

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
биологии Карельского научного центра Российской академии наук

На правах рукописи

Антонова Екатерина Петровна

**АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ У ПРИРОДНО-
АДАптиРОВАННЫХ К ГИПОКСИИ-РЕОКСИГЕНАЦИИ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
В.А. Илюха

Петрозаводск – 2016

СОДЕРЖАНИЕ:

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Антиоксидантная система и ее роль в адаптациях млекопитающих к изменяющемуся уровню кислорода в среде.....	10
1.1.1. Антиоксидантная защита тканей при гибернации у мелких млекопитающих.....	20
1.1.2. Антиоксидантная система у ныряющих млекопитающих	25
1.1.3. Роль антиоксидантной системы в адаптациях подземно-роющих млекопитающих.....	29
1.2. Эколого-физиологические особенности мелких млекопитающих.....	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1. Экспериментальные животные.....	38
2.2. Определение активности супероксиддисмутазы	41
2.3. Определение активности каталазы.....	42
2.4. Определение количества белка.....	43
2.5. Статистическая обработка результатов исследования.....	46
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	47
3.1. Активность антиоксидантных ферментов у гибернирующих летучих мышей.....	47
3.2. Активность антиоксидантных ферментов у млекопитающих (Rodentia, Insectivora) различного экогенеза	52
3.2. Возрастные изменения активности антиоксидантных ферментов у полуводных и сухопутных насекомоядных и грызунов	56

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	60
4.1. Активность антиоксидантных ферментов у летучих мышей во время гибернации	60
4.2. Активность антиоксидантных ферментов у полуводных, подземно-роющих и сухопутных насекомоядных и грызунов	65
4.3. Онтогенетические изменения антиоксидантной защиты тканей у насекомоядных и грызунов	70
4.4. Влияние различных факторов на активность антиоксидантных ферментов у млекопитающих.....	73
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	82
ВЫВОДЫ.....	86
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	87
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	88

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. По современным представлениям, наиболее опасными в плане увеличения продукции активных форм кислорода (АФК), являются часто встречающиеся в природе состояния гипоксии и реоксигенации (Allan, Storey, 2012; Welker et al., 2013). Как дефицит кислорода (Hindle et al., 2009), так и его повышенное потребление непосредственно после ныряния (Cantu-Medellin et al., 2011) и при выходе из спячки (Breukelen, Martin, 2002) может приводить к усиленной генерации АФК, разбалансировке между образованием кислородных радикалов и антиоксидантной системой (АОС). Одним из способов поддержания на стационарном уровне АФК и предотвращения окислительных повреждений является изменение активности антиоксидантных ферментов (АОФ) – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Сравнительное изучение активности АОФ и их физиологической роли в адаптациях млекопитающих, в частности к изменению уровня кислорода, является одной из актуальнейших медико-биологических проблем (Toien et al., 2001; Hochachka, Somero, 2002; Wihelm Filho et al., 2002; Zenteno-Savín, Clayton-Hernandez, Elsner, 2002; Carey, Andrews, Martin, 2003; Wihelm Filho et al., 2007; Allan, Storey, 2012; Larson et al., 2014; Richard et al., 2014; Hermes-Lima et al., 2015). Природно-адаптированные к дефициту кислорода млекопитающие (зимоспящие, ныряющие и подземно-роющие животные) могут служить удобной моделью для изучения процессов гипоксии-реоксигенации (Wihelm Filho et al., 2007; Allan, Storey, 2012; Welker et al., 2013), состояний, когда условия недостатка кислорода чередуются с избыточным поступлением O_2 в ткани. Гибернация является энергосберегающим состоянием, при котором происходит значительное снижение температуры тела (до $+2^\circ C$), позволяющее гетеротермным млекопитающим выживать в неблагоприятных условиях среды (Carey, Andrews, Martin, 2003; Drew et al., 2007; Storey, Storey, 2010; Dave et al.,

2012). Нырание мелких млекопитающих также сопровождается небольшим снижением температуры тела (до 30° С) (MacArthur, 1984; McCulloch, 2012). На данный момент выявлено, что по сравнению с другими видами, животные, периодически подвергающиеся гипоксии-реоксигенации, владеют определённым набором биохимических и физиологических адаптаций для поддержания кислородного гомеостаза. Вместе с тем такие исследования выполнены в основном на крупных морских млекопитающих и сусликах, в то время как сведения об адаптациях полуводных ныряльщиков, мелких зимоспящих и подземно-роющих животных, также испытывающих гипоксию-реоксигенацию, крайне малочисленны и фрагментарны.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось сравнительно-видовое исследование активности АОФ как у природно-адаптированных, так и у не подвергающихся гипоксии-реоксигенации млекопитающих, принадлежащих к разным систематическим группам.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать активность СОД и каталазы у рукокрылых, грызунов и насекомоядных.
2. Провести сравнительную оценку участия АОФ в механизмах физиологических адаптаций к периодической гипоксии у впадающих в спячку, ныряющих и подземно-роющих видов млекопитающих.
3. Исследовать сезонные изменения активности СОД и каталазы у летучих мышей во время гибернации.
4. Изучить динамику становления ферментативного звена антиоксидантной системы в онтогенезе у ныряющих и сухопутных видов млекопитающих.

Научная новизна: Впервые обнаружено, что по сравнению с незимоспящими видами млекопитающих у летучих мышей в начале

гибернационного периода (ноябрь) активность каталазы в сердце и СОД в скелетной мышце выше, при этом к середине спячки (февраль-март) активность каталазы снижалась, а активность СОД повышалась.

Впервые показано, что полуводные грызуны имеют повышенные уровни активности СОД и каталазы в печени, почках и сердце по сравнению с неадаптированными к нырянию животными. Максимальное количество различий в активности АОФ между ныряющими и наземными грызунами выявлено в наиболее чувствительных к смене кислородных условий тканях сердца. Впервые продемонстрировано, что становление дефинитивного профиля АОФ в онтогенезе у полуводных грызунов происходит раньше, чем у сухопутных. Подземно-роющий крот отличался более высокой активностью АОФ в тканях по сравнению с животными той же систематической группы (Насекомоядные).

Научно-практическая значимость работы. Полученные данные об участии АОФ в адаптациях гибернирующих, полуводных и подземно-роющих млекопитающих расширяют и углубляют существующие представления о механизмах и стратегиях адаптаций к условиям гипоксии-реоксигенации, а также способствуют пониманию механизмов естественного предотвращения их патологических последствий, в частности окислительных повреждений. Адаптация организма к экстремальным факторам, в частности к недостатку кислорода, представляет интерес как научная проблема с возможными практическими выходами в медицину.

Результаты работы используются при чтении лекционных курсов по экологической физиологии и биохимии в Петрозаводском государственном университете.

Легитимность исследования. Протоколы экспериментов одобрены независимым локальным комитетом по биоэтике Института биологии КарНЦ РАН (протокол № 11 от 22.11.2012).

Положения, выносимые на защиту:

1. Антиоксидантные ферменты участвуют в адаптациях природно-адаптированных к гипоксии-реоксигенации млекопитающих.
2. Повышенная активность АОФ в сердечной (каталазы) и скелетной мышце (СОД) у летучих мышей по сравнению с сопоставимыми по массе незимоспящими видами млекопитающих обеспечивает антиоксидантную защиту при периодических пробуждениях.
3. Полуводные и подземно-роющие животные имеют в тканях органов повышенную активность СОД или каталазы по сравнению с наземными животными той же систематической группы.
4. Становление дефинитивного профиля АОФ в онтогенезе у полуводных видов грызунов происходит раньше, чем у сухопутных.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на всероссийских, региональных и международных конференциях: 13, 14, и 16-я Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2009, 2010, 2012); XXII съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова (Волгоград, 2013); VI Всероссийский с международным участием Конгресс молодых ученых биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013); VI Международный симпозиум «Динамика популяций охотничьих животных Северной Европы» (п. Киркколахти, 2014); XXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2014» (Москва, 2014); X Международная научно-практическая конференция «Научный прогресс на рубеже тысячелетий – 2014» (Прага, 2014); 9th Baltic Theriological Conference (Daugavpils, Latvia, 2014); Международная медико-биологическая научная конференция молодых учёных «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2015); IX Международная конференция «Биоантиоксидант», (Москва, 2015). Диссертационная работа апробирована на заседании Ученого совета Федерального государственного бюджетного

учреждения науки Института биологии Карельского научного центра Российской академии наук.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 25 работ, включающие 8 статей, из которых 5 в журналах, рекомендованных ВАК. Материалы исследования вошли в зарегистрированную базу данных «Состояние антиоксидантной системы млекопитающих различного экогенеза при влиянии факторов среды» (Свидетельство о государственной регистрации № 2013621172, от 17 сентября 2013 г.) Авторы: Хижкин Е.А., Антонова Е.П., Ильина Т.Н., Илюха В.А.

Достоверность полученных результатов подтверждается наличием репрезентативной выборки объектов, адекватной целям и задачам исследования, проведенного с помощью современных методик, большим объемом фактического материала, который обработан с использованием традиционных методов статистики, применяемых в биологических исследованиях, публикацией результатов работы в рецензируемых журналах и представлением на региональных, всероссийских, и международных конференциях.

Личный вклад автора. Основные результаты получены автором самостоятельно. Автор лично выполнял методики и обобщал полученные данные. Выводы сделаны на основе собственных оригинальных данных.

В разных совместных публикациях вклад автора составил от 60 до 95%.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 113 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы и 12 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 разделов результатов собственных исследований, обсуждения, заключения,

выводов и списка литературы, который включает 246 наименований, из них 201 иностранных.

Работа выполнена в лаборатории экологической физиологии животных Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Карельского научного центра Российской академии наук (ИБ КарНЦ РАН) в период обучения в аспирантуре (2012-2015 гг.) при финансовой поддержке гранта Президента НШ-1642.2012.4, НШ-1410.2014.4 (Руководитель д.б.н., член-корр. РАН Н.Н. Немова), ФЦП ГК № 02.740.11.0700 и ФЦП ГК № 8050, федерального бюджета на выполнение государственного задания (№ 0221-2014-0001). Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

Автор выражает глубокую благодарность своему учителю и наставнику – научному руководителю д.б.н. Виктору Александровичу Илюхе за всестороннюю поддержку в проведении исследования, а также всем сотрудникам лаборатории экологической физиологии животных ИБ КарНЦ РАН, в частности к.б.н. С.Н. Сергиной, к.б.н. Л.Б. Узенбаевой и к.б.н. Е.А. Хижкину за ценные научные советы. Особая благодарность сотрудникам лаборатории зоологии ИБ КарНЦ РАН за помощь в отлове животных в природе – к.б.н. А.Е. Якимовой и к.б.н. В.В. Белкину.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Антиоксидантная система и ее роль в адаптациях млекопитающих к изменяющемуся уровню кислорода в среде

В аэробных организмах в процессе биологического окисления возможно образование активных форм кислорода АФК, которые представляют собой высокореакционные, преимущественно радикальные, кислородные соединения, которые образуются в результате неполного восстановления молекулярного кислорода или изменения спина одного из его электронов, находящихся на внешних орбиталях (Меньщикова, 2006).

Действие реакционно-свободных метаболитов кислорода в тканях неоднозначно и определяется состоянием организма, влиянием различных факторов внешней и внутренней среды – таких, как степень насыщения тканей кислородом, наличие токсических соединений, антигенной и неантигенной природы, развитие воспалительных реакций (Дубинина, 1989). К наиболее вероятным мишеням цитотоксической окислительной атаки АФК относятся: повреждение мембранных белков и ДНК клеток (Ames, 1999; Dizdaroglu, 2002; Singh et al., 2010), инактивация ферментов (Stadtman, 2001) и активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биологических мембранах (Meral et al., 2000; Hulbert et al., 2007). Большое количество патологических состояний и заболеваний связывают с неконтролируемым образованием АФК (Gutteridge, 1993; McGeer, McGeer, 1998; Venditti, Costagliola, DiMeo, 2002; Singh et al., 2010; Fukai, Ushio-Fukai, 2011; Andriantsitohaina et al., 2012). Кислородные радикалы занимают ведущее место в патогенезе ряда бронхолегочных, сердечно-сосудистых (Bachorun et al., 2006; Serdar et al., 2006; Maharjan et al., 2008) и раковых заболеваний (Valko et al., 2006; Serrano, Blasco, 2007), атеросклероза (Schleicher, Friess, 2007; Curtis, 2009), нейродегенеративных заболеваний и при старении мозга (Tretter et al., 2004;

Resende et al., 2008; Sun et al., 2009), заболеваний почек (Montesa et al., 2009; Sathyapriya et al., 2009), ревматоидного артрита (Maurice et al., 1997; Cunnane, et al., 2001), сахарного диабета (Freanzini et al., 2008) и деструкции тканей, вызванной развитием воспалительной реакции (Laroux et al., 2001).

В нормальных условиях подавляющее количество молекулярного кислорода (более 95%) потребляется в клетке митохондриальным ферментом цитохромоксидазой (Меньщикова, 2006). В настоящее время понятие "токсичных молекул" для свободных радикалов устарело, так как генерация умеренных количеств АФК является совершенно необходимым элементом клеток всех типов (Stuart et al., 2014). Наиболее известные классические представления о защитной роли АФК касаются их участия в неспецифическом иммунитете, в частности, в процессах фагоцитоза (Коган, 1999), и в микросомальном окислении самых разнообразных химических соединений (детоксицирующая роль) (Ozaki, Ohashi, Niva, 1986). Помимо этого известно, что АФК могут выступать в клетках в качестве "двойных агентов": либо инициируя интенсивный окислительный стресс, что сопровождается повреждениями и гибелью клеток (Hulbert et al., 2007), либо действуя в качестве сигнальных молекул, индуцирующих ряд молекулярных, биохимических и физиологических реакций, способствуя формированию адаптивных механизмов и повышению устойчивости организма (Hulbert et al., 2007; Stuart et al., 2014).

В нормально функционирующем организме защита клеток от повреждающего действия свободных радикалов и перекисей обеспечивается различными путями: 1) снижением образования АФК – путем уменьшения в клетке O_2 или его более быстрого использования дыхательной цепью; 2) работой АОС (Gutteridge, 1995; Кулинский, 2007; Hulbert et al., 2007). Рассмотрим поподробнее второй механизм.

Уровень кислородных радикалов в тканях регулируется антиоксидантной защитной системой. Нет сомнений в том, что антиоксиданты являются

жизненно важными элементами в многочисленных метаболических реакциях и участвуют в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза (Droge, 2002; Buettner, 2006; Dalle-Donne et al., 2006; Loscalzo, 2008). Антиоксидантная система включает как низкомолекулярные антиоксиданты, так и АОФ. К специализированным системам ферментативных антиоксидантов относятся супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатион-зависимые пероксидазы и трансферазы (Fukai, Ushio-Fukai, 2011) (Рис. 1).

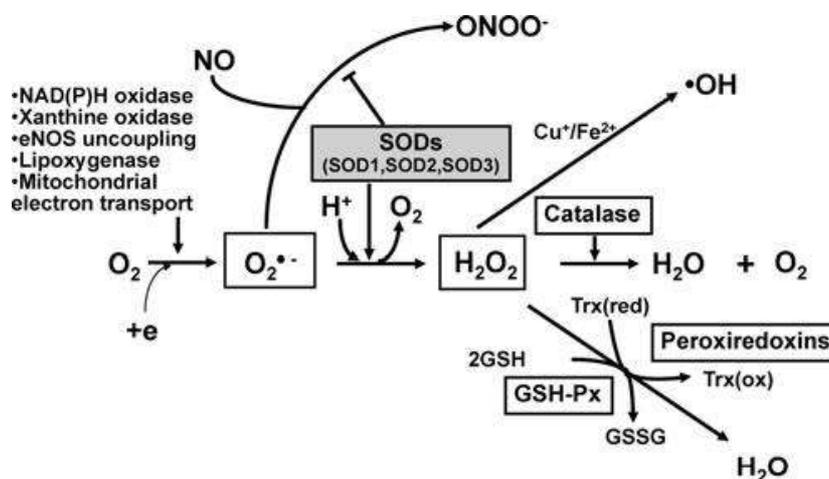
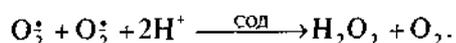


Рис. 1. Генерация и метаболизм активных форм кислорода (по Fukai, Ushio-Fukai, 2011).

Ферментативные антиоксиданты характеризуются высокой специфичностью действия, направленного против определенных АФК; специфичностью клеточной и органной локализации; специфичностью использования в качестве катализаторов металлов, к которым относятся медь, цинк, марганец, железо (гемовое) и селен (Зенков, Ланкин, Меньщикова, 2001). К числу антирадикальных энзимных защитных механизмов, существующих в клетках, прежде всего, относят ферменты группы супероксиддисмутаз (СОД, КФ 1.15.1.1). Структура и свойства СОД всесторонне изучены (Weisiger, Fridovich, 1973). Супероксиддисмутазы катализируют реакцию образования перекиси водорода из супероксидного радикала ($O_2^{\bullet-}$) (Меньщикова, Зенков,

1993). Повышение концентрации свободных радикалов кислорода, в частности супероксидного анион-радикала, индуцирует синтез СОД (Львова, Абаева, 1996). Скорость этой реакции более чем в 10000 раз выше по сравнению со спонтанной дисмутацией $O_2^{\bullet-}$. При этом в отличие от спонтанной дисмутации $O_2^{\bullet-}$ образуется перекись водорода и триплетный кислород:



Впервые СОД была описана в 1969 году Дж. Мак-Кордом и И. Фридовичем (McCord, Fridovich, 1969), изучавшими супероксид-ингибирующую активность различных субстратов. В последующем выяснилось, что СОД имеет несколько изоферментных форм, отличающихся строением активного центра. Структура и свойства разных изоформ СОД всесторонне изучены (Поберезкина, Лосинская, 1989). Благодаря способности СОД использовать супероксидные радикалы в качестве субстрата, она признана наиболее мощным природным антиоксидантом (Авакян, 1989). В организме млекопитающих выделяются 3 основные изоформы СОД: медь-цинковая (Cu,Zn-СОД; СОД1), марганцевая (Mn-СОД; СОД2) и экстрацеллюлярная (Э-СОД; СОД3) (Fukai, Ushio-Fukai, 2011). Первая (Cu,Zn-СОД) в клетках высших животных и человека состоит из двух субъединиц, содержащих один атом меди и один атом цинка. Она представляет собой димер с молекулярной массой 32 кДа, встречающийся во всех клетках эукариот. Считается, что атом меди обеспечивает каталитическую активность фермента, а атом цинка придает ему стабильность. У человека и высших животных Cu,Zn-СОД – это, главным образом, внутриклеточный фермент. Только небольшие количества СОД присутствуют во внеклеточных жидкостях – плазме крови, цереброспинальной или синовиальной жидкостях, что, возможно, связано с деструкцией клеточных мембран (Хавинсон и др., 2003). В клетках Cu,Zn-СОД локализована преимущественно в цитозоле и в межмембранном пространстве митохондрий. Наличие Cu,Zn-супероксиддисмутазной активности установлено в микросомальной фракции. Кроме Cu,Zn-СОД существует и СОД2, содержащая

ион марганца. Mn-SOD обнаружена как у прокариот, так и у эукариот. Показано, что у высших животных Mn-SOD присутствует в цитозольной фракции печени и в матриксе митохондрий. Характерной особенностью Mn-SOD является ее резистентность к действию H_2O_2 , а также индуцибельность (Петрович, Гуткин, 1986). Э-SOD содержится во внеклеточном матриксе и характеризуется водорастворимостью и устойчивостью в различных органических растворителях. Интересно, что исследования с использованием SOD3-дефицитных мышей показали, что Э-SOD играет существенную роль в репаративной неоваскуляризации в ишемически поврежденных тканях, и защите от перепроизводства $O_2^{\cdot-}$ (Kim et al., 2007) и H_2O_2 (Oshikawa et al., 2010).

В организме человека наиболее высокий уровень активности СОД отмечается в печени, в некоторых областях мозга и тестикулах. Напротив, низкая активность СОД характерна для эритроцитов, щитовидной и поджелудочной желез, а также легких. В различных отделах мозга у крыс активность СОД сильно колеблется. В коре, полосатом теле, гиппокампе и мозжечке активность значительно меньше, чем в гипоталамусе, среднем и промежуточном мозгу (Хавинсон и др., 2003).

Регуляция активности СОД осуществляется по принципу отрицательной обратной связи – избыточная продукция H_2O_2 приводит к угнетению активности фермента (Fridovich, 1975). В то же время высокая активность СОД тормозит действие фосфолипазы А2 и уменьшает продукцию арахидоновой кислоты – предшественника эйкозаноидов. Супероксиддисмутаза, тормозя процесс избыточной генерации супероксидного радикала, осуществляет защитное действие и выступает в качестве природного мембрано- и цитопротектора. Существуют и специфические ингибиторы СОД, к которым относят ряд токсичных химических веществ. Так, свинец, кадмий, оксид углерода, гидразины, нитрит, р-хлоранилин, корбарил, изодранил ингибируют активность СОД. К сожалению, СОД может инактивироваться и в очагах

патологии, для которых характерным является низкий уровень рН (Хавинсон и др., 2003).

Несмотря на то, что токсичность H_2O_2 значительно меньше, чем $\text{O}_2^{\cdot-}$, образующаяся под действием СОД перекись водорода участвует в инициации ПОЛ, вызывает нарушение проницаемости биомембран, взаимодействует с ДНК, приводит к хромосомным aberrациям, обладает метгемоглобинообразующим действием. Эти токсические эффекты перекиси водорода не проявляются до тех пор, пока в организме успешно функционирует вторая линия ферментативной антиоксидантной защиты, представленная антиперекисными ферментами каталазой и глутатионпероксидазой (ГПО) (Хавинсон и др., 2003) (Рис. 1).

