

УДК 591.542: 591.1: 599.323.4

ВЛИЯНИЕ ПОСТОЯННОГО ОСВЕЩЕНИЯ НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ КРЫС ЗАВИСИТ ОТ ВОЗРАСТА ЖИВОТНЫХ

**Е. А. Хижкин¹, Т. Н. Ильина¹, Т. А. Лотош²,
В. А. Илюха^{1,2}, И. А. Виноградова², В. Н. Анисимов³**

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² Петрозаводский государственный университет

³ НИИ онкологии им. проф. Н. Н. Петрова Росмедтехнологий

Исследована активность антиоксидантных ферментов и содержание токоферола в различных органах, а также продолжительность жизни крыс, подвергавшихся воздействию постоянного освещения с месячного и четырнадцатимесячного возраста. Установлено, что влияние постоянного освещения начиная с 14-месячного возраста способно приводить к более позднему «старению» антиоксидантной системы, что, возможно, является одной из причин продления жизни животных. Содержание животных с месячного возраста при постоянном освещении оказывает противоположное воздействие на компоненты АОС и сопровождается сокращением жизни крыс.

Ключевые слова: постоянное освещение, антиоксидантная система, продолжительность жизни.

**E. A. Khizhkin, T. N. Ilyina, T. A. Lotosh, V. A. Ilukha, I. A. Vinogradova,
V. N. Anisimov. EFFECT OF CONTINUOUS LIGHT ON RATS ANTIOXIDANT
SYSTEM IS DEPEND ON ANIMALS AGE**

We evaluated the effect of exposure to constant light started at the age of 1 month and at the age of 14 months on the survival, life span and age-related dynamics of activity antioxidant enzymes and level of α -tocopherol in various organs in comparison to the rats maintained at the standard (12 : 12) light/dark regimen. The exposure to constant light started at the age of 14 months delayed aging of enzymatic and non-enzymatic component of antioxidant defence system that, probably, is one of the reasons of prolongation of a life span of animals. Circadian disruption induced by light-at-night started at the age of 1 month accelerates aging.

Key words: light-at-night, antioxidant enzymes, life span.

Введение

Открытие чуть более полувека назад мелатонинсекретирующей роли эпифиза привело к интенсивному изучению физиологических функций этого органа, ранее считавшегося рудиментарным. Установленные для мелатонина уникальные антиоксидантные свойства позво-

лили возвести эпифиз в ранг органов, контролирующих не только формирование различных биологических ритмов, но и процесс старения, по крайней мере, у млекопитающих [Pierpaoli, Bulian, 2001]. Несмотря на то что свет является практически единственным экологическим фактором, обладающим четко выраженной суточной и сезонной периодичностью, физиоло-

гические механизмы его влияния на организм млекопитающих выяснены слабо [Анисимов, 2008]. Практически одновременно с открытием мелатонина получила свое распространение, а чуть позже и подтверждение свободнорадикальная теория старения Хармана – Эмануэля [Harman, 1956; Эмануэль, 1975]. Два открытия позволили модулировать с помощью различных световых режимов как состояние антиоксидантной системы (АОС), так и влияние на продолжительность жизни. Было обнаружено, что продолжительность жизни животных отрицательно коррелирует с уровнем основного метаболизма и аутоокисляемостью тканей [Dowling, Simmons, 2009], а одним из способов защиты клеток от действия активных форм кислорода является повышение или восстановление активности антиоксидантных ферментов (АОФ), в том числе и в результате их синтеза *de novo* [Gutteridge, 1995].

Однако нерешенным остается вопрос, связанный, прежде всего, с моментом начала воздействия постоянного освещения, вызывающего функциональное «выключение» пинеальной железы. В литературе имеются сведения о том, что эпифиз в определенные возрастные периоды способен запускать внутреннюю «программу» старения организма [Pierpaoli, Bulian, 2001, 2005].

