

На правах рукописи



ХИЖКИН

Евгений Александрович

**ВЛИЯНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭПИФИЗА
НА ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ
ФЕРМЕНТОВ В ОРГАНАХ КРЫС**

03.03.01 – физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Петрозаводск – 2011

Работа выполнена в лаборатории экологической физиологии животных
Учреждения Российской академии наук Института биологии Карельского
научного центра РАН (ИБ КарНЦ РАН)

Научный руководитель: доктор биологических наук
ИЛЮХА Виктор Александрович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
ОЛЕЙНИК Виктор Михайлович

доктор медицинских наук, профессор
МЕЙГАЛ Александр Юрьевич

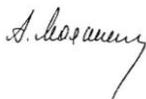
Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук
Институт физиологии Коми научного
центра Уральского отделения РАН
(г. Сыктывкар)

Защита состоится «25» ноября 2011 года в 14 часов на заседании диссер-
тационного совета ДМ 212.087.02 при Карельской государственной педа-
гогической академии по адресу: 185035, Республика Карелия,
г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Карельской государ-
ственной педагогической академии.

Автореферат разослан «___» октября 2011 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент



А. И. Малкиель

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Роль антиоксидантной системы (АОС) состоит в регуляции свободнорадикальных процессов и обезвреживании свободных радикалов и перекисей, к которым относятся активные формы кислорода (АФК). Их неконтролируемая наработка может привести к развитию патологий. Одним из способов защиты клеток от АФК является повышение (восстановление) активности антиоксидантных ферментов (АОФ) посредством усиления их функции и/или синтеза *de novo* (Gutteridge, 1995). Баланс между системами генерации и тушения АФК необходим для сохранения гомеостаза при действии на организм разнообразных факторов среды (Зенков, Ланкин, Меньщикова, 2001, 2003).

Реакция организма на изменение световых условий окружающей среды обусловлена функцией эпифиза (пинеальной железы). Изменение функционального состояния эпифиза возможно как за счет модификации световых ритмов, так и в результате применения веществ, усиливающих функциональную активность. Воздействие постоянного освещения приводит к подавлению синтетической функции эпифиза, а постоянной темноты к усилению синтеза гормона-геропротектора мелатонина (Simonneaux, Ribelayga, 2003; Stevens, 2005; Anisimov, 2006). На северо-западе России (в условиях Карелии) наблюдается своеобразный фотопериодизм с длинным световым днем в весенне-летний период и короткой продолжительностью дня в осенне-зимний период. Модифицирующее действие постоянного освещения на ферменты АОС описаны многими исследователями (Pablos et al., 1998; Albarran et al., 2001; Tomas-Zapico et al., 2003; Tunez et al., 2003), однако в подобных работах воздействие света было кратковременным.

Основную роль в геропротекторном действии мелатонина играют его свойства низкомолекулярного антиоксиданта. Возможны как минимум два механизма антиоксидантного действия гормона: 1) непосредственное улавливание АФК и/или торможение их генерации; 2) регуляция активности АОФ в результате воздействия на генетический аппарат клетки (Pierrefiche et al., 1993; Tan et al., 1994; Melchiorri et al., 1995). Усилению синтетической функции эпифиза и увеличению выброса в кровь мелатонина, помимо воздействия постоянной темноты, способствует синтетический тетрапептид – эпиталон (Ala-Glu-Asp-Gly) (Хавинсон, Анисимов, 2003).

В литературе имеются сведения о том, что эпифиз в определенные возрастные периоды способен запускать или тормозить внутреннюю «программу» старения организма (Pierpaoli, Bulian, 2001, 2005). До на-

стоящего времени остается не выясненным вопрос, как на разных стадиях онтогенеза эпифиз влияет на основные физиологические функции организма млекопитающих, в том числе и на активность АОФ.

Таким образом, изучение возрастных изменений активности АОФ при длительном нарушении светового режима на разных этапах постнатального онтогенеза, а также влияния препаратов эпифиза является не только актуальным, но и имеет практическую значимость.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы – изучение влияния измененного с помощью светового режима функционального состояния эпифиза и геропротекторов на возрастную динамику активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы тканей и органов крыс.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние различных световых режимов (стандартного, постоянного, естественного освещения в условиях Карелии и постоянной темноты) на изменения активности СОД и каталазы в органах крыс в ходе постнатального онтогенеза.

2. Оценить реакцию исследуемых ферментов на экзогенный мелатонин и эпиталон при старении в органах крыс, содержащихся в различных световых условиях.

3. Сравнить влияние момента начала воздействия постоянного освещения (в период внутриутробного развития, сразу после рождения, с 1 и 14 месяцев) на возрастные изменения активности СОД и каталазы в органах крыс.

Научная новизна. Впервые исследованы возрастные изменения АОФ тканей органов крыс при изменении функционального состояния эпифиза в течение длительного времени с помощью различных режимов освещения, а также на введение геропротекторов. Выявлено органоспецифичное возрастное снижение активности АОФ у крыс («старение» ферментативного компонента АОС). Воздействие на крыс естественного и особенно постоянного освещения ускорило этот процесс, а мелатонин и эпиталон замедляли его.

Впервые показано, что угнетение синтетической функции эпифиза постоянным освещением на разных этапах постнатального развития может как индуцировать, так и замедлять процесс «старения» ферментативного компонента АОС. Воздействие постоянного освещения на самок в период беременности, и крысят с момента рождения, приводило к рассогласованию активности АОФ у крысят уже в 3-месячном возрасте. Установлено, что у крыс, находившихся при постоянном освещении с одно-

месячного возраста, нарушение сопряженного изменения активности СОД и каталазы происходило в более позднем возрасте (12 и 18 месяцев). Воздействие постоянного освещения с 14-месячного возраста характеризовалось синхронным изменением активности АОФ и оказывало замедляющий эффект на «старение» ферментативного компонента АОС.

