

УДК 599.742.1:612.35

ВИДОСПЕЦИФИЧНОСТЬ ИЗМЕНЕНИЯ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА В ПЕЧЕНИ ХИЩНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ СЕМЕЙСТВА *CANIDAE* ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА

¹Сергина С.Н., ^{1,2}Илюха В.А., ³Лапински С., ³Недбала П.,
⁴Окулова И.И., ⁴Бельтюкова З.Н.

¹Институт биологии КарНЦ РАН, Петрозаводск, e-mail: cvetnick@yandex.ru;

²Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, e-mail: ilykha@bio.krc.karelia.ru;

³Краковский сельскохозяйственный институт, Краков, e-mail: s.lapinski@ur.krakow.pl;

⁴ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт охотничьего хозяйства и звероводства им. проф. Б.М. Житкова РАСХН», Киров, e-mail: labvet@mail.ru

Исследовали влияние препарата мелатонина на уровень генерации активных форм кислорода (АФК) и активность антиоксидантных ферментов (АОФ) в печени двух близкородственных видов семейства *Canidae* – фермерских серебристо-чёрных лисиц и вуалевых песцов. Выявлено, что имплантированный при длинном световом дне мелатонин способствовал ускоренному формированию зимнего меха. Показана видоспецифичность реакции изученных показателей на препарат. Наиболее восприимчивой к действию гормона оказалась антиоксидантная система песца, выходя из высоких широт, тогда как у лисицы, обитателя умеренных широт, изменений этих показателей не выявлено. Вызванное мелатонином снижение активностей супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы наряду с тенденцией к увеличению концентрации супероксидного аниона-радикала у песцов может быть связано с регуляцией гормоном иммунной системы в период подготовки к зимним условиям существования.

Ключевые слова: активные формы кислорода (АФК), антиоксидантные ферменты (АОФ), лисица, песец, мелатонин

SPECIES-SPECIFICITY OF PRO- AND ANTIOXIDATIVE BALANCE CHANGES IN CARNIVOROUS *CANIDAE* MAMMALS LIVER UNDER THE INFLUENCE OF EXOGENOUS MELATONIN

¹Sergina S.N., ^{1,2}Ilyukha V.A., ³Lapinski S., ³Niedbala P., ⁴Okulova I.I., ⁴Belyukova Z.N.

¹Institute of biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, e-mail: cvetnick@yandex.ru;

²Petrozavodsk State University Petrozavodsk, e-mail: ilykha@bio.krc.karelia.ru;

³University of Agriculture in Krakow, Krakow, Poland, e-mail: s.lapinski@ur.krakow.pl;

⁴Russian Research Institute of Game Management and Fur Farming, Russian Academy of Agricultural Sciences, Kirov, e-mail: labvet@mail.ru

It was investigated the melatonin influence on the reactive oxygen species (ROS) generation level and the antioxidant enzymes' activities in the liver of two closely related *Canidae* species – farm – breeding silver fox and arctic blue fox. It was revealed that treatment of melatonin implants led to accelerate winter fur mature in the long day length. The species-specificity of the investigated indicators reaction to hormone was highlighted. Antioxidant system of arctic blue fox, originated from high latitudes, was more sensitive to melatonin implant than in silver fox, inhabiting in temperate latitude. Both the superoxide dismutase and catalase activities decrease and the tendency of superoxide anion-radical level increase in arctic blue fox treated with melatonin implants may be connected with hormone regulation of immune system at the period of preparation for winter conditions.

Keywords: reactive oxygen species (ROS), antioxidant enzymes, silver fox, arctic blue fox, melatonin

Гормон пинеальной железы мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) принято называть таймер-гормоном, поскольку в продолжительности и амплитуде его секреции «закодирована» информация о длине светового дня, что позволяет ему играть одну из главных ролей в регуляции болюшнства суточных и сезонных адаптаций в организме млекопитающих [6, 8]. Наряду с этим эффекты мелатонина в периферических тканях характеризуются широкой функциональной плейотропией [4]. Особый интерес вызывает действие гормона на про-

и антиоксидантный статус у различных видов млекопитающих, поскольку изучение антиокислительных способностей мелатонина проводилось в основном на лабораторных животных, утративших за период долгого разведения в неволе многие черты своих диких предковых видов [4, 10].

