032.
194. Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues in Escherichia coli glutamine synthetase mimics adenylation: relevance to signal transduction / B. S. Berlett [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 1996. – № 93. – P. 1776–1780.
195. Personal PM<sub>2.5</sub> exposure and markers of oxidative stress in blood / M. Sorensen [et al.] // *Environ. Health Perspect.* – 2003. – Vol. 111, N 2. – P. 161–166.
196. Posati L. P. Composition of Foods, Dairy and Egg Products / L. P. Posati, M. L. Orr // *Agriculture Handbook USDA-ARS / Consumer and Food Economics Institute Publishers.* - Washington. – 1976. – No.8-1. - P. 77–109.
197. Potential role of free radicals in benzene-induced myelotoxicity and leukemia / V. V. Subrahmanyam [et al.] // *Free Rad. Biol. Med.* – 1991. – Vol. 11, N5. – P. 495 – 515.
198. Presence of Cu, Zn-superoxide dismutase in human serum lipoproteins / P. Mondola [et al.] // *FEBS Lett.* – 2000. – V.467, N1. – P. 57–60.

199. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation / P. C. Heinrich [et al.] // *Biochem. J.* – 2003. – V.374 (Pt. 1). – P.1-20.
200. Protective effect on antioxidant vitamins on red blood cell lipoperoxidation induced by SO<sub>2</sub> inhalation / O. Etlik [et. al.] // *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 8. – P.31–43.
201. Protein oxidation and proteolysis in RAW 264.7 macrophages: effects of PMA activation / J. Gieche [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2001. – V.1538, N2-3. – P. 321–328.
202. Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome / T. Grune [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V.270, N5. – P.2344-2351.
203. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme / K. Takahashi [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1987. –V. 256, N2. – P. 677–686.
204. Rivett A. J. Metal-catalyzed oxidation of *Escherichia coli* glutamine synthetase: correlation of structural and functional changes / A. J. Rivett, R. L. Levine // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1990. – № 278. – P. 26–34.
205. Redox cycling of phenol induces oxidative stress in human epidermal keratinocytes / A. A. Shvedova [et al. ] // *J. Invest. Dermatol.* – 2000. – Vol. 114, N2. – P.354– 364.
206. Redox-regulated signaling by laktosylceramide in the proliferation of human aortic smooth muscle cells / A. K. Brunia [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V.272, N25. – P.15642–15649.
207. Roseman J. E. Purification of a protease from *Escherichia coli* with specificity for oxidized glutamine synthetase / J. E. Roseman, R. L. Levine // *J. Biol. Chem.* –1987. – № 262. – P. 2101–2110.
208. Rowley D. A. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide and iron salts by superoxide- and ascorbate-dependent mechanisms : relevance to the pathology of rheumatoid disease / D. A. Rowley, B. Halliwell // *Clin. Sci (Lond.)*. – 1983. – V.64, N6. – P. 649–653.

209. Sagai M. Lipid peroxidation and antioxidative protection mechanism in rat lungs upon acute and chronic exposure to nitrogen dioxide / M. Sagai, T. Ichinose // *Environ. Hlth Perspect.* – 1987. – Vol. 73. – P. 179–189.
210. Schuessler H. Oxygen effect in the radiolysis of proteins. Part 2. Bovine serum albumin / H. Schuessler, K. Schilling // *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* – 1984. – Mar. 45(3). – P. 267–281.
211. See V. Oxidative stress induces neuronal death by recruiting a protease and phosphatase-gated mechanism / V. See, J-P. Loeffler // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V.276, N37. – P. 35049–35059.
212. Selective inhibition of the activity of inducible nitric oxide synthase prevents the circulatory failure, but not the organ injury / dysfunction, caused by endotoxin / G. M. Wray [et al.] // *Shock.* – 1998. – V.9, N5. – P. 329–335.
213. Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF- $\kappa$ B signal transduction pathway / M. T. Anderson [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Shi. USA.* – 1994. – V.91, N24. – P.11527–11531.
214. Siems W. G. Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonene is not the main product / W. G. Siems // *J. Lipid Res.* – 1997. – V. 38, N3. – P.612–622.
215. Singh H. Effect of gamma radiation E. coli ribosomes. I. Inactivation by hydrogen atoms, hydroxyl radicals, hydrated electrons and secondary radicals / H. Singh, J. A. Vadasz // *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem.* – 1983. –V.44, N6. – P. 601–606.
216. Singh H. Effect of gamma radiation E. coli ribosomes. II. Efficiencies of inactivation by free radicals / H. Singh, A. Singh // *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* – 1983. – V.44., N6. – P. 607–613.
217. Singlet oxygen production by human eosinophils / J. R. Kanofsky [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1988. – V.263, N20. – P. 9692–9696.
218. Sitte N. Proteasome-dependent degradation of oxidized proteins in MRC-5 fibroblasts / N. Sitte, K. Merker, T. Grune // *FEBS Lett.* – 1998. – V.440, N3. – P. 399–402.

219. Siu G. M. Metabolism of malondialdehyde in vivo and in vitro / G. M. Siu, H. Draper // *Lipids*. – 1982. – V.17, N5. – P. 349–355.

220. Skulachev V. P. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants *Quart* / V. P. Skulachev // *Rev. Biophys.* – 1996. – №29. – P. 169–202.

221. Sobey C. G. Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate  $K^+$  channels / C. G. Sobey, D. D. Heistad, F. M. Faraci // *Stroke*. – 1997. – V.28, N11. – P. 2290–2294.

222. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease / M. J. Davies [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – V.27, N11/12. – P.1151–1163.

223. Stadtman E. R. Free radical mediated oxidation of proteins / E. R. Stadtman // *Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants*. – N.Y., 1998. – P. 51-64.

224. Stadtman E. R. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins / E. R. Stadtman, R. L. Levin // *Amino Acids*. – 2003. – №5. – P. 207–218.

225. Stadtman E. R. Implication of metal-catalyzed oxidation of enzymes in aging, protein turnover, and oxygen toxicity / E. R. Stadtman, C. N. Oliver, P. E. Starke-Reed // *Korean J. Biochem.* – 1991. – № 23. – P. 49-54.

226. Stadtman E. R. Inactivation of *Escherichia coli* glutamine synthetase by xanthine oxidase, nicotinate hydroxylase, horseradish peroxidase, or glucose oxidase: effects of ferredoxin, putidaredoxin, and menadione / E. R. Stadtman, M. E. Wittenberger // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1985. – № 239. – P. 379–387.

227. Stadtman E. R. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences / E. R. Stadtman, C. N. Oliver // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266. – P. 2005 – 2008.

228. Stadtman E. R. Oxidation of free amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions / E. R. Stadtman // *Annu. Rev. Biochem.* – 1993. – №62. – P. 797–821.

229. Stadtman E. R. Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences / E. R. Stadtman, J. Moskovitz, R. L. Levine // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2003. – № 5. – P. 577–582.
230. Stadtman E. R. Principles of enzyme regulation derived from studies on glutamine synthetase / E. R. Stadtman // In *Proceedings of The Robert A. Welch Foundation Conference on Chemical Research XXXV Chemistry at the Frontiers of Medicine*, October 28-29. – Houston, 1991. – TX. – P.182–203.
231. Stadtman E. R. Protein oxidation / E. R. Stadtman, R. L. Levine // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2000. – V.899. – P.191–208.
232. Stadtman E. R. Role of oxidized amino acids in protein breakdown and stability / E. R. Stadtman // *Methods Enzymol.* – 1995. – V.258. – P.379–393.
233. Stress, aging, and neurodegenerative disorders. Molecular mechanisms / J. Busciglio [et al.] // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1998. – V.851. – P. 429–443.
234. Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis / Y. Sun // *Free Radic. Biol. Med.* – 1990. – V.8, N6. – P. 583–599.
235. Superoxide anion-induced histamine release from rat peritoneal mast cells / M. Akagi [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* – 1994. – V.17, N5. – P.723–734.
236. Suzuki Y. J. Oxidants as stimulators of signal transduction / Y. J. Suzuki, H. J. Forman, A. Sevanian // *Free Radic. Biol. Med.* – 1997. – V.22, N1/2. – P. 269–285.
237. Suzuki Y. J. Superoxide stimulates IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup>-release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum / Y. J. Suzuki, G. D. Ford // *Am. J. Physiol.* – 1992. – V.262, N1(Pt 2). – P. H114-H116.
238. Tappel A. L. Analysis of oxidized heme proteins and its application to multiple antioxidant protection / A. L. Tappel // *Free Radical Biol. Med.* – 1999. – Vol. 27. – P. 1193–1196.
239. Thannickal V. J. Activation of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor-β1 / V. J. Thannickal, B. L. Fanburg // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V.270, N51. – P. 30334-30338.

240. The EGF receptor as central transducer of heterologous signaling systems / E. Zwick [et al.] // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1999. – V.20, N10. –P.408–412.
241. The biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation / R. T. Dean [et al.] // *Biochem. J.* – 1997. – № 324. – P. 1-18.
242. The  $\text{Ca}^{2+}$  / NADPH - dependent  $\text{H}_2\text{O}_2$  generator in thyroid plasma membrane: Inhibition by diphenyleneiodonium / D. Deme [et al.] // *Biochem. J.* – 1994. – V.301 (Pt. 1). – P.75–81.
243. Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis / R. L. Levine [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1981. – №78. – P. 2120–2124.
244. Uchida K. Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction / K. Uchida, E. R. Stadtman // *Biol. Chem.* – 1993. – №268. – P. 6388–393.
245. Ultrastructural localization of superoxide dismutase in human skin / T. Kobayashi [et al.] // *Acta Derm. Venerol.* – 1993. – V.73, N1. – P.41–45.
246. Verity M.A. Role of reactive oxygen species (ROS) in neuronal degeneration: modulation by protooncogene expression / M.A. Verity, D.E. Bredesen, T. Sarafian // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1995. V. 765. P. 340.
247. Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: Biochemical and histological studies / A. Gurel [et al.] // *J. Chem. Neuroanat.* – 2005. – Vol.29, N3. – P.173–178.
248. Walker K. W. Catalysis of oxidative protein folding by mutants of protein disulfide isomerase with a single active-site cysteine / K. W. Walker, M. M. Lyles, H. F. Gilbert // *Biochemistry.* – 1996. – V. 35, N6. – P.1972–1980.
249. Wei E. P. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite / E. P. Wei, H. A. Kontos, J. S. Beckman // *Am. J. Physiol.* – 1996. – V.40, N3. – P. H1262-1266.
250. Wolff S. P. Free radicals, lipids and protein degradation / S. P. Wolff, A. Garner, R.T. Dean // *Trends Biochem. Sci.* – 1986. – V.11. – P. 27–31.

251. Yangilar F. As a potentially functional food: goats' milk and products / F. Yangilar // J. Food Nutr. Res. – 2013. – Vol. 1, N 4. – P. 68–81.