Практическая значимость работы. Полученные данные дополняют имеющиеся сведения о механизмах становления в онтогенезе ферментативного компонента АОС и его функционировании при изменении световых условий окружающей среды. Результаты исследований могут быть использованы для составления рекомендаций населению, проживающему в условиях светового загрязнения в крупных городах, а также на территории со специфическим фотопериодизмом (длинный световой день весной и летом – «белые ночи» – и короткий в осенне-зимний период).

Выявление антиоксидантных свойств мелатонина и эпигаллона у животных, содержащихся в условиях нарушенного светового режима, свидетельствует о перспективности применения этих препаратов в качестве средств профилактики патологических состояний, связанных с развитием окислительного стресса.

Результаты работы могут использоваться при чтении лекционных курсов по экологической физиологии и биохимии в высших учебных заведениях.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на всероссийских, региональных и международных конференциях: Симпозиум «Световой режим. Старение и рак.» (Петрозаводск-Кондопога, 2005); 10-я Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2006); II, III Съезд физиологов СНГ (Кишинев, 2008; Ялта, 2011); Всероссийская научно-практическая конференция «50 лет мелатонину: итоги и перспективы исследований» (Санкт-Петербург, 2008); XV Школа по биологии развития (Звенигород, 2008); конференция молодых ученых «Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых» (Москва, 2008); IV, V российский симпозиум «Белки и пептиды» (Казань, 2009; Петрозаводск, 2011); V, VI научно-практическая геронтологическая конференция с международным участием, посвященная памяти Э.С. Пушкиной «Пушковские чтения» (Санкт-Петербург, 2009, 2010); XXI съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2010); VIII Международная конференция «Биоантиоксидант» (Москва, 2010).

Положения, выносимые на защиту:

1. Возрастные изменения активности АОФ в органах крыс зависят от функционального состояния эпифиза. Угнетение синтетической функции эпифиза постоянным освещением на разных этапах постнатального развития может как индуцировать, так и замедлять процесс «старения» ферментативного компонента АОС.

2. Применение мелатонина или эпиталона оказывает компенсаторный эффект на возрастные изменения АОФ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 23 работы, включающие 7 статей, из которых 5 в журналах, рекомендованных ВАК.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста, содержит 2 таблицы и 11 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 частей результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 217 наименований, из них 148 иностранных.

Благодарности. Автор выражает искреннюю признательность и благодарность своему учителю и наставнику – научному руководителю д.б.н. Виктору Александровичу Илюхе, а также всем сотрудникам лаборатории экологической физиологии животных ИБ КарНЦ РАН и в частности к.б.н. Л.Б. Узенбаевой, к.б.н. Т.Н. Ильиной и к.б.н. С.Н. Сергиной за ценную профессиональную помощь, научные советы и дискуссии. Глубокая благодарность д.м.н., заведующей кафедрой фармакологии, организации и экономики фармации с курсами микробиологии и гигиены медицинского факультета ПетрГУ И.А. Виноградовой, д.м.н., профессору, руководителю отдела канцерогенеза и онкогеронтологии НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова В.Н. Анисимову, а также сотрудникам виария Петрозаводского государственного университета (ПетрГУ) за организацию и помощь в проведении экспериментов.

Работа выполнялась при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 04-04-49168 и № 07-04-00546), ФЦП ГК № 02.740.11.0700 и грантами Президента РФ НШ–306.2008.4 и НШ–3731.2010.4 (руководитель научной школы член-корреспондент РАН, д.б.н., профессор Н.Н. Немова).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были проведены на лабораторных крысах линии ЛИО (Ленинградский институт онкологии), полученных из НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова. Крыс содержали в стандартных помещениях вивария ПетрГУ площадью 25 м² в клетках размером 44x25x62 см при температуре 22±2°C. Все животные получали стандартный готовый лабораторный корм и воду без ограничений. Работа выполнена с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС), «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Биоэтических правил проведения исследований на человеке и животных».

Схемы постановки экспериментов. Исследование влияния различных режимов освещения на активность АОФ проводили на крысах, которых в 25-дневном возрасте рандомизировано разделили на 4 группы. Первая группа крыс находилась в условиях стандартного фиксированного режима освещения (12 часов свет 750 лк/12 часов темнота; LD). Вторая группа животных находилась в условиях естественного освещения (NL), в данном случае учитывались особенности годовой фотопериодичности северо-запада России. Многократные измерения освещенности производились в различное время суток в течение годового цикла. При данном режиме освещенность помещений определялась сезоном года: зимой минимальная продолжительность дня составляла 4,5 часа, а летом продолжительность светового дня достигала 20 часов («белые ночи»). Освещенность в помещении изменялась в течение суток и составляла на уровне клеток в утренние часы – 50-200 лк на 1 м² площади, днем – до 1000 лк в ясный день и 500 лк в пасмурный день, к вечеру – от 150 до 500 лк на 1 м² площади. Третья группа крыс содержалась при круглосуточном постоянном освещении (750 лк; LL). Животные четвертой группы находились в условиях световой депривации (DD), при этом освещенность в помещении составляла 0–0,5 лк на 1 м² площади.

В возрасте 4 месяцев крыс первых 3 групп разделили на 3 подгруппы. Крысы первой подгруппы получали ежемесячно 5 дней в неделю с питьевой водой в ночное время мелатонин (10 мг/л). Крысам второй подгруппы ежемесячно 5 дней в неделю подкожно в утренние часы вводили эпиталон по 0,1 мкг на крысу в 0,1 мл физиологического раствора. Крысы третьей подгруппы являлись контрольными. В работе были использованы мелатонин (N-ацети-5-метокситриптамиин) (Sigma; США); эпиталон

(Ala-Glu-Asp-Gly), синтезированный в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН; физиологический раствор (Polfа; Польша). В возрасте 6, 12, 18 и 24 месяца у 5 крыс из каждой подгруппы отбирали образцы тканей для последующего анализа (у животных в группе DD при красном свете).