Целью нашего исследования было изучение влияния постоянного освещения, воздействие которого начиналось в возрасте одного (период становления репродуктивной функции) и четырнадцати (время начала снижения синтеза половых гормонов и «старения» многих физиологических функций) месяцев, на активность АОФ – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, содержание токоферола в органах, а также на продолжительность жизни крыс.

Материалы и методы

Опыт проводили на самцах и самках крыс линии ЛИО, содержащихся на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде. Были сформированы 3 группы 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 постоянном освещении с возраста одного месяца (LL-1) и 14 месяцев (LL-14), соответственно.

У крыс первых двух групп (LD и LL-1) образцы тканей печени, почек, сердца отбирали после декапитации в 6, 12, 18 и 24 месяца, у животных третьей группы (LL-14) – в 15, 18, 24 и 30 месяцев. Определение активности фермен-

тов проводили спектрофотометрически: СОД по модифицированной адrenoхромной методике [Misra, Fridovich, 1972], каталазы – по количеству разложенной перекиси водорода [Bears, Sizer, 1952]. Концентрацию токоферола определяли методом ВЭЖХ [Скурихин, Двинская, 1989]. Оценивали различные показатели, характеризующие продолжительность жизни в каждой из групп: среднюю продолжительность жизни (СПЖ), СПЖ последних 10 % крыс и максимальную продолжительность жизни (МПЖ) животных. Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики, сравнение проводили с применением непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни, влияние факторов оценивали с использованием дисперсионного анализа [Коросов, Горбач, 2007]. 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».

Результаты и обсуждение

Установлено, что с возрастом происходит в разной степени выраженное рассогласование в работе ферментов антиоксидантной системы у крыс первых двух групп. В печени и почках крыс групп LD и LL-1 отмечено снижение активности СОД к 12 месяцам с последующим увеличением к 18-месячному возрасту, тогда как активность каталазы, наоборот, повышалась у 12-месячных крыс и снижалась к 18 месяцам. В отличие от этого, у крыс, содержащихся при постоянном освещении с 14 месяцев, наблюдалась синхронность изменений активности ферментов – при увеличении активности СОД возрастала и активность каталазы. Для этих ферментов в обоих органах зарегистрирована сезонная цикличность изменений активности. При сохранении этой цикличности у группы LL-14 наблюдалась и более высокая активность обоих ферментов, причем ее максимальные значения отмечались в двухлетнем возрасте, а не в 12 и 18 месяцев, как это происходило в первых двух группах (рис. 1, 2).

В сердечной мышце у крыс, содержащихся в условиях стандартного и постоянного освещения с месячного возраста, активность СОД снижалась уже к первому году и сохранялась на этом уровне в течение дальнейшей жизни. У крыс, находившихся при постоянном освещении с 14 месяцев, активность этого фермен-

та начиная с 18 месяцев резко увеличивалась и среднее ее значение к 30 месяцам более чем в 7 раз превышало таковое у 15-месячных животных (рис. 3). Активность каталазы в сердце крыс группы LL-1 несколько увеличивалась к 18 месяцам, тогда как ее активность у крыс группы LL-14 повышалась к 24 месяцам.