Объектами нашего исследования явились фермерские лисицы и песцы, сохранившие присущую их диким сородичам сезонность физиологических функций. Это близкородственные виды, принадлежащие к одному семейству *Canidae*, но раз-

личающиеся географическими ареалами распространения: песец узкоспециализирован к суровым условиям высоких широт, тогда как лисица – обитатель преимущественно умеренных широт. Животных разводят в неволе для получения ценного зимнего меха. Для его ускоренного созревания часто применяют имплантируемый препарат мелатонина [9].

Цель исследования – провести сравнительно-видовой анализ реакции АОФ и системы генерации АФК в печени песцов и лисиц на имплантат мелатонина.

Материалы и методы исследований

Объекты исследования: вуалевый песец (*Alopx lagopus* L.), серебристо-чёрная лисица (*Vulpes vulpes* L.). Животные каждого вида (n = 10, половозрелые самки в возрасте 2-5 лет) были разделены на 2 равноценные группы. Особям подопытных групп в июне подкожно был имплантирован препарат, содержащий 11,2 мг мелатонина для песцов, 12 мг – для лисиц. Контрольным особям имплантация проведена не была. Образцы печени отбирали в период планового забоя, замораживали и хранили при – 25 °С до проведения анализа.

Гомогенаты печени готовили в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0). После центрифугирования при 6000g в течение 15 мин в полученных супернатантах проанализированы следующие показатели. Для определения уровня генерации АФК использовали хемилюминесцентный анализ (ХЛ) [3] с применением люминола и люцигенина как люминофоров и соли железа (FeSO₄) в качестве активатора свечения. Хемилюминесценция в присутствии люминола в основном отражает уровень супероксидного анионрадикала O₂^{•-}, тогда как в присутствии люцигенина используется для оценки образования гидроксильного и органических радикалов [3].

Спектрофотометрически измеряли активность АОФ – СОД (К.Ф. 1.15.1.1) – по модифицированной адренохромной методике [8] и каталазы (К.Ф. 1.11.1.6) – по количеству разложенной H₂O₂ [1]. Активность каталазы выражали в мкМ H₂O₂, разложенной за 1 минуту, а за 1 усл. ед. активности СОД принимали количество фермента, способное затормозить реакцию автоокисления адреналина на 50 %.

Полученные данные обрабатывали с использованием пакетов программ MS Excel и Statgraphics общепринятыми методами вариационной статистики, сравнение различий между группами проводили с применением непараметрического критерия

(U) Вилкоксона-Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия с p < 0,05.

Исследование проводилось с использованием Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН. Работа выполнена в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 г. с изменениями от 1975, 1983, 1989, 2000 гг.

Результаты исследований и их обсуждение

В результате проведённого эксперимента были выявлены межвидовые различия активностей АОФ и уровня генерации АФК у контрольных животных. Гомогенаты печени песцов характеризовались по сравнению с лисицами меньшей интенсивностью люцигенин-зависимой ХЛ, что свидетельствует о более низком уровне генерации гидроксильного и органических радикалов (табл.1). При этом у песцов выявлена более высокая активность СОД, чем у лисиц. Остальные показатели (активность каталазы и уровень образования O₂^{•-}) у контрольных животных достоверно не отличались.

Несмотря на то, что исследованные нами серебристо-чёрная лисица и вуалевый песец содержатся в условиях неволи, они сохранили присущую их диким предковым видам сезонность биологических ритмов линьки, размножения и обмена веществ. Многие виды животных, в том числе дикие лисицы и песцы, обитают в динамически изменяющихся условиях окружающей среды и испытывают колебания погодных условий, доступности ресурсов и риска заражения инфекциями в течение года. Для успешного размножения и выживания их организм вынужден распределять ресурсы среди «соревнующихся» за них физиологических систем в целях максимизации приспособленности к периодически меняющимся условиям среды [6]. Это приводит к необходимости физиологического компромисса между многими системами, в частности, между иммунной и репродуктивной – у сезонных животных в осенне-зимний период наряду с активацией иммунной функции подавлена функция размножения.