Для исследования влияния на активность АОФ постоянного освещения, воздействие которого начиналось в период беременности самок и с момента рождения потомства были сформированы 3 группы беременных самок. Первая находилась в условиях стандартного (LD; 12 часов свет/12 часов темнота), вторая – естественного освещения Республики Карелия (NL) и третья – постоянного освещения (LL). Потомство от самок первой группы с момента рождения разделили на 2 подгруппы и содержали при стандартном (LD/LD) и постоянном (LD/LL) освещении. Крысята от самок второй и третьей групп после рождения оставались в тех же световых условиях, при которых находились их матери – естественном (NL/NL) и постоянном освещении (LL/LL), соответственно. В возрасте 3 месяцев у животных из каждой подгруппы отбирали образцы тканей для последующего анализа.

Опыт по изучению реакции АОФ крыс на постоянное освещение, воздействие которого начиналось с 14-месячного возраста, проводили на 3 группах животных. Первая содержалась в стандартных условиях освещения в течение всей жизни (12 часов свет/12 часов темнота; LD) и являлась контрольной, вторая и третья – при круглосуточном постоянном освещении с возраста одного месяца (LL) и 14 месяцев (LL-14), соответственно. Образцы тканей отбирали после декапитации в возрасте 6, 12, 18 и 24 месяца у 5 крыс из групп LD и LL и в возрасте 15, 18, 24 и 30 месяцев у 6 животных группы LL-14.

Методы исследования. Образцы тканей печени, почек, сердца, легких, селезенки и скелетной мышцы крыс отбирали после декапитации, замораживали и хранили до проведения анализа при -25°C . Для определения активности антиоксидантных ферментов гомогенаты тканей готовили в 0,05 М фосфатном буферном растворе ($\text{pH}=7,0$), после чего центрифугировали при 6000g в течение 15 мин.

Активность АОФ определяли спектрофотометрически: СОД – по модифицированной адrenoхромной методике (Misra, Fridovich, 1972), каталазы – по количеству разложенной перекиси водорода (Bears, Sizer, 1952). За 1 усл. ед. активности СОД принимали количество фермента, способное затормозить реакцию автоокисления адреналина на 50%. Активность каталазы выражали в мкмоль H_2O_2 , разложенной за 1 минуту. Активность ферментов рассчитывали на 1 г сырой ткани.

Полученные данные обрабатывали с использованием пакетов статистических программ MS Excel и Statgraphics общепринятыми методами вариационной статистики. Сравнение проводили с применением непараметрического критерия (U) Вилкоксона-Манна-Уитни. Для оценки степени влияния факторов на активность АОФ использовали дисперсионный анализ (Коросов, Горбач, 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние световых режимов на активность антиоксидантных ферментов в органах крыс

В результате проведенного эксперимента были выявлены органотканевые особенности возрастной динамики активности АОФ. В печени крыс, содержащихся в условиях стандартного освещения (12/12, LD), активность СОД (Рис.1) была выше у стареющих и старых животных (18 и 24 месяца, соответственно) по сравнению со взрослыми (12 месяцев). В сердечной мышце, легких и почках взрослых крыс отмечено значительное уменьшение активности СОД по сравнению с молодыми животными (6 месяцев).

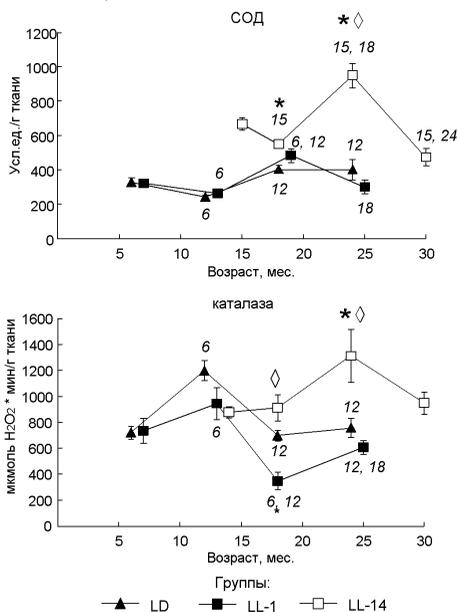


Рис. 1. Возрастная динамика активности АОФ в печени крыс при различных режимах освещения. (M±m)

Условные обозначения: LD – стандартное освещение, LL – постоянное освещение с месячного возраста, LL-14 – постоянное освещение с 14 месяцев; 6, 12, 15, 18, 24 – изменения достоверны по сравнению с 6-ти 12-ти, 15-ти, 18-ти и 24-месячными крысами при одинаковых световых режимах; * – различия достоверны по сравнению с животными, содержащимися при LD, ◇ – различия достоверны по сравнению с животными, содержащимися при LL ($p < 0,05$, критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Несмотря на сходство возрастных изменений активности данного фермента в сердце, легких и почках ее уровень значительно различался. Активность СОД в скелетной мышечной ткани у старых крыс (24 месяца) была достоверно ниже, чем у взрослых животных. Активность каталазы в процессе старения животных снижалась в печени (Рис. 1), почках и легких, не изменялась в сердце и незначительно увеличивалась в скелетных мышцах. В печени (Рис. 1) и почках возрастные изменения выявлялись не только в уровне активности, но и в рассогласовании сопряженных изменений активности антиоксидантных ферментов – при снижении активности СОД, активность каталазы повышалась и наоборот.

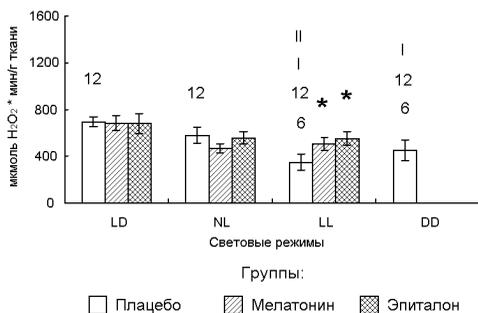


Рис. 2. Влияние световых режимов и геропротекторов на активность каталазы в печени 18-месячных крыс (M±m).