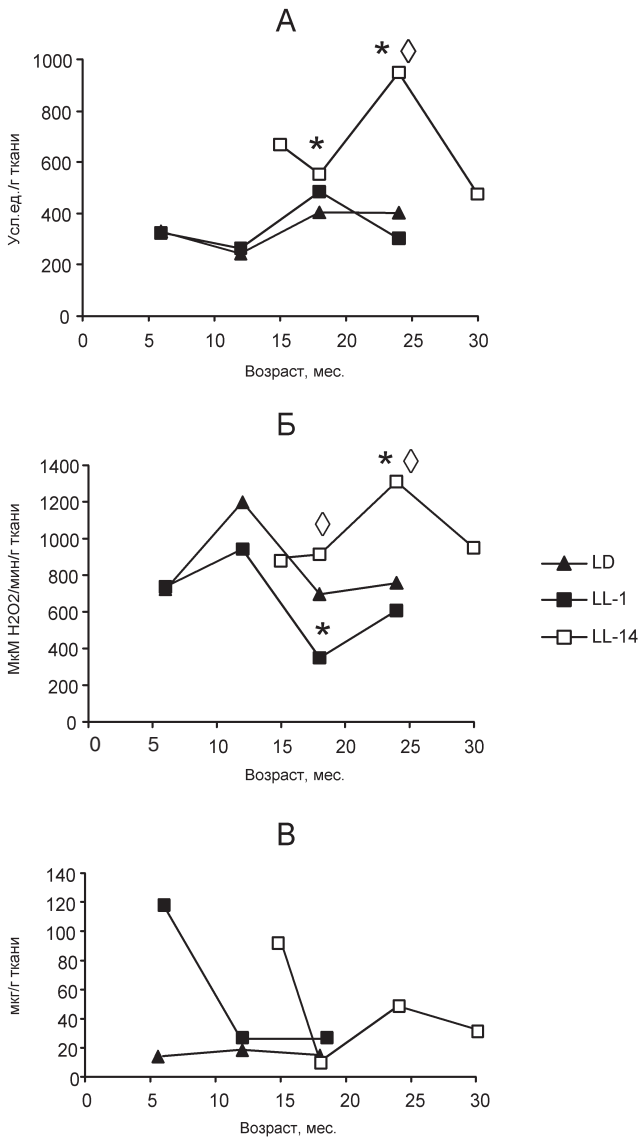


Рис. 1. Возрастные изменения активности СОД (А), каталазы (Б) и содержания токоферола (В) в печени крыс, содержащихся в различных режимах освещения:

LD – стандартное освещение, LL-1 – постоянное освещение с месячного возраста, LL-14 – постоянное освещение с 14 месяцев; * – различия достоверны по сравнению с животными, содержащимися при LD, ◊ – различия достоверны по сравнению с животными, содержащимися при LL-1

Снижение активности АОФ, свидетельствующее о «старении» АОС, в органах крыс, с 14 месяцев содержащихся в условиях постоянного освещения, происходило позже (24 месяца), чем у животных, которые находились при

стандартном и постоянном освещении с месячного возраста. Активность как СОД, так и каталазы в большинстве органов 24-месячных крыс группы LL-1 была ниже по сравнению с их активностью у животных того же возраста группы LL-14.

При изучении состояния АОС необходимо не только учитывать изменения, касающиеся антиоксидантных ферментов, но и принимать во внимание ее неферментативный компонент. Было установлено, что содержание токоферола в органах крыс, так же как и активность АОФ, различалось в зависимости от сроков начала экспериментальных воздействий. При этом возрастное снижение концентрации токоферола в органах крыс, находившихся в группах LD и LL-1, наступало раньше, чем у животных LL-14 (рис. 1–3).