Каталаза (КФ 1.11.1.6) представляет собой тетрамер-гемопроtein, который участвует в реакциях разложения H_2O_2 до H_2O и O_2 (Брюханов, Нетрусов, 2004). Каталаза, присутствует во всех аэробных клетках, у эукариот локализована преимущественно в пероксисомах, и может долго сохранять свою высокую активность, почти не требуя энергии активации, скорость реакции этого фермента лимитируется только скоростью диффузии субстрата к активному центру (Шинкаренко, Алексеевский, 1982). Каталаза содержится в печени, почках, мышцах, головном мозге, костном мозге, эритроцитах, легких, сердечной мышце, спинномозговой жидкости, ее активность также определяется в моче. Наибольшая активность каталазы у человека отмечается в печени и эритроцитах, меньшая – в мозге, скелетных мышцах, поджелудочной железе, легких (Зенков, Ланкин, Меньщикова, 2001). Каталаза имеет большую молекулярную массу, что препятствует ее попаданию внутрь клеток, а во внеклеточных жидкостях быстро теряет свою активность, поэтому считается, что внеклеточная защитная роль этого фермента незначительна (Lock, Dahlgren, 1988).

Каталаза обладает бифункциональной активностью, т.е. может разлагать перекись водорода по двум различным путям. В первом случае фермент

разлагает H_2O_2 до воды и триплетного кислорода (каталазное действие). Во втором случае – катализирует окисление перекисью водорода различных эндогенных и экзогенных субстратов, например, этанола, метанола, формиата и других (пероксидазное действие). Каталазное действие регистрируется при относительно высокой концентрации H_2O_2 , пероксидазное – при более низких уровнях содержания перекиси водорода в клетке. Каталаза также действует, как регуляторный белок, связывая НАДФ•Н и высвобождая его, когда клетка находится в условиях окислительного стресса. Высвобождение НАДФ•Н из комплекса с каталазой активирует глутатионредуктазу (ГР) и стимулирует функционирование ГПО с удалением H_2O_2 (Хавинсон и др., 2003).

При гипоксии, несмотря на дефицит O_2 , наблюдается активация ПОЛ. Блокада конечного звена переноса электронов приводит к утечке электронов и неполному восстановлению O_2 , что сопровождается усилением генерации кислородных радикалов (Giussani et al., 2012; Pialoux, Mounier, 2012). Существуют различные внутриклеточные ферментативные пути образования АФК у млекопитающих: митохондриальная электронтранспортная цепь, цитохром P450-содержащая монооксигеназная система, НАДФН-оксидазы, ксантинооксидазы, циклооксигеназы (Dowling, Simmons, 2009). Молекулярный ответ на гипоксию, требует быстродействующих механизмов, функционирующих в широком диапазоне парциального давления кислорода.

Доступность O_2 внутри митохондрий является важным параметром в регулировании продукции АФК. Действительно, образование в пробирке кислородных радикалов увеличивается, когда концентрация O_2 поднимается выше нормальных атмосферных уровней (Andriantsitohaina et al., 2012). Последствия снижения концентрации O_2 для продукции АФК полностью не изучены. Некоторые исследования сообщают о парадоксальном росте АФК на уровне III дыхательного комплекса (Guzy et al., 2005). Вызванная гипоксией продукция АФК, вероятно не токсична для клеток (Duranteau et al., 1998; Andriantsitohaina et al., 2012), и может играть важную роль в сигнальных путях,

однако их роль в стабилизации HIF-1 (гипоксия индуцибельный транскрипционный фактор-1) остается неясной (Chua et al., 2010).

Одним из ключевых факторов адаптации к гипоксическим условиям является HIF-1 (Jiang et al., 1997). HIF был открыт Semenza и коллегами и идентифицирован как кислород-зависимый транскрипционный фактор (Semenza, 2007). Число известных генов-мишеней HIF постоянно растет, и в настоящее время их насчитывается более сотни (Tafari et al., 2016). HIF состоит из кислород-чувствительной субъединицы HIF1 α и конститутивной субъединицы HIF-1 β (Bruick, 2003).

HIF-1 α , являясь регулируемой субъединицей, накапливается в условиях гипоксии, тогда как HIF-1 β экспрессируется конститутивно (O'Rourke et al., 1999). В присутствии кислорода HIF-1 α гидроксилируется пролил-гидроксилазой, убиквитинилируется и подвергается протеасомной деградации (Jiang et al., 1997; Masson et al., 2001). В условиях гипоксии пролил-гидроксилаза инактивируется, и HIF-1 α перестает восприниматься убиквитинлигазой. В условиях устойчивой гипоксии разрушение HIF1 α субъединицы заингибировано, что позволяет белку накапливаться, гетеродимеризоваться и транслоцироваться в ядро, где он образует комплекс с HIF-1 β и CBP/p300, тем самым усиливая транскрипцию различных генов гипоксии (Kwon et al., 2012). Усиление же транскрипции генов гипоксии происходит в результате того, что HIF-1 α субъединица связывается со специфической областью HRE (hypoxia response element), представляющей собой согласовывающиеся последовательности в ДНК (Guzy, Schumacker, 2006; Semenza, 2007). Установлено, что HIF-1 обеспечивает транскрипцию фактора роста эндотелия сосудов, ГПО, транспортера глюкозы-1, ферментов пентозофосфатного пути, лактатдегидрогеназы и цитокина эритропоэтина (Damert, Ikeda, Risau, 1997).

Существует значительный объем доказательств того, что свободные радикалы, такие как АФК и активные формы азота могут изменять работу и/или

активность HIF (Turrens, 2003; Skulachev et al., 2009; Zepeda et al., 2013). Несмотря на признанную роль АФК в ответе клетки на гипоксию, прежде всего как триггеров индукции ряда сигнальных путей (Tobiume et al., 2001; Турпаев, 2002; Dirmeier et al., 2002; Dougherty et al., 2004; Zepeda et al., 2013; Tafani et al., 2016), результаты экспериментов по изучению их влияния на активацию HIF противоречивы. Возможно, такая неоднозначность объясняется разнообразием используемых моделей, методическими трудностями с определением АФК, а также зависит от характера гипоксии (гипоксемическая, анемическая, застойная и гистотоксическая (Koh et al., 2008)). Предполагается, что для стабилизации белка HIF-1 α необходима перекись водорода, а не супероксид анион (Brunelle et al., 2005). Активные формы кислорода, образуемые митохондриями в результате гипоксии, действуют как сигнальные агенты, запускающие различные функциональные ответы, включающие активацию экспрессии генов посредством стабилизации HIF-1 α (Brunelle et al., 2005; Mansfield et al., 2005; Zepeda et al., 2013; Tafani et al., 2016).

Ключевым моментом гликолитического пути является образование пирувата, который у млекопитающих в условиях гипоксии превращается в лактат, а в нормальных условиях под действием пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК) – в ацетил-коэнзим А (ацетил-КоА) (Reed, 2001; Sugden, Holness, 2003). Активность лактатдегидрогеназы А и монокарбоксилатных транспортеров также возрастает в результате гипоксии (благодаря HIF-1), в сочетании с неспособностью клеток превращать пируват в ацетил-КоА посредством активации пируватдегидрогеназы (Е1, ПВК-дегидрогеназа), что приводит к увеличению концентрации лактата (Brahimi-Horn, Chiche, Pouyssegur, 2007). Лактат может усиливать и поддерживать активацию HIF в результате ингибирования пролилгидроксилаз (Lu et al., 2005). Метаболизм пирувата резко изменяется в условиях гипоксии в результате координированной стимуляции лактатдегидрогеназы А и ингибирования ПДК. В итоге, пируват выводится из митохондрий, подавляя ход цикла

трикарбоновых кислот и, тем самым, уменьшая доставку восстановительных эквивалентов в цепь переноса электронов (Semenza, 2007).

Таким образом, в большом количестве экспериментов доказывается важная роль HIF не только как триггера при запуске гипоксического ответа на клеточном и системном уровне, но и как регулятора многих процессов на стадии эмбриогенеза и во взрослом организме (Wenger, 2000; Wenger, 2002; Semenza, 2004). Это согласуется с детекцией HIF в различных тканях при нормоксии. Так, HIF-1 α обнаруживается в мозге, почках, печени, сердце и скелетных мышцах мышц при нормальном уровне кислорода, а в ответ на гипоксию его концентрация увеличивается (Stroka et al., 2001; Анохина, Буравкова, 2010).

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). Экогенез (от греч. *oikos* жилище, местообитание и *genesis* – происхождение) – развитие в процессе эволюции организмов экологических отношений со средой или возникновение новых форм под влиянием среды (Еськов, 2009). Экологические условия, в которых существуют позвоночные, сильно различаются. Так, например, температура широко варьирует от полюсов к экватору и сопровождается физиологическими адаптациями у соответствующих видов-резидентов; сезонные колебания температуры и доступности пищевых ресурсов могут вызвать физиологические и поведенческие приспособления (миграция, зимняя спячка). Уровень кислорода также широко варьирует у животных, адаптированных к высокогорью, обитающих под землей или в водной среде. Приспособление к сходным экологическим условиям приводило к образованию различных жизненных форм животных (группа видов, объединяющихся не по систематической принадлежности, а по морфологическим особенностям). По классификации Д. Н. Кашкарова выделяют следующие жизненные формы:

наземные (не делающие нор, делающие норы), роющие (абсолютные и относительные землерои), плавающие (чисто водные, полуводные) (Рассашко, Ковалева, Крук, 2010). В последние годы накапливается все больше данных об участии в приспособительных реакциях антиоксидантных ферментов, основной функцией которых является поддержание на определенном уровне концентрации АФК, необходимых для ПОЛ и ряда других биохимических процессов в клетке (Cantu-Medellin et al., 2011; Allan, Storey, 2012; Lilley et al., 2014). Особый интерес вызывают приспособления организмов на биохимическом уровне, связанные с изменением кислородных условий (аноксия, гипоксия, реоксигенация).

1.1.1. Антиоксидантная защита тканей при гибернации у мелких млекопитающих

По современным представлениям, наиболее опасными в плане активации перекисных процессов при гипоксии являются состояния, когда временное выраженное нарушение кровоснабжения сменяется его восстановлением – реперфузией (Allan, Storey, 2012). Считается, что усиление образования свободных радикалов и перекисных соединений, которое происходит сразу вслед за нарушениями кровообращения, является ведущим фактором в патогенезе ишемических поражений тканей и органов (Wilhelm Filho et al., 2007). Так, например, данный процесс наблюдается при периодических пробуждениях и выходе из зимней спячки у гибернирующих млекопитающих.

Необходимо отметить, что имеющаяся в литературе информация о роли антиоксидантов в условиях гибернации касается, главным образом, лабораторных животных (Hudson, Scott, 1979; Barja et al., 1994; Ohta et al., 2006), в то время как исследования, проведенные на диких гибернирующих млекопитающих, малочисленны (Sohal et al., 1993; Selman et al., 2000; Morin, Storey, 2007; Allan, Storey, 2012), и только в последнее десятилетие возрос

интерес к таким объектам исследования, как летучие мыши (Wilhelm Filho et al., 2007; Conde-Pérezprina et al., 2012; Storey, 2012; Lilley et al., 2014).

Первооткрывателем роли различных компонентов АОС при гибернации является российский ученый Н. И. Калабухов. Уже в 1929 г. им было показано, что токоферол тормозит уровень обмена веществ в тканях и, тем самым, подавляет выведение и расход аскорбиновой кислоты, в связи с чем уровень токоферола служит важным регулятором физиологического состояния зимоспящих животных (Калабухов, 1929). Доказано, что изменение содержания обоих антиоксидантов (витаминов С и Е) при переходе от спячки к пробуждению происходит синхронно, но их концентрация меняется противоположно (Okamoto et al., 2006). У сусликов (*Spermophilus parryii*) при гибернации наблюдается увеличение содержания витамина С, одного из низкомолекулярных антиоксидантов, в плазме крови и спинномозговой жидкости (Toien et al., 2001; Drew et al., 2002; Drew et al., 2004). Во время пробуждения его уровень резко снижается, но в основном не из-за взаимодействия с АФК, а вследствие захвата лейкоцитами. Предполагается, что аскорбат и глутатион (GSH) могут действовать как первая линия обороны от окислительного стресса при реперфузии, тогда как витамин Е включается в процесс позднее при его более тяжелой форме, что частично объясняет противоречивые результаты о витамине Е, полученные на различных животных и в клинических исследованиях (Dhalla, Elmoselhi, 2000). Вероятно, рукокрылые используют другой механизм, т.к. известно, что они утратили в процессе эволюции способность к синтезу витамина С (Cui et al., 2011).

Внутриклеточные механизмы антиоксидантной защиты у гибернирующих видов включают как метаболиты (GSH) (Carey et al., 2003), так и ферменты. Весьма интересен вопрос об использовании антиоксидантных ферментов во время гибернации. Их уровень находится под генетическим контролем, принцип которого заключается в активации генов, кодирующих ферменты, при повышении концентрации $O_2^{\cdot-}$ или H_2O_2 (Mongkolsuk, Helmann,

2002). Тем не менее, энзиматическая активность, как правило, снижается во время спячки, так, например, значительно понижается трансляция белков, которая возвращается к норме в период пробуждения. Синтез белков у зимоспящих нарушается как на уровне инициации, так и на уровне элонгации. Сходное угнетение в период спячки и пробуждения отмечается и для окислительного фосфорилирования (Breukelen, Martin, 2002). Снижение метаболизма имеет определенные последствия для использования ферментов, т.к. для синтеза белков, во-первых, необходима энергия (при этом организм находится в состоянии максимального энергосбережения), во-вторых, нужно большое количество аминокислот, которые также имеются в дефиците. Но гибернирующие виды нашли выход из данной ситуации – регуляция активности фермента может осуществляться посредством изменения содержания его изоформ, что описано для разных ферментов (Carey et al., 2003; Storey, Storey, 2004; Eddy, Storey, 2007; Storey, 2012), а также в результате посттрансляционных модификаций фермента, таких как фосфорилирование (MacDonald, Storey, 1999; Storey, 2012; Storey, 2015), ацетилирование (Storey, 2015) и глутатионилирование (Storey, 1997; Storey, 2012). Во время пробуждения в плазме сирийских хомячков активность СОД и каталазы увеличивается в 3 раза (Ohta et al., 2006; Okamoto et al., 2006). Интересно, что скрининг ДНК сусликов и летучих мышей показал увеличение в 2 раза регуляции СОД, ГПО и глутатион-S-трансферазы в почках во время пробуждения (Carey et al., 2003). В исследовании Y. Maistrovski и соавторов (2012) на сусликах (*S. tridecemlineatus*) и малой бурой ночнице (*Myotis lucifugus*) было показано, что у гибернирующих ночниц по сравнению с бодрствующими животными, в печени и скелетных мышцах увеличивается как экспрессия HIF-1 α , так и уровень белка HIF-1 α , однако у сусликов достоверно повышается только уровень белка (HIF-1 α) в скелетных мышцах.

Другой метаболит с антиоксидантными свойствами – это гормон мелатонин, который, также возможно, играет важную роль при гипоксии –

реоксигенации (ныряние, гибернация и рождение) (Tan et al., 2005; Aarseth, Froiland, Jorgensen, 2010). Обнаруженные кратковременные высокие уровни мелатонина у сусликов во время пробуждения от зимней спячки, очевидно, образуются благодаря синтетическим процессам во многих тканях, а не только шишковидной железе, которая считается основным местом синтеза гормона.

Снижение метаболизма в организме млекопитающих в течение торпора предполагает обратимое подавление уровня дыхания митохондрий. Так, у тринадцатиполосных сусликов (*S. tridecemlineatus*) в печени и скелетной мышце оно достигает 70% и 30%, соответственно (Brown et al., 2012). Метаболические приспособления, необходимые организму во время гибернации, включают в себя активацию одной из транскрипционных мишеней фактора HIF-1, киназы пируватдегидрогеназы -4 (PDK-4), как это показано в скелетной и сердечной мышце сусликов (Buck, Squire, Andrews, 2002). PDK-4 ингибирует пируватдегидрогеназу, таким образом, сводя к минимуму окисление углеводов и предотвращая поток гликолитических продуктов в цикл трикарбоновых кислот.

Поддержание размера и активности скелетной мышечной ткани в течение периодов естественной спячки является необходимым условием для успешной двигательной активности в течение последующего после гибернации периода пробуждения. В клинических и экспериментальных моделях мышечный покой млекопитающих, такой, например, как иммобилизация конечностей, ведёт к атрофии мышц и снижению их сократительной способности (Powers, Kavazis, McClung, 2007; Clark, 2009). В течение баутов торпора, гибернанты не показывают заметных движений, хотя при этом отмечается относительно низкий уровень мышечной дистрофии по сравнению с моделями мышечного покоя (Musacchia, Steffen, Fell, 1988; Hudson, Franklin, 2002; Shavlakadze, Grounds, 2006). Целый ряд механизмов лежит в основе устойчивости гибернантов к мышечной атрофии: повышенный уровень антиоксидантов (Hudson, Franklin, 2002; Allan, Storey, 2012), пониженное содержание

миостатина (Braulke et al., 2010; Brooks, Myburgh, Storey, 2011; Nowell et al., 2011) и регуляция транскрипционных факторов, связанных с мышечной активностью (Tessier, Storey, 2010). Ранее, было выявлено, что изоферментные спектры лактатдегидрогеназы грудной мышцы летучих мышей (*Vespertilionidae*), способных к быстрому и маневренному полету, отличаются преобладанием Н-субъединиц (Н от англ. heart) и больше зависят от аэробного метаболизма, чем от анаэробных процессов (Valdivieso, Conde, Tamsitt, 1968). В исследованиях на малой бурой ночнице (*Myotis lucifugus*) было показано, что все волокна грудной мышцы обладали высокой окислительной способностью (активность сукцинатдегидрогеназы) и низким гликолитическим потенциалом (активность фосфофруктокиназы), а также повышенной активностью аденозинтрифосфатаз (АТФ-азы) (Armstrong, Ianuzzo, Kunz, 1977). Учитывая данные факты, потенциал для образования АФК увеличивается для скелетных мышц гибернантов, что должно вызывать реакцию со стороны АОС. Так, выявлено повышение активности Mn-SOD в начале оцепенения в скелетной мышце у сусликов (Allan, Storey, 2012). Также на сусликах показано, что общая антиоксидантная мощность икроножной мышцы на 156% выше во время торпора по сравнению с летним периодом активности (James et al., 2013).

Таким образом, различные физиологические системы, в частности АОС, повышают устойчивость животных к недостатку кислорода во время спячки и реоксигенации при пробуждении, внося определенный вклад в высокие адаптивные возможности гибернирующих млекопитающих.

1.1.2. Антиоксидантная система у ныряющих млекопитающих

Переход млекопитающих из наземной среды обитания в водную, сопровождается многочисленными морфологическими, физиологическими и биохимическими компенсаторными изменениями (Галанцев и др., 1994; Hochachka, Somero, 2002; MacArthur et al., 2001; Noren et al., 2008). Формирование адаптаций к нырянию происходит на разных уровнях организации, первоначальными являются анатомо-морфологические приспособления, далее физиологические, и лишь потом появляются биохимические, когда организм не может справиться с возникшими трудностями. Известно, что АОФ активируются как при избытке, так и при недостатке кислорода. Стратегия защиты от потенциально возможного окислительного стресса, связанного с гипоксией-реоксигенацией при нырянии, включает у вторичноводных млекопитающих повышение активности АОФ в тканях жизненно важных органов (Коваленко, Молчанов, 2001).

Большинство исследований об участии АОС в адаптациях ныряющих млекопитающих посвящено крупным морским млекопитающим – китообразным (Noren et al., 2000; Cantú-Medellín et al., 2011) и различным видам тюленей (Elsner et al., 1998; Fuson et al., 2003; Wilhelm Filho et al., 2002; Vázquez-Medina et al., 2007; Vázquez-Medina et al., 2011 Vázquez-Medina et al., 2012).

У морских млекопитающих после ныряния происходит реперфузия органов, с первым вдохом пополняются запасы O_2 и АТФ, при этом увеличивается генерация АФК и, следовательно, повышается риск возникновения окислительного стресса (Fridovich, 1998; Davis, 2014). Продолжительное воздействие ишемии на ткани во время погружения может привести к накоплению гипоксантина (ГКс) и ксантина (Кс) в результате ферментативного катаболизма АТФ (Elsner et al., 1998). Во время реперфузии,

ксантинооксидаза катализирует окисление ГКс и Кс, снижая концентрацию O_2 и увеличивая генерацию $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 (Lipton, 1999; Hermes-Lima, 2004). Во время ишемии происходит накопление электронов в электрон-транспортной цепи приводя к увеличению формирования $O_2^{\bullet-}$ (Kevin et al., 2005). Эндогенная антиоксидантная защита, как ферменты, так и низкомолекулярные антиоксиданты, способствует предотвращению повреждений в клетках и тканях (Kevin et al., 2005; Halliwell, Gutteridge, 2007). Исследования на кольчатой нерпе показали, что при ишемии в почках накапливается гипоксантин (Elsner et al., 1998) и во время реперфузии увеличивается продукция $O_2^{\bullet-}$, что компенсируется повышенной антиоксидантной способностью (Zenteno-Savín et al., 2002).