Таблица 1

Влияние мелатонина на про- и антиоксидантный статус в печени животных (M±m)

Показатель	Виды и группы животных			
	Лисица		Песец	
	контроль	опыт	контроль	опыт
1	2	3	4	5
Активность СОД, у.е./гр ткани	276,48±31,22	363,98±45,87	644,40±41,83 ♦	193,46±12,35 *
Активность каталазы, мкмоль H ₂ O ₂ /мин/гр ткани	513,54±120,33	609,24±57,40	312,35±29,55	201,09±14,80 *

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5
Интенсивность люминол-зависимой ХЛ, тыс имп./ 40 сек/ гр ткани	116,18±42,55	-9,96±66,88	-2378,47±1959,76	2221,56±1080,74
Интенсивность люцигенин-зависимой ХЛ, тыс имп./ 40 сек/ гр ткани	-2478,48±1028,93	-2890,38±667,52	-15272,40±2235,15 ♦	-12735,10±1230,58

Примечание: * – различия между контрольной и подопытной группами одного вида достоверны ($p < 0,05$); ♦ – различия между видами в контрольных группах достоверны ($p < 0,05$); отрицательные значения интенсивности ХЛ обозначают подавление свечения в образце по сравнению с холостой пробой

Среди эндокринных медиаторов сезонных изменений в организме фотозависимых млекопитающих важную роль играет мелатонин, обладающий ингибирующим действием на репродуктивную систему и неоднозначными, зависящими от многих факторов эффектами на иммунную функцию [4, 6, 11]. В ходе исследования нами было подтверждено действие экзогенного мелатонина, отвечающего за большинство сезонных адаптаций млекопитающих [6, 9]. За счёт имплантата мелатонина, введённого при длинном световом дне, обеспечивалось продолжительное высвобождение гормона в кровь, на что организм отреагировал как на стимул подготовки к зимним условиям существования. На подопытных животных были продемонстрированы ускоренное созревание зимнего меха и значительная прибавка в весе уже в сентябре (данные не представлены), тогда как контрольные животные достигали тех же показателей только в ноябре.

В связи с тем, что печень функционирует как центр промежуточного метаболизма, а также имеет рецепторы мелатонина, некоторые метаболические эффекты экзогенного гормона могут быть опосредованы через нее [9]. Так, на тундровой полевке (*Microtus oeconomus*) показано [9] стимулирующее воздействие гормона на глюконеогенез и синтез гликогена. Данные, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что в нашем исследовании экзогенный мелатонин не вызвал статистически значимых изменений уровня генерации АФК в печени подопытных животных. Тем не менее у песцов наблюдается тенденция к увеличению концентрации O_2^- (по интенсивности люминол-зависимой ХЛ) на фоне достоверного снижения активностей СОД и каталазы. Одна из важнейших функций АФК – это их участие в механизмах неспецифического иммунного ответа, в частности, окислительного взрыва фагоцитирующих клеток [2]. Необходимый для жизнедеятельности уровень АФК поддерживается как за счет си-

стем генерации, так и благодаря АОФ: СОД, катализирующей реакцию дисмутации O_2^- с образованием H_2O_2 и молекулярного кислорода, и каталазы, разлагающей H_2O_2 до воды и молекулярного кислорода. Возможно, зафиксированные нами изменения показателей АОФ связаны с ролью мелатонина в усилении иммунной функции в период подготовки к зиме. Ранее на взрослых лисицах показано, что имплантат индоламина оказывает модуляторное действие на лейкоцитоз, усиливая образование лимфоцитов и их функциональную активность [11].

Нами была отмечена видоспецифичность реакции системы генерации АФК и АОФ на экзогенный мелатонин у близкородственных видов – исследованные показатели у песца, приспособленного к арктическим условиям и разводимого в неволе, оказались чувствительнее по сравнению с лисицей. Сходные результаты были получены на представителях рода *Peromyscus* (белоногие или олени хомячки) [5]. Отмечено, что репродуктивная и иммунная системы особей, обитающих и/или родившихся в более высоких широтах, по сравнению с особями из более низких широт, восприимчивее к укорочению длины светового дня. Можно предположить, что и в нашем случае география места обитания диких предковых видов исследованных нами животных оказывает воздействие на чувствительность антиоксидантной системы к экзогенному мелатонину как имитатору эффекта укороченного фотопериода.

В отличие от исследований других авторов [10], показавших способности экзогенного мелатонина нейтрализовать АФК и/или повышать активности АОФ у крыс, нами был выявлен ингибирующий эффект гормона на активности СОД и каталазы у песцов наряду с отсутствием его воздействия на активность АОФ у лисиц (табл. 1). Помимо этого, уровни генерации АФК в печени животных двух видов также не претерпели статистически значимых измене-

ний под действием экзогенного мелатонина. Различия в реакции показателей про- и антиоксидантного статуса на гормон у крыс и изученных нами хищников могут объясняться как разницей способов введения мелатонина в организм (крысам гормон инъецировали внутривенно или давали его с питьевой водой, а хищникам – подкожно имплантировали препарат), так и тем, что исследуемые животные сформировались как вид в различных условиях. Обычная белая лабораторная крыса является линией серой или канализационной крысы *Rattus norvegicus*, которая родом из Восточной Азии [11]. Песец – выходец из высоких широт, тогда как лисица – очень пластичный вид, в отличие от песца не обладающий узкоспециализированными адаптациями, в связи с чем характеризующийся довольно обширным ареалом распространения.

Выводы

1. Имплантированный при длинном световом дне мелатонин способствовал ускоренному возникновению зимнего фенотипа животных, что подтверждает действие гормона как сезонного медиатора биологических функций.
2. Реакция и чувствительность АОФ и системы генерации АФК на экзогенный мелатонин характеризуется видоспецифичностью, определяемой экологическими особенностями формирования вида.
3. Воздействие мелатонина на антиоксиданты и уровень генерации $O_2^{\cdot -}$ в печени песцов может отражать его участие в активации иммунной системы в период подготовки к зимним условиям существования.

Список литературы

1. Bears R.F., Sizes I.N. A spectral method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // *J. Biol. Chem.* – 1952. – Vol. 195, № 1. – P. 133–140.
2. Dowling D.K., Simmons L.W. Reactive oxygen species as universal constraints in life–history evolution // *Proc. R. Soc. B.* – 2009. – Vol. 276. – P. 1737–1745. doi:10.1098/rspb.2008.1791.
3. Klinger W., Karge E., Kretzschmar M., Rost M., Schulze H.P., Dargel R., Reinemann C., Rein H. Luminol– and lucigenin–amplified chemiluminescence with rat liver microsomes. Kinetics and influence of ascorbic acid, glutathione, dimethylsulfoxide, N–t–butyl–a–phenyl–nitron, copper–ions and a copper complex, catalase, superoxide dismutase, hexobarbital and aniline // *Exp. Toxicol. Pathol.* – 1996. – Vol. 48, № 5. – P. 447–460.
4. Luchetti F., Canonico B., Betti M., Arcangeletti M., Pilolli F., Piroddi M., Canesi L., Papa S., Galli F. Melatonin signaling and cell protection function // *FASEB J.* – 2010. – Vol. 24. – P. 3603–3624.
5. Lynch G.R., Heath H.W., Johnston C.M. Effect of geographical origin on the photoperiodic control of reproduction in the white–footed mouse, *Peromyscus leucopus* // *Biol. Reprod.* – 1981. – Vol. 25. – P. 475–480. doi:10.1095/biolreprod25.3.475.
6. Martin L.B., Weil Z.M., Nelson R.J. Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade–offs // *Phil. Trans. R. Soc. B.* – 2008. – Vol. 363. – P. 321–339. doi:10.1098/rstb.2007.2142.

7. McCulloch P.F. Animal models for investigating the central control of the mammalian diving response // *Frontiers in physiology*. – 2012. – Vol. 3:169. doi: 10.3389/fphys.2012.00169.
8. Misra H.P., Fridovich F. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase // *J. Biol. Chem.* – 1972. – Vol. 247, № 10. – P. 3170–3175.
9. Mustonen A.–M. Seasonality, photoperiod and nutritional status in the control of endocrinological weight–regulation: PhD Dissertations in Biology, n.o 18. ISSN 1457–2486. – University of Joensuu, Finland. 2003. – 211 pp.
10. Reiter R.J., Paredes S.D., Korkmaz A., Manchester L.C., Tan D.X. Melatonin in relation to the strong and weak versions of the free radical theory of aging // *Adv Med Sci.* – 2008. – Vol. 533. – P. 119–129.
11. Uzenbaeva L.B., Vinogradova I.A., Kizhina A.G., Prokopenko O.A., Malkiel A.I., Goranskii A.I., Lapinski S., Ilyukha V.A. Influence of melatonin on neutrophil–to–lymphocyte ratio in mammalian blood depending on age of the animal // *Advances in Gerontology*. – 2013. – Vol. 3, № 1. – P. 61–66.

References

1. Bears R.F., Sizes I.N. A spectral method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, 1952, Vol. 195, no. 1, pp. 133–140.
2. Dowling D.K., Simmons L.W. Reactive oxygen species as universal constraints in life–history evolution. *Proc. R. Soc. B.*, 2009, Vol. 276, pp. 1737–1745.
3. Klinger W., Karge E., Kretzschmar M., Rost M., Schulze H.P., Dargel R., Reinemann C., Rein H. Luminol– and lucigenin–amplified chemiluminescence with rat liver microsomes. Kinetics and influence of ascorbic acid, glutathione, dimethylsulfoxide, N–t–butyl–a–phenyl–nitron, copper–ions and a copper complex, catalase, superoxide dismutase, hexobarbital and aniline. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 1996, Vol. 48, no. 5, pp. 447–460.
4. Luchetti F., Canonico B., Betti M., Arcangeletti M., Pilolli F., Piroddi M., Canesi L., Papa S., Galli F. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J.*, 2010, Vol. 24, pp. 3603–3624.
5. Lynch G.R., Heath H.W., Johnston C.M. Effect of geographical origin on the photoperiodic control of reproduction in the white–footed mouse, *Peromyscus leucopus*. *Biol. Reprod.*, 1981, Vol. 25, pp. 475–480.
6. Martin L.B., Weil Z.M., Nelson R.J. Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade–offs. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 2008, Vol. 363, pp. 321–339.
7. McCulloch P.F. Animal models for investigating the central control of the mammalian diving response. *Frontiers in physiology*, 2012, Vol. 3:169. doi: 10.3389/fphys.2012.00169.
8. Misra H.P., Fridovich F. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 1972, Vol. 247, no. 10, pp. 3170–3175.
9. Mustonen A.–M. Seasonality, photoperiod and nutritional status in the control of endocrinological weight–regulation: PhD Dissertations in Biology, n.o 18. ISSN 1457–2486. University of Joensuu, Finland. 2003, 211 pp.
10. Reiter R.J., Paredes S.D., Korkmaz A., Manchester L.C., Tan D.X. Melatonin in relation to the strong and weak versions of the free radical theory of aging. *Adv Med Sci.*, 2008, Vol. 533, pp. 119–129.
11. Uzenbaeva L.B., Vinogradova I.A., Kizhina A.G., Prokopenko O.A., Malkiel A.I., Goranskii A.I., Lapinski S., Ilyukha V.A. Influence of melatonin on neutrophil–to–lymphocyte ratio in mammalian blood depending on age of the animal. *Advances in Gerontology*, 2013, Vol. 3, no. 1, pp. 61–66.

Рецензенты

Высоцкая Р.У., д.б.н., профессор, гл. науч. сотр. лаб. экологической биохимии Института биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск;

Мейгал А.Ю., д.м.н., профессор кафедры физиологии человека и животных, патофизиологии Петрозаводского государственного университета, г. Петрозаводск

Работа поступила в редакцию 04.06.2014.