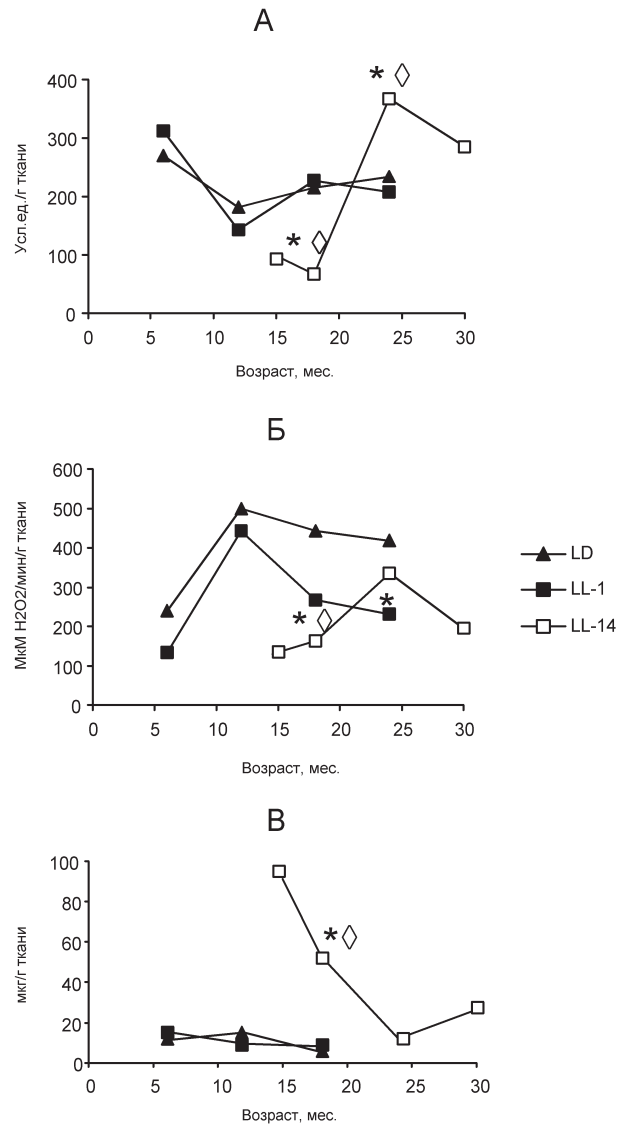


Рис. 2. Возрастные изменения активности СОД (А), каталазы (Б) и содержания токоферола (В) в почках крыс, содержащихся в различных режимах освещения: усл. обозн. см. на рис. 1

Одним из интересных, на наш взгляд, фактов была обнаруженная сезонность в изменении активности АОФ, с учетом того, что крысы достаточно долгое время разводятся в лабораторных условиях. Влияние сезона на активность СОД наблюдалось в сердце, а каталазы – в печени и почках. Содержание витамина Е под влиянием этого фактора изменялось только в сердце. Кроме того, как и предполагалось, существенное влияние оказывало время начала светового воздействия (табл. 1).

Таблица 1. Оценка влияния различных факторов на активность антиоксидантных ферментов и содержание токоферола

Органы	Факторы			
	Возраст	Сезон	Режим освещения	Время начала светового воздействия
СОД				
Печень	–	–	9,1 % 11,01 0,0016	25,5 % 26,02 0,0001
Сердце	–	17,6 % 6,67 0,0025	–	–
Каталаза				
Печень	9,1 % 15,2 0,0003	30,8 % 25,58 0,0001	20,1 % 33,34 0,0001	32,2 % 53,47 0,0001
Почки	–	14,0 % 7,84 0,001	–	–
Витамин Е				
Печень	12,2 % 8,03 0,007	–	8,1 % 5,33 0,03	–
Почки	11,8 % 8,53 0,005	–	–	24,3 % 17,59 0,0001
Сердце	9,4 % 8,09 0,006	8,1 % 7,02 0,01	–	21,6 % 18,61 0,0001

Примечание. Данные представлены в виде степени влияния, в %, критерия Фишера и уровня значимости. Указаны только достоверно влияющие факторы.

В целом возрастные изменения можно охарактеризовать как рассогласование в работе антиоксидантных ферментов, а также как постепенное снижение уровня антирадикальной защиты неферментативными антиоксидантами в изученных органах. Снижение функциональной активности пинеальной железы с помощью постоянного освещения влияло как на динамику, так и на уровень активности ферментов. Однако изменения в значительной степени зависели от возраста животного, включаемого в эксперимент с постоянным освещением: если применение постоянного освещения с месячного возраста влияло, в основном, лишь на уровень активности, то у крыс группы LL-14, прежде всего, на динамику, а не только на абсолютные значения активности ферментов (рис. 1–3).