Известно, что морские ныряющие млекопитающие характеризуются более высоким базальным уровнем генерации АФК в тканях по сравнению с наземными видами (Wilhelm Filho et al., 2002; Cantú-Medellín et al., 2011). В исследовании N. Cantú-Medellín и соавторов (2011) было обнаружено, что различия в стратегии ныряния (продолжительность и глубина погружения) отражаются на продукции $O_2^{\bullet-}$ и уровне антиоксидантов. Образование $O_2^{\bullet-}$ и общий уровень GSH были выше, а активность СОД – ниже в тканях морских ныряльщиков с наибольшей продолжительностью погружения, чем у видов с короткими поверхностными ныряниями. Высокая активность СОД в тканях афалин по сравнению с кашалотами может привести к увеличению производства H_2O_2 , которая, в свою очередь, влечёт за собой серию каскадных реакций ПОЛ (Fridovich, 1998). Возможно, окисление липидов играет важную роль в индукции пути Keap1-Nrf2 (Kelch-like ECH-associated protein 1 – nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2), ответственного за активацию антиоксидант-респонсивного элемента (ARE)-опосредованной транскрипции гена во время окислительного стресса (Van Muiswinkel, Kuiperij, 2005; Uchida, 2007). Полагают (Cantú-Medellín et al., 2011), что генерация АФК (в частности, H_2O_2) в тканях афалины и окисление липидных молекул действует как механизм

сигналинга, через Keap1-Nrf2 путь, для активации антиоксидантных генов с целью защиты тканей от потенциального окислительного стресса, связанного с ишемией-реперфузией при нырянии. Однако возможен и другой вариант – у морских млекопитающих АФК способствуют активации HIF-1 α во время ишемии вызванной погружением (Johnson et al., 2004; Vi et al., 2015).

Продукция GSH быстрая и менее энергозатратная, чем синтез фермента (Halliwell, Gutteridge, 1999), возможно, поэтому высокие уровни GSH наблюдаются в тканях животных, подвергающихся изменениям содержания кислорода при нырянии, гибернации и эстивации (Vázquez-Medina et al., 2007). Другие исследования (Haddad, 2002) предполагают, что GSH-связанный метаболизм играет ключевую роль в контроле не гипоксической активации HIF-1 α . Известно, что экспрессия ГПО или каталазы, но не СОД, предотвращает гипоксическую стабилизацию HIF-1 α (Brunelle et al., 2005). Эти результаты обеспечивают генетические доказательства, что кислородная чувствительность зависит от генерации митохондриями АФК, в особенности H₂O₂. Эта молекула считается медиатором в сигнальном пути экспрессии гена эритропоэтина. Продукция основного регулятора эритропоэза – эритропоэтина – почками и печенью увеличивается в ответ на снижение гематокрита, артериальную гипоксемию или повышение сродства гемоглобина к кислороду (Ratcliff et al., 1998).

Изучению АОС полуводных млекопитающих посвящено значительно меньше внимания (Галанцев и др., 1994; Илюха, 1995; Hindle et al., 2009). Влияние кратковременного гипоксического воздействия на крыс и ондатр имеет ряд принципиальных отличий. Так, было установлено (Martin et al., 2002), что в почках у крыс, содержащихся при пониженной концентрации O₂ (5-6%) в течение 25 минут, наряду с повышением активности СОД, усиливается экспрессия генов цитоплазматической СОД, каталазы и глутатионредуктазы. В исследовании В. П. Галанцева и коллег (Галанцев и др., 1994) отмечается, что ПОЛ в сердце у крыс имеет тенденцию к усилению при брадикардии,

вызванной задержкой дыхания, а у ондатр, наоборот, уменьшается на 30%, активность каталазы при этом у последних увеличивается почти в 2 раза. В результате у адаптированных к водному образу жизни млекопитающих тканевая гипоксия развивается в более поздние сроки, чем у неадаптированных видов. В отличие от крыс, у ондатр при задержке дыхания в ткани сердца увеличивается содержание как лактата, так и пирувата, соотношение лактат/пируват при этом не изменяется. По мнению исследователей (Галанцев и др., 1994), это свидетельствует об активации как анаэробных, так и аэробных путей получения энергии в сердце у природно-адаптированных к гипоксии-реоксигенации животных.

В литературе встречается мало экспериментальных данных, характеризующих антиоксидантную систему ныряющих насекомоядных. Тем не менее, в работах Hindle и соавторов (2010) на двух симпатрических видах землероек было показано, что в скелетной мышце активность каталазы оказалась выше в 2 раза у ныряющей бурозубки (*Sorex palustris*), однако активность ГПО была в три раза выше у короткохвостой землеройки (*Blarina brevicauda*), уровень СОД был соизмерим у двух видов. Кроме того, авторами было зарегистрировано, что в мышцах у водяной бурозубки содержание маркеров окислительного стресса было ниже, чем у наземной бурозубки, без относительного увеличения антиоксидантной способности (Hindle et al., 2010). Вероятно, что это может быть связано с повышенным содержанием миоглобина в мышцах водяной бурозубки по сравнению с короткохвостой землеройкой (Gusztak, 2008; Stewart et al., 2005). Помимо того, что миоглобин участвует в запасании кислорода, он обладает прямыми антиоксидантными свойствами (Flögel et al., 2004).

Несмотря на высокие энергетические затраты, связанные с полуводным образом жизни, эти животные являются современными аналогами эволюционных промежуточных форм между предковыми наземными млекопитающими и их потомками, ведущими полностью водный образ жизни

(Fish, Baudinette, 1999). Изучение приспособлений полуводных млекопитающих расширит представления о механизмах и стратегиях адаптаций данной экологической группы к гипоксии-реоксигенации.

1.1.3. Роль антиоксидантной системы в адаптациях подземно-роющих млекопитающих

Подземно-роющие виды являются моделью для изучения адаптаций не только к низкому уровню кислорода в среде, но и к повышенному содержанию CO₂ (гиперкапния) (Schaefer, Sadleir, 1979; Campbell et al., 2010). Находясь под землей, почти полной темноте, животные часто подвергаются значительному гипоксическому и гиперкапническому стрессу из-за резких флуктуаций уровня O₂ и CO₂ во время дождя (Caballero et al., 2006), что может приводить образованию избытка АФК и к окислительным повреждениям. Действительно, проведенные исследования (Andziak et al., 2005; 2006; Lewis et al., 2013) показали, что содержание маркеров окислительного стресса и уровень ПОЛ у голого землекопа (*Heterocephalus glaber*), был значительно выше по сравнению с лабораторной мышью.

Большинство исследований АОС землероев посвящено представителям грызунов – слепышам (*Spalax spp.*) и голому землекопу (Caballero et al., 2006; Soria-Valles et al., 2010; Schülke et al., 2012; Lewis et al., 2013; Schmidt et al., 2016). Так, например, в исследовании на голом землекопе (Lewis et al., 2013) было показано, что активность СОД1 и СОД2 в органах как молодых, так и взрослых землекопов, была выше по сравнению с подобранными по возрасту лабораторными мышами. Тем не менее, активность глутатиопероксидазы и уровень глутатиона в печени землекопа были значительно ниже, чем у лабораторной мыши. Голые землекопы имеют экстремальную продолжительность жизни (до 24 лет), однако, у них не выявлено онтогенетических изменений уровней антиоксидантной способности и

окислительного стресса (Andziak et al., 2005; 2006; Lewis et al., 2013), при этом они обладают удивительной устойчивостью к действию проапоптических стимулов (Labinskyu et al., 2006).

Изучение антиоксидантной защиты печени, сердца и мозга *Spalax spp.* (Schülke et al., 2012) показало более высокие уровни экспрессии генов Nrf2 и антиоксидантных ферментов – каталазы, ГПО, ГР (исключение СОД) по сравнению с крысой. Уровень мРНК ГПО в мозге *Spalax spp.* был выше до 800 раз. Кроме того, в последовательности гена Nrf2 слепыша были выявлены уникальные аминокислотные замены, которые могут быть функционально важными для этого фактора транскрипции (Schülke et al., 2012). При исследовании антиоксидантной защиты гардеровой железы *Spalax ehrenbergi* (Caballero et al., 2006) была обнаружена высокая активность СОД и каталазы по сравнению с крысой.

Возможно, норные бурозубки также испытывают дефицит кислорода в среде (Hindle et al., 2010). В исследовании Stewart и соавторов (2005) на обыкновенной короткохвостой бурозубке (*Blarina brevicauda*) было выявлено, что в сердце концентрация миоглобина и активность цитохромоксидазы у землеройки больше, чем у крыс и других мелких млекопитающих. Авторы предполагают (Stewart et al., 2005), что потенциал для генерации активных форм кислорода должен быть огромным, так как общая концентрация глутатиона в 300 раз больше в сердце бурозубки, чем в этом органе у крысы.

Таким образом, исследование антиоксидантной системы у подземно-роющих видов представляет особый интерес и требует более детального изучения.

1.2. Эколого-физиологические особенности мелких млекопитающих

Большинство представителей отрядов насекомоядные, грызуны и рукокрылые имеют мелкие размеры, в связи с чем характеризуются

некоторыми особенностями в физиологии и морфологии. Исходя из так называемого «правила поверхности», следует, что чем меньше размер тела, тем относительно больше его поверхность и тем больше теплопотери. И для того чтобы не снизилась температура тела, животное должно производить тепло со скоростью, равной скорости его потери (Шмидт-Ниельсен, 1987). Поэтому мелким млекопитающим требуется относительно больше энергии на поддержание жизни. Подсчитано, что маленькие животные расходуют до 95% своей энергии на поддержание постоянной температуры тела и обеспечение жизненных процессов в организме и лишь единицы процентов на активную жизнь (Пантелеев, 1983).

Негативность высоких удельных энергозатрат и соответственно пищевых потребностей, перекрывается преимуществами в абсолютно малых потребностях кормовых ресурсов и уходом в экологические ниши с многочисленными мелкими видами корма. Короткая индивидуальная жизнь (исключение рукокрылые) и невозможность передачи жизненного опыта потомству, нивелируется большим генетическим разнообразием (Пантелеев, 2010). Малые размеры определяют и наиболее общие экологические особенности этой группы животных. От размера тела зависит энергетика организма. Р. Петерс насчитал 88 физиологических функций в организме, которые зависят от размеров тела (Peters, 1983). Поэтому размеры животных так важны (Шмидт-Ниельсен, 1987).

Мелкие млекопитающие отличаются несовершенной терморегуляцией, из-за чего наблюдается их неустойчивость к колебаниям температуры среды. Понижение температуры среды вынуждает мелких зверьков увеличивать теплопродукцию для сохранения температуры тела, а это сильно сокращает возможности организма для производства полезной работы. В связи с этим мелкие млекопитающие слишком часто находятся под угрозой переохлаждения, и именно поэтому у некоторых насекомоядных не развито потоотделение. Несмотря на огромные затраты энергии, им не удаётся иметь

надежную терморегуляцию, какой обладают крупные звери (Пантелеев, 1983; Шмидт-Ниельсен, 1987).

Температура тела у насекомоядных, рукокрылых и некоторых грызунов может широко изменяться. Способность переносить значительные колебания температуры тела, сохраняя при этом жизнедеятельность – важная адаптивная особенность мелких млекопитающих. При резком изменении температуры окружающей среды они вынуждены «отказаться» от сохранения постоянства внутренней среды. Они приспособились отвечать на это быстрым изменением интенсивности физиологических процессов с последующим их восстановлением (Пантелеев, 1983). Регулирование температуры тела у них достигается главным образом за счет увеличения или уменьшения выработки внутреннего тепла с помощью процессов химической (внутриклеточной и тканевой) терморегуляции, т.е. за счет изменения интенсивности обмена веществ. Размеры тела и высокая двигательная активность мелких млекопитающих ограничивают накопление липидов и жирорастворимых витаминов, а высокий обмен веществ у мелких зверьков (в особенности у землероек) требует более быстрой оборачиваемости крови, прежде всего для переноса кислорода от легких к тканям и обратного отведения углекислоты от тканей. В связи с этим у них наблюдается четкая зависимость между размерами тела, частотой пульса и скоростью кровотока (Шмидт-Ниельсен, 1987; Vornanen, 1989). Поэтому насекомоядные, рукокрылые и грызуны, обладающие маленькими размерами тела, имеют очень высокую частоту сердечных сокращений, и, следовательно, высокую скорость кровотока (Шмидт-Ниельсен, 1987). Их сердце хорошо адаптировано, чтобы соответствовать потребностям, налагаемым на него высоким уровнем метаболизма. Минутный объем сердца определяется ударным объемом (размер сердца) и сердечным ритмом. Эти две переменных были измерены для некоторых мелких млекопитающих (Vornanen, 1989). Обычно сердце млекопитающего составляет около 0,59 % от массы тела, что выражается уравнением $M_h = 0,0059M_b^{0,98}$, где M_h – масса сердца, а M_b –

масса тела (Stahl, 1967). Сопоставление вычисленных значений массы сердца с предсказанными значениями показало, что желудочки сердца диких мелких млекопитающих крупнее, чем средних млекопитающих. Вместе с тем у землероек (Soricidae), несмотря на в 2-3 раза более высокий уровень метаболизма, сердце не крупнее, чем у других млекопитающих с такой же массой тела (Vornanen, 1989). У большинства млекопитающих частота сердечных сокращений (ЧСС) повышается при снижении размера тела в соответствии с уравнением $ЧСС = 241Mb^{-0,25}$ (Stahl, 1967). Мелкие дикие млекопитающие значительно отклоняются от этого уравнения. Значения сердечного ритма землеройки равно 627 уд/мин (Nagel, 1985; Vornanen, 1989). Таким образом, землеройки с уровнем метаболизма в три раза большим, чем вычислено для их размера, имеют более низкую ЧСС по сравнению с другими млекопитающими, исходя из уравнения Stahl (отношение между сердечным ритмом и размером тела). Максимальные сердечные ритмы также неожиданно малы у этих млекопитающих (Morrison et al., 1959), хотя причина этого явления не до конца ясна. Возможно, что ЧСС активных млекопитающих значительно выше, чем измеренная в состоянии покоя, особенно для очень активных землероек. Другая причина состоит в ограничениях, связанных с особенностями клеточных элементов миокарда, что может затруднять абсолютное повышение ЧСС со снижением размеров тела. Сердечный цикл включает сложную очередность электрических и механических событий для инициации сокращения и для возобновления релаксации сердечной мышцы, что не позволяет безгранично сокращать его минимальное время (Vornanen, 1989).

Известно, что у мелких диких грызунов достаточный минутный объем сердца сохраняется за счет компенсации ограниченного сердечного ритма большим ударным объемом, то есть размером сердца. У землероек это выполняется частично, так как повышенный размер сердца недостаточен, чтобы компенсировать относительно низкий сердечный ритм, учитывая их

высокий уровень метаболизма. Адаптация бурозубок к высокому метаболическому уровню, возможно, заключается в форме сердца, похожего на сердце колибри (Trochilidae). Желудочки миокарда бурозубок длинные и узкие с конической верхушкой, тогда как другие мелкие млекопитающие имеют шарообразные сердца (Vornanen, 1989). В соответствии с законом Лапласа для полости с малым конечно-диастолическим объемом, то есть с маленьким внутренним радиусом в поперечном сечении, необходимо меньшее миокардиальное напряжение для развития равного внутрижелудочкового давления, чем того, у которого радиус больше. Таким образом, удлинённый желудочек должен создавать идентичное кровяное давление используя меньше энергии или более высокое кровяное давление используя такое же количество энергии, чем шарообразное сердце (Vornanen, 1989).

В отряде Insectivora, для которых характерна большая концентрация эритроцитов в крови по сравнению с грызунами, их количество у представителей отдельных видов также соответствует «правилу величины». Например, среднее содержание эритроцитов в 1 мм^3 крови обыкновенного ежа (*Erinaceus europaeus*) и выхухоли (*Desmana moschata*) равно 9,4 млн. (Галанцев, 1977). У более мелких видов – крота (*Talpa europaea*) и водяной куторы (*Neomys fodiens*) – этот показатель оказался выше – соответственно 11,4 и 10,0 млн, а у самого маленького – обыкновенной бурозубки (*Sorex araneus*) – еще больше – 13,1-13,4 млн/мм³ (Ивантер и др., 1985).

По образу жизни насекомоядные, грызуны и рукокрылые распадаются на ряд биологических типов, приспособившихся к разнообразным экологическим условиям существования, в связи с чем, у них развиваются определенные физиологические и морфологические адаптации. Наиболее многочисленны наземные формы, в различной степени специализированные к условиям жизни на поверхности земли, где они добывают корм, а укрытие от непогоды, опасности – находят в логовах и норах (Строганов, 1957). С наступлением холодов и выпадением снега многие из них скрываются от суровой зимней

погоды под толщей снегового покрова и деятельны всю зиму, некоторые (например, обыкновенный еж, лесная мышовка (*Sicista betulina*) и летучие мыши) впадают в зимнюю спячку, длящуюся до начала весенней вегетации растительности. Для мелких млекопитающих свойственна высокая чувствительность к световому фактору, проявляющаяся в сезонной регуляции биологических функций. Особенно ярко сезонность выражена у гибернирующих видов млекопитающих.

Гибернация – это самая эффективная энергосберегающая стратегия выживания, доступная млекопитающим, при которой существенно снижается потребность в ресурсах (Carey et al., 2003; Geiser, 2004; Storey, 2010). Мелкие зимоспящие – это уникальные млекопитающие, в плане адаптации к функционированию при низких температурах тела. В зимний период мелкие млекопитающих впадают в оцепенение, при котором температура тела приближается к температуре окружающей среды (Heldmaier, Ortmann, Elvert, 2004). Эти фазы, называемые оцепенением, регулярно перемежаются короткими периодами разогрева, когда температура тела восстанавливается до нормального эутермического уровня на несколько часов (Hut et al., 2002). Основными характеристиками спячки мелких млекопитающих является значительное снижение метаболизма и потребления кислорода до 1/100 от «базального» уровня, более чем стократное уменьшение частоты сердечных сокращений (ЧСС) и экстремально низкая температура тела, которая колеблется у разных видов в пределах +2–+4° С (Breukelen, Martin, 2002; Storey, 2010), но может снижаться до -2 °С (Heldmaier, Ortmann, Elvert, 2004).

К млекопитающим, испытывающим гипоксию, также относятся ныряющие (Wilhelm Filho et al., 2002; Vázquez-Medina et al., 2007; Hindle et al., 2010; Vázquez-Medina et al., 2011) и подземно-роющие формы (Kuhnen, 1986; Campbell et al., 2010). Процесс ныряния животных связан с исключением внешнего дыхания. Поэтому в ходе эволюции у них вырабатывались адаптивные сдвиги, компенсирующие гипоксическое состояние организма,

возникающее в период длительного апноэ (Галанцев, 1977). Адаптивные преобразования организма связаны, прежде всего, с морфофункциональными приспособительными изменениями дыхательной, сердечно-сосудистой систем и крови. Общая обеспеченность организма Hb у ныряющих животных (в расчете на единицу веса) очень высока (Robinson, 1939). Даже у полуводных видов, например у куторы, на 1 кг веса приходится больше Hb (19,3 г), чем у родственного ей вида – обыкновенной бурозубки (10,5 г) (Коржуев, Корецкая, 1962). Около 13г/кг Hb содержится в организме ондатры. Звездорыл (*Condylura cristata*), являющийся одним из самых маленьких ныряльщиков в мире, имеет средний объем легких в 1,81 раза выше, чем аллометрическое значение и превышающий этот же показатель у тихоокеанского крота (*Scapanus orarius*) на 65,4% (McIntyre, Campbell, MacArthur, 2002). Средняя концентрация миоглобина (Mb) в скелетной мышце взрослого звездорыла на 19,5% выше, чем у тихоокеанского крота и на 54,2 % выше, чем у американского землеройкового крота (*Neurotrichus gibbsii*) (McIntyre, Campbell, MacArthur, 2002).

Подземно-роющие виды адаптируются не только к гипоксической среде, но и к повышенному содержанию углекислого газа в норах (Schaefer, Sadleir, 1979; Kuhnen, 1986; Campbell et al., 2010). Такие факторы, как повышенная физическая активность в сочетании с низкой концентрацией O₂ и наличием пылевых частиц во вдыхаемом воздухе, привели к адаптивным модификациям гемоглобина у *Talpa europaea* – повышенное сродство крови к кислороду (по сравнению с наземными млекопитающими аналогичного размера), что связано с функцией 2,3-дифосфоглицерата (Jelkmann et al., 1981).

Приспособлениями к низкому парциальному давлению подземных видов грызунов (*Spalax spp.*) являются изменения в структуре скелетных мышц и кардиореспираторной системе – увеличение плотности кровеносных сосудов и количества митохондрий и эритроцитов (Caballero et al., 2006; Schülke et al., 2012). Некоторые исследователи (Hindle et al., 2010) предполагают, что норные землеройки также как и подземно-роющие кроты и голые землекопы

(*Heterocephalus glaber*), могут испытывать гипоксию под землей. При исследовании голых землекопов не обнаружено возрастных изменений уровней антиоксидантной способности и окислительного стресса (Andziak et al., 2005; 2006; Lewis et al., 2013).

Изученная в нашей работе группа млекопитающих (насекомоядные, грызуны и рукокрылые) разнообразна филогенетически, по биологическим типам, по размерам и уровню метаболизма, поэтому ожидать схожих закономерностей адаптаций к гипоксии-реоксигенации не стоит, потому что организм – это чрезвычайно сложная целостная система, в которой компенсаторно-приспособительные процессы развиваются на всех уровнях. Адаптация отдельных систем неизбежно сопровождается соответствующими коадаптациями, т.е. взаимозависимыми и согласованными изменениями других систем и в целом всей организации. Благодаря этому приспособления организма приобретают целостный, интегрированный характер (Галанцев, 1977).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Экспериментальные животные

Объектами исследования являлись рукокрылые (Chiroptera), грызуны (Rodentia) и насекомоядные (Insectivora) (Таблица 1).

Таблица 1.