Условные обозначения: 6, 12 – изменения достоверны по сравнению с 6-ти и 12-месячными крысами, находившимися при одинаковых световых режимах; I, II – изменения достоверны по сравнению с животными, содержащимися при стандартном и естественном освещении, соответственно; * – изменения достоверны, по сравнению с плацебо ($p < 0,05$, критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

В отличие от других органов, в селезенке у старых животных наблюдалось возрастное повышение активности ферментов. У 24-месячных крыс активность СОД в этом органе была выше, чем у 12-месячных животных, а каталазы, чем у молодых крыс. Указанные изменения могут быть связаны со способностью лейкоцитов (количество которых в селезенке увеличивается с возрастом) генерировать АФК, повреждающих мембрану эритроцитов и усиливающих их гемолиз у старых животных (Weiss, 1980).

Несмотря на то, что крысы достаточно долгое время разводились и использовались как лабораторные животные, для изученных нами ферментов в большинстве органов зарегистрирована сезонная цикличность изменений. Так, например, в печени дисперсия активности СОД на 8,64% и каталазы на 13,54% определялась фактором «сезон».

Различные световые режимы оказывали модулирующее влияние на возрастные изменения ферментов АОС. Содержание животных с одномосячного возраста в условиях постоянного освещения (LL) приводило к снижению активности СОД в печени у 12-месячных крыс по сравнению с

животными при естественном освещении (NL) и в легких у 24-месячных крыс по сравнению с животными, находившимися в стандартных световых условиях (LD). В LL световом режиме активность каталазы в печени у стареющих крыс (Рис. 2), в почках у молодых и старых и в легких у старых крыс была ниже, чем у животных при стандартном освещении. Причиной таких изменений, вероятно, является угнетение постоянным освещением синтеза эпифизарного мелатонина – мощного антиоксиданта, способного не только непосредственно взаимодействовать с АФК, но и влиять на экспрессию генов кодирующих АОФ (Allegra et al., 2003; Rodrigues et al., 2004).

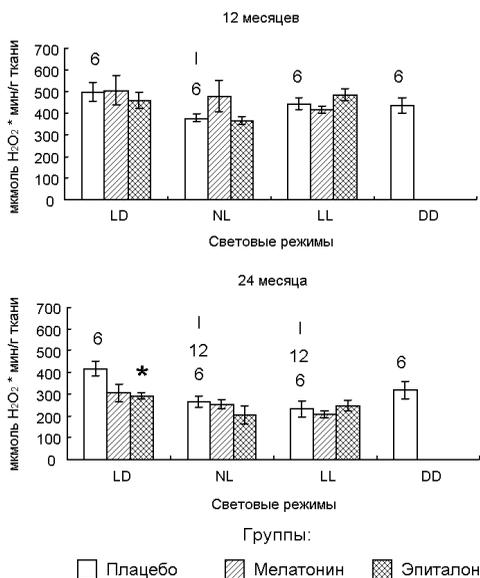


Рис. 3. Влияние световых режимов и геропротекторов на активность каталазы в почках крыс разных возрастов ($M \pm m$).
Условные обозначения: как на рисунке 2.

Влияние естественного освещения на уровень активности АОФ в органах крыс отмечено только в возрасте 12 и 24 месяцев. У крыс этих возрастов, в NL условиях освещения, происходило снижение активности СОД в легких, а также каталазы в почках (Рис. 3) и скелетных мышцах по сравнению с животными, содержащимися в LD режиме. Крысы достигали возраста 12 и 24 месяцев в конце мая, когда на северо-западе России наблюдается период «белых ночей» и продолжительность дня практически совпадала с LL режимом.

Возможно, сходное влияние естественного освещения Карелии в весеннее время года и постоянного освещения на возрастные изменения активности АОФ связано со снижением синтетической функции эпифиза при увеличении длительности светового дня.

Содержание животных в постоянной темноте (DD) способствует усилению работы эпифиза и сопровождается увеличением синтеза мелатонина этой железой (Simonpeaux, Ribelayga, 2003). Воздействие DD режи-

ма приводило к снижению активности СОД в легких у старых крыс и каталазы в печени стареющих животных (Рис. 2) по сравнению с крысами в группе LD. В других исследованных органах влияния постоянной темноты на активность АОФ не установлено. Те изменения, которые обнаружены при воздействии постоянной темноты были идентичны тем, которые наблюдались у крыс, находившихся при постоянном освещении. Вероятно, в DD световых условиях, в отличие от LL, когда синтез эпифизарного мелатонина блокируется, определяющим фактором являлось не увеличение концентрации мелатонина, а отсутствие суточной периодичности его синтеза (Simonneaux, Ribelayga, 2003).

С возрастом влияние на ферменты АОС таких факторов, как световой режим и пол животных становилось более выраженным (Рис. 4). По данным дисперсионного анализа у 6-месячных крыс влияния светового фактора на активность СОД в печени не было выявлено. В 12 месяцев дисперсия данного показателя в этом органе на 27,80%, а в 18 месяцев – на 28,05% определяется фактором «световой режим». Для активности каталазы в печени наблюдалась аналогичная картина: отсутствие влияния в 6 месяцев с последующим его увеличением до 22,74%, 28,24%, и 39,90% в старшие возрастные периоды (12, 18 и 24 месяца, соответственно). Влияние этого фактора на активность СОД в легких и активность каталазы в почках у старых крыс (24 месяца) было в 2,5 раза сильнее по сравнению с молодыми животными.

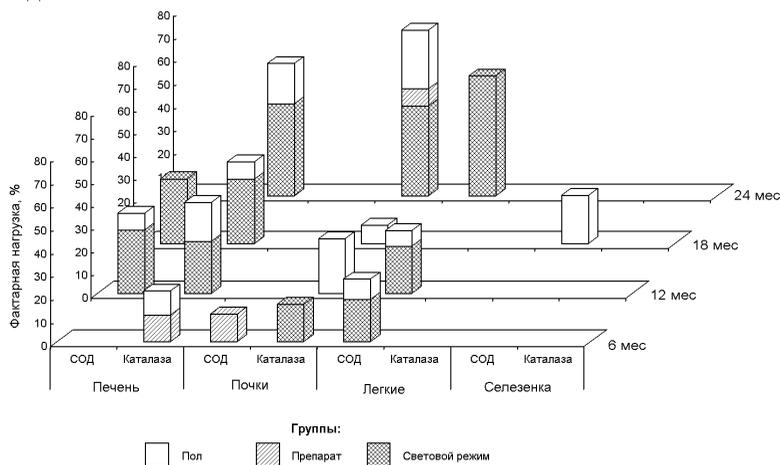


Рис. 4. Влияние изученных факторов на активность АОФ в органах крыс разного возраста (по данным дисперсионного анализа)

Полученные результаты свидетельствуют, что по мере старения животных в приспособительную реакцию все больше включаются АОФ, так как ферментативный компонент АОС, в отличие от низкомолекулярных антиоксидантов (Ильина и др., 2008), является эволюционно более молодым и более чувствителен к различным экспериментальным воздействиям (Зенков, Ланкин, Меньщикова, 2003).

Влияние фактора «пол животных» (Рис. 4), связано с уровнем половых стероидов у самцов и самок, что отражается на метаболизме мелатонина. Установлено, что тестостерон стимулирует синтез этого пинеального гормона, тогда как кастрация приводит к снижению его образования (Hernandez et al., 1990). При увеличении продукции эстрадиола синтез мелатонина снижается, а овариэктомия вызывает обратный эффект (Hayashi, Okatani, 1999; Okatani, Morioka, Hayashi, 1999).

Таким образом, выявлено органоспецифичное возрастное снижение активности исследованных ферментов у крыс, свидетельствующее о «старении» ферментативного компонента АОС. Изменение функционального состояния эпифиза при воздействии световых режимов оказывало модулирующее влияние на возрастную динамику активности СОД и каталазы в органах крыс. Содержание животных в условиях постоянного освещения с возраста 1 месяца приводило к снижению активности АОФ – ускоренному «старению» исследованной ферментной системы, что, вероятно, может являться следствием угнетения светом синтетической функции эпифиза. Наши данные согласуются с результатами И.А. Виноградовой (2009) о том, что у крыс в группе LL средняя и максимальная продолжительность жизни были меньше, а частота развития спонтанных новообразований повышена по сравнению с животными при LD. Снижение активности ключевых ферментов АОС, наблюдаемое нами в LL условиях, может сопровождаться неконтролируемым образованием АФК, что играет значительную роль при канцерогенезе и в процессе старения (Harman., 1956; Эмануэль, 1975).

Влияние естественного освещения зависело от сезона года. Активность как СОД, так и каталазы снижалась в весенний период при, практически, круглосуточном освещении («белые ночи»). Содержание животных в естественных световых условиях способствовало увеличению темпов старения, сокращению продолжительности жизни и повышению, даже в большей степени, чем при LL, риска развития опухолей (Виноградова, 2009), что по мнению автора связано с нарушением периодических процессов, направленных на приспособление организма к циклическим изменениям окружающей среды.

При усилении секреторной функции эпифиза (в условиях постоянной

темноты) возрастные изменения активности СОД и каталазы в ряде органов были сходны с теми, которые наблюдались при постоянном освещении. Возможно, в условиях световой депривации определяющим фактором является не увеличение уровня мелатонина, а отсутствие суточной периодичности его синтеза. Наряду с этим у крыс в группе DD отмечено снижение темпов старения организма и риска развития опухолей (Виноградова, 2009).

Влияние мелатонина и эпیتالона на активность антиоксидантных ферментов

Влияние геропротекторов на активность АОФ в органах крыс зависело от режима освещения, при котором содержались животные, и, опосредованно, от уровня эндогенного мелатонина, т.к. содержание при различных световых режимах приводит либо к блокаде при постоянном освещении, либо к усилению его синтеза при световой депривации (Анисимов и др., 1997; Анисимов, 2003; Reiter, 1993).

Отмечена тканевая специфика реакции исследованных ферментов АОС на препараты. У молодых крыс (6 месяцев), получавших мелатонин в стандартных световых условиях (LD), активность каталазы в печени была выше, чем у интактных животных. Введение эпیتالона при LD световом режиме приводило к снижению активности этого фермента в почках молодых и старых (Рис. 3) животных и в легких молодых крыс по сравнению с группой плацебо. Специфика изменений активности СОД и каталазы под влиянием геропротекторов может быть обусловлена особенностями взаимодействия мелатонина с активными формами кислорода. Гормон может реагировать с перекисью водорода, являющейся субстратом для каталазы, и не реагирует с супероксидным анион-радикалом, являющимся субстратом для СОД, что продемонстрировано в опытах *in vitro* (Marshall et al., 1996; Allegra et al, 2003).

В условиях постоянного освещения (LL) оба препарата вызывали повышение активности каталазы в печени 18-месячных (Рис. 2) и почках 6-месячных крыс по сравнению с контрольными животными. Известно, что воздействие постоянного освещения значительно снижает синтез эпифизарного мелатонина, а дополнительное введение гормона или вещества, стимулирующего его синтез, может являться причиной повышения активности АОФ. Сходное влияние препаратов было отмечено и в других исследованиях. Показано (Хавинсон, Мильников, 2000), что введение эпیتالона и мелатонина, значительно увеличивает удельную активность

каталазы и снижает уровень продуктов ПОЛ у *D. melanogaster*. Аналогичные результаты были получены при исследовании общей антиоксидантной активности сыворотки крови крыс, получавших мелатонин и эпителин (Анисимов и др., 1997).

У крыс, находившихся при естественном освещении (NL), влияние геропротекторов на активность АОФ было разнонаправленным. Эпиталон, в отличие от мелатонина, снижал активность СОД в почках у 18-месячных крыс и каталазы в легких у 12-месячных животных. Ранее (Анисимов и др., 1997) также была отмечена разнонаправленность влияния препаратов на активность СОД и церулоплазмينا и высказано предположение о том, что антиоксидантные свойства мелатонина связаны с его антирадикальной активностью – способностью непосредственно взаимодействовать со свободными радикалами, а эпителина – с воздействием на систему антиоксидантных ферментов.

В отличие от других изученных нами органов в сердечной и скелетной мышечной ткани применение гормона и тетрапептида не влияло на активность исследованных АОФ. Возможной причиной этого является низкий базальный уровень мелатонина в этих тканях, который лишь незначительно изменяется, по сравнению с другими тканями, при его дополнительном введении (Kveder, McIsaac, 1961; Lahiri et al., 2004).

Таким образом, максимальное количество изменений активности ферментов АОС в тканях органов под влиянием препаратов отмечено для групп, содержащихся в условиях постоянного и естественного освещения. Это согласуется с данными И.А. Виноградовой (2009) о том, что введение крысам в ночные часы мелатонина или в утреннее время эпителина оказывает нормализующее влияние на большинство показателей у животных, содержащихся в условиях постоянного или естественного режимов освещения, и приводит к замедлению процессов старения, торможению развития у них возрастной патологии, включая новообразования, и увеличивает продолжительность жизни.

Нами было показано, что при естественном освещении действие препаратов на активность АОФ носило преимущественно разнонаправленный, а при постоянном – однонаправленный характер. В последнем случае и мелатонин, и эпителин повышали активность каталазы, что, очевидно, связано с низким базальным уровнем эндогенного мелатонина. Введение экзогенного препарата даже в достаточно низких (физиологических) дозах приводило к имитации естественного периодического повышения его содержания в органах и тканях. Наблюдаемые в условиях естественного освещения изменения можно охарактеризовать как компенсаторные в ответ на поступление в организм мелатонина (экзогенного

антиоксиданта) или эпителина (вещества, повышающего его эндогенный уровень).

Влияние момента начала воздействия постоянного освещения на активность антиоксидантных ферментов в органах крыс

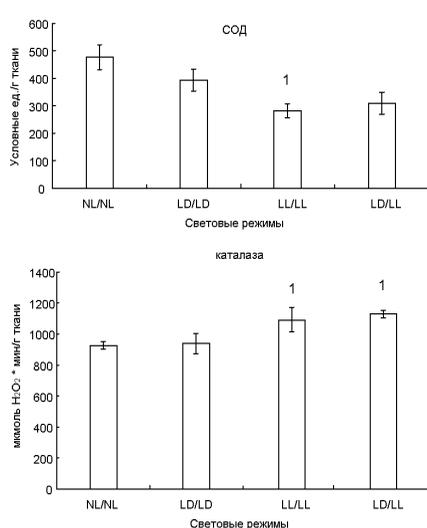


Рис. 5. Влияние режимов освещения на активность АОФ в печени 3-месячных крыс ($M \pm m$).

Условные обозначения: NL/NL, LD/LD, LL/LL – беременные самки и крысята от них с момента рождения содержались при естественном, стандартном и постоянном освещении, соответственно, LD/LL – беременные самки содержались при стандартном освещении, а крысята от них при постоянном освещении с момента рождения; 1 – изменения достоверны по сравнению животными, которые содержались в группе NL/NL ($p < 0,05$).

на декабрь, когда происходит уменьшение продолжительности светлого времени суток и увеличение длительности ночей на северо-западе России. Такие изменения фотопериода сопровождаются усилением синтеза антиоксиданта-мелатонина (Simonneaux, Ribelayga, 2003), что, возможно, являлось причиной полученных нами результатов.

Установлено, что воздействие постоянного освещения как на беременных самок, так и на крысят с момента рождения оказывало модулирующее действие на активность ферментов антиоксидантной системы потомства. Влияние постоянного освещения, независимо от того, подвергались ли его воздействию самки во время беременности и новорожденные крысята (LL/LL) или крысята сразу после рождения (LD/LL), вызывало рассогласование сопряженных изменений активности АОФ в печени (Рис. 5) и почках у крыс в 3-месячном возрасте. Это проявлялось значительным снижением активности СОД с параллельным повышением активности каталазы.

При естественном световом режиме (NL/NL) у 3-месячных крыс изменения активности антиоксидантных ферментов в печени (Рис. 5) и почках противоположны наблюдаемым в группах LD/LL и LL/LL. Данный возраст крыс (3 месяца) приходился

У крыс, содержащихся в условиях постоянного освещения с 14 месяцев (LL-14), наблюдалась синхронность изменений активности ферментов в печени (Рис. 1) и почках. При увеличении активности СОД возрастала и активность каталазы. Для этих ферментов в обоих органах зарегистрирована сезонная цикличность изменений, причем максимальные значения активности отмечались в двухлетнем возрасте, а не в 12 и 18 месяцев, как это происходило в группе LL.

В сердечной мышце и легких у крыс, содержащихся в LL режиме, активность СОД снижалась уже к концу первого года и сохранялась на этом уровне в течение дальнейшей жизни. У крыс LL-14 активность СОД в сердце резко увеличивалась, начиная с 15 месяцев, и среднее ее значение к 30 месяцам более чем в 7 раз превышало таковое у 15-месячных животных. Динамика возрастных изменений активности этого фермента в легких и селезенке крыс, содержащихся при постоянном освещении с 14 месяцев, в отличие от животных при LL освещении, характеризовалась V-образной кривой – снижалась к 24 и повышалась к 30 месяцам.

Полученные данные свидетельствуют о более позднем «старении» ферментативного компонента АОС в большинстве органов крыс, содержащихся при постоянном освещении с 14 месяцев, по сравнению с LL.

Таким образом, изменение активности АОФ в процессе старения зависело от возраста, в котором начиналось воздействие постоянного освещения. Угнетение синтетической функции эпифиза как у самок в период беременности, так и у новорожденных крысят приводило к рассогласованию в изменении активности СОД и каталазы. У крыс, находившихся при постоянном освещении с одномесячного возраста, нарушение сопряженных изменений активности СОД и каталазы происходило в более позднем возрасте (12 и 18 месяцев). У крыс, с 14 месяцев содержащихся в условиях постоянного освещения, отмечена синхронность изменений активности АОФ. «Старение» ферментативного компонента АОС у животных этой группы наблюдалось в более позднем возрасте (в 24 месяца), чем у крыс в LL режиме.

Эффект момента «физиологической пинеалэктомии» на активность АОФ согласуется с изменениями продолжительности жизни у крыс в группах LD, LL и LL-14 (Vinogradova et al., 2010). Было показано, что и у самок и у самцов крыс, находившихся в LL-14 режиме средняя и максимальная продолжительность жизни достоверно выше, чем у крыс, содержащихся при постоянном освещении с одного месяца. Средняя и максимальная продолжительность жизни крыс, содержащихся при LL освещении, были значительно ниже по сравнению с животными других групп.

Полученные нами результаты являются подтверждением предполо-

жения Уолтера Пиерпаоли (Pierpaoli, Bulian, 2005) о ключевой роли эпифиза в запуске «программы» старения организма. Воздействие постоянного освещения, подавляющего функциональную активность эпифиза, с возраста 14 месяцев, способно приводить к более позднему «старению» ферментативного компонента антиоксидантной системы крыс, что, возможно, является одной из причин продления жизни животных.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено органоспецифичное возрастное снижение активности АОФ у крыс («старение» ферментативного компонента АОС). При этом в ряде органов отмечается асинхронность в изменениях активности СОД и каталазы. Наиболее чувствительными к экспериментальным воздействиям оказались изученные показатели в печени и почках крыс.

2. Различные световые режимы оказывают модулирующее влияние на возрастные изменения активности СОД и каталазы в органах крыс. Постоянное освещение ускоряет процесс «старения» исследованной ферментной системы. Влияние естественного освещения зависит от сезона года – активность СОД и каталазы снижается в весенний период при круглосуточном освещении («белые ночи»). При постоянной темноте динамика возрастных изменений АОФ в ряде органов сходна с наблюдаемыми при постоянном освещении.

3. Действие мелатонина и эпیتالона на АОФ зависит от световых режимов, в которых содержатся крысы. Наблюдаемые изменения можно охарактеризовать как компенсаторные в ответ на поступление в организм мелатонина (потенциального антиоксиданта) или эпیتالона (вещества, повышающего его синтез).

4. Изменения активности АОФ при функциональном «выключении» эпифиза зависят от возраста, в котором начинается воздействие постоянного освещения. Угнетение синтетической функции пинеальной железы как у беременных самок, так и у крысят с момента рождения, приводит к рассогласованию сопряженного изменения активности СОД и каталазы у потомства.

5. Воздействие постоянного освещения с 14-месячного возраста характеризуется синхронным изменением активности СОД и каталазы и замедляет «старение» ферментативного компонента АОС.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АОС – антиоксидантная система,
АОФ – антиоксидантные ферменты,
АФК – активные формы кислорода,
ПОЛ – перекисное окисление липидов,
СОД – супероксиддисмутаза.
LD – группа крыс, содержащихся при стандартном освещении (12/12),
LL – группа крыс, содержащихся при постоянном освещении с одномесячного возраста,
NL – группа крыс, содержащихся при естественном освещении с одномесячного возраста,
DD – группа крыс, содержащихся при постоянной темноте с одномесячного возраста,
LL-14 – группа крыс, содержащихся при постоянном освещении с четырнадцатимесячного возраста,
NL/NL – беременные самки и крысята от них с момента рождения содержались при естественном освещении,
LD/LD – беременные самки и крысята от них с момента рождения содержались при стандартном освещении,
LL/LL – беременные самки и крысята от них с момента рождения содержались при постоянном освещении,
LD/LL – беременные самки содержались при стандартном освещении, а крысята от них с момента рождения при постоянном освещении.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах

1. Виноградова И.А., Юнаш В.Д., Федорова А.С., Илюха В.А., **Хижкин Е.А.**, Унжаков А.Р. Возрастные изменения физической работоспособности и некоторых биохимических показателей мышц крыс под влиянием световых режимов и гормонов эпифиза // Успехи геронтологии.– 2007.– Т. 20, №1. – С. 66 – 73.
2. Ильина Т.Н., Виноградова И.А., Илюха В.А., **Хижкин Е.А.**, Анисимов В.Н., Хавинсон В.Х. Влияние геропротекторов на возрастные изменения антиоксидантной системы печени крыс при различных световых режимах // Успехи геронтол. – 2008. – Т. 21, Вып. 3. – С. 386 – 393.
3. Vinogradova I.A., Anisimov V.N., Bukalev A.V., Plyukha V.A., **Khizhkin E.A.**, Lotosh T.A., Semenchenko A.V., Zabezhinski M.A. Circadian disruption induced by light-at-night accelerates aging and promotes tumorigenesis in young but not in old rats // Aging.– 2010.– Vol 2., № 1.– P. 82 – 92.
4. **Хижкин Е.А.**, Илюха В.А., Ильина Т.Н., Унжаков А.Р., Виноградова И.А., Анисимов В.Н. Антиоксидантная система и энергообеспечение сердца крыс при ста-

рении зависят от световых режимов и устойчивы к введению мелатонина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.– 2010.– № 3.– С. 363 – 365.

5. **Хижкин Е.А.**, Илюха В.А., Лотош Т.А., Виноградова И.А., Анисимов В.Н. Особенности реагирования антиоксидантных ферментов в органах крыс на нарушение циркадианных ритмов на разных этапах онтогенеза // Ученые записки Петрозаводского государственного университета.– 2010.– №4(109).– С. 22 – 26.

Работы, опубликованные в сборниках трудов, в материалах региональных, российских и международных конференций

6. Унжаков А.Р., Илюха В.А., **Хижкин Е.А.**, Виноградова И.А. Влияние световых режимов и гормонов эпифиза на изоферментные спектры лактатдегидрогеназы гомогенатов органов 18-месячных крыс // Медицинский академический журнал.– 2005.– 5, №3, прил. 7. (Симпозиум «Световой режим. Старение и рак», Петрозаводск, Кондопога, 2005., Материалы научной сессии). – С. 38 – 40.

7. **Хижкин Е.А.** Влияние световых режимов и гормонов эпифиза на возрастные изменения изоферментных спектров лактатдегидрогеназы мышечной ткани крыс // 10-я Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушкино, Московская область, 2006. С. 172.

8. Ильина Т.Н., Виноградова И.А., Унжаков А.Р., Руоколайнен Т.Р., Илюха В.А., Федорова А.С., **Хижкин Е.А.**, Вельб А.Н. Влияние световых режимов на возрастные изменения антиоксидантной системы и процесс гликолиза в органах крыс // 3-я Региональная научно-практическая конференция Северо-западного федерального округа «Проблемы геронтологии и гериатрии-2006». Сыктывкар, 2006. С. 86 – 87.

9. Илюха В.А., Калинина С.Н., Ильина Т.Н., **Хижкин Е.А.**, Подлепина Л.Г., Фартышева М.В. Реакция антиоксидантной системы млекопитающих на биологически активные вещества обуславливается экологическими особенностями вида // Научные труды II Съезда физиологов СНГ. Молдова, Кишинев, 2008. С. 262.

10. Илюха В.А., Белоус А.В., Виноградова И.А., Ильина Т.Н., Калинина С.Н., **Хижкин Е.А.** Является ли влияние мелатонина на антиоксидантную систему уравнением со многими неизвестными? // Тез. докл. Всероссийской научно-практ. конф. «50 лет мелатонину: итоги и перспективы исследований». Санкт-Петербург, 2008. С. 19.

11. Илюха В.А., Виноградова И.А., Ильина Т.Н., **Хижкин Е.А.**, Анисимов В.Н. Возрастные изменения систем генерации и тушения активных форм кислорода у крыс при различных световых режимах и их коррекция геропротекторами // Всероссийская конференция с международным участием «Северные территории России: проблемы и перспективы развития». Архангельск, 2008. С. 536 – 538.

12. **Хижкин Е.А.** Функциональное состояние эпифиза влияет на возрастные изменения антиоксидантных ферментов и метаболизма мышечной ткани крыс // Материалы конференции «XV Школа по биологии развития». Звенигород, Московская область, 2008. С. 112 – 114.

13. **Хижкин Е.А.**, Белоус А.В. Функциональное состояние пинеальной железы влияет на антиоксидантные ферменты и метаболизм в печени крыс // Материалы конференции «Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых». Москва, 2008. С. 401.

14. Илюха В.А., Виноградова И.А., Ильина Т.Н., Узенбаева Л.Б., **Хижкин Е.А.**, Унжаков А.Р., Голубева А.Г., Анисимов В.Н., Хавинсон В.Х. Влияние эпителина и мелатонина на физиолого-биохимические показатели крыс с различной функциональной активностью эпифиза // Тезисы докладов IV российского симпозиума «Белки и пептиды». Казань, 2009. С. 197.

15. Илюха В.А., Узенбаева Л.Б., Виноградова И.А., Ильина Т.Н., **Хижкин Е.А.**, Букалев А.В. О некоторых физиолого-биохимических особенностях старых крыс-опухоленосителей // V научно-практическая геронтологическая конференция с международным участием, посвященная памяти Э.С. Пушкиной «Пушковские чтения». Санкт-Петербург, 2009. С. 221 – 222.

16. **Хижкин Е.А.**, Лотош Т.А., Илюха В.А., Виноградова И.А. Особенности реагирования антиоксидантных ферментов в органах крыс на нарушение циркадианных ритмов на разных этапах онтогенеза // Там же С. 238 – 239.

17. **Хижкин Е.А.**, Морозов А.В., Айзиков Д.Л., Илюха В.А., Виноградова И.А. Постоянное освещение в период беременности и раннего постнатального онтогенеза модулирует активность антиоксидантных ферментов у крыс // VI научно-практическая геронтологическая конференция с международным участием, посвященная памяти Э.С. Пушкиной «Пушковские чтения». Санкт-Петербург, 2010. С. 293 – 294.

18. **Хижкин Е.А.**, Ильина Т.Н., Лотош Т.А., Илюха В.А., Виноградова И.А., Анисимов В.Н. Влияние постоянного освещения на антиоксидантную систему крыс зависит от возраста животных // Труды Карельского НЦ РАН.– 2010.– №2.– С. 62 – 67.

19. **Хижкин Е.А.**, Лотош Т.А., Илюха В.А., Виноградова И.А., Анисимов В.Н. Эффект постоянного освещения на антиоксидантную систему в органах крыс зависит от возраста животных // XXI съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова. Калуга, 2010. С. 655.

20. **Хижкин Е.А.**, Илюха В.А., Виноградова И.А., Лотош Т.А. Влияние мелатонина на возрастные изменения активности антиоксидантных ферментов у крыс с различным функциональным состоянием эпифиза // VIII Международная конференция «Биоантиоксидант». Москва, 2010. С. 495 – 496.

21. **Хижкин Е.А.**, Башникова И.В., Ильина Т.Н., Виноградова И.А., Илюха В.А. Влияние нарушения светового режима в период беременности и в раннем онтогенезе на антиоксидантную систему крыс // Медицинский академический журнал.– 2010.– 5, №10.– С. 223.

22. Илюха В.А., Виноградова И.А., Ильина Т.Н., Узенбаева Л.Б., **Хижкин Е.А.**, Кижина А.Г., Анисимов В.Н., Хавинсон В.Х. Сравнительная характеристика влияния эпителина и мелатонина на физиолого-биохимические показатели крыс // Тезисы докладов V российского симпозиума «Белки и пептиды». Петрозаводск, 2011. С. 223.

23. Илюха В.А., Виноградова И.А., **Хижин Е.А.**, Ильина Т.Н., Узенбаева Л.Б., Лотош Т.А., Айзиков Д.Л., Кижина А.Г., Анисимов В.Н. Влияние постоянного и естественного освещения на физиологическое состояние крыс – роль сроков начала воздействия // Научные труды III Съезда физиологов СНГ. Украина, Ялта, 2011. С. 292.

Сдано в печать 14. 10.2011 г. Формат 60x84¹/₁₆.
Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Уч.-изд. л. 1,1. Усл. печ. л. 1,3. Тираж 100. Изд. № 237
Заказ № 994

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