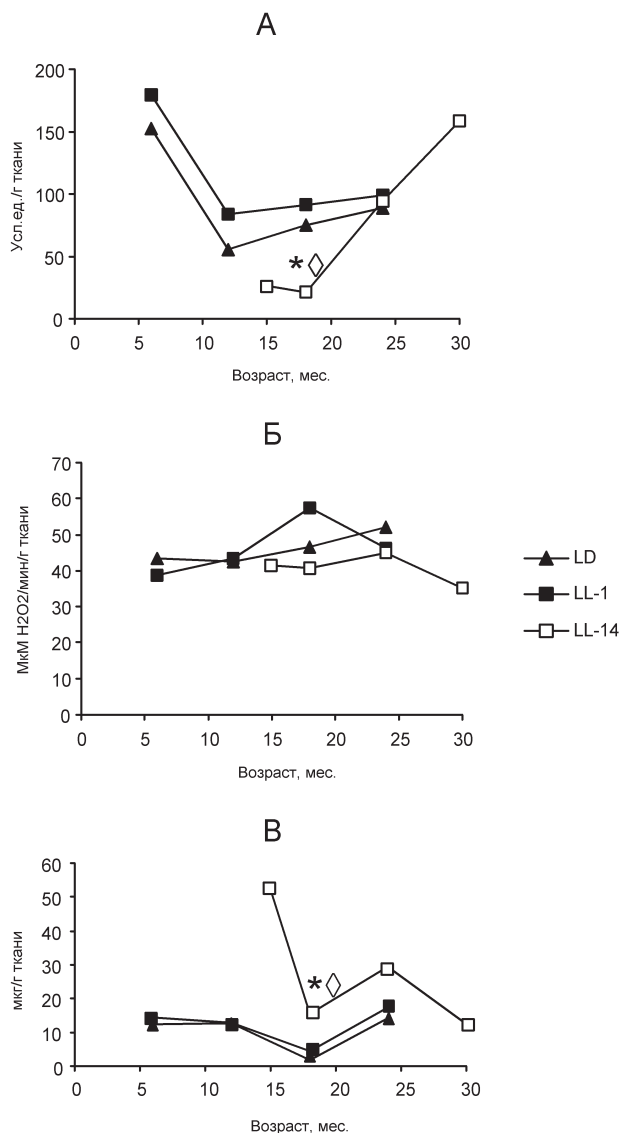


Рис. 3. Возрастные изменения активности СОД (А), каталазы (Б) и содержания токоферола (В) в сердце крыс, содержащихся в различных режимах освещения: усл. обозн. см. на рис. 1

Полученные данные по активности ферментов согласуются с показателями продолжительности жизни экспериментальных животных. Установлено, что крысы, с одномесячного возраста находившиеся при постоянном освещении, характеризовались более низкой средней (самки – на 22,1 % и самцы – на 3 %) и максимальной продолжительностью жизни (самки – на 18 %, самцы – на 4 %) по сравнению с крысами, находившимися при стандартном освещении (табл. 2). СПЖ самок в группе LL-14 на 4% ниже, тогда как МПЖ на месяц больше, чем у самок крыс при стандартном освещении. Самцы в группе LL-14 имели более высокие показатели продолжительности жизни по сравнению с животными, находившимися в стандартных световых условиях. Показатели

продолжительности жизни самцов и самок в группе LL-14 превышают таковые у крыс, содержащихся в группе LD.

Таблица 2. Влияние различных режимов освещения на продолжительность жизни самцов и самок крыс

Показатели		Световой режим		
		Стандартное освещение (LD)	Постоянное освещение (LL-1)	Постоянное освещение (LL-14)
Самцы	Количество крыс	57	50	88
	СПЖ, сут	766 ± 25,3	744 ± 28,0	818 ± 18,0
Самки	МПЖ, сут	1045	1005	1198
	СПЖ последних 10 % крыс, сут	994 ± 9,2	1002 ± 1,8	1087 ± 8,3
Самцы	Количество крыс	40	54	59
	СПЖ, сут	844 ± 33,6	658 ± 22,8	811 ± 20,0
Самки	МПЖ, сут	1167	956	1198
	СПЖ последних 10 % крыс, сут	1129 ± 18,9	921 ± 19,7	1113 ± 24,9