Общая характеристика и количество использованных экспериментальных животных

Отряд	Вид	Возраст, количество	Время отбора образцов	Жизненная форма
Рукокрылые (Chiroptera)	Северный кожанок (<i>Eptesicus nilssonii</i> Keyserling, Blasius)	Ad, n=4 (1♂, 3♀)	ноябрь	зимоспящие
		Juv, n=2 (♀), Ad, n=6 (3♂, 3♀)	февраль-март	
	Ночница Брандта (<i>Myotis brandtii</i> Eversmann)	Ad, n=2 (1♂, 1♀)	ноябрь	зимоспящие
		Ad, n=5 (2♂, 3♀)	февраль-март	
	Бурый ушан (<i>Plecotus auritus</i> L.)	Ad, n=1(♀)	ноябрь	зимоспящие
		Ad, n=3 (1♂, 2♀)	февраль-март	
	Водяная ночница (<i>M. Daubentonii</i> Kuhl)	Ad, n=3 (1♂, 2♀)	ноябрь	зимоспящие
		Ad, n=2 (1♂, 1♀)	февраль-март	

Грызуны (Rodentia)	Крыса лабораторная (<i>Rattus norvegicus</i> Berk.)	6 мес., n=5 (2♂, 3♀)	октябрь	наземные
		18 мес, n=5 (2♂, 3♀)		
	Водяная полевка (<i>Arvicola terrestris</i> L.)	Juv, n=10 (7♂, 3♀)	август- сентябрь	полуводные
		Ad, n=14 (7♂, 7♀)		
	Ондатра (<i>Ondatra zibethicus</i> L.)	Juv (5-6 мес.), n=11 (5♂, 6♀)	октябрь	полуводные
		Ad (>12 мес), n=12 (8♂, 4♀)		
Европейский бобр (<i>Castor fiber</i> L.)	Ad (>3 лет), (8♂, 4♀), n=12	октябрь	полуводные	
Насекомоядные (Insectivora)	Обыкновенная бурозубка (<i>Sorex araneus</i> L.)	Juv, n=8 (3♂, 5♀)	август- сентябрь	норные
		Ad, n=6 (3♂, 3♀)		
	Водяная кутора (<i>Neomys fodiens</i> Pennant.)	Juv, n=22 (9♂, 13♀)	август- сентябрь	полуводные
		Ad, n=13 (8♂, 5♀)		
Обыкновенный крот (<i>Talpa europaea</i> L.)	Ad, n=8 (5♂, 3♀)	август- сентябрь	подземно- роющие	

Примечание: Juv – неполовозрелые особи, Ad – половозрелые особи.

Лабораторные крысы Wistar содержались в стандартных помещениях вивария ПетрГУ площадью 25 м² в клетках размером 44x25x62 см при температуре 22±2°C. Изъятие летучих мышей проводили в начале зимней спячки (конец ноября) и в период глубокой спячки (февраль-март) на зимовках в Республике Карелия (61-63° с.ш., 30-36° в.д.) по Разрешениям Управления охотничьего хозяйства РК (№№ 0002-2010, 0001-2011, 00008-2013). Отловленных рукокрылых помещали в холод (-4 °С) на сутки, после производили декапитацию и отбор образцов у спящих животных (стадия баута не определялась). Самцы и самки ондатр (n=23) были отловлены в осенний период (15–17 октября 2011 г.) на оз. Миккельское в окрестностях п. Эссойла (Карелия). Остальные животные отловлены в природе на Каскеснаволоцком стационаре Института биологии КарНЦ РАН в 2010 – 2015 гг.

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».

В настоящем исследовании не было выявлено достоверных различий между полами по изученным показателям, поэтому результаты для обоих полов были объединены для будущего анализа. Образцы тканей печени, почек, сердца, легких и скелетной мышцы исследованных животных 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 (рН=7,0), после чего центрифугировали при 6000g в течение 15 мин.

2.2. Определение активности супероксиддисмутазы

Активность супероксиддисмутазы исследовали модифицированным адренохромным методом (Misra, Fridovich, 1972). Спектрофотометрический метод определения активности СОД основан на способности фермента ингибировать реакцию автоокисления адреналина в адренохром. 50% торможения этого процесса соответствует одной условной единице (у.е.) активности СОД.

Приготовление реактивов

1. Карбонатный буферный раствор (рН 10,2).

Содержит 0,3 М карбоната и $4,5 \times 10^{-2}$ М гидрокарбоната натрия. Кроме того, в буфер вводят ЭДТА – 3×10^{-4} М. 31,8 г Na_2CO_3 , 3,78 г NaHCO_3 и 0,0876 г ЭДТА взвешивают на аналитических весах, количественно переносят дистиллированной водой в мерную колбу на 1 л. После растворения объем доводят до метки и раствор тщательно перемешивают. Хранят буферный раствор на холоду.

2. $5,5 \times 10^{-3}$ М раствор адреналина.

0,1007 г адреналина взвешивают на аналитических весах, переносят в мерную колбу на 25 мл, растворяют, добавляя 5 мл 0,1 н HCl , а затем доводят дистиллированной водой до метки. Раствор тщательно перемешивают.

0,1 н HCl готовят из концентрированного раствора соляной кислоты. Для этого под тягой 8,2 мл 37,3% раствора HCl (уд. м. 1,185) переносят количественно в мерную колбу на 1 л, осторожно доливают до метки дистиллированную воду, перемешивают и переливают в бутылку с притертой пробкой.

Ход определения

Оптическую плотность раствора определяют на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 480 нм (лампа накаливания), при температуре 25°C в кювете на 10 мм. Щель прибора устанавливают по воде.

В кювету наливают 2,5 мл буферного раствора и 0,025-0,100 мл супернатанта (торможение реакции автоокисления должно находиться в пределах 20-70 %). После этого в смесь вносят 0,2 мл раствора адреналина, осторожно перемешивают стеклянной палочкой и устанавливают начальную экстинкцию – $E_{\text{СОД1}}$. Через 1 мин измеряют нарастание оптической плотности – $E_{\text{СОД2}}$. В контрольные пробы вместо супернатанта вносят воду.

Расчет

Активность СОД рассчитывают по формуле:

$$A = ([\ln((E_{\text{СОД2}} - E_{\text{СОД1}}) / (E_{\text{СОД2к}} - E_{\text{СОД1к}}))] / \ln(0,5)) * 2 / V / m,$$

где A – активность СОД, у.е./г ткани,

$E_{\text{СОД1к}}$ – начальная экстинкция контрольной пробы,

$E_{\text{СОД2к}}$ – экстинкция контрольной пробы через 1 мин,

V – объем вносимого супернатанта (мл),

m – навеска ткани (г),

0,5 – изменение экстинкции, соответствующее 1 у. е. активности фермента,

2 – объем фосфатного буфера для приготовления гомогената.

Удельную активность СОД рассчитывают на 1 мг белка.

2.3. Определение активности каталазы

Активность каталазы определялась спектрофотометрическим методом Beers, Sizes (1952), который основан на способности фермента разлагать перекись водорода с образованием кислорода и воды. При этом регистрируется уменьшение поглощения при длине волны 240 нм. Разница в поглощении в каждую единицу времени является мерой активности каталазы.

Приготовление реактивов

1. 0,05 М фосфатный буферный раствор (рН 7,4)
2. Рабочая смесь.

Готовят непосредственно перед определением, смешивая фосфатный буфер (100 мл) и 30% раствор перекиси водорода (0,1-0,2 мл), с учетом того, что показания СФ должны находиться в пределах 0,4 – 0,5.

Ход определения

В спектрофотометрическую кювету на 10 мм наливают 2,5 мл рабочей смеси и 0,05 мл супернатанта, быстро перемешивают стеклянной палочкой и немедленно измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 240 нм (лампа дейтериевая) и температуре 25°С. Щель прибора устанавливают по воде. Повторяют измерение экстинкции раствора точно через 1 мин.

Расчет

Активность каталазы рассчитывают по формуле:

$$A = [(2,3 * [\lg(E_1/E_2)]) * (2/V)] / m,$$

где А – активность каталазы (мкМ/г ткани),

E_1 – начальная экстинкция пробы,

E_2 – экстинкция пробы через 1 мин,

V – объем вносимого супернатанта (мл),

m – навеска ткани (г),

2,3 – коэффициент молярной экстинкции перекиси водорода при 240 нм,

2 – объем фосфатного буфера для приготовления гомогената.

Удельную активность каталазы рассчитывают на 1 мг белка.

2.4. Определение количества белка

Количество белка определяли методом Лоури (Lowry, 1951), который основан на способности медных производных белка восстанавливать реактив Фолина с образованием окрашенных в синюю тональность комплексов.

Приготовление реактивов

1. 0,05 М фосфатный буферный раствор (рН 7,4).

Предварительно готовят 0,05 М раствор кислого фосфорнокислого однозамещенного калия (6,81 г KH_2PO_4 на 1 л раствора) и 0,05 М раствор кислого фосфорнокислого двухзамещенного натрия (8,90 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ или 7,1 г безводного Na_2HPO_4 на 1 л раствора). Взвешенную на теххимических, а затем на аналитических весах навеску переносят в мерную колбу на 1 л, растворяют вещество в дистиллированной воде, объем доводят до метки и раствор тщательно перемешивают.

Для получения фосфатного буфера с рН 7,4 первый и второй растворы смешивают в соотношении 4:6. Буферный раствор хранят в холодильнике.

2. Рабочий раствор.

Готовят из 1% раствора сульфата меди (II), 2% раствора виннокислого калия и 2% раствора карбоната натрия. Для приготовления 1% раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ к 1,6 г кристаллогидрата добавляют 98,4 мл дистиллированной воды и хорошо перемешивают. Для приготовления 2% раствора виннокислого калия смешивают 2 г $\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ и 98 мл дистиллированной воды. 2% раствор Na_2CO_3 готовят на 0,1 н растворе едкого натра. Для этого берут 2 г соли и 98 мл 0,1 н NaOH . Для приготовления 0,1 н NaOH 4 г щелочи помещают в фарфоровый стакан и растворяют в дистиллированной воде под тягой при постоянном помешивании стеклянной палочкой. Остывший раствор щелочи количественно переносят в мерную колбу на 1 л, объем доводят до метки и тщательно размешивают.

Для приготовления рабочего раствора перед анализом смешивают 0,5 мл 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5 мл 2% виннокислого калия и 50 мл щелочного 2% Na_2CO_3 .

3. Реактив Фолина.

В круглодонную колбу на 1,5–2,0 л вносят 100 г х.ч. $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 25 г х.ч. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и растворяют их в 700 мл дистиллированной воды. К раствору добавляют 50 мл 85% H_3PO_4 и 100 мл концентрированной HCl . К колбе присоединяют обратный холодильник и смесь кипятят в течение 10 ч. После кипячения в колбу вносят 150 г Li_2SO_4 , добавляют 50 мл

дистиллированной воды и 15–20 капель бромной воды. Смесь кипятят под тягой без холодильника в течение 30 мин. Раствор охлаждают до комнатной температуры, объем его доводят растворителем до 1 л и фильтруют. Затем определяют кислотность полученного реактива; для этого его разводят в 10 раз и титруют 0,1 н раствором щелочи по фенолфталеину. Исходя из данных титрования, реактив разводят с таким расчетом, чтобы кислотность его была 1 н.

1% раствор альбумина.

1 г бычьего сывороточного альбумина растворяют в 99 мл дистиллированной воды.

Ход определения

Исходный супернатант разбавляют фосфатным буфером в 6 раз: 0,1 мл супернатанта смешивают с 0,5 мл 0,05 М фосфатного буфера. В опытную пробирку наливают 0,1 мл разбавленного супернатанта и 2,5 мл рабочего раствора. Одновременно с опытными ставят стандартные пробы, в которые вместо гомогената вносят по 0,05, 0,075 и 0,1 мл 1% раствора альбумина и, соответственно, по 2,55, 2,525 и 2,5 мл рабочего раствора. Содержимое всех проб встряхивают и пробирки оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют по 0,2 мл реактива Фолина, после перемешивания пробы помещают в термостат на 30 мин и затем колориметрируют на СФ-46 при длине волны 750 нм (лампа накаливания) в кюветах на 10 мм. Щель спектрофотометра устанавливают по воде.

Расчет

Содержание белка рассчитывают по формуле:

$$C = [(E - b_0) / b_1] * [(0,1 + 0,5) / 0,1],$$

где С – содержание белка (мг/г ткани),

Е – экстинкция пробы,

b_0 и b_1 – коэффициенты линейной регрессии для калибровочной кривой, построенной по бычьему сывороточному альбумину.

$(0,1 + 0,5)$ – количество, соответственно, исходного супернатанта и фосфатного буфера (мл),

0,1 – объем супернатанта, взятый после разведения (мл).

2.5. Статистическая обработка результатов исследования

Полученные данные обрабатывали с использованием пакетов статистических программ MS Excel и Statgraphics общепринятыми методами вариационной статистики. Сравнение проводили используя непараметрический критерий (U) Вилкоксона-Манна-Уитни и кластерный анализ (метод ближайшего соседа). Для оценки степени влияния факторов использовали дисперсионный анализ (Коросов, Горбач, 2010). В настоящем исследовании не было выявлено достоверных половых различий по изученным показателям, поэтому результаты для обоих полов были объединены.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Активность антиоксидантных ферментов у гибернирующих летучих мышей

В результате исследования была выявлена ткане- и видоспецифичность активности АОФ в органах изученных видов летучих мышей (бурый ушан, северный кожанок, ночницы Брандта и водяная). В основном, наблюдались тенденции к изменению активности того или иного фермента в период глубокой спячки по сравнению с периодом вхождения в неё, тем не менее, достоверно различающиеся изменения также были обнаружены.

В печени у всех исследованных видов летучих мышей выявлена тенденция к увеличению активности СОД в период глубокой спячки (зима) при сравнении с особями, отловленными в начале гибернации (осенью), для северного кожанка различия достоверны (Рис. 2).

Активность каталазы в печени снижалась к середине гибернации (зима) только у северного кожанка, напротив, у бурого ушана, ночницы Брандта и водяной ночницы наблюдалось незначительное увеличение активности данного фермента. Максимальная среди исследованных летучих мышей активность АОФ в печени выявлена у водяной ночницы в зимнее время (Рис. 2).

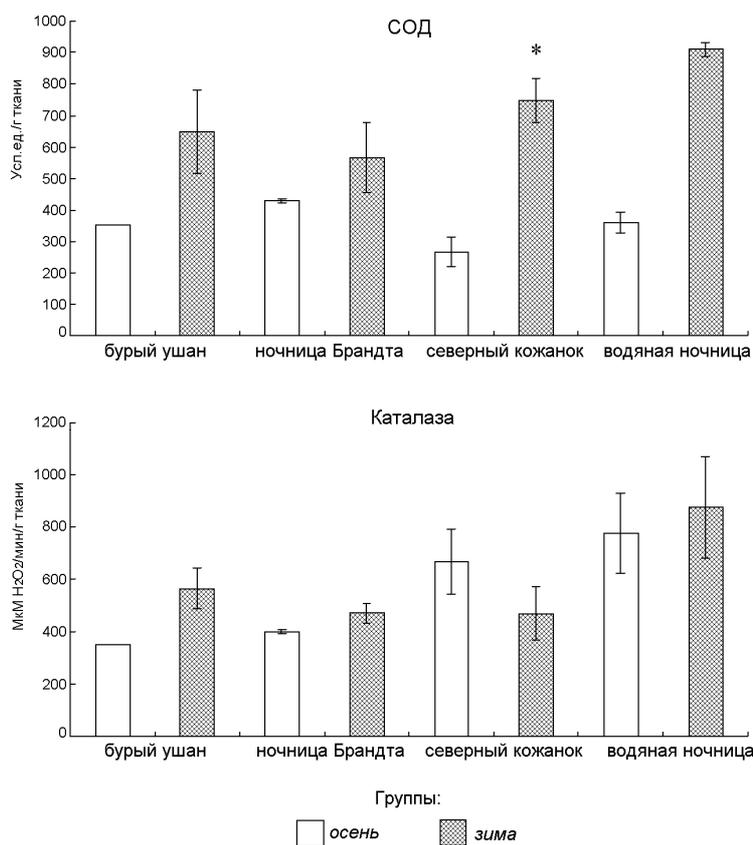


Рис. 2. Активность АОФ в печени летучих мышей в начале гибернации (осень) и во время глубокой спячки (зима) ($M \pm m$). Условные обозначения: * – различия достоверны по сравнению с животными отловленными осенью у одного вида ($p < 0,05$, критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Анализ ферментативного компонента антиоксидантной защиты в сердце показал, что у летучих мышей находящихся в более глубокой спячке (февраль-март) активность каталазы была ниже, чем у особей, отловленных в начале гибернации (ноябрь) – снижение активности каталазы составило у ночницы Брандта 75,6%, а у северного кожанка 65,7% (Рис. 3).

Высокие активности, как СОД, так и каталазы в сердце обнаружены у ночницы Брандта и северного кожанка, для сравнения у куторы активность каталазы в сердце равна 71,6, для крысы – 43,9 $MkM H_2O_2/мин/г$ ткани.

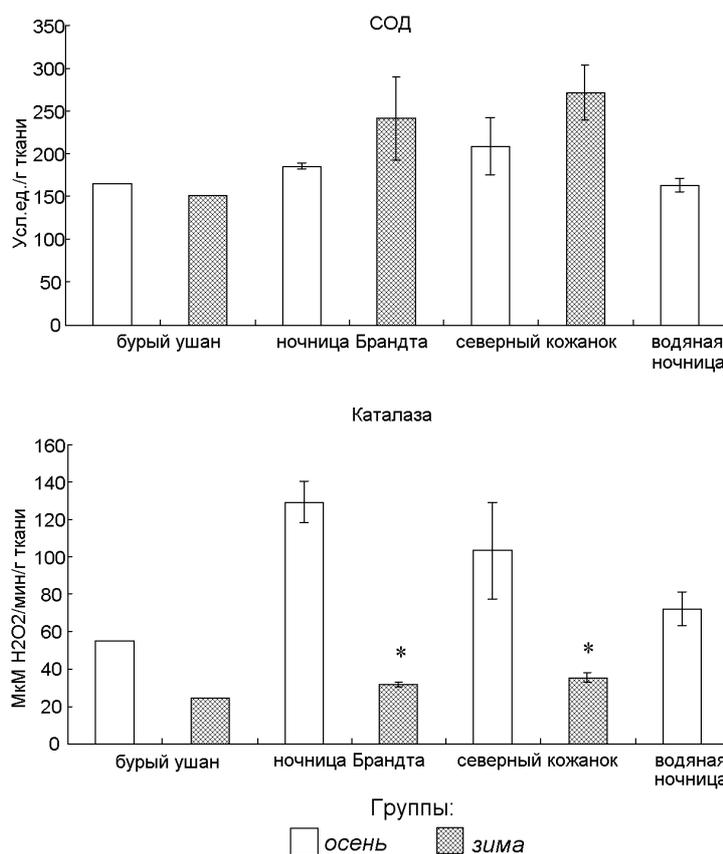


Рис. 3. Активность АОФ в сердце летучих мышей в начале гибернации (осень) и во время глубокой спячки (зима) ($M \pm m$). Условные обозначения: как на рисунке 2.

Активность СОД в сердце (Рис. 3) и почках (Рис. 4) у северного кожанка и ночницы Брандта, точно так же как и печени, была выше у особей отловленных зимой. В почках активность каталазы снижалась (ночница Брандта, северный кожанок) к середине гибернации.

Необходимо отметить, что в почках у бурого ушана активность каталазы в осеннее время была значительно ниже по сравнению с другими исследованными видами летучих мышей (Рис. 4). Самая высокая среди изученных видов летучих мышей активность СОД в данном органе выявлена у ночницы Брандта, отловленной в зимнее время. Наибольшая активность каталазы в почках наблюдалась у водяной ночницы.

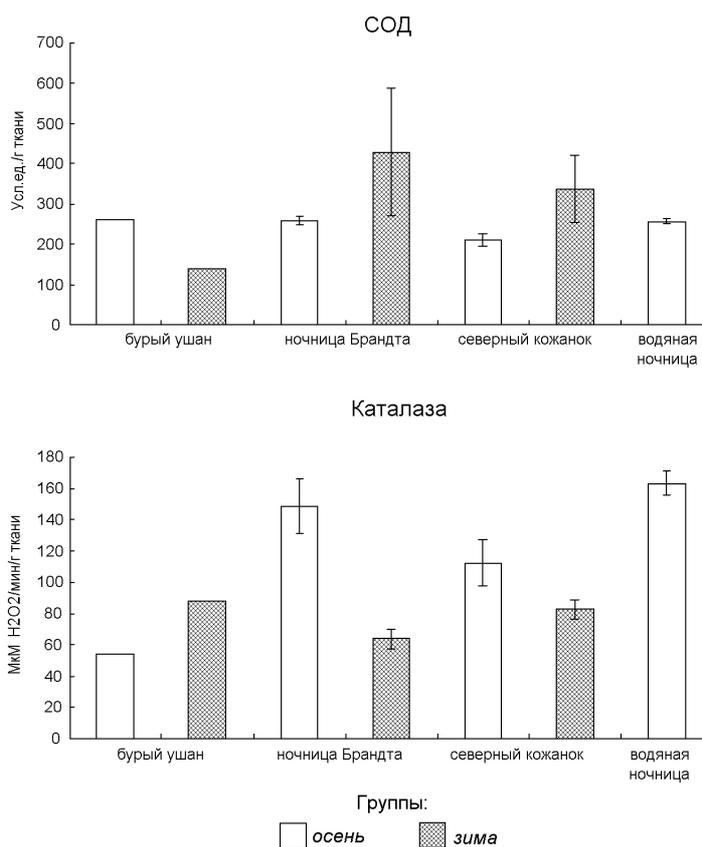


Рис. 4. Активность АОФ в почках летучих мышей в начале гибернации (осень) и во время глубокой спячки (зима) ($M \pm m$). Условные обозначения: как на рисунке 2.

В легких у изученных видов летучих мышей активность СОД увеличивалась к середине спячки, у северного кожанка более чем в 2 раза (Рис. 5). Наибольшая активность СОД в легких обнаружена у бурого ушана, как осенью, так и зимой. Активность каталазы, наоборот, снижалась в зимнее время у бурого ушана, ночницы Брандта и северного кожанка. Максимальная среди исследованных летучих мышей активность каталазы в легких выявлена у ночницы Брандта в начале гибернации, а минимальная у этого же вида в период глубокой спячки (Рис. 5).

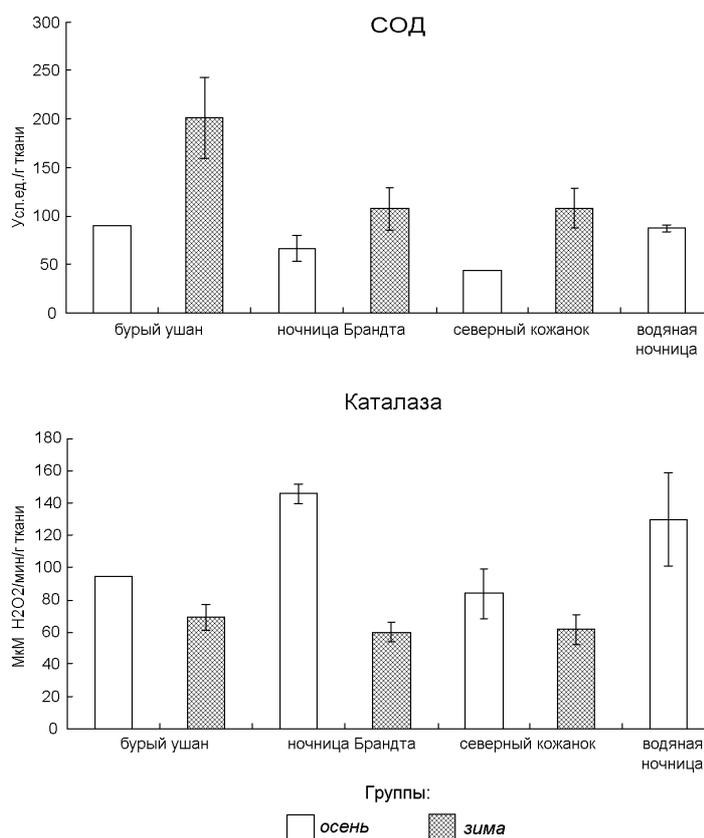


Рис. 5. Активность АОФ в легких летучих мышей в начале гибернации (осень) и во время глубокой спячки (зима) ($M \pm m$). Условные обозначения: как на рисунке 2.

В скелетных мышцах исследованных видов летучих мышей (Рис. 6) выявлена значительно более высокая активность СОД по сравнению с незимоспящими видами (у куторы – 128,9, у бурозубки – 113,9 у.е./г ткани).

Наибольшая среди исследованных видов летучих мышей активность СОД в скелетных мышцах обнаружена у северного кожанка, при этом у водяной ночницы она была минимальна в данном органе. Наименьшая активность каталазы в скелетных мышцах наблюдалась у бурого ушана и ночницы Брандта в зимнее время (Рис. 6).

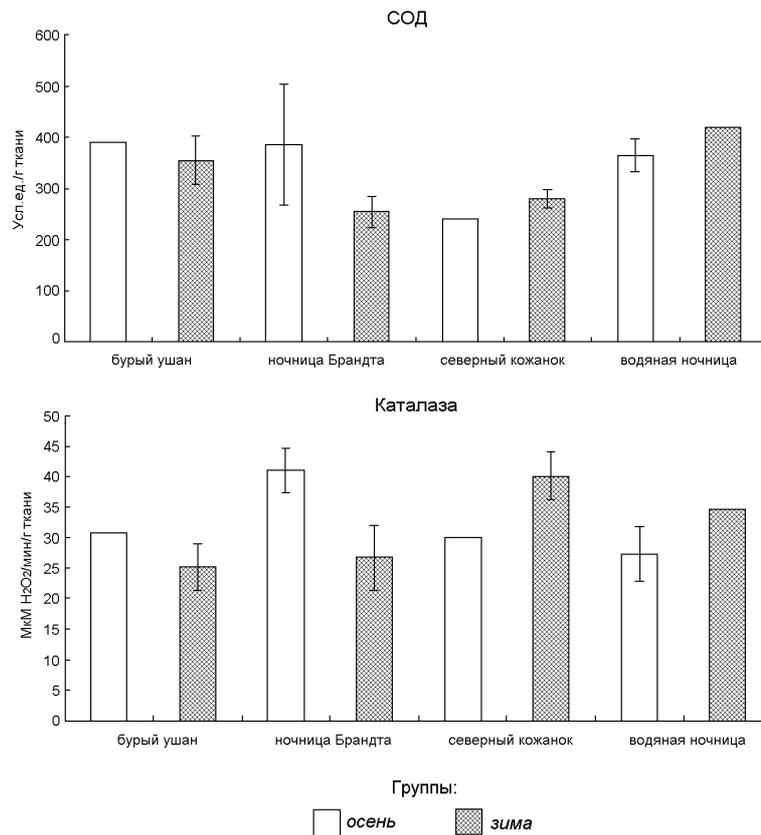


Рис. 6. Активность АОФ в скелетной мышце летучих мышей в начале гибернации (осень) и во время глубокой спячки (зима) ($M \pm m$). Условные обозначения: как на рисунке 2.

3.2. Активность антиоксидантных ферментов у млекопитающих (Rodentia, Insectivora) различного экогенеза

В рассматриваемой нами группе представлены млекопитающие, различающиеся как по систематической принадлежности, так и по особенностям экологических условий обитания – природно-адаптированные к гипоксии-реоксигенации (полуводные, подземно-роющие) и неподвергающиеся смене кислородных условий (сухопутные) виды. У изученных животных выявлены общие, свойственные другим млекопитающим, закономерности распределения активности СОД и каталазы в органах (Marklund, Karlsson,

1990): максимальная активность данных ферментов обнаружена, как правило, в печени, минимальная в легких. Однако, несмотря на общее межорганное сходство, абсолютные значения изучаемых показателей различались.

В нашей работе изучение ферментов системы антиоксидантной защиты выявило ряд отличий ныряющих от сухопутных видов млекопитающих (Рис. 7).

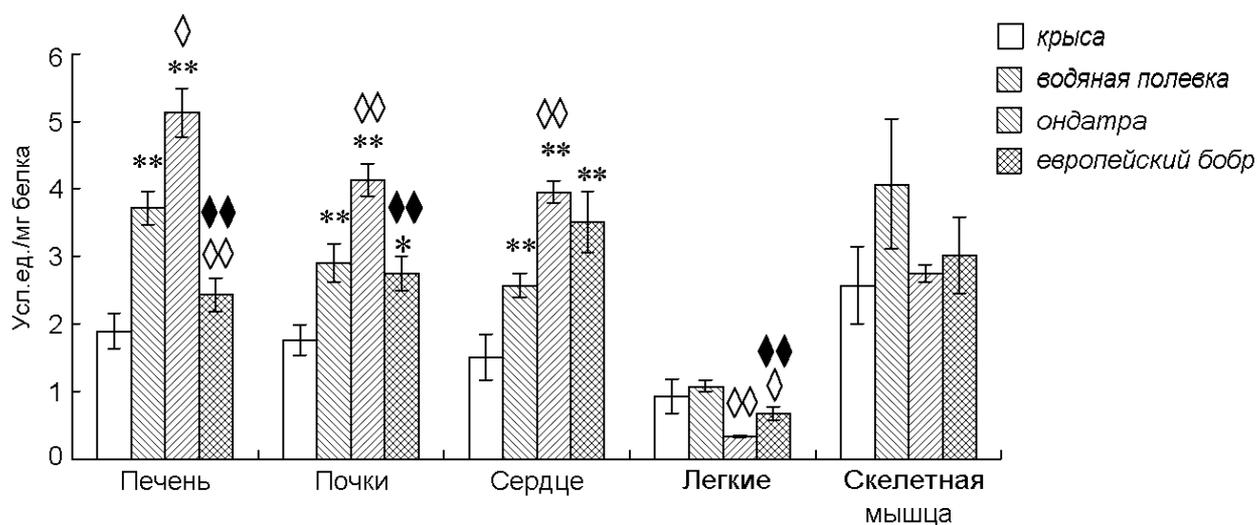


Рис. 7. Удельная активность СОД у грызунов различного экогенеза ($M \pm m$). Условные обозначения: * – различия достоверны по сравнению с крысой; \diamond – различия достоверны по сравнению с водяной полевкой; \blacklozenge – различия достоверны по сравнению с ондатрой; *, \diamond , \blacklozenge $p < 0.05$; **, $\diamond\diamond$, $\blacklozenge\blacklozenge$ $p < 0.01$ (критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Было обнаружено, что у полуводных грызунов (водяная полевка, ондатра, европейский бобр) уровень удельной активности СОД выше в печени, почках и сердце по сравнению с лабораторной крысой (Рис. 7). Очевидно, что это связано с усиленным образованием супероксида в тканях ныряльщиков, поскольку известно, что активность фермента изменяется в ответ на изменение концентрации своего субстрата. По сравнению с другими изученными видами у

ондатры в указанных органах наблюдалась самая высокая активность СОД, при этом в легких – самая низкая. В сердце выявлены значительные различия ($p < 0.01$) в активности СОД между наземной крысой и всеми полуводными видами. Однако в скелетных мышцах исследованных видов грызунов не обнаружено достоверных межвидовых различий (Рис. 7).

Удельная активность другого ключевого антиоксидантного фермента – каталазы – была выше почти во всех органах у полуводных видов грызунов по сравнению с крысой, исключением являлись печень и сердце водяной полевки (Рис. 8).

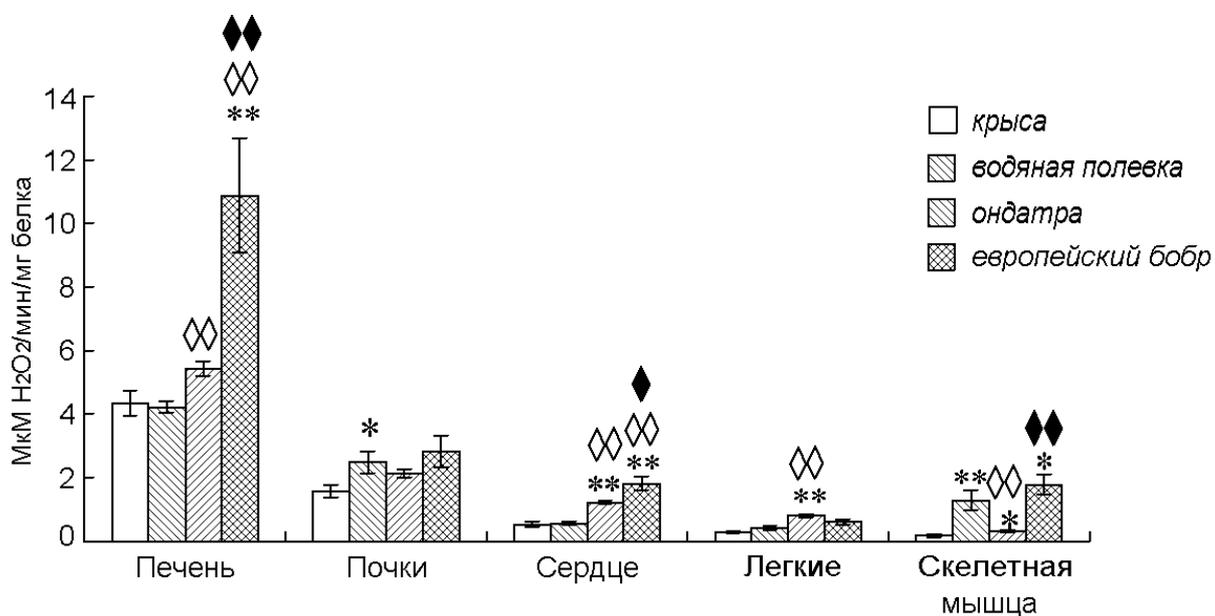


Рис. 8. Удельная активность каталазы у грызунов различного экогенеза ($M \pm m$). Условные обозначения: * – различия достоверны по сравнению с крысой; ◇ – различия достоверны по сравнению с водяной полевкой; ◆ – различия достоверны по сравнению с ондатрой; *, ◇, ◆ $p < 0.05$; **, ◇◇, ◆◆ $p < 0.01$.

Самая высокая удельная активность каталазы выявлена в печени, почках, сердце и скелетной мышце у бобра по сравнению с теми же тканями других изученных видов (Рис. 8). Активность каталазы в легких была выше у ондатры

по сравнению с крысой и водяной полевкой. Отмеченная наряду с повышенной активностью каталазы в печени бобра и легких ондатры (Рис. 8) относительно низкая активность СОД в указанных органах (Рис. 7) свидетельствует о наличии других источников перекиси водорода. В сердце наибольшая активность каталазы выявлены у ондатры и бобра, в то время как в скелетной мышце высокая активность обнаружена у бобра и водяной полевки.

В отличие от грызунов у представителей отряда *Insectivora* наблюдалась другая картина. Самая высокая среди изученных видов удельная активность СОД выявлена в скелетных мышцах крота (Рис. 9). Удельная активность СОД в печени была выше у водяной куторы, чем у обыкновенной бурозубки (Рис. 9). В печени, легких и скелетной мышце удельная активность СОД была выше у обыкновенного крота по сравнению с бурозубкой. Самая высокая удельная активность каталазы в печени, почках, сердце и легких обнаружена у крота по сравнению с другими изученными видами (Рис. 9). У водяной куторы удельная активность каталазы была ниже во всех органах по сравнению с кротом и ниже в печени, почках и сердце по сравнению с обыкновенной бурозубкой (Рис. 9).

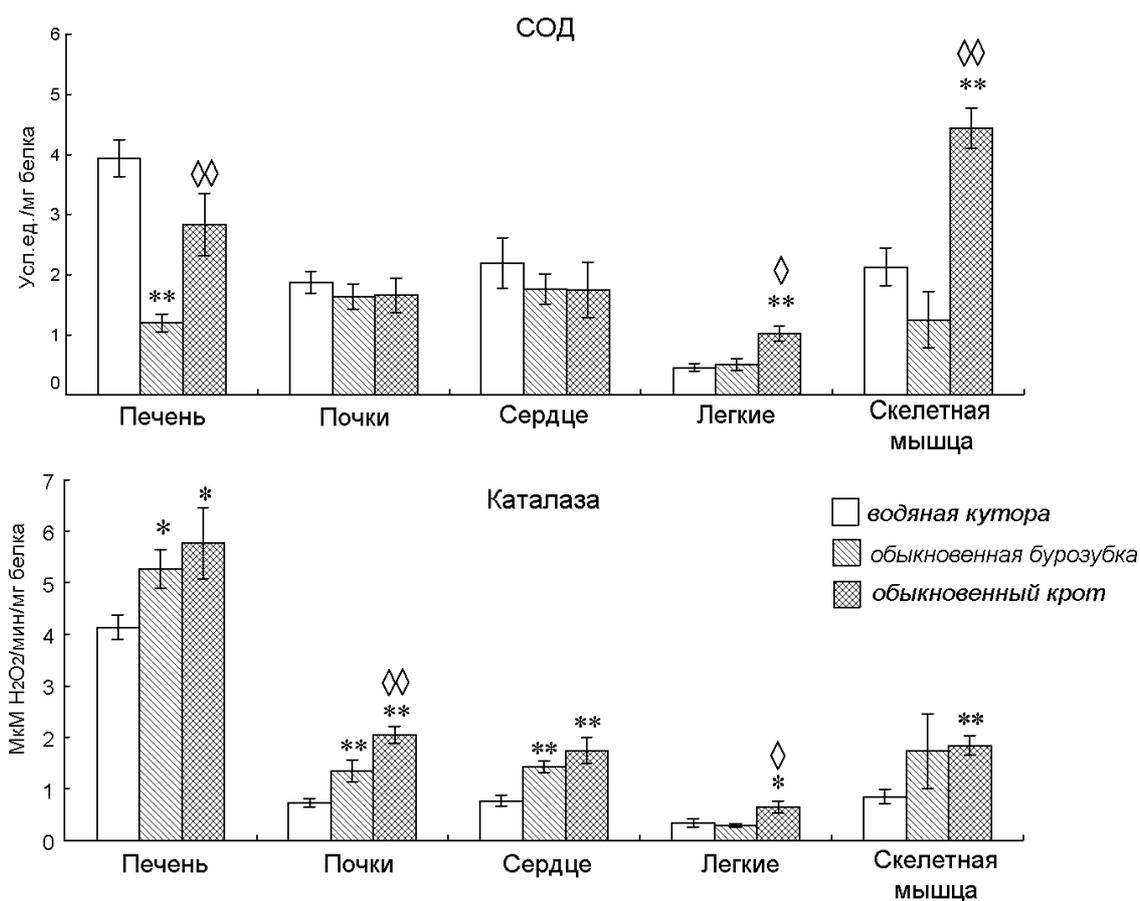


Рис. 9. Удельная активность АОФ в органах и тканях у представителей насекомоядных ($M \pm m$). Условные обозначения: * – различия достоверны по сравнению с водяной куторой; ◇ – различия достоверны по сравнению с обыкновенной бурозубкой; *, ◇ – $p < 0.05$; **, ◇◇ – $p < 0.01$.

3.2. Возрастные изменения активности антиоксидантных ферментов у полуводных и сухопутных насекомоядных и грызунов

В результате исследования возрастных изменений активности АОФ у полуводных и наземных представителей грызунов и насекомоядных были выявлены видо- и тканеспецифичные особенности становления АОС. Так, например, активность АОФ не изменялась с возрастом в органах водяной

куторы, за исключением почек, где выявлено снижение активности СОД и сердца и скелетной мышцы, где отмечено её увеличение (Табл. 2).

Таблица 2.

Возрастные изменения удельной активности СОД и каталазы в органах
насекомоядных

Вид	Орган	Активность СОД		Активность каталазы	
		juv	ad	juv	ad
Водяная кутора	Печень	4,16±0,45	3,56±0,32	3,82±0,26	4,41±0,39
	Почки	2,0±0,18	1,39±0,17*	0,77±0,13	0,67±0,07
	Сердце	1,55±0,13	2,46±0,65*	0,50±0,06	0,49±0,07
	Легкие	0,36±0,06	0,58±0,10	0,23±0,03	0,46±0,17
	Скелет- ная мышца	1,72±0,16	2,57±0,62*	0,87±0,19	0,82±0,19
Обыкновен- ная бурозубка	Печень	1,13±0,17	1,28±0,27	4,48±0,38	6,31±0,41*
	Почки	1,83±0,26	1,25±0,31	1,65±0,28	0,61±0,08*
	Сердце	1,87±0,57	1,73±0,30	1,52±0,26	1,40±0,14
	Легкие	0,42±0,04	0,58±0,18	0,33±0,03	0,27±0,05
	Скелет- ная мышца	НО	1,25±0,47	НО	0,27±0,07

Условные обозначения: juv – неполовозрелые, ad – половозрелые;

* – различия достоверны в той же самой ткани по сравнению с неполовозрелыми животными того же вида ($p < 0,05$).

Примечание: НО – определение активности фермента не проводилось.

У бурозубки отмечены возрастные изменения только активности каталазы, которая увеличивалась в печени и снижалась в почках половозрелых особей по сравнению с неполовозрелыми (Табл. 2).

Удельная активность АОФ в органах ондатры с возрастом не изменялась, за исключением скелетной мышцы, где обнаружено достоверное снижение активности каталазы (Табл. 3).

В исследованных органах водяной полевки не обнаружено достоверных различий удельной активности АОФ между половозрелыми и неполовозрелыми особями (Табл. 3).

В почках и сердце лабораторной крысы наблюдалось «рассогласование» в работе ферментов – увеличение удельной активности каталазы и снижение активности СОД с возрастом (Табл. 3). Удельная активность СОД с возрастом в легких у крысы достоверно снижалась, а в скелетных мышцах – активность, как СОД, так и каталазы у молодых крыс (6 мес.) была достоверно ниже, чем у взрослых животных (12 мес.) (Табл. 3).

Таблица 3.

Возрастные изменения удельной активности СОД и каталазы в органах представителей грызунов

Вид	Орган	Активность СОД		Активность каталазы	
		juv	ad	juv	ad
Ондатра	Печень	5,16±0,47	5,10±0,55	5,58±0,33	5,27±0,34
	Почки	3,93±0,28	4,32±0,38	2,12±0,24	2,12±0,15
	Сердце	4,06±0,28	3,85±0,17	1,19±0,09	1,21±0,06
	Легкие	0,32±0,02	0,33±0,02	0,78±0,09	0,79±0,07
	Скелетная мышца	2,95±0,19	2,57±0,17	0,39±0,04	0,23±0,03*

Продолжение таблицы 3.

Водяная полевка	Печень	3,70±0,47	3,21±0,37	4,01±0,45	3,99±0,45
	Почки	3,20±0,19	3,24±0,41	2,24±0,16	2,19±0,14
	Сердце	2,78±0,26	2,42±0,23	0,58±0,05	0,53±0,07
	Легкие	1,23±0,14	0,97±0,10	0,32±0,07	0,48±0,09
	Скелетная мышца	3,67±0,93	2,36±0,42	1,46±0,39	0,78±0,23
Лабораторная крыса	Печень	1,91±0,22	1,88±0,52	4,78±0,61	3,89±0,52
	Почки	1,81±0,38	1,70±0,28	1,11±0,15	2,00±0,19*
	Сердце	2,01±0,58	1,01±0,24	0,39±0,02	0,65±0,16
	Легкие	1,36±0,33	0,37±0,12*	0,25±0,04	0,29±0,05
	Скелетная мышца	1,31±0,27	3,82±0,78*	0,08±0,01	0,25±0,04*

Условные обозначения: * – различия достоверны по сравнению с молодыми животными одного вида ($p < 0,05$, критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Активность антиоксидантных ферментов у летучих мышей во время гибернации

Летучие мыши являются прекрасной моделью для изучения окислительного стресса и механизмов предотвращения окислительных повреждений из-за высокой продолжительности жизни. Учитывая их малый размер тела, они в среднем живут в 3,5 раза дольше, чем нелетающие млекопитающие (Wilkinson, South, 2002). Согласно гипотезе Munshi-South и Wilkinson (2010), летучие мыши противостоят старению средствами эффективной системы антиоксидантной защиты и устранения окислительных повреждений. Однако, в основном, в подобных исследованиях используется ограниченное количество органов, а в качестве объекта – только один вид летучих мышей (Brunet-Rossinni, 2004; Wilhelm Filho et al., 2007; Lilley et al., 2014), что создает определенные трудности и требует экспериментальных подтверждений.

В результате нашего исследования была выявлена ткане- и видоспецифичность активности антиоксидантных ферментов в органах изученных видов летучих мышей. Максимальная среди изученных видов рукокрылых (бурый ушан, северный кожанок, ночницы Брандта и водяная) активность АОФ в печени выявлена у водяной ночницы в зимнее время (Рис. 2). В исследовании Lilley и соавторов (2014) было показано, что водяная ночница отличается от других видов летучих мышей (ночницы Брандта и усатой, бурый ушан, северный кожанок) более высокой активностью СОД и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназой (обеспечивающей образование НАДФ-Н, необходимого для поддержания уровня GSH) в крови. Предполагают (Lilley et

al., 2014), что это связано с наибольшей зараженностью вида эктопаразитами, которые вызывают иммунную реакцию и всплеск образования АФК, что, в свою очередь, влечёт увеличение активности антиоксидантных ферментов (Halliwell, Gutteridge 2007; Murphy et al., 2007). Эктопаразиты активизируют иммунную систему хозяина либо непосредственно (Wikel, 1999), либо косвенно через вторичные инфекции микробов, вирусов или простейших (Van de Crommenacker et al., 2012).

Все исследованные нами виды (северный кожанок, ночница Брандта, бурый ушан), кроме водяной ночницы, предпочитают укрываться в кровельных конструкциях и чердаках зданий (Dietz et al., 2009). Водяная ночница выбирает гнезда птиц и дупла дятлов (Encarnacao, 2012) с большим количеством эктопаразитов. Ранее (Lilley et al., 2014) была выявлена не только положительная корреляция между количеством паразитов и активностью АОФ в крови у летучих мышей, но и увеличение активности ферментов к осени.

Исходя из теории «преадаптации к окислительному стрессу» (Hermes-Lima et al., 1998; Welker et al., 2013), на начальных стадиях гипоксии происходит увеличение продукции АФК, несмотря на снижение концентрации O_2 . Следовательно, животные, способные выживать при изменении кислорода в среде, имели более высокие уровни антиоксидантов. Возможно, обнаруженная в нашем исследовании высокая активность каталазы в сердечной ткани летучих мышей (для сравнения у куторы активность каталазы в сердце равна 71,6, для крысы – 43,9 МкМ H_2O_2 /мин/г ткани) в начале гибернации необходима для защиты от избытка АФК при гипоксии. Данная теория подтверждается исследованиями на сусликах (*Spermophilus spp.*) (Storey, 2005; Morin, Storey 2007; Астаева, Кличханов, 2009), на которых было показано, что активность каталазы в крови перед впадением в спячку увеличивается.

Сезонные изменения антиоксидантного статуса у животных в природе не являются редкостью. Так, например, исследователи Raja-aho et al. (2012) показали, что деревенские ласточки (*Hirundo rustica*) осенью во время

миграции имеют более высокую активность некоторых окислительно-восстановительных ферментов (СОД, ГР и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа).

В нашем исследовании в печени у всех исследованных видов летучих мышей выявлено увеличение активности СОД в зимний период при сравнении с особями отловленными осенью (начало гибернации), для северного кожанка достоверное (Рис. 2). Аналогичные закономерности отмечены для тропических летучих мышей (*Sturnira lillium*): увеличение содержания глутатиона, а также активности СОД и каталазы в крови у впадающих в кратковременное дневное оцепенение летучих мышей по сравнению с активными животными (Wilhelm Filho et al., 2007).

Скорее всего, выявленное в нашем исследовании увеличение активности СОД в большинстве исследованных органов к середине гибернации летучих мышей не связано с синтезом фермента *de novo*. Имеющиеся данные в экспериментах на 13-полосных сусликах свидетельствуют об отсутствии различий в экспрессии генов СОД между активными и гибернирующими животными (Page, 2009). Вполне вероятно, что одним из механизмов повышения активности СОД в ходе гибернации может быть восстановление тиоловой группы фермента под действием глутатиона, цистеина и других SH-содержащих соединений. Другим механизмом быстрой регуляции активности СОД может быть фосфорилирование и дефосфорилирование молекулы фермента (MacDonald, Storey, 1999).

Активность каталазы в печени снижалась к середине гибернации (зима) только у северного кожанка, а у бурого ушана, ночницы Брандта и водяной ночницы наблюдалось незначительное увеличение активности данного фермента в зимнее время.

Анализ ферментативного звена антиоксидантной защиты в сердце и почках показал, что у летучих мышей находящихся в более глубокой спячке (февраль) активность каталазы в изученных органах была ниже, чем у особей, отловленных в начале гибернации (ноябрь) – для сердца снижение активности

каталазы составляло у ночницы Брандта 75,6%, а у северного кожанка 65,7% (Рис. 3, 4), для почек 57,1% и 26,6% соответственно.

Кратковременная гибернация у сусликов (*S. pugnax*) приводит к некоторому снижению активности каталазы в крови, а после 6 месяцев спячки активность каталазы практически равна активности у бодрствующих летом животных (Астаева, Кличханов, 2009). Авторы предполагают, что такое снижение, может быть связано как с угнетением синтеза фермента (поскольку он индуцируется субстратом), так и с функциональным «выключением» в результате его фосфорилирования, что позволяет клеткам быстро реагировать на стремительно меняющиеся потребности организма при пробуждении (MacDonald, Storey, 1999; Астаева, Кличханов, 2009). Данный способ регуляции дает возможность существенно экономить энергию и не тратить ее на синтез нового белка при пробуждении. Отчасти снижение активности каталазы также связано с уменьшением интенсивности метаболизма и как следствие снижением продукции АФК. Согласно данным ряда исследований (Эмирбеков и др., 1998; Львова, Гасангаджиева, 2003) у млекопитающих во время гибернации происходит снижение интенсивности спонтанного ПОЛ. Интересно отметить, что даже в летнее время, в период высокой биологической активности сусликов, интенсивность спонтанного ПОЛ в гомогенатах тканей, особенно печени и сердца, существенно ниже, чем у незимоспящих млекопитающих (Львова и др., 1993).

Необходимо отметить, что в результате нашего исследования у ночницы Брандта (по сравнению с другими исследованными видами летучих мышей) обнаружена высокая активность АОФ – максимальная активность каталазы в сердце, легких и скелетной мышце, наибольшая активность СОД в почках и скелетной мышце. В исследовании Lilley и соавторов (2014) максимальная активность глутатион-S-трансферазы и содержание глутатиона в крови было выявлено у ночницы Брандта. Глутатион-S-трансфераза за счет восстановленного глутатиона осуществляет прямую регенерацию

липоперекисей в мембранах, без предварительного фосфолипазного гидролиза, снижая последствия окислительного стресса и эндогенной интоксикации (Колеснеченко, Кулинский, 2000).

Поддержание размера и активности скелетной мышечной ткани в течение спячки необходимо для успешной двигательной активности в течение последующего после гибернации периода пробуждения. В течение гибернации отмечается относительно низкий уровень мышечной дистрофии по сравнению с неестественными моделями мышечного покоя (Hudson, Franklin, 2002; Shavlakadze, Grounds, 2006). В нашем исследовании в скелетных мышцах исследованных видов летучих мышей (Рис. 6) выявлена значительно более высокая активность СОД по сравнению с незимоспящими видами (у куторы – 128,9, у бурозубки – 113,9 у.е./г ткани). Активность СОД изменяется в зависимости от количества субстрата – $O_2^{\cdot-}$. Вероятно высокая окислительная способность грудной мышцы летучих мышей (Vespertilionidae) (Armstrong, Ianuzzo, Kunz, 1977) приводит к увеличению продукции супероксидного анион-радикала и росту активности СОД. Возможно, повышенный уровень СОД вносит вклад в устойчивость гибернантов к мышечной атрофии. Так, например, было показано повышение активности Mn-SOD в начале оцепенения в скелетной мышце у сусликов (Allan, Storey, 2012).

В заключение, выявленные межвидовые различия в активности АОФ в органах могут быть связаны с множеством факторов, это не только филогения, но и разные экологические ниши, пищевые предпочтения, миграция и количество паразитов. Тем не менее, выявленные повышенные активности АОФ в сердце (каталаза) и скелетной мышце (СОД) летучих мышей в начале гибернации необходимы для обезвреживания избытка АФК, образующихся на начальных стадиях гипоксии. При этом наблюдаемое увеличение активности СОД в ходе спячки летучих мышей служит для предотвращения окислительных повреждений при выходе из торпора.

4.2. Активность антиоксидантных ферментов у полуводных, подземно-роющих и сухопутных насекомоядных и грызунов

Переход млекопитающих из наземной среды обитания в водную, сопровождается многочисленными морфологическими, физиологическими и биохимическими компенсаторными изменениями (Слоним, 1971; Галанцев и др., 1994; MacArthur et al., 2001; Hochachka, Somero, 2002; Noren et al., 2008). Практически неизученными остаются адаптации полуводных млекопитающих, которые считаются современными аналогами эволюционных промежуточных форм между предковыми наземными видами и их потомками, ведущими полностью водный образ жизни (Fish, Baudinette, 1999).

В нашей работе изучение ферментов системы антиоксидантной защиты выявило ряд отличий ныряющих от неныряющих видов млекопитающих. Было обнаружено, что у полуводных грызунов (водяная полевка, ондатра, европейский бобр) уровень удельной активности СОД выше в печени, почках и сердце по сравнению с лабораторной крысой, в этих же органах самая высокая активность СОД наблюдалась у ондатры (Рис. 7). Известно, что активность фермента изменяется в зависимости от концентрации своего субстрата. Очевидно, что выявленный нами повышенный уровень удельной активности СОД является следствием усиленного образования $O_2^{\cdot -}$. Проведенные Zenteno-Savin и коллегами исследования (2002) показали, что генерация супероксидного анион-радикала выше в органах кольчатой нерпы, чем в сердце, почках и скелетных мышцах свиньи, как прямое следствие гипоксии-реоксигенации, связанной с нырянием. Однако у тюленей не отмечалось связанных с этим окислительных повреждений липидов и белков (Zenteno-Savin et al., 2002). Судя по всему, активность АОС обеспечивает адекватную антиоксидантную защиту сердца, печени, легких и мышц (Elsner et al., 1998; Vazquez-Medina et al., 2006). Это согласуется с данными, полученными Wilhelm-Filho и соавторами (2002), согласно которым активность СОД и ГПО

выше в эритроцитах ныряльщиков по сравнению с наземными млекопитающими (Wilhelm-Filho et al., 2002).

Ныряние млекопитающих сопровождается вазоконстрикцией периферических сосудов, поддерживая центральное артериальное давление и сохраняя кровообращение, прежде всего, для сердца, легких и головного мозга (Jones et al., 1982; Davis, 2014). Во время реперфузии увеличивается генерация $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 (Lipton, 1999; Hermes-Lima, 2004). Перекись водорода, наиболее стабильная молекула из всех АФК и может активировать различные сигнальные пути (Li, 2001). Помимо этого, группой исследователей (Armogida, Nisticò, Mercuri, 2012) были продемонстрированы нейропротекторные эффекты H_2O_2 *in vitro* и *in vivo* в ишемических моделях через механизм, связанный с активностью каталазы. Показано также, что у морских млекопитающих АФК способствуют активации NIF-1 α во время гипоксии, вызванной погружением (Johnson et al., 2004; Vi et al., 2015).

В результате нашего исследования было выявлено, что удельная активность каталазы, ускоряющей реакцию двухэлектронного восстановления H_2O_2 до H_2O , была выше у полуводных грызунов почти во всех органах по сравнению с крысой, за исключением печени и сердца водяной полевки (Рис. 8). Влияние кратковременного гипоксического воздействия на крыс и ондатр имеет ряд принципиальных отличий. Так, было установлено (Martin et al., 2002), что в почках у крыс, содержащихся при пониженной концентрации O_2 (5-6%) в течение 25 минут, наряду с повышением активности СОД, усиливается экспрессия генов цитоплазматической СОД, каталазы и глутатионредуктазы.

Аналогичные результаты для ондатр были получены В.П. Галанцевым и коллегами (Галанцев и др., 1993; 1994). Авторами было показано, что ПОЛ в сердце у крыс имеет тенденцию к усилению при брадикардии, вызванной задержкой дыхания, а у ондатр, наоборот, уменьшается на 30% наряду с увеличением активности каталазы почти в 2 раза. В исследовании на норках (*Neovison vison*) (Галанцев и др., 1993), адаптированных к задержке дыхания,

было показано, что после 40 секундного апноэ наряду с увеличением активности каталазы содержание перекиси водорода в тканях значительно снижается, преимущественно в сердце и головном мозге. Такие изменения могут являться механизмом, обеспечивающим защиту от свободнорадикальных повреждений. В результате у адаптированных к полуводному образу жизни млекопитающих тканевая гипоксия развивается в более поздние сроки, чем у неадаптированных видов (Галанцев и др., 1993; 1994).

В печени, почках, сердце и скелетной мышце максимальная среди грызунов удельная активность каталазы выявлена у бобра, в легких у ондатры (Рис. 8). Наблюдаемые повышенные уровни данного показателя в печени бобра и легких ондатры, при относительно низкой активности СОД, говорят о наличии других источников перекиси водорода. Очевидно, что выявленное нами высокая удельная активность каталазы является следствием усиленного образования перекиси водорода (субстрата для каталазы), источниками которого в организме помимо реакций дисмутации супероксидного анион-радикала, катализируемых СОД, являются реакции, катализируемые различными оксидазами (Меньщикова и др., 2006). Помимо этого важным является то, что H_2O_2 считается медиатором в различных сигнальных путях (Armogida, Nisticò, Mercuri, 2012). Вероятно, увеличение активности каталазы у ныряльщиков в сердечной мышце может быть связано с важной сигнальной ролью перекиси водорода в кровеносной системе. Существует доказательства того, что млекопитающие обладают как минимум двумя H_2O_2 -сенсорами, один из которых находится в нейроэпителиальных тельцах легкого и отвечает за сужение или расширение дыхательных путей, а другой выполняет ту же функцию применительно к кровеносным сосудам, находясь в клетках каротидного синуса (Bunn, Poyton, 1996; Wang et al., 1996; Brunelle et al., 2005). Сигнал на сужение дыхательных путей и сосудов возникает при повышении концентрации H_2O_2 независимо от причины, вызвавшей это повышение. Такой причиной может быть не только рост концентрации O_2 в крови из-за

уменьшения потребления кислорода в тканях, но и активация продукции H_2O_2 или торможение ее расщепления (Wang et al., 1996).

В результате нашего исследования АОС насекомоядных выявлена более высокая удельная активность каталазы в печени, почках и сердце у обыкновенной бурозубки по сравнению с полуводной куторой (Рис. 9). Однако удельная активность СОД в органах водяной куторы была выше (для печени достоверно), чем у бурозубки, за исключением легких. Полученные нами результаты не согласуются с имеющимися в литературе сведениями. Так, например, в работе Hindle и соавторов (2010) на двух симпатрических видах землероек было показано, что в скелетной мышце активность каталазы оказалась выше в 2 раза у ныряющей болотной бурозубки (*Sorex palustris*), однако активность ГПО была в три раза выше у короткохвостой землеройки (*Blarina brevicauda*), уровень СОД был соизмерим у двух видов. В исследовании Stewart и соавторов (2005) на обыкновенной короткохвостой бурозубке (*Blarina brevicauda*) было выявлено, что в сердце концентрация миоглобина и активность цитохромоксидазы у землеройки больше, чем у крыс и других мелких млекопитающих. Полагают (Stewart et al., 2005), что потенциал для генерации активных форм кислорода должен быть огромным, так как общая концентрация глутатиона в 300 раз больше в сердце бурозубки, чем в этом органе у крысы. Кроме того, было зарегистрировано, что в мышцах у болотной бурозубки содержание маркеров окислительного стресса было ниже, чем у наземной короткохвостой бурозубки, без относительного увеличения антиоксидантной способности (Hindle et al., 2010). Вероятно, что это может быть связано с повышенным содержанием миоглобина в мышцах болотной бурозубки по сравнению с короткохвостой землеройкой (Stewart et al., 2005; Gusztak, 2008). Известно, что миоглобин у ныряющих млекопитающих выполняет ряд функций – помимо того, что он участвует в запасании кислорода, он обладает прямыми антиоксидантными свойствами (Flögel et al., 2004; Hendgen-Cotta, Kelm, Rassaf, 2014; Wright, Davis, 2015).

Кроме того, авторы (Hindle et al., 2010) предполагают, что норные короткохвостые землеройки могут испытывать гипоксию под землей. Известно, что подземно-роющие виды (сем. Talpidae) адаптируются как к гипоксии, так и гиперкапнии в норах (Schaefer, Sadleir, 1979; Kuhnen, 1986; Campbell et al., 2010). Так, например, образование венозных коллекторов у ныряющих млекопитающих (и некоторых других амниот) наиболее общая черта эволюционного изменения их кровеносной системы (Галанцев, 1983). Однако подобные образования могут наблюдаться в природе и при адаптациях к другим условиям среды, например, к норному образу жизни, хотя эти перестройки у таких животных и выражены несравненно слабее. Учитывая, что у норных животных в норе развивается брадикардия (Галанцев, Русаков, 1967), не исключено, что расширения венозных магистралей у них выполняют ту же функциональную роль, что и у ныряющих видов (депонирование крови). Бурозубки, ведущие норный образ жизни, вероятно так же сталкиваются с дефицитом кислорода как голые землекопы (*Heterocephalus glaber*, Rodentia). Землекопы имеют несколько более высокие уровни активности СОД по сравнению с аналогичными по возрасту мышами, тем не менее, у них не выявлено возрастных изменений уровней антиоксидантной способности и окислительного стресса (Andziak et al., 2005; 2006; Lewis et al., 2013).

У исследованного нами обыкновенного крота (насекомоядные) в печени, почках, сердце и легких была обнаружена максимальная активность каталазы, по сравнению с двумя другими изученными видами этого отряда (Рис. 9), при этом в скелетных мышцах активность СОД была выше, чем в печени. Данные факты свидетельствуют об усиленном образовании АФК ($O^{\cdot -}_2$, H_2O_2) и вероятном увеличении окислительных повреждений. Действительно, проведенные исследования (Andziak et al., 2005; 2006; Hindle et al., 2010; Lewis et al., 2013) показали, что содержание маркеров окислительного стресса и уровень ПОЛ, как у землероек, так и у голого землекопа, были значительно выше по сравнению с лабораторными крысой и мышью, соответственно.

Высокая активность животного приводит к увеличению скорости метаболических реакций в скелетных мышцах и росту продукции АФК. Несмотря на то, что образование кислородных радикалов увеличивается с возрастом (Veјma, Ji 1999), скелетные мышцы обладают высокой устойчивостью к стрессу (Renault et al., 2002). Вероятно, обнаруженный повышенный уровень СОД в скелетных мышцах крота не полностью обезвреживает АФК, что приводит к росту ПОЛ.

Таким образом, можно заключить, что выявленные адаптивные изменения, характеризующиеся повышенным уровнем активности АОФ в органах ныряющих и подземно-роющих млекопитающих, необходимы для защиты тканей от потенциального окислительного стресса, связанного с гипоксией-реоксигенацией.

4.3. Онтогенетические изменения антиоксидантной защиты тканей у насекомыхядных и грызунов

Выявление основных закономерностей онтогенеза животных различных экологических и филогенетических групп необходимо для понимания становления механизмов адаптации и оценки скорости формирования приспособительных реакций. В результате гетерохронного развития все важнейшие адаптивные черты у одних видов оказываются сформированными уже у новорожденных особей, а у других – темпы развития тех же приспособительных признаков запаздывают и формирование их заканчивается на более поздних стадиях постнатальной жизни. Так, например, неравномерность темпов адаптивного преобразования одних и тех же структур и функциональных свойств сердечно-сосудистой системы наблюдается даже у довольно близких (в систематическом отношении) видов (Галанцев, 1983). В результате исследования возрастных изменений активности АОФ у полуводных и наземных грызунов были выявлены видо- и тканеспецифичные особенности

становления системы. В печени исследованных видов грызунов не выявлено достоверных возрастных изменений активности АОФ. В почках и сердце лабораторной крысы наблюдалось «рассогласование» работы ферментов с возрастом – увеличение активности каталазы и снижение активности СОД, в то время как у полуводных видов (ондатра и водяная полевка) в этих органах не обнаружено достоверных изменений активности АОФ. Высокое количество возрастных различий активности ферментов у исследованных видов грызунов выявлено в скелетной мышце. Так, у ныряющих видов (ондатра и водяная полевка) в скелетных мышцах активность АОФ с возрастом снижается (для ондатры достоверно снижалась только активность каталазы). Напротив у молодых крыс (не адаптированные к гипоксии-реоксигенации) была обнаружена более низкая активность СОД и каталазы по сравнению со взрослыми животными (Табл. 3). При исследовании влияния кратковременной изобарической гипоксии, а также реоксигенации на содержание маркеров окислительного стресса и на экспрессию мРНК антиоксидантных ферментов (Cu, Zn- и Mn-СОД, каталаза, ГР и ГПО) в печени и почках молодых (6 месяцев) и старых (22-25 месяцев) крыс были обнаружены различия ответной реакции (Martin et al., 2002). Гипоксия приводила к значительному снижению экспрессии генов Cu, Zn- и Mn-СОД в обеих возрастных группах, при этом реоксигенация вызвала увеличение содержания мРНК Cu, Zn-СОД и ГПО в печени молодых и Mn-СОД в печени старых животных. В почках, экспрессия генов Cu,Zn-СОД, ГР и ГПО была значительно выше у старых животных по сравнению с молодыми крысами (Martin et al., 2002). Эти данные показывают, что экспрессия генов антиоксидантных ферментов зависит от возраста и значительно отличается между печенью и почками (Martin et al., 2002).

В исследовании Галанцева (1983) было показано, что проявление адаптивных функциональных и структурных признаков сердечно-сосудистой системы у разных видов ныряющих млекопитающих в полной мере обнаруживается на различных стадиях постнатального онтогенеза. Например,

приспособительные сердечно-сосудистые реакции особенно в яркой и типичной форме начинают проявляться при погружении в воду животных с началом периода освоения ими водной среды, то есть на тех стадиях онтогенетического развития, которые приурочены к началу активного плавания и ныряния. У одних видов ныряющих млекопитающих все важнейшие черты структурно-функциональных адаптаций этой системы в силу особенностей их экологии оказываются сформированными уже в первые дни после рождения (*Enhydra lutris*), у других их развитие заканчивается значительно позже, на определенных стадиях постнатального онтогенеза. В нашем исследовании у ондатры возрастные изменения изучаемых показателей минимальны. В исследовании Hindle и соавторов (2006) было выявлено, что с возрастом способность ондатр к длительным погружениям возрастает – молодые ондатры второй генерации значительно меньше находятся под водой, нежели животные первой генерации (5-6 месяцев) и взрослые особи (более 12 месяцев). Вероятно, обнаруженные в нашем исследовании минимальные различия между молодыми и взрослыми животными, говорят о том, что к возрасту 5-6 месяцев у ондатры уже происходит становление антиоксидантной системы.

В отличие от грызунов, у насекомоядных в печени достоверные возрастные различия выявлены только у бурозубки, активность каталазы у молодых животных была ниже, чем у взрослых особей. Согласно теории Sohal и Weindruch («oxidative stress theory of aging», 1996), с возрастом увеличивается количество окислительных повреждений из-за дисбаланса образования АФК и антиоксидантной защитой. Тем не менее, в исследовании на землеройках (*Sorex palustris*, *Blarina brevicauda*) (Hindle et al., 2010) было показано возрастное увеличение содержания только одного маркера окислительного стресса (ПОЛ) в скелетных мышцах. Кроме того, авторами (Hindle et al., 2010) было зарегистрировано, что активность антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза, ГПО) в скелетных мышцах у молодых животных была ниже, чем у взрослых землероек. В нашем исследовании у водяной куторы выявлено увеличение

активности СОД в сердечной и скелетной тканях по сравнению с бурозубкой, у которой не наблюдалось достоверных возрастных изменений активности АОФ (сердце) (Табл. 2). Однако в почках обнаружено снижение удельной активности АОФ с возрастом у насекомоядных (Табл. 2), у водяной куторы достоверно снижалась активность СОД, а у обыкновенной бурозубки – каталаза.

Интересно то, что в легких у куторы и бурозубки наблюдалось увеличение удельной активности СОД. Анатомия легких короткохвостой землеройки показала, что животные проводят много времени в пыльных норах (George et al., 1986), при этом если диффузия кислорода в легких снижается с возрастом, как у живущих в норах белоногих хомячков (*Peromyscus*) (Chappell et al., 2003), то тканевая гипоксия увеличивается в онтогенезе у землероек.

Таким образом, у полуводных грызунов (ондатра, водяная полевка) возрастные изменения исследованных показателей были выражены в меньшей степени, по сравнению с насекомоядными (бурозубка, кутора). Вероятно, дефинитивный уровень активности АОФ у ныряющих грызунов формируется на более ранних стадиях онтогенеза и поддерживается на определенном уровне, обеспечивая необходимую защиту органов во время ныряния.

4.4. Влияние различных факторов на активность антиоксидантных ферментов у млекопитающих

В природе животные сталкиваются не с одним, а с целым рядом воздействующих на них факторов (Хочачка, Сомеро, 1988; Шмидт-Ниельсен, 1982). В то же время их влияние может приводить к одним и тем же отклонениям со стороны ферментативных систем. В рассматриваемой нами группе представлены млекопитающие, различающиеся как по систематической принадлежности, так и по особенностям экологических условий. Из исследуемых видов животных четырех можно отнести к тем, которые в той или иной степени испытывают выраженную гипоксию. Полуводные

млекопитающие – европейский бобр, ондатра, водяная полевка и кутора – испытывают функциональную нагрузку на организм, связанную с дефицитом кислорода при нырянии. Обыкновенная бурозубка и крот, обитающие в норах, также испытывают гипоксию. В отношении бурозубок существует мнение (Hindle et al., 2006) о том, что они, так же как и голые землекопы, не согласуются с радикальной теорией старения.

Адаптационные изменения, ответственные за обеспечение процесса ныряния, могут рассматриваться как отражение одной из сторон экологической специализации животных к водной среде обитания. В создании оптимального взаимодействия организма с абиотическими факторами среды функциональные адаптации сердечно-сосудистой системы играют ведущую роль (Галанцев, 1983). Полученные данные на основе кластерного анализа (метод ближайшего соседа) были объединены в общую дендрограмму (Рис. 10). Длина ветвей кластерного дерева выражается в условных единицах и отражает различие по всем изученным показателям системы нейтрализации АФК среди исследованных видов млекопитающих. Из дендрограммы видно, что наибольшим сходством обладали – водяная полевка и кутора (полуводные) (Рис. 10), а также обыкновенная бурозубка и крот (насекомоядные), образовавших отдельную группу. Более крупные ныряльщики – ондатра и европейский бобр, отделились от остальных исследованных видов, что говорит об их некотором сходстве, но при этом расстояние между ними было значительным. Особняком расположилась лабораторная крыса.

кислорода, что в свою очередь приводит к увеличению продукции $O_2^{\cdot -}$ и как следствие – повышению активности СОД.

Возможно, разный уровень экологической специализации видов также оказывает влияние на уровень активности АОФ. Такие виды, как водяная полевка и водяная кутора, образовавшие отдельный кластер, некоторые ученые относят к околководным формам, поскольку они менее всех связаны с водной средой (Галанцев, 1977). Из полуводных млекопитающих они обладают наименьшей продолжительностью естественного ныряния. Кутора за 15-22с проплывает под водой около 4-6 м (Сосновский, 1958). Водяная полевка в поисках корма (на глубине 60 см) более 21с не задерживается (Скалинов, 1967; Галанцев и др., 1974).

Изучение генотипических (природных) адаптаций – многоплановая проблема, включающая как эволюционно-экологическое, так и онтогенетическое направления (Галанцев, 1983). Дисперсионный анализ активности ферментов и содержания белка у исследованных видов показал, что изученные нами факторы (вид животных, пол и возраст) объясняют до 80% дисперсии изученных показателей (Рис. 11).

В печени исследованных видов (ондатра, водяная полевка, водяная кутора, крыса, обыкновенная бурозубка) обнаружено влияние фактора «возраста» на активность каталазы (3,6%), при этом совместное воздействие факторов «возраст» и «вид» (АВ) составило 11, 7%, а возраста и пола (ВС) – 2,8% (Рис 11). Максимальное влияние такого фактора как «вид» на активность СОД в печени составило 39,7%. В почках наблюдалось минимальное воздействие возраста на активность каталазы, совместно с фактором «вид» (АВ) оно равнялось 21,4%. При этом на активность каталазы их влияние выше, чем на активность СОД.

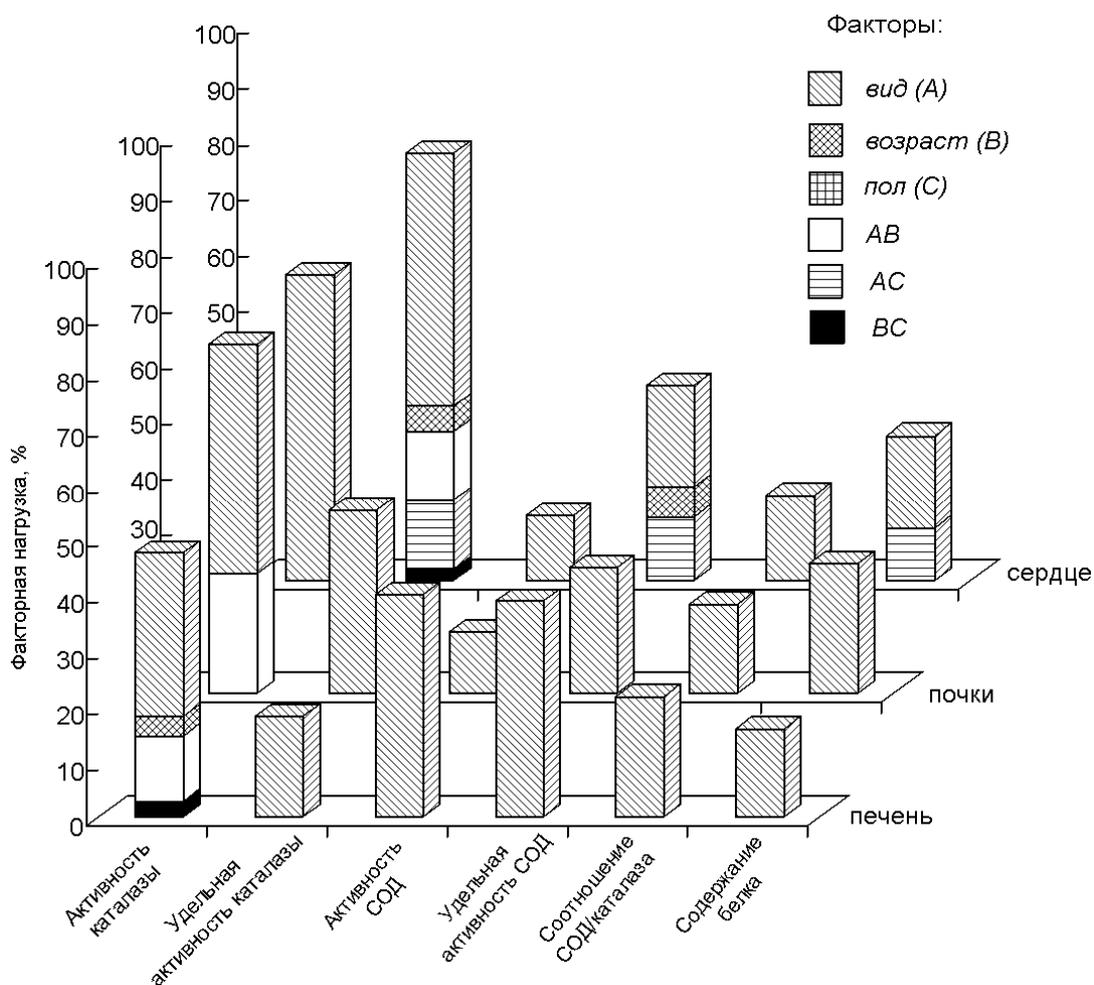


Рис. 11. Влияние различных факторов на активность АОФ, соотношение СОД/каталаза и содержание белка в органах млекопитающих (ондатра, водяная полевка, водяная кутора, крыса, обыкновенная бурозубка) (по данным дисперсионного анализа).

Хорошо известно, что у морских животных, адаптированных к нырянию, происходят перестройки во всех органах, однако наиболее существенные различия отмечаются в сердце, легких и мозге, которые продолжают оставаться на аэробном режиме метаболизма даже в условиях анаэробноза (Шмидт-Ниельсен, 1982; Ночачка, Somero, 2002). Именно для сердца обнаружено максимальное действие фактора «возраст», как отдельно, так и совместно с другими факторами. Так, например, факторная нагрузка (В) на удельную активность каталазы в данном органе составила 4,5%, а на удельную активность СОД – 5,5% (Рис. 11.). Интересно, что для сердечной ткани

выявлено совместное влияние факторов «вид» и «пол животного» (АС) на удельную активность каталазы (12,6%), активность СОД (11,4%) и содержание белка – 9,4%. Максимальное влияние видового фактора в сердце, также как и в почках, было обнаружено на активность каталазы. По результатам дисперсионного анализа влияние фактора «возраст» на удельную активность каталазы в скелетных мышцах составило 4,5%, в легких на активность СОД – 2,1% и на удельную активность СОД – 3,7%. В легких максимальное влияние видового фактора выявлено на активность каталазы и составило 62,6%. Совместное влияние факторов «вид» и «пол животного» в легких на активность СОД составило 11,6%, в то время как, влияние факторов «вид» и «возраст» на удельную активность СОД равнялось 15,9%. Так же в легких наблюдалось влияние фактора «пол животного» на активность СОД (6,4%).

Таким образом, что дисперсия исследованных факторов (вид, возраст, пол) в органах представителей насекомоядных и грызунов была максимальна для активности каталазы и наибольшее влияние фактора «возраст» выявлено для сердечной ткани. Как уже указывалось, для развития приспособительных функциональных и структурных особенностей в онтогенезе у полуводных наибольшее значение имеют адаптивные изменения сердечно-сосудистой системы для обеспечения процесса ныряния (Галанцев, 1983).

Энергетический обмен у животных в течение года не постоянен. Особый интерес представляют зимоспящие млекопитающие, так как они способны существенно изменять температуру тела не только в различные сезоны года, но и в период гибернации. В исследовании А. И. Ануфриева и Ю. В. Ревина (2006) было показано, что продолжительность оцепенений и пробуждений в течение гибернации у летучих мышей не была постоянна и изменялась следующим образом: в начальный период спячки длительность оцепенений постоянно возрастала, достигала максимума, затем происходило снижение их продолжительности. Периоды активного состояния, в свою очередь, были более продолжительны в начальный и конечный периоды спячки и

уменьшались в середине зимы. Подобная ритмика характерна для других зимоспящих видов млекопитающих (Heldmaier, Ortman, Elvert, 2004; Соломонов, Ануфриев, Охлопков, 2012). Необходимо отметить, что температура тела снижается все значительнее с каждым последующим баутом (Ruby, 2003; Ануфриев, Ревин, 2006; Соломонов, Ануфриев, Охлопков, 2012). Интересно, что при снижении температуры тела ниже 7°C (январь, февраль) у гибернантов увеличивается интенсивность метаболизма для повышения теплопродукции (Heldmaier, Ortman, Elvert, 2004). Изменения интенсивности метаболизма в течение гибернации сказываются и на интенсивности образования АФК в тканях. В результате проведенного нами дисперсионного анализа активности АОФ и содержания белка у исследованных видов рукокрылых было показано, что изученные факторы (пол животного, сезон отлова и видовая принадлежность) наибольшее влияние оказывают на активность каталазы (Рис. 12).

В печени летучих мышей было выявлено влияние сезона на активность СОД (34%) и удельную активность СОД (37,5%) (Рис. 12). В печени совместное влияние таких факторов как «сезон» и «видовая принадлежность» (ВС) на активность каталазы, в том числе и удельную, составило 23,5% и 26,8% соответственно. В скелетных мышцах данные факторы вместе (ВС) воздействовали на активность СОД (33,7%) и удельную активность, как СОД (51,6%), так и каталазы (31,7%) (Рис. 12).

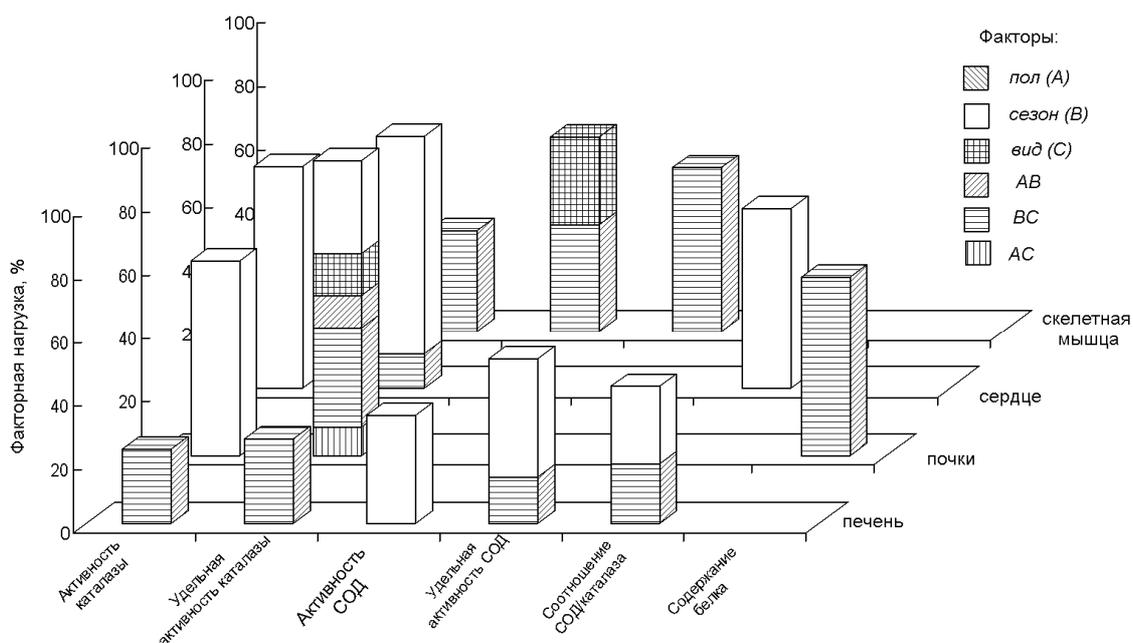


Рис. 12. Влияние изученных факторов на активность АОФ, соотношение СОД/каталаза и содержание белка в органах исследованных видов рукокрылых (северный кожанок, ночница Брандта, водяная ночница, бурый ушан) (по данным дисперсионного анализа).

Перестройки метаболизма у зимоспящих затрагивают, прежде всего, сердце, в связи с переключением энергообеспечения с углеводов, как основного источника энергии на жиры. Гликолиз приводит не только к накоплению его продуктов (лактата), но и к закислению среды, что может увеличивать и нагрузку на почки (Breukelen, Martin, 2002). В почках летучих мышей дисперсионный анализ (Рис. 12) выявил влияние «сезона» на активность каталазы (61,8%), при этом совместное влияние таких факторов как «сезон» и «вид» (BC) на удельную активность каталазы в данном органе составило 36,4% (Рис 12.). Совокупное воздействие факторов «сезон» и «пол животных» (AB) на удельную активность каталазы равнялось 10,4%.

В сердце было обнаружено максимальное влияние сезона на активность каталазы (69,9%), в том числе удельную (68,7%), а совместное воздействие факторов «сезон» и «вид» (BC) на удельную активность каталазы составило 10,9% (Рис. 12).

Таким образом, в печени и скелетных мышцах сезон оказывал большее влияние на активность СОД, в то время как в почках и сердце – на активность каталазы. Наблюдаемые сезонные изменения активностей АОФ (снижение активности каталазы в почках и сердце, и незначительное увеличение активности СОД к середине гибернации) вероятно необходимы для обеспечения высокой эффективности функционирования метаболических систем и поддержания оптимального энергетического баланса в условиях вхождения в гипометаболическое состояние, собственно гибернации и при периодических пробуждениях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования была выявлена ткане- и видоспецифичность активности антиоксидантных ферментов в органах десяти изученных видов млекопитающих. Несмотря на то, что исследуемые виды относились к различным отрядам и экологическим группам, межорганное распределение по активности СОД и каталазы было сходное: как правило, максимальная активность наблюдалась в печени, минимальная – в легких. Аналогичное распределение активности антиоксидантных ферментов отмечают для млекопитающих и другие авторы (Marklund, Karlsson, 1990; Pukha et al, 1998; Илюха, 2001; Зенков, Ланкин, Меньщикова, 2001; Хавинсон и др., 2003). Тканеспецифичность активности антиоксидантных ферментов связана с физиологической функцией органа. Печень имеет высокую интенсивность метаболизма и риск утечки электронов самый большой, в связи с чем, печень характеризуется высокой активностью АОС. Однако ряд факторов влияет на генерацию АФК, так например, повышенная физическая активность и колебания содержания кислорода приводят к изменению метаболизма и росту продукции кислородных радикалов.

Однако, несмотря на общее межорганное сходство, абсолютные значения изучаемых показателей различались. Изучение АОС у летучих мышей во время гибернации выявило не только видоспецифичность, но и сезонные изменения активности ферментов. У исследованных видов летучих мышей (северный кожанок, ночницы Брандта и водяная, бурый ушан) выявлена значительно более высокая активность каталазы (сердце) и СОД (скелетная мышца) по сравнению с незимоспящими видами. Учитывая тот факт, что на первых стадиях гипоксии происходит увеличение образования АФК (Welker et al., 2013), выявленная повышенная активность каталазы в сердце у летучих мышей (отловленных в начале гибернации) является преадаптацией, необходимой для

обеспечения высокой эффективности функционирования метаболических систем и поддержания оптимального энергетического баланса в условиях вхождения в гипометаболическое состояние. Повышенный уровень СОД в скелетных мышцах вносит вклад в устойчивость гибернантов к мышечной атрофии.

Адаптивные изменения системы антиоксидантной защиты тканей летучих мышей выражались в снижении активности каталазы и увеличении активности СОД в большинстве органов в ходе гибернации. Изменение активности АОФ во время гибернации летучих мышей не связано с синтезом фермента *de novo*. Вполне вероятно, что основным механизмом быстрой регуляции активности СОД и каталазы является фосфорилирование и дефосфорилирование молекулы фермента (MacDonald, Storey, 1999; Storey, 2015). Наблюдаемое увеличение активности СОД в органах в ходе спячки летучих мышей служит для предотвращения окислительных повреждений при периодических пробуждениях и выходе из торпора. В результате проведенного нами дисперсионного анализа активности АОФ и содержания белка у исследованных видов рукокрылых было показано, что изученные факторы (пол животного, сезон отлова и видовая принадлежность) оказывают наибольшее влияние на активность каталазы. При этом в сердце было обнаружено максимальное влияние «сезона».

В результате проведенного исследования, было показано, что активность АОФ у природно-адаптированных к гипоксии-реоксигенации грызунов (европейский бобр, ондатра, водяная полевка) была выше по сравнению с неадаптированным видом (крысой) в большинстве исследованных органов. Увеличенная мощность антиоксидантной системы полуводных видов является приспособительной реакцией, обеспечивающей не только защиту органов и тканей при реоксигенации, связанной с восстановлением после ныряния, но и, очевидно, с важной сигнальной ролью перекиси водорода в кровеносной системе (Drew et al., 2004; Van Muiswinkel, Kuiperij, 2005; Uchida, 2007; Cantú-

Medellín et al., 2011). Стратегии адаптаций водных организмов различаются, вероятно, что у полуводных видов также существуют различия в механизмах приспособления к нырянию. В нашем исследовании была обнаружена видоспецифичность связанных с нырянием изменений АОФ у полуводных грызунов – ондатра отличается повышенным уровнем активности СОД, а у бобра выявлена максимальная активность каталазы в органах по сравнению с другими исследованными видами грызунов.

В печени, почках и сердце крота и обыкновенной бурозубки активность каталазы была достоверно выше, чем у полуводной куторы, при этом у крота в скелетных мышцах активность СОД была выше, чем в печени. Данные факты свидетельствуют о том что, подземно-роющий крот и норная бурозубка испытывают гипоксию под землей, что приводит к усиленному образованию АФК ($O^{\cdot -}_2$, H_2O_2) и вероятному увеличению окислительных повреждений. Возможно, более низкая активность АОФ у водяной куторы связана с высоким содержанием миоглобина в мышцах, так как известно, что у полуводных насекомоядных млекопитающих содержание миоглобина в мышцах повышено (Gusztak, 2008; Stewart et al., 2005). Миоглобин выполняет ряд функций (запасание кислорода, антиоксидантные свойства) и участвует в адаптациях ныряльщиков (Flögel et al., 2004; Hendgen-Cotta, Kelm, Rassaf, 2014; Wright, Davis, 2015).

Исследование возрастных изменений активности АОФ показало, что у полуводных грызунов (ондатра, водяная полевка) онтогенетические изменения исследованных показателей были выражены в меньшей степени, при сравнении с наземной крысой. Вероятно, дефинитивный уровень активности АОФ у ныряющих грызунов формируется на более ранних стадиях онтогенеза и поддерживается на определенном уровне, обеспечивая необходимую защиту органов во время ныряния. Дисперсия исследованных факторов (вид, возраст, пол) в органах представителей насекомоядных и грызунов была максимальна

для активности каталазы и наибольшее влияние фактора «возраст» выявлено для сердечной ткани.

Образование кислородных радикалов увеличивается с возрастом (Veijma, Ji, 1999). Однако, было показано возрастное увеличение содержания только одного маркера окислительного стресса (ПОЛ) в скелетных мышцах землероек (Hindle et al., 2010), что говорит об увеличении антиоксидантной мощности в онтогенезе. В нашем исследовании у водяной куторы выявлено увеличение активности СОД в сердечной и скелетной тканях по сравнению с бурозубкой, у которой не наблюдалось достоверных возрастных изменений активности АОФ в сердце. Полученные результаты частично согласуются с имеющимися в литературе сведениями. Так, в исследовании Hindle и соавторов (2010) было обнаружено увеличение с возрастом активности каталазы и ГПО как у ныряющей болотной бурозубки, так и у короткохвостой землеройки. Аналогично, активность Cu, Zn-СОД была значительно выше у взрослых животных обоих видов (увеличение с возрастом до 60% у болотной бурозубки, 25% у короткохвостой землеройки).

Таким образом, выявленные межвидовые различия в активности АОФ между природно-адаптированными и неадаптированными к гипоксии-реоксигенации видами млекопитающих, а также сезонные и возрастные изменения активности СОД и каталазы расширяют знания о закономерностях формирования адаптивных механизмов, обеспечивающих взаимодействие организма с окружающей средой у животных различных экологических и филогенетических групп.

ВЫВОДЫ

1. Установлено участие АОФ в адаптивных реакциях к гипоксии-реоксигенации у гибернарующих, ныряющих и подземно-роющих млекопитающих.
2. По сравнению с сопоставимыми по массе незимоспящими видами млекопитающих летучие мыши характеризуются повышенной активностью СОД в скелетной мышце, что вероятно вносит вклад в устойчивость гибернантов к мышечной атрофии.
3. Снижение активности каталазы и увеличение активности СОД в ходе гибернации в тканях летучих мышей является одним из физиологических механизмов приспособления к периодической гипоксии-реоксигенации.
4. Показано, что у полуводных грызунов активность АОФ в органах (печень, почки, сердце) была выше, чем у наземной крысы. Обнаруженная у полуводных грызунов видоспецифичность связанных с нырянием изменений АОФ (повышенная активность СОД в тканях органов ондатры и каталазы у бобра) является отражением экологической специализации этих видов.
5. Среди исследованных видов насекомоядных наиболее высокий уровень активности СОД (легкие и скелетная мышца) и каталазы (печени, почки, сердце и легкие) отмечался у подземно-роющего крота, что связано с обитанием в среде с дефицитом кислорода и повышенным содержанием углекислого газа.
6. Возрастные изменения исследованных показателей у полуводных грызунов были выражены в меньшей степени, чем у насекомоядных. Очевидно, дефинитивный уровень активности АОФ у ныряльщиков формируется на более ранних стадиях онтогенеза.
7. Из всех исследованных органов антиоксидантная защита сердца оказалась наиболее чувствительной к действию онтогенетического (насекомоядные, грызуны) и сезонного (рукокрылые) факторов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Основные сокращения, принятые в тексте, соответствуют рекомендациям комиссии по биохимической номенклатуре IUPAC.

Другие используемые сокращения приведены ниже:

АОС – антиоксидантная система;

АОФ – антиоксидантные ферменты;

АФК – активные формы кислорода;

ГКс – гипоксантин;

ГПО – глутатионпероксидаза;

ГР – глутатионредуктаза;

Кс – ксантин;

ПДК – пируватдегидрогеназный комплекс;

ПОЛ – перекисное окисление липидов;

СОД – супероксиддисмутаза;

ЧСС – частота сердечных сокращений;

Э-СОД – экстрацеллюлярная супероксиддисмутаза;

ARE – антиоксидант-респонсивный элемент;

GSH – глутатион;

HRE – hypoxia response element;

Keap1 – Kelch-like ECH-associated protein 1;

Nrf2 (NFE2L) – nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) – фактор, родственник ядерному эритроидному фактору 2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авакян А.Х. Супероксиддисмутазная активность микросом печени при метаболизме производных гидразина монооксигеназной системой // Биоантиоксиданты. – 1989. – Т.1. – С. 35–36.
2. Анохина Е.Б., Буравкова Л.Б. Механизмы регуляции транскрипционного фактора HIF при гипоксии.// Биохимия. – 2010. – Т.75. Вып. 2. – С. 185–195.
3. Ануфриев А.И., Ревин Ю.В. Биоэнергетика зимней спячки летучих мышей (*Chiroptera: Vespertilionidae*) в Якутии // Plecotus et al. – 2006. – №9. – С. 8–17.
4. Астаева М.Д., Кличханов Н.К. Окислительная модификация и антиокислительная активность крови сусликов в ходе индуцированного пробуждения от зимней спячки // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2009. – № 6. – С. 662–668.
5. Брюханов А.Л., Нетрусов А.И. Каталаза и супероксиддисмутаза: распределение, свойства и физиологическая роль в клетках строгих анаэробов // Биохимия. – 2004. – Т.69. Вып. 3. – С. 1170–1186.
6. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы // Вестн. Рос. АМН. – 1998. – №7. – С. 43–51.
7. Галанцев В.П. Эволюция адаптаций ныряющих животных. Эколого- и морфофизиологические аспекты.– Л.: Наука, 1977. – 191 с.
8. Галанцев В.П. Структурно-функциональные адаптации сердечно-сосудистой системы к нырянию у млекопитающих. Дис. д-ра биол. наук, Л.: Наука, 1983. – 417 с.
9. Галанцев В.П., Коваленко Р.И., Криворучко Б.И. и др. К вопросу об особенностях толерантности к дефициту кислорода у неадаптированных и

- адаптированных к водному образу жизни грызунов // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 1999. – Т.35. – №1. – С. 43–47.
10. Галанцев В.П., Камардина Т.А., Коваленко Р.И. Реакции сердечно-сосудистой системы и биоэнергетический метаболизм в связи с адаптацией к апноэ // Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 1994. – Т.80. – №9. – С. 117–123.
11. Галанцев В.П., Русаков О.С. Некоторые черты строения кровеносной система крота в связи с экологическими особенностями вида. – В кн.: Сб. научно-технической информации ШИИЖП, М., 1967. Вып.17. – С. 24–31
12. Галанцев В.П., Скалинов С.В., Храбров Г.П. Об особенностях ныряния и приспособлении организма водяной полевки к пребыванию под водой // Вестн. ЛГУ. – 1974. – Т.21. – С. 12–17.
13. Дубинина Е.Е. Биологическая роль супероксидного анион-радикала и супероксиддисмутазы в тканях организма // Успехи соврем. биологии. – 1989. – Т.108. Вып. 1 (4). – С. 3–19.
14. Еськов Е.К. Эволюционная экология. Принципы, закономерности, теории, гипотезы, термины и понятия. М.: Высшая школа, 2009. – 584 с.
15. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. – М.: МАИК «Наука / Интерпериодика», 2001. – 343 с.
16. Ивантер Э.В., Ивантер Т.В., Туманов И.Л. Адаптивные особенности мелких млекопитающих: эколого-морфологические и физиологические аспекты. – Л.: Наука, 1985. – 318 с.
17. Илюха В.А. Супероксиддисмутаза и каталаза в органах млекопитающих различного экогенеза // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. – 2001. – Т. 37. – № 3. – С. 183–186.

- 18.Калабухов Н.И. Летняя спячка сусликов (*C. fulvus* и *C. pygmaeus*) // Тр. лаб. эксперимент. биологии Моск. Зоопарка. – 1929. – Т.5. – С.163–176.
- 19.Коваленко Р.И., Молчанов А.А. Биохимические аспекты адаптации вторичноводных амниот // Структурно-функциональные основы приспособительных реакций на разных уровнях организации живых систем (Нервная система, вып. 34). – СПб.: Изд-во С.-Петербургского ун-та, 2001. – С.154–193.
- 20.Коган А.Х. Фагоцитзависимые кислородные свободнорадикальные механизмы аутоагрессии в патогенезе внутренних болезней // Вестник РАМН. – 1999. – №2. – С. 3–10.
- 21.Колеснеченко Л.С., Кулинский В.И. Глутатионтрансферазы // Успехи современной биологии. – 2000. – Т.107. Вып.2. – С. 179–194.
- 22.Коржуев П.А., Корецкая Т.И. Эколого-физиологические особенности крови землероек и кротов // Тр. ин-та морфологии животных АН СССР. – 1962. Вып.41. – С. 129–136.
- 23.Коросов А.В., Горбач В.В. Компьютерная обработка биологических данных. – Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2010. – 84 с.
- 24.Кулинский В.Н., Колеснеченко Л.С. Глутатион ядра клетки и его функции // Биомедицинская химия. – 2010. Т.56. Вып.6. – С. 657–662.
- 25.Львова С.П., Абаева Е.М. Антиоксидантная система тканей крыс в раннем постнатальном развитии крыс // Онтогенез. – 1996. – Т.27. – № 3. – С. 204–207.
- 26.Львова С.П., Абаева Е.М., Михайленко И.К. Интенсивность перекисного окисления липидов в мозге гибернирующих сусликов // Организованный мозг. Матер. науч. конф. М., 1993. – 49 с.
- 27.Львова С.П., Гасангаджиева А.Г. Перекисное окисление липидов и состояние антиоксидантной системы в тканях малых сусликов (*Citellus*

- rugtaeus*) в динамике гибернации // Известия РАН. Серия биол. – 2003. – №6. – С. 658–661.
- 28.Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.:«Слово», 2006. – 503 с.
- 29.Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Успехи современной биологии. – 1993. – Т.113. – №4. – С. 422–455.
- 30.Пантелеев П.А. Биоэнергетика мелких млекопитающих. Адаптация грызунов и насекомоядных к температурным условиям среды. – М.: Наука, 1983. – 271 с.
- 31.Пантелеев П.А. Родентология. – М.: Т-во научных изданий КМК, 2010. – 221 с.
- 32.Петрович Ю.А., Гуткин Д.В. Свободнорадикальное окисление и его роль в патогенезе воспаления, ишемии и стресса // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1986. – №5. – С. 85–92.
- 33.Поберезкина Н.Б., Лосинская Л.Ф. Биологическая роль супероксиддисмутазы // Укр. биохим. журн. – 1989. – Т. 61. – № 2. – С. 14 – 27.
- 34.Рассашко И.Ф., Ковалева О.В., Крук А.В. Общая экология. Тексты лекций для студентов специальности 1-33 01 02 «Геоэкология». – Гомель: ГГУ им. Ф. Скорины, 2010. – 252 с.
- 35.Раушенбах Ю.О. Экогенез домашних животных / Ю.О. Раушенбах. – М.: Наука, 1985. – 197 с.
- 36.Слоним А.Д. Экологическая физиология животных. – М., 1971. – 448 с.
- 37.Соломонов Н.Г., Ануфриев А.И., Охлопков И.М. Ритмы зимней спячки арктического суслика *Spermophilus parryi* при температуре тела ниже нуля // Наука и образование. – 2012. – № 1. – С. 60–64.

38. Сосновский И.П. Биологические особенности куторы. В кн.: Сб. статей Моск. Зоопарка. – М. – 1958. Вып.2. – С. 64–68.
39. Строганов С.У. Звери Сибири: Насекомоядные. – М.: Изд. Академии Наук СССР, 1957. – 267 с.
40. Турпаев К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов // Биохимия. – 2002. – Т. 67. Вып.3. – С. 339–352.
41. Хавинсон В.Х., Баринов В.А., Арутюнян А.В. и др. Свободнорадикальное окисление и старение. – СПб.: Наука, 2003. – 327 с.
42. Шинкаренко Н.В., Алексовский В.Б. Химические свойства синглетного молекулярного кислорода и значение его в биологических системах // Успехи химии. – 1982. – Т.51. – № 5. – С. 713–735.
43. Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных. Приспособление и среда, кн.1: Пер. с англ. / Под ред. Е.М. Крепса. – М.: Мир, 1982. – 414 с.
44. Шмидт-Ниельсен К. Размеры животных: почему они так важны?: Пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 259 с.
45. Эмирбеков Э.З., Львова С.П., Гасангаджиева А.Г. Влияние многократного холодового стресса на интенсивность перекисного окисления липидов и антиоксидантную систему тканей // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1998. – Т. 125. – № 4. – С. 385–387.
46. Aarseth J.J., Froiland E., Jorgensen E.H. Melatonin implantation during spring and summer does not affect the seasonal rhythm of feeding in anadromous Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) // Polar Biol. – 2010. – V. 33. – P. 379–388.
47. Allan M.E., Storey K.B. Expression of NF- κ B and downstream antioxidant genes in skeletal muscle of hibernating ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus* // Cell. Biochem. Funct. – 2012. – V. 30. – P. 166–174.
48. Allers D., Culik B.M. Energy requirements of beavers (*Castor canadensis*) swimming underwater // Physiol. Zool. – 1997. – V. 70. – P. 456–463.

49. Ames B.N. Micronutrient deficiencies. A major cause of DNA damage // Ann. NY Acad. Sci. – 1999. – V. 889. – P. 87–106.
50. Andriantsitohaina R., Auger C., Chataigneau T. et al. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols // Br. J. Nutr. – 2012. – V. 108. – P. 1532–1549.
51. Andziak B., O'Connor T.P., Buffenstein R. Antioxidants do not explain the disparate longevity between mice and the longest-living rodent, the naked mole-rat // Mech. Ageing Dev. – 2005. – V. 126. – P. 1206–1212.
52. Andziak B., O'Connor T.P., Qi W. et al. High oxidative damage levels in the longestliving rodent, the naked mole-rat // Aging Cell. – 2006. – V. 5. – P. 463–471.
53. Armogida M., Nisticò R., Mercuri N.B. Therapeutic potential of targeting hydrogen peroxide metabolism in the treatment of brain ischaemia // Br. J. Pharmacol. – 2012. – V. 166. №4. – P. 1211–1224.
54. Armstrong R.B., Ianuzzo C.D., Kunz T.H. Histochemical and biochemical properties of flight muscle fibers in the little brown bat, *Myotis lucifugus* // J. Comp. Physiol. – 1977. – V. 119. – P. 141–154.
55. Austad S.N. Diverse aging rates in metazoans: targets for functional genomics // Mech. Ageing Dev. – 2005. – V. 126. – P. 43–49.
56. Bachorun T., Soobrattee M.A., Luximom-Ramma V. et al. Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease // IJMU. – 2006. – V. 11. – P. 1–21.
57. Barja G., Cadenas S., Rojas C. et al. Low mitochondrial free radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high metabolic rate in birds // Free Radic. Res. – 1994. – V. 21. – P. 317–328.
58. Bears R.F., Sizes I.N. A spectral method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // J. Biol. Chem. – 1952. – V. 195. – P. 133–140.

59. Bejma J., Ji L.L. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle // *J. Appl. Physiol.* – 1999. – V. 87. – P. 465–470.
60. Bi J., Hu B., Zheng J. et al. Characterization of the hypoxia inducible factor 1 alpha gene in the sperm whale, beluga whale, and Yangtze finless porpoise // *Mar. Biol.* – 2015. – V. 162. – P. 1201–1213.
61. Brahim-Horn M.C., Chiche J., Pouysségur J. Hypoxia signalling controls metabolic demand // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2007. – V. 19. – P. 1–7
62. Braulke L.J., Heldmaier G., Berriel Diaz M. et al. Seasonal changes of myostatin expression and its relation to body mass acclimation in the *Djungarian hamster*, *Phodopus sungorus* // *J. Exp. Zool.* – 2010. – V. 313. – P. 548–556.
63. Breukelen F., Martin S.L. Invited Review: Molecular adaptations in mammalian hibernators: unique adaptations or generalized responses? // *J. Appl. Physiol.* – 2002. – V. 92. – P. 2640–2647.
64. Brooks N.E., Myburgh K.H., Storey K.B. Myostatin levels in skeletal muscle of hibernating ground squirrels // *J. Exp. Biol.* – 2011. – V. 214. – P. 2522–2527.
65. Brown J.C., Chung D.J., Belgrave K.R. et al. Mitochondrial metabolic suppression and reactive oxygen species production in liver and skeletal muscle of hibernating thirteen-lined ground squirrels // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2012. – V. 302. №1. – P. 15–28.
66. Brunet-Rossini A.K. Reduced free-radical production and extreme longevity in the little brown bat (*Myotis lucifugus*) versus two non-flying mammals // *Mech. Ageing Dev.* – 2004. – V. 125. – P. 11–20.
67. Bruick R.K. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor // *Genes and Development.* – 2003– V. 17. – P. 2614–2623.

68. Brunelle J.K., Bell E.L., Quesada N.M. et al. Oxygen sensing requires mitochondrial reactive oxygen species but not oxidative phosphorylation // *Cell Metab.* – 2005. – V. 1. №6. – P. 409–414.
69. Brunet-Rossini A.K., Austad S.N. Ageing studies on bats: a review // *Biogerontology.* – 2004. – V. 5. – P. 211–222.
70. Buck M.J., Squire T.L., Andrews M.T. Coordinate expression of the PDK4 gene: a means of regulating fuel selection in a hibernating mammal // *Physiol. Genomics.* – 2002. – V. 8. – P. 5–13.
71. Bunn H.F., Poyton R.O. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia // *Physiol. Rev.* – 1996. – V. 76. №3. – P. 839–85.
72. Caballero B., Tomás-Zapico C., Vega-Naredo I. et al. Antioxidant activity in *Spalax ehrenbergi*: a possible adaptation to underground stress // *J Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* – 2006. – V. 192. №7. – P. 753–9.
73. Campbell K.L., Storz J.F., Signore A.V. et al. Molecular basis of a novel adaptation to hypoxic-hypercapnia in a strictly fossorial mole // *BMC Evolutionary Biology.* – 2010. – V. 10214. – P. 1–14.
74. Cantú-Medellín N., Byrd B., Hohn A. et al. Differential antioxidant protection in tissues from marine mammals with distinct diving capacities. Shallow/short vs. deep/long divers // *J. Comp. Biochem. Physiol. A.* – 2011. – V. 158. – P. 438–443.
75. Carey H.V., Andrews M.T., Martin S.L. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature // *Physiol. Rev.* – 2003. – V. 83. – P. 1153–1181.
76. Clark B.C. In vivo alterations in skeletal muscle form and function after disuse atrophy // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 2009. – V. 41. – P. 1869–1875.
77. Chappell M.A., Rezende E.L., Hammond K.A. Age and aerobic performance in deer mice. *J. Exp. Biol.* – 2003. – V. 206. – P. 1221–1231.

78. Chua S.K., Hung H.F., Shyu K.G. et al. Acute ST-elevation myocardial infarction in young patients: 15 years of experience in a single center. *Clin Cardiol.* – 2010. – V. 33. – P. 140–148.
79. Conde-Perezprina J.C., Luna-Lopez A., Gonzalez-Puertos V.Y. et al. DNA MMR systems, microsatellite instability and antioxidant activity variations in two species of wild bats: *Myotis velifer* and *Desmodus rotundus*, as possible factors associated with longevity // *Age.* – 2012. – V. 34. №6. – P. 1473–1492.
80. Cui J., Pan Y.H., Zhang Y. et al. Progressive pseudogenization: vitamin C synthesis and its loss in bats // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – V. 28. – P. 1025–1031.
81. Cunnane G., Fitz Gerald O., