



На правах рукописи

ИЛЮХА

Виктор Александрович

**АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ В
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ АДАПТАЦИЯХ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ
(СРАВНИТЕЛЬНО-ВИДОВОЙ,
ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ПРИКЛАДНОЙ АСПЕКТЫ)**

(03.00.13 - физиология)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Сыктывкар - 2004

Работа выполнена в лаборатории экологической физиологии животных
Института биологии Карельского научного центра
Российской академии наук

Научный консультант - доктор биологических наук, профессор
Немова Нина Николаевна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Бойко Евгений Рафаилович

доктор биологических наук, профессор
Иржак Лев Исакович

доктор биологических наук, профессор
Соловьев Владимир Анатольевич

Ведущая организация - Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова Российской академии
наук (г. Санкт-Петербург).

Защита состоится 22 апреля 2004 года в ___ часов на заседании диссер-
тационного совета Д. 004.017.01 в Институте физиологии Коми научного
центра Уральского отделения Российской академии наук по адресу:
167982, Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, 50.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Коми на-
учного центра УрО РАН.

Автореферат разослан «___» марта 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
канд. биол. наук



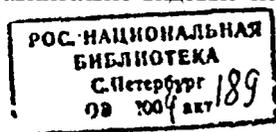
Н.А.Черных

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Адаптация является фундаментальной особенностью всех существующих на Земле живых организмов. Рамки настоящего исследования не позволяют сделать ссылки на всех отечественных и зарубежных ученых, внесших значительный вклад в изучение различных аспектов проблемы адаптации к самым разнообразным условиям жизни. Адаптация осуществляется на различных уровнях - от клеточного, до организменного и популяционного. В последние годы накапливается все больше данных об участии в приспособительных реакциях антиоксидантных ферментов, основной функцией которых является поддержание на стационарном уровне концентрации активных форм кислорода, необходимых для перекисного окисления липидов и ряда других биохимических процессов в клетке (Барабой, 1989; Владимиров, 2000; Владимиров, Арчаков, 1972; Зенков, Ланкин, Меньщикова, 2001). Супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза являются ключевыми ферментами защиты клетки от активных форм кислорода, с действием которых связан ряд патологических нарушений (Дубинина, 1992; Зенков, Ланкин, Меньщикова, 2001; Кулинский, 1999; Aebi, Wiss, 1978; Fridovich, 1978, 1999). Имеется достаточно обширная литература, характеризующая роль антиоксидантных ферментов в механизмах устойчивости животных к токсическому действию кислорода в онтогенетическом и сравнительно-видовом аспектах (Frank et al., 1978; Marklund, 1984; Perez-Campo et al., 1993; Sohal, Orr, 1992). Показатели активности антиоксидантных ферментов широко используются как тест при окислительном стрессе и патологических процессах (Зенков, Ланкин, Меньщикова, 2001). Большинство исследований выполнены на человеке и лабораторных животных, которые в результате длительного (в течение многих поколений) выращивания в условиях неволи утратили многие физиолого-биохимические особенности, характерные для их диких предковых видов, что не позволяет экстраполировать эти данные на млекопитающих. Исследование адаптивных механизмов эволюционно сформировавшихся в различных экологических условиях у животных, позднее введенных в зоокультуру и не утративших черт своих диких предковых видов (Берестов, 1971; Берестов, Кожевникова, 1981), позволяет более полно изучить роль антиоксидантной системы в физиологических адаптациях.

Одним из подходов для выявления роли системы антиоксидантных ферментов в адаптациях являются сравнительно-видовые исследования



млекопитающих, различающихся как систематически, так и по особенностям экогенеза (Раушенбах, 1985). Анализ становления системы в процессе онтогенеза позволяет раскрыть адаптивные экологически обусловленные механизмы, формирующиеся у организма в этот период. Изучение ферментов антиоксидантной системы при различных патологических процессах, измененном функциональном состоянии организма и под влиянием биологически активных веществ дает возможность выявить адаптивные резервы антиоксидантной системы - «норму реакции» системы у каждого из видов.

Настоящая работа посвящена изучению функционирования системы антиоксидантных ферментов в органах и тканях восьми видов млекопитающих, часть из которых близки систематически, но различаются по экогенезу. Оставшаяся от диких предковых видов сезонность размножения пушных зверей позволяет выявить особенности участия данной системы в гено- и фенотипических адаптациях, а также раскрыть глубинные эволюционно сформировавшиеся механизмы адаптации у видов млекопитающих, которые различаются по экологической специализации. Актуальность разрабатываемой проблемы определяется использованием в практике пушного звероводства полученных сведений о роли антиоксидантной системы в адаптациях для контроля за состоянием здоровья хозяйственно-полезных млекопитающих и корректного проведения профилактических и терапевтических мероприятий с использованием биологически активных веществ и антиоксидантов для повышения устойчивости и улучшения показателей воспроизводства.

Работа выполнялась в рамках Программы Отделения общей биологии РАН, международного проекта (Россия - Финляндия - Польша) и получала поддержку Российского фонда фундаментальных исследований и Федеральной целевой программы «Интеграция» (рег. № 637).

Цель и задачи исследования

Основной целью настоящей работы являлось исследование общих закономерностей функционирования системы антиоксидантных ферментов, роли в физиологических адаптациях и становления в постнатальном онтогенезе у млекопитающих, различающихся по экологическим особенностям их диких предковых видов и сохранивших эволюционно сформированные особенности адаптации к экологическим нишам. Для решения этой проблемы были поставлены следующие задачи:

- сравнительное изучение активности супероксиддисмутазы и каталазы в тканях органов и эритроцитах крови различающихся по экогенезу

- восьми видов млекопитающих (песца, лисицы, енотовидной собаки, норки, хорька, шиншиллы, нутрии и белых беспородных крыс);
- выявить динамику становления системы антиоксидантных ферментов в период раннего постнатального онтогенеза у экологически различающихся видов (песца и норки);
 - оценить роль генотипических и средовых факторов в функционировании антиоксидантной системы;
 - выяснение влияния биологически активных веществ и витамина Е на состояние антиоксидантной системы в норме и при коррекции патологических состояний у пушных зверей.

Научная новизна

Анализ межвидовых различий состояния антиоксидантных ферментов впервые показал, что даже в условиях клеточного разведения сохранены эволюционно сформировавшиеся специфические механизмы адаптации, характерные для диких предковых видов животных, различающихся по экогенезу. У амфибионтного вида - нутрии, и впадающей в прерывистую зимнюю спячку енотовидной собаки обнаружен высокий общий уровень активности каталазы в большинстве тканевых органов, что связано с гипоксией при нырянии и снижением метаболизма во время зимнего сна. Сравнительный анализ активностью в тканях различных органов выявил самую высокую активность в тканях печени у всех исследованных видов, за исключением шиншиллы, для которой характерно проявление максимальной активности каталазы в почках.

Впервые установлено более раннее формирование функций антиоксидантной системы у песцов, по сравнению с норками, что связано с эволюционно сформировавшейся спецификой адаптации песцов к условиям Севера. Выявлена органоспецифичность становления системы антиоксидантных ферментов в постнатальном онтогенезе.

Впервые показано, что однонаправленная реакция антиоксидантной системы в тканях органов и эритроцитах зависит от воздействующего фактора (голодание, янтарная кислота), что позволяет использовать эритроциты в качестве маркера состояния антиоксидантной системы у животных. Системный анализ взаимосвязей между антиоксидантными ферментами и другими физиолого-биохимическими гематологическими показателями животных позволил установить, что наряду с оценкой абсолютных величин целесообразно учитывать количество и силу коррелятивных связей, которые характеризуют напряженность работы адаптивной системы в целом.

Практическая значимость работы

Высокая чувствительность системы антиоксидантных ферментов к факторам среды позволяет использовать их для целей физиолого-биохимического мониторинга. Применение полученных результатов исследования участия антиоксидантной системы в адаптивных механизмах используется для контроля за состоянием животных, разводимых в промышленных комплексах, является необходимым условием для обеспечения сохранности поголовья и повышения продуктивности стада.

На основании материалов разработаны рекомендации по физиолого-биохимическому контролю за состоянием здоровья пушных зверей («Мониторинг физиологического состояния пушных зверей в различные биологические периоды».- Петрозаводск, 2000.- 25 с), а также по использованию ряда биологически активных веществ в практике звероводства («Рекомендации по использованию энергостима в промышленном звероводстве».- Петрозаводск — Краснодар, 1993.— 18 с, «Рекомендации по использованию мидийного гидролизата в промышленном звероводстве».- Петрозаводск, 2000.- 17 с). Полученные материалы используются при чтении лекционных курсов для студентов Петрозаводского государственного университета.

Апробация работы

Материалы работы доложены и обсуждались на I(XI) и XII международных совещаниях по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 1996, 2001), съезде физиологов Сибири и Дальнего востока (Новосибирск, 1997), съездах Международной ассоциации ученых-звероводов (Варшава, 1996, Кастория, 2000), 3-м международном симпозиуме по физиологии и этологии диких животных и животных в зоопарках (Egkner, Германия, 2000), съезде Российского физиологического общества (Казань, 2001), VI и VII съездах териологического общества (Москва, 1999, 2003), 7-м симпозиуме «Витамины и добавки в питании человека и животных» (Jena, Германия, 1999) и 27 других всероссийских и международных научных и научно-практических конференциях и симпозиумах.

Положения, выносимые на защиту

1. Межвидовые различия системы антиоксидантных ферментов у представителей отряда грызунов (нутрии, шиншиллы, крысы), отряда хищных — семейства псовых (лисицы, песца, енотовидной

собаки) и семейства кунных (норка и хорек), являются проявлением эволюционно сформировавшихся специфических механизмов адаптации, характерных для диких предковых видов животных, различающихся по экогенезу. Высокий уровень активности антиоксидантных ферментов в тканях печени характерен для всех видов исследованных животных, за исключением высокогорного вида - шиншиллы.

2. Обнаружено более раннее формирование антиоксидантной системы в онтогенезе песцов, по сравнению с норками, характеризующееся высокой активностью антиоксидантных ферментов в пятидневном возрасте в тканях сердечной и скелетной мышцы. Наблюдается органоспецифичность становления системы антиоксидантных ферментов в постнатальном онтогенезе.
3. Активность супероксиддисмутазы в эритроцитах крови пушных зверей может служить маркером состояния антиоксидантной системы при воздействии факторов среды.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 267 страницах машинописного текста, содержит 16 таблиц и 54 рисунка. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 4-х глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Список литературы включает 523 названия, из них 196 на русском языке.

По теме диссертации опубликовано 72 работы.

Материалы и методы исследований

Объектами исследования являлись песцы (*Alopex lagopus* L.), лисы (*Vulpes vulpes* L.), енотовидные собаки (*Nuctereutes procyonoides* Gray), норки (*Mustela vison* Schr.), хорьки (*Mustela putoris furo*), шиншиллы (*Chinchilla laniger* Gray), нутрии (*Myocastor coypus* M.) и белые беспородные крысы. Образцы тканей печени, почек, сердца, легких, селезенки и скелетной мышцы отбирали в период забоя животных на звероферме, замораживали и хранили при -25°C . Гомогенаты тканей готовили в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0). После центрифугирования при 6000g в течение 15 мин в супернатантах спектрофотометрически определяли активность ферментов и содержание белка: СОД - по модифицированной адrenoхромной методике (Misra, Fridovich, 1975), каталазы - по количеству разложенной перекиси водорода (Bears, Sizes, 1952), белка - по Лоруи (Lowry et al., 1951), с использованием в качестве стандарта бычьего

сывороточного альбумина. Активность каталазы выражали в мкМ перекиси водорода, разложенной за 1 минуту, а за 1 усл. ед. активности СОД принимали количество фермента, способное затормозить реакцию автоокисления адреналина на 50%. Активность ферментов рассчитывали на 1 г сырой ткани, а удельную активность - на 1 мг белка.

Кровь для анализа активности СОД в эритроцитах у куньих получали после отсекания кончика хвоста, а у собачьих - из плантарной вены, с использованием в качестве антикоагулянта гепарина (Берестов, 1971). После центрифугирования при 3000 об./мин отбирали 0,1 мл эритроцитов, гемолизировали в 0,9 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 7,0) и осаждали гемоглобин (с использованием 0,250 мл спирта и 0,150 мл хлороформа) в течение 10 мин на холоде. После центрифугирования при 6000 g в течение 10 мин в супернатанте производили определение активности СОД, которую выражали в условных единицах на 100 мкл эритроцитов.

Оценку других физиолого-биохимических показателей крови производили с использованием общепринятых методов (Берестов, 1971; Берестов, Кожевникова, 1981).

В сравнительно-видовых исследованиях использованы 4 нутрии, 6 шиншил и по 10 представителей других видов млекопитающих при равном соотношении самцов и самок в группах.

Активность СОД и каталазы в период раннего постнатального онтогенеза изучена на темно-коричневых норках обоего пола в возрасте 1-3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 и 75 дней (всего 70 щенков) и в течение трех последовательных лет на 54 песцах в возрасте 1,5, 10, 20, 35 и 50 дней. Изменение активности антиоксидантных ферментов (АОФ) в позднем постнатальном онтогенезе исследовали в органах у 7- (неполовозрелые), 18- и 54- месячных самок песцов (14 зверей).

Опыт по влиянию однодневной пищевой деиривации проведен на норках 40-дневного возраста (10 животных), а 4-х дневного голодания - на 7- месячных песцах (20 животных). У пяти опытных песцов пробы органов отбирались сразу после голодания, а у пяти - по прошествии недельного периода восстановительного кормления.

Проведено исследование динамики роста и активности АОФ у щенков песцов из 10 малых (до 5 щенков) и 10 больших (более 10 щенков) пометов. Для выявления изменений при алеутской болезни (АБ) были изучены органы 20 больных норок.

Влияние на эритроцитарную СОД лактации исследовалось на самках норок (89 животных) и песцов (20 животных) с различным числом щенков в начале и конце лактации в условиях нормального кормления, а также в сере-

дине лактации при кормлении неполноценным по аминокислотному составу белком или дефиците около 10% белка и энергии в корме. При исследовании норок-«стригунов» изучены 10 животных с нормальным волосяным покровом, 5 - «стригунов» (животные, которые стригли своего соседа), 5 - с остриженным соседом по клетке волосом и 8 - обрастающих после «стрижки».

Биологически активные вещества (БАВ) животным вводили с кормом ежедневно с двухдневным интервалом через каждые пять дней. Подобный прерывистый режим способствует повышению адаптационных возможностей организма и является удобным при работе в зверохозяйствах. Контролем во всех случаях служили животные того же возраста и пола, отобранные по принципу аналогов, содержащиеся на общехозяйственном рационе без добавки препарата.

Янтарную кислоту (ЯК) взрослые самки темно-коричневых норок в период беременности, шенения и лактации (с апреля по июль) получали с кормом по 50 мг/кг живой массы, а щенки - после отсадки (с июля по октябрь) по 25 мг/кг и 50 мг/кг. Для щенков песцов использовалась доза 50 мг/кг в период после отсадки от матери и до забоя.

Влияние мидийного гидролизата (МИГИ-К) исследовали на здоровых и больных АБ норках. В двух сериях экспериментов - на самках в период воспроизводства и на растущих щенках без признаков АБ, животные получали с кормом по ОД и 0,5 мл/кг МИГИ-К. Половозрелым самкам препарат вводили в рацион в репродуктивный период - с начала гона и до шенения трижды: две недели в начале марта и по неделе в начале и конце апреля, щенкам — в послеотъемный период. Щенки норок, полученные от самок с проявлениями АБ, находились на экспериментальных рационах в течение четырех месяцев (июль-октябрь) с добавкой препарата в дозе 0,2 и 0,5 мл/кг. При кратковременном (десятидневном) применении МИГИ-К подопытные больные щенки пятимесячного возраста получали гидролизат в дозах 0,5, 1,0, 2,0 и 4,0 мл/кг массы, соответственно.

Влияние дополнительного введения витамина Е проведено на 59 двухлетних самках песцов, из которых в случайном порядке, с учетом их показателей воспроизводства в предыдущий период, было сформировано две группы. Опытная группа сверх рекомендуемой нормы (107,7 мг а-токоферол ацетата) получала дополнительно еще 50 мг препарата в период последних двух недель беременности и весь период лактации. Щенков взвешивали на 3, 7 (взвешивание помета), 14 и 21 сутки (индивидуально). У самок проанализирован жирнокислотный состав молока и уровень в нем витамина Е, а у шестимесячных щенков - активность АОФ в ткани печени. У части животных, полученных от самок контрольной и опытной групп, проанализированы показатели воспроизводства.

Всего активность АОФ была определена в тканях органов 216 норок, 154 песцов, 10 крыс, 10 енотовидных собак, 10 хорьков, 10 лисиц, 6 шиншилл и 4 нутрий. Проведено более 3000 анализов по определению активности СОД в эритроцитах норок, хорьков, песцов, лисиц и енотовидных собак.

Взвешивание проводили с точностью 10 г для норок и 50 г для песцов. Родословные и результаты воспроизводства брали из племенных карточек и журналов регистрации хода гона и щенения. Все сведения заносились в электронную базу данных с использованием компьютерных программ dBase III Plus и Access.

Полученные цифровые материалы обрабатывали с использованием пакетов программ Statgraphics и SPSS общепринятыми методами вариационной статистики, сравнение проводили с применением непараметрических критериев (Зайцев, 1990). Для оценки вклада каждого из анализируемых факторов и силы их влияния использовали одно- или многофакторный дисперсионный, корреляционный и регрессионный анализ. Для выявления наиболее информативных признаков, характеризующих исследуемые группы животных, применяли дискриминантный анализ и метод главных компонент.

Основные результаты

Система антиоксидантных ферментов в видовых адаптациях млекопитающих

Активность СОД и каталазы в тканях различных органов млекопитающих

У изученных животных выявлены общие закономерности распределения СОД и каталазы в органах, свойственные другим млекопитающим: максимальная активность данных ферментов обнаружена, как правило, в печени, в остальных органах она ниже. В то же время отмечены некоторые видовые особенности.

У представителей отряда грызунов (крысы, нутрии и шиншиллы) (рис. 1) выявлена высокая межвидовая вариабельность активности ферментов в тканях печени, сердца, селезенки и легких и различия в соотношении активностей обоих ферментов в изученных органах. Так, если активность СОД в печени у шиншилл и нутрий значительно выше, чем у крыс, то достоверно более высокая активность каталазы в данном органе характерна только для нутрий. Распределение активности каталазы в тканях органов шиншилл отличалось от характерного для других млекопи-

тающих: максимальной она была не в печени, а в почках. В тканях печени, селезенки и легких данного вида отмечены близкие по уровню значения активности фермента.