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о более позднем старении как ферментативного, так и неферментативного компонента антиоксидантной системы крыс, содержащихся при постоянном освещении с 14 месяцев, по сравнению как с LL-1, так и с LD. Обычно изменения активности антиоксидантных ферментов, вызванные воздействием светового режима, связывают с нарушением синтеза и секреции мелатонина эпифизом [Simonneaux, Ribelayga, 2003]. Для протекторного влияния мелатонина при перекисном окислении липидов возможны как минимум два механизма действия [Меньщикова и др., 2006], включающие непосредственное улавливание активных форм кислорода и/или торможение их генерации в клетке, а также регуляцию экспрессии генов АОФ.

Косвенным подтверждением участия эндогенного мелатонина в наблюдаемых процессах является различная степень выраженности изменений каждого из ферментов, а также органоспецифичность установленных сдвигов активности. Степень изменений активности СОД и каталазы обусловлена не только спецификой антиоксидантных ферментов, но и особенностями взаимодействия мелатонина с активными формами кислорода. Мелатонин может реагировать с перекисью водорода, являющейся субстратом для каталазы, и не реагирует с супероксидным анион-радикалом, являющимся субстратом для СОД [Allegra et al., 2003].

Снижение активности АОФ и содержания витамина Е в исследованных органах крыс, находившихся в условиях постоянного освещения с месячного возраста, хорошо согласуется с со-

кращением времени жизни крыс. Полученные результаты позволяют утверждать, что воздействие постоянного освещения может не только приводить к снижению продолжительности жизни крыс, как было показано ранее [Vinogradova et al., 2009], но и способствовать увеличению выживаемости животных. Фактором, обуславливающим эти различия, как и в ранее проведенных экспериментах на мышах [Pierpaoli, Bulian, 2005], является срок начала экспериментальных воздействий. Удаление эпифиза на разных этапах постнатального онтогенеза (3, 5, 7, 9, 14 и 18 месяцев) приводит как к сокращению, так и к увеличению продолжительности жизни животных [Pierpaoli, Bulian, 2005]. Эпифизэктомия в 14-месячном возрасте значительно увеличивала выживаемость мышей и поддерживала их гормональный и метаболический статус на уровне 5-месячных животных. Авторы считают, что именно в этом возрасте эпифиз запускает «программу» старения организма. Воздействие постоянного освещения с 14 месяцев у крыс, так же как и эпифизэктомия в этом возрасте у мышей [Pierpaoli, Bulian, 2005], оказывает сходное влияние на продолжительность жизни животных. Нами установлено, что у самок крыс, находившихся в группе LL-14, СПЖ, МПЖ и СПЖ последних 10 % животных и у самцов этой группы МПЖ достоверно выше, чем у крыс, содержащихся при стандартном и постоянном освещении с одного месяца. Средняя и максимальная продолжительность жизни крыс, содержащихся при постоянном освещении с месячного возраста, были значительно ниже по сравнению с животными других групп.

Заключение

Проведенное исследование является еще одним подтверждением свободнорадикальной теории старения, выдвинутой Д. Харманом [Harman, 1956] и Н. М. Эмануэлем [Эмануэль, 1975] более полувека назад. Воздействие подавляющего функциональную активность эпифиза постоянного освещения с возраста 14 месяцев способно приводить к более позднему «старению» ферментативного и неферментативного компонентов антиоксидантной системы крыс, что, возможно, является одной из причин продления жизни животных, а также подтверждает предположение [Pierpaoli, Bulian, 2005] о ключевой роли эпифиза в запуске «программы» старения организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 07-04-00546) и Грантов Президента РФ НШ-306.2008.4 и НШ-3731.2010.4.

Литература

Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: В 2 т. 2-е изд., перераб. и доп. СПб.: Наука, 2008. Т. 1. 481 с.

Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных: Метод. пособие. Петрозаводск: ПетрГУ, 2007. 76 с.

Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.

Скурихин В. Н., Двинская Л. М. Определение α -токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии // С.-х. биология. 1989. № 4. С. 127–129.

Эмануэль Н. М. Некоторые молекулярные механизмы и перспективы профилактики старения // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1975. № 4. С. 785–794.

Allegra M., Reiter R. J., Tan D.-X. et al. The chemistry of melatonin's interaction with reactive specie // J. Pineal Res. 2003. Vol. 34. P. 1–10.

Bears R. F., Sizer I. N. A spectral method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // J. Biol. Chem. 1952. Vol. 195, N 1. P. 133–140.

Dowling D. K., Simmons L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution // Proc. R. Soc. 2009. Vol. 276. P. 1737–1745.

Gutteridge J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage // Clinical Chemistry. 1995. Vol. 41, N 12. P. 1819–1828.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry // J. Gerontol. 1956. Vol. 11, N 2. P. 298–300.

Misra H. H., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase // J. Biol. Chem. 1972. Vol. 247. P. 3170–3175.

Pierpaoli W., Bulian D. The pineal aging and death program. I. Grafting of old pineals in young mice accelerates their aging // J. Anti-Aging. Med. 2001. Vol. 4, N 1. P. 31–37.

Pierpaoli W., Bulian D. The pineal aging and death program. II. Life prolongation in pre-aging pinealectomized mice // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2005. Vol. 1057. P. 133–144.

Simonneaux V., Ribelayga C. Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters // Pharmacol. Rev. 2003. Vol. 55. P. 325–395.

Vinogradova I. A., Anisimov V. N., Bukalev A. V. et al. Circadian disruption induced by light-at-night accelerates aging and promotes tumorigenesis in rat // Aging. 2009. Vol. 1, N 10. P. 855–865.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Хижник Евгений Александрович

аспирант
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: hizhkin84@mail.ru
тел.: (8142) 573107

Ильина Татьяна Николаевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ilyina@bio.krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

Лотош Татьяна Анатольевна

старший преподаватель кафедры фармакологии, организации и экономики фармации с курсами микробиологии и гигиены мед. фак-та
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия,
185910
эл. почта: tatyanakotosh@yandex.ru
тел.: (8142) 769871

Илюха Виктор Александрович

зав. лаб. экологической физиологии животных, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: llyukha@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

Виноградова Ирина Анатольевна

зав. кафедрой фармакологии, организации и экономики фармации с курсами микробиологии и гигиены мед. фак-та, д. м. н.
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия,
185910
эл. почта: iri89569627@yandex.ru
тел.: (8142) 769871

Анисимов Владимир Николаевич

руководитель отдела канцерогенеза и онкогеронтологии, д. м. н.
НИИ онкологии им. проф. Н. Н. Петрова Росмедтехнологий
Песочный-2, Санкт-Петербург, Россия, 197758
эл. почта: aging@mail.ru

Khizhkin, Evgeniy

Institute of Biology, Karelian Research
Centre, Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: hizhkin84@mail.ru
tel.: (8142) 573107

Ilyina, Tatiana

Institute of Biology, Karelian Research
Centre, Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: ilyina@bio.krc.karelia.ru
tel.: (8142) 573107

Lotish, Tatyana

Petrozavodsk State University
33 Lenina pr., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: tatyanakotosh@yandex.ru
tel.: (8142) 769871

Ilyukha, Victor

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy
of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: llyukha@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 573107

Vinogradova, Irina

Petrozavodsk State University
33 Lenina pr., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: iri89569627@yandex.ru
tel.: (8142) 769871

Anisimov, Vladimir

Department of Carcinogenesis and Oncogerontology N. N.
Petrov Research Institute of Oncology
Pesochny-2, 197758, St. Petersburg, Russia
e-mail: aging@mail.ru