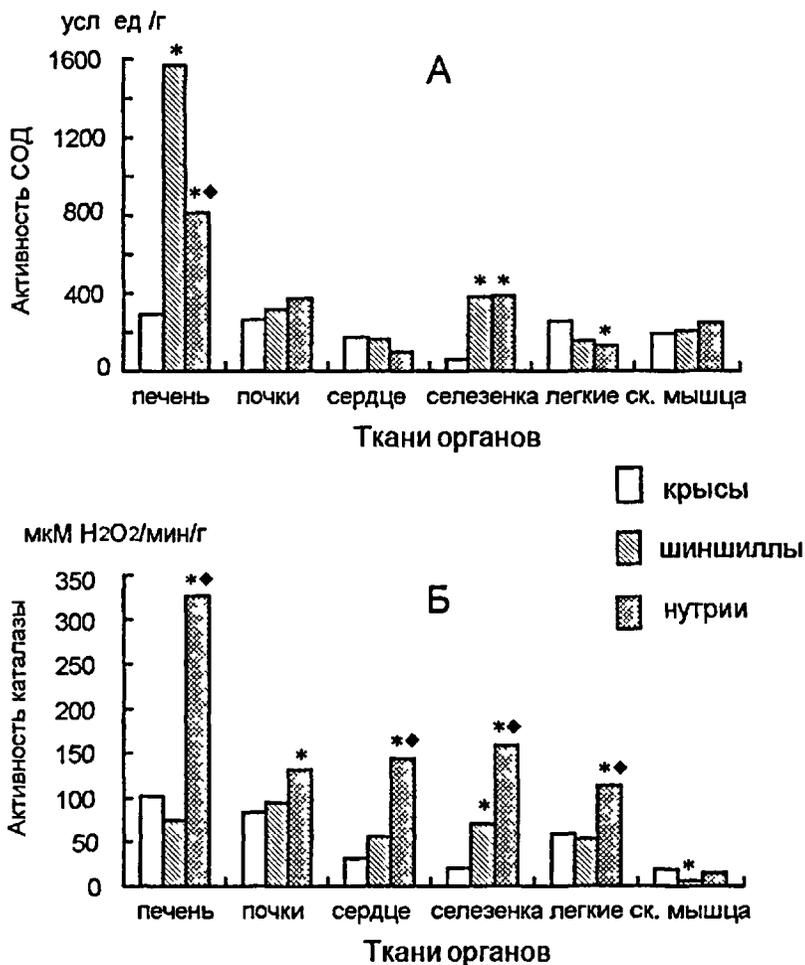


Рис. 1. Активность СОД (А) и каталазы (Б) в органах млекопитающих отряда грызунов

Условные обозначения * - различия достоверны по сравнению с крысами, ♦ — различия достоверны по сравнению с шиншиллами ($p < 0,05$, критерий Вилкоксона — Манна — Уитни)

Значительные различия в активности СОД и каталазы обнаружены и у представителей семейства собачьих (лисицы, песцы и енотовидные собаки) (рис. 2). Эти три вида близки по массе тела, однако различаются по происхождению и по экологии их диких предковых видов. В природе лисицы являются аборигенами для данной местности, в то время как песцы - выходцы высоких широт, родина же енотовидной собаки — Дальний Восток. Изменения активности антиоксидантных ферментов в тканях органов этих животных связаны, очевидно, прежде всего, с экологическими особенностями среды обитания диких предковых видов и, в первую очередь, с типом питания и уровнем обменных процессов (Олейник, 1996, Слоним, 1952, Туманов, 2003). Так, в тканях печени, почек, сердца и селезенки самая низкая активность СОД отмечена у лисиц, а самая высокая - у енотовидных собак, что достаточно хорошо согласуется с данными по потреблению кислорода и уровню обменных процессов у этих видов. Следует также учесть, что отбор проб для анализа производился в осенний период, когда у этих видов наблюдается усиление обменных процессов и накопления жировых запасов, что хорошо коррелирует с активностью СОД в тканях печени, почек и селезенки. Однако, как и у грызунов, не для всех органов отмечена сопряженность в уровне активности СОД и каталазы. У песцов, по сравнению с лисами, при более высокой активности СОД в печени, почках и селезенке активность каталазы в этих органах была достоверно ниже.

У представителей семейства куньих (норки и хорьков) не удалось выявить отличий в уровне активности СОД и каталазы ни в одном из исследованных органов. Эти животные близки как по размерам и массе тела, так и по абсолютному и относительному весу внутренних органов (Сегаль, 1975, Терновский, 1977). Одним из основных морфологических отличий являются более сильные жировые накопления у норки, а также ее способность плавать более длительное время (Терновский, Терновская, 1994; Томилин, 1997; Dunstone, 1993).

У большинства видов (крысы, песцы, лисы, хорьки, норки) не наблюдается достоверных различий в удельной активности СОД и каталазы (рассчитанных на 1 мг белка) в ткани печени. У шиншиллы, нутрий и енотовидных собак активность ферментов значительно выше, чем у пяти выше перечисленных видов. При этом степень отличий и соотношение ферментативных активностей разные. У шиншиллы, имеющих достоверно более высокую активность СОД, активность каталазы не отличается от таковой у первых пяти видов. В то же время у нутрий, у которых удельная активность СОД в два раза ниже, чем у шиншиллы, удельная активность каталазы почти в 6 раз выше, чем у остальных животных, за исключением енотовидных собак, у которых она еще выше, в то время как удельная активность СОД превышает таковую у пяти первых видов менее чем в 2 раза.

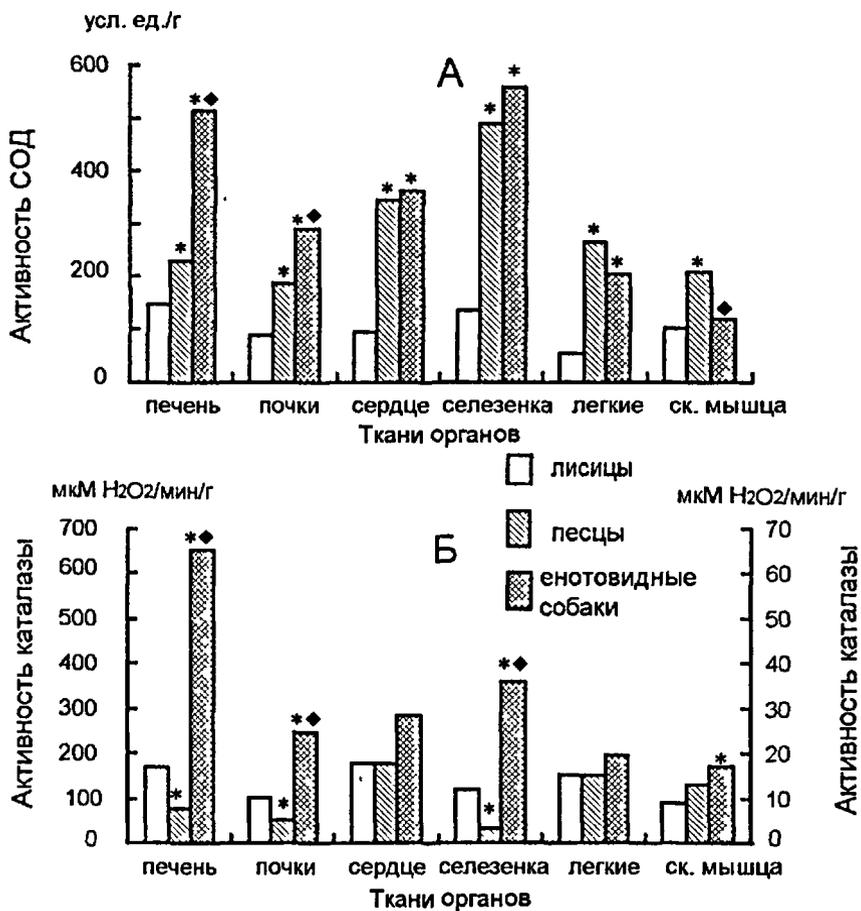


Рис. 2. Активность СОД (А) и каталазы (Б) в органах млекопитающих семейства собачьих

Для активности каталазы в печени и почках—левая шкала, для остальных органов— правая шкала. Условные обозначения * - различия достоверны по сравнению с лисами, • - различия достоверны по сравнению с песцами ($p < 0,05$, критерий Вилкоксона - Манна - Уитни)

Шиншиллы, перенесенные из высокогорных районов на равнину, где они разводятся в условиях неволи, испытывают избыточное парциальное давление кислорода, что и ведет к активации СОД. Специфический профиль АОФ в органах енотовидных собак, очевидно, обусловлен тем, что для них даже в условиях неволи характерен зимний сон.

У нутрий, ведущих в природе полуводный образ жизни, в ряде органов отмечено повышение активности каталазы, что может быть связано с дополнительной потребностью в кислороде при нырянии или усиленной генерацией активных форм кислорода при гипоксии - реоксигенации. Аналогичное повышение активности каталазы обнаружено другими авторами в сердечной мышце природно-адаптированных к водному образу жизни грызунов - ондатры, по сравнению с неадаптированными - крысы (Галанцев и др., 1999; Лощагин и др., 2001), а также большинства АОФ в эритроцитах ныряющих животных, при сравнении их с типичными сухопутными видами (Wilhelm Filho, 2002).

Таким образом, активность СОД и каталазы в одном и том же органе значительно различается даже у таксономически близких видов исследованных млекопитающих и определяется, прежде всего, спецификой экологии их диких предковых видов и, очевидно, связана в основном с адаптацией животных к гипо- или гипероксии.

Активность СОД в эритроцитах различных видов хищных млекопитающих

Одна из биологических функций СОД в эритроцитах - защита липидов мембран эритроцитов и гемоглобина, как основного транспортера кислорода. Изучаемые виды различаются как по содержанию эритроцитов, так и по уровню гемоглобина (Берестов, 1971; Петрова, 1971), которые в свою очередь, в значительной степени зависят от уровня кормления. Дисперсионный анализ позволил установить, что при сбалансированном кормлении согласно рекомендуемым для каждого вида нормам активность СОД зависит от количества эритроцитов и концентрации в них гемоглобина.

В случае, когда шенки пушных зверей выращивались в условиях неполноценного кормления, межвидовые различия проявляются более четко, а фактор «вид» при дисперсионном анализе достоверно оказывает влияние на активность СОД, хотя линейная зависимость от количества эритроцитов и уровня гемоглобина сохраняется. Тот факт, что она носит характер обратной пропорциональности, вполне объясним. При анемии количество «оборотов» каждого эритроцита возрастает и, в связи с этим, увеличивается количество супероксидных радикалов, что в свою очередь индуцирует синтез фермента. Аналогичная картина отмечена для каталазы при сравнении видов различающихся по содержанию эритроцитов в крови (Клиорин, Тиунов, 1974).

В норме нами не отмечено половых различий в активности эритроцитарной СОД, точно так же, как и для других исследованных тканей ни у одного из видов млекопитающих.

Становление системы антиоксидантных ферментов в органах норок и песцов в постнатальном онтогенезе

Активность СОД и каталазы в раннем постнатальном онтогенезе у норок

В ходе постнатального онтогенеза у норок изменения активности СОД и каталазы происходят синхронно в большинстве органов. В первые дни после рождения активность обоих ферментов значительно ниже таковой у взрослых животных. Только в селезенке и скелетной мышечной ткани в этот период наблюдается высокая активность, которая затем снижается (рис. 3). Аналогичное явление отмечали другие авторы (Дубинина и др., 1984) в пуповинной крови человека и связывали его с оксидационным стрессом при рождении. По-видимому, этим же можно объяснить обнаруженную нами относительно высокую активность этих ферментов в первый день после рождения в селезенке — кроветворном органе. Изменения в мышечной ткани, вероятнее всего, связаны с резким увеличением на нее гравитационной нагрузки сразу после рождения (Аршавский, 1982). Между тем, активность указанных ферментов в легких — органе, непосредственно контактирующем с кислородом, в это время, по нашим данным, низка по сравнению с другими органами, хотя в литературе отмечено активизирующее влияние кислорода на легочную ткань как у взрослых крыс (Autor, Stevens, 1978), так и у новорожденных млекопитающих различных видов (Frank et al., 1978).

В ходе дальнейшего развития происходит плавное увеличение активности ферментов в печени, почках, сердце и скелетной мышце. В скелетной мышце максимального уровня она достигала к 40-му дню, а в печени, почках и сердце — к 50-му. В последующие дни развития активность ферментов в печени, почках и скелетной мышце постепенно снижалась, а в сердце сохранялась на стабильном уровне. Для мозга и селезенки аналогичных изменений не отмечено. Во всех органах, кроме мозга, сердца и селезенки соотношение СОД/каталаза постоянно после 30-го дня развития.

Влияние различных факторов на организм: переход с молочного питания на смешанное, отсадка от матери и т.д., отражается в большей степени на удельной активности ферментов. Отмечено ее увеличение в печени, почках, мозге и селезенке к 25 - 30-му дню, а затем — снижение к 40-му дню. Второй пик, хотя и менее высокий, наблюдается в печени и почках к 50-му дню.

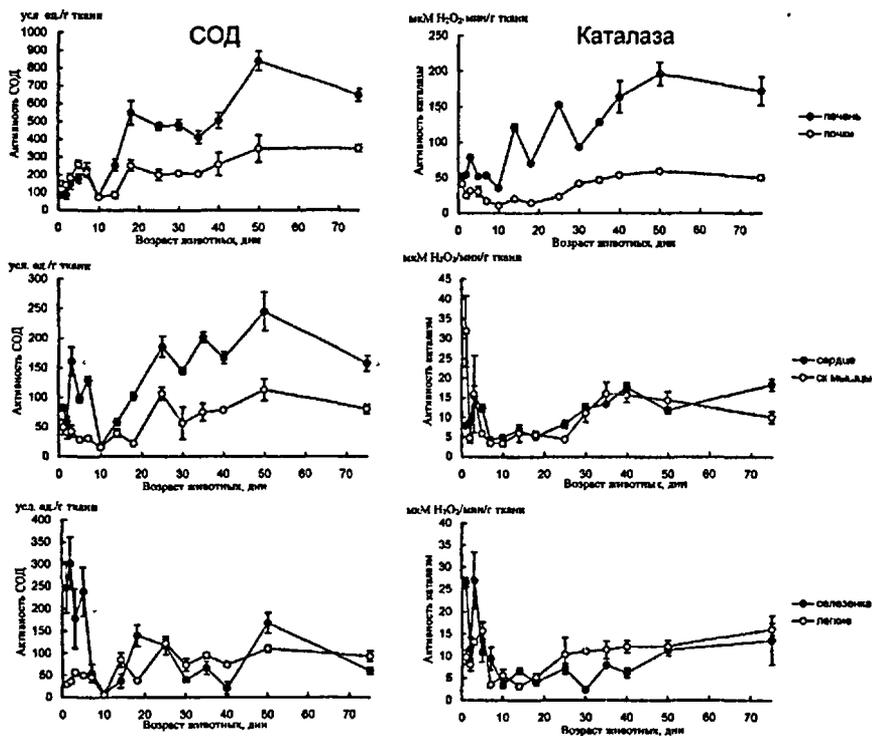


Рис. 3. Активность СОД и каталазы в тканях органов норки в период постнатального онтогенеза ($M \pm m$)

Активность СОД и каталазы в большей мере связана с интенсивностью роста органов, а не с их относительным весом. Прирост всех органов наиболее интенсивно происходит в первый месяц жизни, на втором он резко снижается. На протяжении третьего месяца жизни сердце, печень и почки продолжают увеличиваться в размерах, а легкие и селезенка останавливаются в росте (Мелькина, 1966). У американской норки с возрастом прослеживается закономерное снижение относительного веса всех исследованных внутренних органов, за исключением сердца, относительный вес которого незначительно снижается только на начальных этапах постэмбрионального развития.

На протяжении первых двух-трех недель после рождения интенсивность обменных процессов в организме норчат несколько ослабевает по сравнению с уровнем метаболизма новорожденных. Затем следует резкое

усиление интенсивности метаболизма, достигающее максимума к 30-му дню. В это время (25 - 30 дней) у щенков формируются механизмы гомеотермии, открываются глаза и слуховые проходы (Сегаль, 1975). Именно с этим периодом связан первый пик удельной активности обоих ферментов в большинстве органов.

Потребление кислорода (в пересчете на единицу массы) существенно увеличивается у щенков в возрасте 30-33 и 40 - 42 дней, т.е. в период их прозревания и участвовавших выходов из гнезда (Данилов, Туманов, 1976; Мелькина, 1966; Туманов, 2003; Jonasen, 1987). К этому времени они переходят на самостоятельное питание, а в условиях неволи молодняк отсаживают в отдельные клетки. Во время четвертой и пятой декад жизни основной обмен постепенно снижается, достигая минимальных показателей расхода энергии к 50-дневному возрасту. Потребление кислорода и теплопродукция в этом возрасте ниже, чем у хсивотных в любом другом периоде роста и значительно ниже, чем у взрослых животных. Низкие показатели окислительного метаболизма, характеризующие возраст 40 - 60 дней, связаны с бурным нарастанием живой массы, когда процессы дифференцировки выражены крайне слабо (Мелькина, 1966). К этому периоду активность СОД и каталазы достигает своего максимума в печени и в почках - органах, тесно связанных с процессами метаболизма.

АктивностьСОДикаталазывраннемпостнатальномонтогенезе у песцов

В период раннего постнатального онтогенеза изменения активности ферментов у песцов носили ярко выраженную органоспецифичность (рис. 4), но в отличие от норок имели более плавный характер. Как и у взрослых животных, у щенков не было обнаружено половых различий в активности ферментов и содержании белка. В большинстве тканей органов щенков песцов активность ферментов достигала своего пика уже к 35 дню развития, т.е. раньше, чем у норок. У песцов, по сравнению с норками, обнаружено более раннее формирование антиоксидантной системы в тканях сердечной и скелетной мышцы, характеризующееся высокой активностью антиоксидантных ферментов уже в 5-ти дневном возрасте. К 50-му дню развития профиль АОФ в тканях органов щенков соответствовал таковому у взрослых животных и был сходным с тем, который наблюдается у других млекопитающих. Активность ферментов уменьшалась в ряду печень > почки = селезенка > легкие > сердце > мозг > скелетная мышца для СОД и печень > почки > сердце > легкие > селезенка >

скелетная мышца > мозг для каталазы. Многофакторный дисперсионный, анализ позволил установить, что влияние возраста и года исследования на активность АОФ различалось для каждого из органов, но в большинстве случаев сила влияния возраста в два и более раза превышала влияние внешних факторов. В печени и почках активность ферментов и содержание белка зависели от обоих факторов, а в мозге не отмечено влияния ни одного из них. В сердце и селезенке выявлена зависимость показателей АОФ от возраста животных и лишь для некоторых - от года исследований.

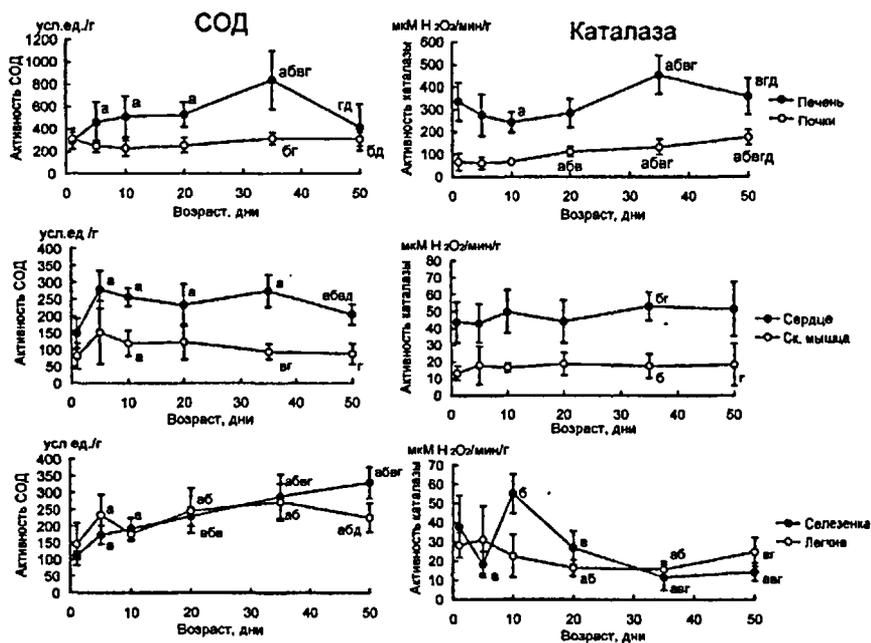


Рис. 4. Активность СВД и каталазы в различных органах песцов в период раннего постнатального онтогенеза ($M \pm \sigma$)

Буквы обозначают достоверность различий по сравнению с 1 - (а), 5 - (б), 10 - (в), 20 - (г) и 35 - дневными (д) щенками (Критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Изучение корреляционных зависимостей между АОФ и содержанием белка в тканях исследованных органов показало достаточно высокий уровень взаимосвязи в первые дни онтогенеза с последующим снижением почти в полтора раза к десятому дню и увеличением к 20-му. Начиная

с 35-дневного возраста количество высоко достоверных корреляционных связей ($p < 0,01$) стабилизировалось на более низком (в три раза) уровне, чем в первые дни постнатального онтогенеза.

Активность СОД и каталазы в позднем постнатальном онтогенезе у песцов

Ранее нами было показано, что песцы различного возраста существенно различаются по продуктивным качествам — самки 2-3-летнего возраста приносят больше щенков, и гибель потомства у них значительно ниже, а к пятилетнему возрасту показатели воспроизводства достоверно снижаются. Сравнение активности АОФ в тканях органов у 7-ми (неполовозрелые), 18-ти и 54-х месячных песцов показало, что только в скелетной мышце отмечается связанное с возрастом изменение количества белка - с максимумом у 18-ти месячных животных. Аналогичная динамика возрастных изменений наблюдалась для активности и удельной активности СОД в ткани почек. В то же время, в скелетной мышце отмечено V-образное высоко достоверное ($p < 0,01$) изменение удельной активности СОД и каталазы.

Таким образом, к 4,5-летнему возрасту у песцов в большинстве органов не наблюдается изменений, которые характеризуются как «старение» АОС у других млекопитающих. Вероятно, этот возраст не является для них предельным, поскольку описаны случаи, когда у 10-11 летних песцов в зоопарках не отмечалось признаков старости (Данилов и др., 1979; Туманов, 2003). Изменения показателей воспроизводства и АОФ в органах, очевидно, также не связаны между собой.

Влияние генотипических факторов и факторов среды на систему антиоксидантных ферментов в тканях органов норок и песцов

Изменение активности антиоксидантных ферментов у норок и песцов на разных стадиях репродуктивного цикла

Одной из особенностей изучаемых нами животных является сезонность их жизненного цикла, четкая приуроченность периода размножения к определенному времени года и, связанная с этим, динамика изменений в ряде физиологических систем. Так, осенью у них наблюдается максимальное накопление жировых запасов, а к концу зимы - началу весны — всплеск гормонального фона и усиление метаболизма, связанные с периодом размножения (Сироткина, 1989). Учитывая это, нами проанализировано состояние активности АОФ в ткани печени песцов и тканях органов норок осенью, в период анэструса, и весной - после юна.

Как и следовало ожидать, более интенсивный метаболизм в весенний период, связанный с периодом половой активности, сопровождался повышением, хотя и не в равной степени, как активности, так и удельной активности АОФ у обоих видов. У песцов в ткани печени увеличивалась активность СОД и каталазы, в то время как у норок отмечалось лишь увеличение в большинстве тканей органов (печени, почек, селезенки и скелетной мышцы) каталазы, а активность СОД в тканях печени, сердца и селезенки даже снижалась. Различная степень изменения активности двух ферментов в период гона отразилась на их соотношении. Так у песцов в ткани печени соотношение СОД/каталаза увеличивалось по сравнению с периодом анэструса более чем в полтора раза, а у норок снизилось на 50% в ткани печени, селезенки и скелетной мышцы. В целом, изменения АОС в период гона у песцов носили более выраженный характер, чем у норок.

Наблюдаемые изменения у норок и песцов были связаны с теми функциональными сдвигами, которые наблюдаются в данный сезон: осенью - с формированием волосяного покрова и запасанием подкожного жира, весной - с функцией воспроизводства. Как известно, интенсивность метаболизма у норок, как и других сезонно размножающихся млекопитающих, значительно возрастает в период размножения и выкармливания потомства (Сегаль, 1975). У песцов изменение потребления кислорода по сезонам выражено в еще большей степени (Casey et al., 1979).

Изменения активности АОФ в органах пушных животных, связанные с репродуктивным циклом, были синхронными с изменением активности СОД в эритроцитах. Одним из факторов, в значительной степени оказывающим влияние на активность СОД в эритроцитах млекопитающих, является содержание в крови витаминов - потенциальных антиоксидантов. На это указывает, в частности, синхронность (в противофазе) наблюдаемых изменений в концентрации витамина Е и активности СОД в различные биологические периоды у норок и песцов. Учитывая то, что токоферол интенсивно используется организмом в период воспроизводства - именно в это время наблюдается самая высокая активность эритроцитарной СОД, а также высокая активность АОФ в ткани печени песцов и активность каталазы в большинстве тканей органов норок. Даже в условиях сбалансированного поступления витаминов с кормом в период гона содержание витамина Е в сыворотке крови норок и песцов снижается. В период лактации концентрация токоферола в крови самок увеличивается и, соответственно, снижается активность СОД в эритроцитах.

Учитывая синхронность изменений АОФ в тканях органов и эритроцитах, использование определения активности эритроцитарной СОД можно рекомендовать в качестве теста для характеристики состояния АОС целого организма.

Влияние голодания на активность СОД и каталазы в тканях органов норок и песцов

В условиях клеточного звероводства пищевой фактор, наряду с заболеваниями, становится чуть ли не основным, влияющим как на плодовитость животных, так и на их рост и развитие.

Опыт по влиянию пищевой депривации был проведен на норках 40-дневного возраста, когда в практике звероводства принято отсаживать детенышей от матери, а затем рассаживать их попарно в отдельные клетки. Даже такая нагрузка приводила к значительному увеличению активности АОФ в тканях печени и почек, хотя соотношение СОД/каталаза в печени оставалось стабильным. Жизненно важные органы (сердце, легкие, мозг) не испытали существенных изменений. Указанные отклонения, очевидно, связаны со стрессорирующим воздействием голодания в данном возрасте. Нельзя также исключить и аддитивное влияние на активность ферментов изменения уровня метаболизма.

Исследование влияния 4-х дневного голодания на семимесячных песцах выявило несколько иную картину. Изменения при этом, даже более длительном голодании, в большинстве органов были не столь значительны как у норок. Активность обоих ферментов оставалась стабильной в почках. Вместе с тем, наблюдалось снижение активности СОД и каталазы в печени и легких, а также достоверное снижение удельной активности СОД и повышение активности каталазы в селезенке, что сопровождалось достоверным снижением соотношения СОД/каталаза в этом органе. Обращает на себя внимание факт разнонаправленного изменения активности АОФ в скелетной мышце: СОД в сторону снижения, а каталазы - достоверного увеличения. Через одну неделю восстановительного кормления в большинстве органов уровень активности ферментов возвращался к исходному. Исключением являлись только легкие и селезенка. В первых как активность, так и удельная активность каталазы (и, соответственно, соотношение СОД/каталаза) еще более снижались, в то время как в ткани селезенки изменение активности каталазы имело направленность противоположную таковой при голодании.

Наблюдаемые различия при голодании двух видов, очевидно, связаны как с возрастными особенностями, так и с особенностями их биологии.

Для песцов длительное голодание не является сильным стрессирующим фактором и чем-то необычным в условиях природы. При имеющихся у них в это время запасах жира животные способны голодать около трех недель в природе и более месяца в условиях клеточного содержания (Заболотских, 2000; Prestrud, Nilssen, 1992). Снижение же активности ферментов в ряде органов, очевидно, является отражением общей тенденции к снижению базального метаболизма, а, соответственно, и потребления кислорода в целом, характерного для всех млекопитающих при голодании.

Активность СОД и каталазы в тканях органов песцов из малых и больших пометов

Учитывая то, что клеточные пушные звери получают нормированное количество корма, и этот фактор является равным для всех, мы предприняли попытку выяснить, сколь сильно влияние такого показателя, как количество щенков в помете на рост, развитие и уровень АОФ. Было установлено, что масса тела щенков из разных по размеру пометов различается уже в раннем возрасте (2 и 10 дней). Эти различия составляют 22,06% и 23,87% в пользу щенков из малых пометов. Аналогичные различия отмечены и другими исследователями (Ahlstrom et al., 2000) и объясняются меньшим количеством молока, которое получают щенки из больших пометов. В период после отсадки на рост щенков влияли и такие факторы, как пол и дата рождения, но самцы и самки из малых пометов весили больше. При этом половой диморфизм по массе тела был более выражен в малых пометах.

Изучение уровня АОФ в тканях печени и селезенки песцов из разных по величине пометов подтвердило хорошо известную закономерность о том, что животные меньшего размера обладают более высокой удельной интенсивностью обменных процессов. Поскольку при более интенсивном метаболизме увеличивается потребление кислорода и возрастает возможность образования его активных форм, активность СОД и каталазы также должна повышаться. За исключением изменений в печени у самцов из больших пометов, такое явление действительно наблюдалось. При этом уровень белка в изученных органах был одинаковым у двух групп, а активность ферментов возрастала, что указывает на повышенную необходимость в антиоксидантной защите.

Оценка состояния АОС, базирующаяся на анализе коррелятивных зависимостей, показывает, что у песцов из больших пометов напряженность ее функционирования значительно меньше, чем из малых. При этом корреляционная плеяда, связанная с активностью ферментов

в печени, у последних носит даже черты некоторого «заикливания» — наличие только положительных связей. Данный факт легко объяснить, поскольку как самки, так и самцы из малых пометов превышали по весу своих сверстников из больших пометов. Такое превышение было связано не с дополнительным накоплением мышечной массы, а с увеличенным накоплением жировых запасов (Rouvinen, 1989).

Активность СОД и каталазы в тканях органов норок при алеутской болезни

Алеутская болезнь (АБ) норок является хроническим контагиозным заболеванием, приносящим значительный урон клеточному пушному звероводству (Берестов, 1971; Слугин, 1975). Имеются предположения (Ellis, 1994), что АОФ играют важную роль в патогенезе АБ.

В органах 20 больных норок, дающих положительную реакцию по РИЭОФ (свидетельство наличия антител к вирусу АБ), были отмечены в различной степени выраженные сдвиги активности АОФ (Таблица). У норок с прогрессивной формой заболевания, имеющих положительную реакцию РИЭОФ и уровень сывороточных γ -глобулинов, превышающий 21%, удельная активность СОД увеличивалась на 21-25,7% во всех органах, за исключением легких и скелетных мышц, по сравнению со здоровыми животными, в то время как в легких она снижалась на 44%. Удельная активность каталазы в тканях печени, легких, скелетной мышцы и селезенки больных животных снижалась на 6-30%, а сердца и почек возрастала на 7-10%. В результате указанных изменений происходило резкое увеличение на треть соотношения СОД/каталаза в тканях печени и селезенки, на 11% в ткани почек и 18% - скелетной мышцы и сердца с одновременным снижением этого индекса в легочной ткани.

Значительное изменение соотношения в селезенке, печени и почках, очевидно, было связано с нарушениями в этих органах, которые сильнее всего страдают на более поздних стадиях развития данного заболевания. Существенное снижение количества белка в почках, вероятно, связано с плазмоклеточной инфильтрацией, а увеличение в легких - с нарастанием в них количества макрофагов.

Анализ зависимости между активностью АОФ и одним из показателей тяжести заболевания - уровнем γ -глобулинов в сыворотке крови, позволил выявить связь последнего с таким показателем как соотношение СОД/каталаза в тканях печени, сердца, почек и легких, что свидетельствует об изменении активности не одного антиоксидантного фермента в каком-либо отдельном органе, а АОС организма в целом. На начальных

стадиях изменения активности ферментов могли быть обусловлены адаптивными перестройками, в то время как на более поздних- отражали степень нарушений в органах и тканях.

Таблица

Изменение удельной активности АОФ и их соотношения в органах норок при АБ (в % по сравнению со здоровыми животными, знак указывает на направленность изменений)

Ткани органов	Исследуемые показатели			
	Содержание белка	Активность СОД	Активность каталазы	Соотношение СОД/каталаза
Печень	-2,30	+21,77	-11,48	+31,03
Почки	-9,18	+26,43	+9,92	+11,61
Легкие	+15,0	-44,00	-30,00	-6,96
Ск. мышцы	-1,90	-4,84	-30,43	+18,05
Селезенка	-8,91	+20,58	-6,82	+34,48
Сердце	-2,40	+25,71	+7,40	+17,83

Изменение активности эритроцитарной СОД у норок и песцов при лактационном истощении и у норок-стригунов

Примером успешного использования определения активности эритроцитарной СОД в диагностических целях являются случаи, связанные с лактационным истощением самок норок и песцов в период выкармливания потомства, а также у норок-стригунов.

Показано, что сбалансированность рационов способствовала нормальному прохождению лактации. Несбалансированность рационов по аминокислотному составу белка, равно как и его дефицит, приводили к однонаправленным и существенным изменениям в соотношении белковых фракций сыворотки крови и активности ферментов. Все эти изменения являются признаком развивающегося лактационного истощения самок и значительного снижения возможностей биосинтеза функциональных белков (Берестов, Кожевникова, 1981; Brandt, 1989). Наиболее характерным изменением является четко выраженная гипоальбуминемия, особенно у самок с большими пометами (относительное содержание данной фракции падало в 1,29 - 1,46 раза). О напряженности обменных процессов свидетельствует более чем двукратное увеличение активности СОД в эритроцитах, которое не всегда было связано с изменениями в картине «красной» крови. В ряде случаев оно наблюдалось и тогда, когда показатели уровня эритроцитов и гемоглобина находились в пределах доверительных границ нормы.

При несбалансированном и неполноценном питании в период лактации возрастает количество корреляционных связей - если при сбалансированном кормлении оно к концу лактации у норок было небольшим (4), то при несбалансированном питании возрастало до 7-10. Для самок песцов нагрузка в виде несбалансированного кормления приводила к более значительному возрастанию количества корреляционных связей между различными морфо-биохимическими показателями крови.

Распространенность «стрижки» меха колеблется от фермы к ферме и из года в год в значительных пределах - от полного отсутствия до массовой пораженности стада. У щенков повреждение опущения отмечается вследствие переноса их самками, а также в период после отсадки и не зависит от времени разделения помета и окружающей социальной среды (Damgaard, Hansen, 1996). У половозрелых животных обкусывание меха друг у друга возникает в процессе активного сексуального поведения или агрессии (Houbak, Hansen, 1996). Интенсивность его изменяется по сезонам, а в течение суток возрастает в периоды наибольшей двигательной активности (Malmkvist, Hansen, 1996). Некоторые авторы отмечают строго определенное время появления этого порока и его связь с линькой (Комарова, 1972; Линейцева, 1981, Покк, 1963).

При обследовании норок с нормальным волосным покровом, «стригунов», остриженных и обрастающих после «стрижки» отмечено ослабление обменных процессов, о чем свидетельствуют снижение активности в сыворотке крови ферментов углеводного (ЛДГ), белкового (АСАТ) обмена и эритроцитарной СОД, а также показателей гемопоэза (эритроциты и гемоглобин) до нижней границы нормы или даже ниже ее в зависимости от группы. Более низкая концентрация гемоглобина и содержание эритроцитов наблюдались у норок собственно "стригунов" и остриженных. Корреляционный анализ показал, что в зависимости от стадии нарушения изменяется характер и количество связей между отдельными параметрами крови с наибольшим их количеством у норок-«стригунов».

Как и при лактационном изменении активности эритроцитарной СОД представляют собой неспецифическую реакцию и отражают компенсаторные реакции организма в целом и, прежде всего, те перестройки, которым подвергается эритроцит - изменение интенсивности кислород-транспортной функции, а также микроокружения - перестройки лейкоцитарного профиля крови, связанные со стресс-реакцией. Исследование активности СОД в данном случае оказывается полезным в связи с необходимостью более тонко дифференцировать стадию нарушения.

Использование системы антиоксидантных ферментов при изучении влияния биологически активных веществ и витамина Е

Влияние янтарной кислоты на активность СОД и каталазы в ткани печени у норок

Длительное исследование ЯК в лаборатории экологической физиологии животных Института биологии КарНЦ РАН позволило выявить ее адаптогенное влияние на рост и развитие норок, что отражалось и на качестве получаемой от них пушнины (Патент № 150704 ХРП от 01.04.1993 г.).

Влияние ЯК на систему АОФ в ткани печени норок исследовали на фоне сбоев в кормлении животных. Нарушение режима кормления норок (вместо двухразового ежедневного кормления животные получали корм нерегулярно с перерывами 1 - 2 дня в течение 2 месяцев, дефицит белка и энергии за этот период составил 10 - 15%) приводило к снижению активности обоих ферментов, по сравнению с нормой. У норок, получавших ЯК, наблюдалась одинаковая тенденция возрастания уровня активности СОД и каталазы. Однако, поскольку исходные значения у самцов и самок различались, то степень изменений под влиянием ЯК была различной. Так, активность каталазы у самок осталась на том же уровне, поскольку была близка к норме, в то время как у самцов наблюдалось значительное ее возрастание. Проявление антиоксидантных свойств ЯК, очевидно, было связано с активацией системы АОФ. Введение в организм ЯК стимулирует катехоламинергическую систему (Кондрашева, 1991) и усиливает деятельность скелетных мышц, сердца, почек, нейроэндокринной системы, повышает устойчивость к стрессу. Усиление энергетики и, возможно, утечка электронов полностью компенсировалась в данном случае возрастанием активности АОФ.

В тканях органов у всех исследованных видов млекопитающих нам редко удавалось зарегистрировать какие-либо половые различия в активности СОД и каталазы. В данном же случае половые различия отмечены как в ответ на нарушение режима кормления, так и при использовании в качестве кормовой добавки ЯК. Таким образом, отмечаемая исследователями различная устойчивость самок и самцов к внешним воздействиям реализуется, в том числе, и на уровне клеточных антиоксидантных ферментов, которые достаточно чутко реагируют на все воздействия. Тот факт, что нарушения кормления в меньшей степени сказались на активности СОД и каталазы у самок, свидетельствует о большей устойчивости их АОС.

Влияние мидийного гидролизата на активность СОД и каталазы в ткани печени норок в норме и при алеутской болезни

Несмотря на то, что АБ приносит значительный урон клеточному пушному звероводству (Берестов, 1971, Слугин, 1975), до сих пор не найдено радикальных средств борьбы с этим заболеванием. Карантинные меры и выбраковка в период забоя инфицированных животных не дают ожидаемого результата. Даже в странах, где имеются специальные программы борьбы с АБ, получаемые результаты далеки от ожидаемых.

Поэтому актуален поиск БАВ, позволяющих получить качественную пушнину даже от больных норок. Ряд проведенных экспериментов с мидийным гидролизатом (МИГИ-К) показал его эффективность. Гидролизат у всех спонтанно инфицированных вирусом животных, независимо от схемы и длительности применения, вызывал перераспределение в белковой картине сыворотки крови в сторону снижения содержания у-глобулинов, играющих существенную роль в патогенезе АБ (Узенбаева с соавт., 1999 а, б). Полученные данные представляют несомненный интерес, поскольку снижение концентрации структурно аномальных и функционально неполноценных белков является одним из критериев ремиссии при лимфопролиферативных заболеваниях. Положительное влияние препарата на уровне целого организма у больных норок выражалось в усилении интенсивности роста.

Изменения, происходящие с АОФ печени, зависели от пола животных, дозы и режима введения препарата, но в большинстве случаев имели направленность, противоположную той, которая наблюдается у инфицированных норок по сравнению со здоровыми.

Так, если у больных АБ норок в ткани печени отмечалось повышение активности СОД и снижение активности каталазы с параллельным нарастанием индекса соотношения этих двух ферментов, то введение МИГИ-К приводило к изменениям обратной направленности (рис. 5). У больных самок обе дозы снижали активность СОД и индекс соотношения СОД/каталаза, а доза 0,5 мл/кг приводила еще и к повышению активности каталазы. У самцов же повышение активности каталазы происходило при применении обеих доз, хотя доза 0,2 мл/кг не приводила к изменению активности СОД, а доза 0,5 мл/кг даже повышала ее.

Оценка состояния организма по степени скоррелированности морфо-биохимических показателей крови, так же как и изменения со стороны СОД и каталазы, свидетельствуют о снижении напряженности его функционирования, а изменения фракционного состава сывороточного белка о купировании патологического процесса.

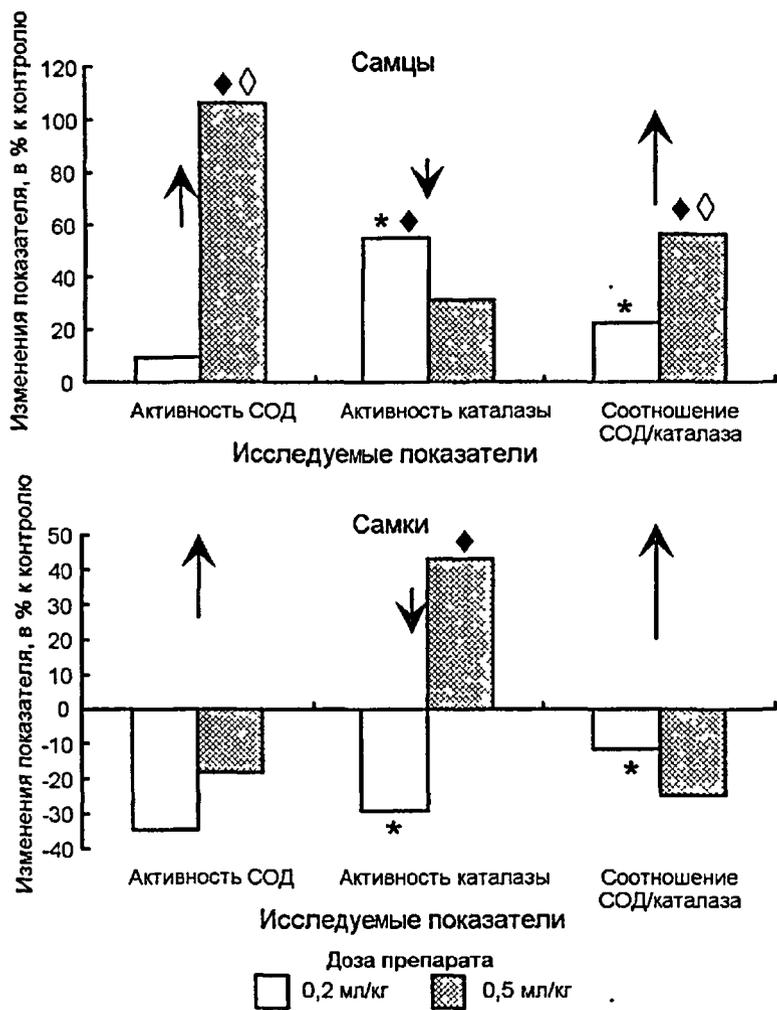


Рис. 5. Влияние МИГИ-К на содержание белка, активность СОД и каталазы в печени щенков темно-коричневых норок, больных АБ

Условные обозначения размер и направление стрелок указывают направленность и величину изменения показателя у больных норок
 Различия достоверны (Критерий Вилкоксона-Манна-Уитни) в группе между самцами и самками (*), по сравнению с контрольной группой (♦), по сравнению с группой, получавшей 0,2 мл/кг гидролизата (0)

Сходные результаты были получены при изучении влияния МИГИ-К на здоровых щенках темно-коричневых норок. Направленность и выраженность изменений зависела как от пола, так и от дозы добавки. Все статистически значимые изменения активности СОД и каталазы имели направленность, противоположную той, которая наблюдается у норок при АБ, но степень изменений активности АОФ в ткани печени у здоровых животных была меньше, чем у больных.

Влияние дополнительного потребления витамина Е на активность СОД и каталазы в ткани печени песцов

Дополнительное введение сверх рекомендуемой нормы витамина Е не оказывало значительного влияния на показатели воспроизводства самок песцов, динамику роста щенков и не вызывало существенных изменений ферментов АОС в печени у их потомства. Оно также не оказывало статистически значимого эффекта на морфо-биохимические показатели крови самок или полученных от них щенков. Отмеченная тенденция некоторого улучшения показателей воспроизводства (сохранности молодняка) в опытной группе, получавшей дополнительный витамин в период беременности и лактации, проявлялась также и в показателях воспроизводства взрослых самок и их потомства на следующий год.

Вместе с тем подопытные самки имели более высокий уровень витамина Е как в крови ($32,3 \pm 9,5$ мкг/мл), так и в молоке ($59,1 \pm 22,7$ мкг/мл), по сравнению с контролем ($23,9 \pm 8,1$ мкг/мл и $39,9 \pm 10,3$ мкг/мл, соответственно), при отсутствии различий между группами в активности глутатионпероксидазы. Наряду с этим, количество жира в молоке опытной группы было ниже, а относительное содержание жирных кислот было таким же, хотя биологический смысл такого изменения не совсем понятен.

Таким образом, при сбалансированном поступлении в организм песцов всех необходимых витаминов, в том числе и антиоксидантов, отсутствует необходимость их дополнительного введения. Ответной реакцией на такое экспериментальное воздействие является лишь незначительное изменение активности СОД и каталазы, и достоверное снижение содержания жира в молоке самок. Очевидно, столь низкая эффективность воздействия была связана с отсутствием напряженности функционирования системы в исходном состоянии.

Изменение активности СОД в эритроцитах различных видов млекопитающих при экспериментальных воздействиях

Оказывая положительное влияние на воспроизводительную функцию у самок норок, ЯК обладала адаптогенным эффектом. У норок, сохранившихся на рационах с ЯК, проявления лактационного истощения

(анемия, повышение эритроцитарной СОД и др.) были выражены слабее или вообще отсутствовали, несмотря на большее количество выращенных ими щенков. В опытах на песцах адаптогенное влияние *ЯК* было менее выражено.

Дополнительное введение витамина Е самкам песцов в период беременности и лактации оказало двоякое действие на их потомство - наряду со стимуляцией репродуктивной функции витамин продемонстрировал типичные антиоксидантные свойства и оказал модулирующее влияние на активность СОД в эритроцитах. Исследование в период первой лактации самок, от матерей получавших витамин Е, позволило выявить у них снижение как количества эритроцитов, так и уровня гемоглобина, что, очевидно, было связано с наличием в их пометах большего числа щенков, нежели у контрольных животных и, соответственно, с повышенной лактационной нагрузкой. Отсутствие различий в активности эритроцитарной СОД может свидетельствовать о достаточно высоком уровне эндогенных антиоксидантов у этих животных и отсутствии необходимости усиления работы ферментного звена АОС.

Влияние на активность эритроцитарной СОД, а также зависимость этого влияния от пола животных отмечено для МИГИ-К. Несмотря на существенные изменения со стороны эритроцитов и гемоглобина активность СОД у лактирующих самок норок оставалась на стабильном уровне. Значительное увеличение активности СОД в эритроцитах крови щенков норок опытных групп под влиянием МИГИ-К было сопряжено с усилением метаболизма.

Таким образом, влияние различных БАВ (*ЯК*, МИГИ-К) и витамина Е на активность СОД в эритроцитах в значительной степени зависели от вида (норка, песец) животных, их пола и возраста (молодые растущие или половозрелые), а также физиологического состояния (норма, физиологическая нагрузка, патология).

Выводы

1. Установлено участие системы антиоксидантных ферментов в этнотипических и фенотипических адаптациях на восьми видах млекопитающих. Высокая активность антиоксидантных ферментов в печени выявлена у представителей отряда грызунов (нутрий и крыс), отряда хищных — семейства псовых (песцов, лисиц и енотовидных собак) и семейства куньих (норок и хорьков). Шиншилла, как представитель высокогорной фауны, отличающаяся от других видов

- грызунов по экогенезу, характеризуется максимальной активностью каталазы в почках. Активность антиоксидантных ферментов в ткани одного и того же органа может значительно отличаться даже у таксономически близких видов, различающихся по экологическим особенностям существования их диких предковых видов.
2. Впервые обнаружена органоспецифичность становления системы антиоксидантных ферментов в постнатальном онтогенезе у норок и песцов. Выявлено, что у песцов, по сравнению с норками, наблюдается более раннее формирование антиоксидантной системы, характеризующееся высокой активностью антиоксидантных ферментов в пятидневном возрасте в тканях сердечной и скелетной мышцы. Снижения активности супероксиддисмутазы и каталазы в тканях органов песцов, как одного из признаков «старения» системы, до 4,5 лет не наблюдается.
 3. Показано, что активность антиоксидантных ферментов у взрослых норок и песцов определяется рядом факторов - уровнем кормления, динамикой роста, гормональным фоном. У песцов, по сравнению с норками, в тканях органов и эритроцитах сильнее выражено увеличение активности антиоксидантных ферментов, связанное с репродуктивным периодом.
 4. Кратковременное (однодневное) голодание 40-дневных щенков норок, приводит к существенному увеличению активности антиоксидантных ферментов в тканях всех органов, за исключением сердца и мозга. У песцов, для которых периоды голодания являются обычным явлением и в природе, при четырехдневном голодании не наблюдается значительных изменений активности супероксиддисмутазы и каталазы в тканях органов.
 5. У норок при алеутской болезни выявлена четкая зависимость между активностью антиоксидантных ферментов и тяжестью заболевания, характеризующейся повышением уровня у-глобулинов в сыворотке крови. Уже на ранних стадиях заболевания наблюдаются изменения антиоксидантной системы в тканях печени, почек и селезенки, в которых деструктивный процесс выражен наиболее сильно.
 6. Направленность и выраженность изменений системы антиоксидантных ферментов под действием биологически активных веществ зависит от вида и пола экспериментальных животных и их физиологического состояния - у больных и ослабленных животных положительное воздействие биологически активных веществ проявляется значительно сильнее, чем у здоровых. Влияние янтарной кислоты на

активность антиоксидантных ферментов, показатели роста и воспроизводства норок и песцов носит ярко выраженный адаптивный характер. Изменения активности супероксиддисмутазы и каталазы при применении мидийного гидролизата у норок отражают протекторный и лечебный эффект препарата.

7. Показано, что дополнительное сверх рекомендуемых норм введение витамина Е самкам песцов в период беременности и лактации не влияет на их плодовитость и сохранность щенков, динамику роста и активность антиоксидантных ферментов полученного от них потомства.
8. Высокая чувствительность системы антиоксидантных ферментов к изменению факторов среды позволяет рекомендовать ее использование для целей физиолого-биохимического мониторинга состояния организма животных при клеточном разведении. Наблюдается синхронность изменений активности супероксиддисмутазы в эритроцитах и тканях органов пушных зверей, поэтому активность супероксиддисмутазы в эритроцитах крови может использоваться для прижизненной диагностики состояния антиоксидантной системы организма в целом.

Список использованных сокращений

АБ - алеутская болезнь норок,
АОС - антиоксидантная система,
АОФ - антиоксидантные ферменты,
АФК - активные формы кислорода,
БАВ - биологически активные вещества,
МИГИ-К - мидийный гидролизат кислотный,
РИЭОФ — реакция иммуно-электрофореза,
СОД - супероксиддисмутаза
ЯК - янтарная кислота.

Благодарности

Выражаю искреннюю признательность моим первым учителям в науке к.б.н. А.С. Погребному, чл.-корр. АН СССР А.И. Карамяну и д.м.н. Т.Н. Соллертинской, а также моему научному консультанту - д.б.н., проф. Н.Н. Немовой за разностороннюю помощь. Данная работа была бы невозможна без искренней заинтересованности и участия в обсуждении полученных материалов к.б.н. Л.Б. Узенбаевой и к.б.н. Л.К. Кожевниковой. Я также благодарю за помощь в работе с животными Х.И. Мелдо и Т.Г. Долгополову и специалистов зверосовхозов

Карелии. Благодарю за конструктивные замечания и продуктивную работу, при проведении совместных исследований сотрудников лаборатории к.б.н. Т.Н. Ильину, д.с.-х.н. Н.Н. Тютюнника, к.б.н. А.Р. Унжакова.

Отдельно хочу поблагодарить студентов (Н.А. Жевневу, О.С. Скотти, А.В.Ворошилову, С.А. Фролову), которые, выполняя курсовые и дипломные работы, оказывали техническую помощь в сборе материала.

Основные работы, опубликованные по теме диссертации

1. Илюха В.А. Модификация метода определения активности супероксиддисмутазы в реакции торможения автоокисления адреналина // Метаболическая регуляция физиологического состояния пушных зверей.- Петрозаводск, Карельский научный центр АН СССР - 1991.- С. 135-139.
2. Ilukha V.A., Uzenbaeva L.B., Meldo H.I. The connection between biochemical and cytochemical mink blood indices with litter size // Scientifur.-1993.-17, №1 - P. 13-16.
3. Илюха В.А. Использование супероксиддисмутазы и каталазы для тестирования физиологического состояния животных // Проблемы экологической физиологии пушных зверей.-Петрозаводск, Карельский научный центр РАН.-1994.-С. 35-50.
4. Илюха В.А. Ферменты антиоксидантной системы в раннем онтогенезе у норки // Онтогенез- 1995- 26, №2.- С. 115-118. (Ilukha V.A. Enzymes of the antioxidant system "during postnatal ontogenesis in the mink // Russian Journal of Developmental Biology-1995.-26, №2.-P. 92-94.)
5. Ilukha V.A., Uzenbaeva L.B., Kozhevnikova L.K., Tyutyunnik N.N., Unzhakov A.R. The changes of some blood indices of fur animals in lactation period // Scientifur.- 1996.-20, №3.-P. 48-53.
6. Илюха В.А., Узенбаева Л.Б., Мелдо Х.И. Устойчивость норки к алеутской болезни в зависимости от величины помета при клеточном разведении // С.-х. биология.- 1996.-№4.-С. 110-113.
7. Ilukha V.A., Uzenbaeva L.B. Aleutian disease of mink: the population analysis of problem // Animal Prod Review, Applied Science Reports-1996- 28 - P. 193-197.
8. Кожевникова Л.К., Илюха В.А. Узенбаева Л.Б., Тютюнник Н.Н., Мелдо Х.И. Биохимический мониторинг состояния норки в период лактации // Ветеринария.- 1997.-№4.- С. 48-51.
9. Kozhevnikova L.K., Ilukha V.A., Tyutyunnik N.N., Unzhakov A.R., Meldo H.I. Specificity of metabolic characteristics of farm-bred white mink // Scientifur.- 1997.- 21, №4 - P. 265-269.
10. Ilukha V.A., Harri M., Rekila T. Reproductive success of farmed blue foxes // J. Anim. Breed. Genet.- 1997- 114,№1.-P. 465-474.
11. Узенбаева Л.Б., Илюха В.А. Адаптогенное влияние янтарной кислоты на организм норки // Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве?- Пушино.- 1997.-С. 205-208.
12. Ilukha V.A., Kozhevnikova L.K., Tyutyunnik N.N., Unzhakov A.R., Meldo H.I. Activity of antioxidant enzyme and the LDH isoenzyme spectrum in organs of mink with Aleutian disease// Scientific.-1998-22, №4 -P. 309-314.

13. Узенбаева Л.Б., Илюха В.А., Тюпонник Н.Н., Мелдо Х.И., Бойков Ю.А. Мидийный гидролизат при алеутской болезни норок // Ветеринария.- 1998.- №12.-С. 21-23.
14. Узенбаева Л.Б., Илюха В.А., Тюпонник Н.Н., Мелдо Х.И., Унжаков А.Р. Эффект гидролизата из мидий при алеутской болезни норок // Вопросы вирусологии.- 1999.-№1.-С. 32-35.
15. Uzenbayeva L.B., Ilukha V.A. Morphobiochemical blood indices in mink with chewed fur // Scientific-1999.- 23, №4.- P. 261-265.
16. Ilukha V.A., Il'ina T.N., Ruokalainen T.R. Connection between levels of vitamins A, E and activity of erythrocytes superoxidizedismutase in farm-bred mink and Polar fox // Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernahrung von Mensch und Tier 7 Symposium, Jena.- 1999.-P. 362-367.
17. Ilukha V.A., Kozhevnikova L., Valtonen M., Kasanen S., Meldo K, Tyutyuimik N. Influence of vitamin E on physiological state, productivity and milk composition in blue fox // Problems of ecological physiology for animals- Petrozavodsk, 2000- V. 2.- P. 119-131.
18. Ilukha V.A., Harri M., Rekilä T. Relationship between weather conditions and cub losses in farmed blue foxes // Proceeding of the Vth International Scientific Congress in Fur Animal Production. Kastoria 2000- Scientifur.- 24, №4, 2000. Volume IV-B: Behaviour and Welfare. P. 151-154.
19. Узенбаева Л.Б., Илюха В.А. Морфобиохимические показатели и метаболизм лейкоцитов крови у норок-стригунов // С.-х. биология.-2001.- №4.- С. 78-82.
20. Илюха В.А. Супероксиддисуताза и каталаза в органах млекопитающих различного экогенеза // Журнал эволюционной биохимии и физиологии.- 2001.- 37, №3.- С. 183-186. (Ilukha V.A. Superoxide dismutase and catalase in the organs of mammals of different ecogenesis // J. evoluth. Biochem. and Phisysiol.- 2001.- 37, №3.-P. 241 - 245.)
21. Тюпонник Н.Н., Кожевникова Л.К., Кондрашова М.Н., Бадовская Л.А., Мелдо Х.И., Узенбаева Л.Б., Илюха В.А., Унжаков А.Р. Янтарная кислота как стимулятор // Кролиководство и звероводство.- 2002.- №4.- С. 7-8.'
22. Илюха В.А. Изменение антиоксидантной ферментной системы в раннем постнатальном онтогенезе у песцов // Современные проблемы природопользования, охотоведения и звероводства. Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию ВНИИОЗ (28-31 мая 2002 г.), Киров.- 2002.- С. 559-561.
23. Илюха В.А., Ильина Т.Н., Узенбаева Л.Б., Белкин В.В., Ворошилова А.В., Скотта О.С., Фролова Г.А., Якимов А.В. Антиоксидантная система в физиологических адаптациях млекопитающих // Наземные и водные экосистемы северной Европы: управление и охрана. Материалы международной конференции посвященной 50-летию Шститута биологии КарНЦ РАН.- Петрозаводск,- 2003.- С.61-65.
24. Тюпонник Н.Н., Кожевникова Л.К., Узенбаева Л.Б., Илюха В.А., Ильина Т.Н., Петрова Г.Г., Сироткина Л.Н., Малинина Г.М., Унжаков А.Р., Рендаков Н.Л., Олейник В.М., Свечкина Е.Б. Физиолого-биохимический статус организма норок и песцов и пути его оптимизации // Там же.- 2003.- С. 159-169.
25. Ilukha V.A. Superoxide dismutase and catalase in organs of three Canidae species // Scientifur.- 2003,- 26, №4.- P. 101-105.

Изд. лиц. №00041 от 30.08.99. Подписано в печать 03.03.04. Формат 60x84 ¹/₁₆
Бумага офсетная. Гарнитура «Times». Печать офсетная.
Уч.–изд. л. 2,0. Усл. печ. л. 2,0. Тираж 100 экз. Изд. № 11. Заказ № 403

Карельский научный центр РАН
185003, Петрозаводск, пр. А. Невского, 50
Редакционно–издательский отдел

№ - 47 0 1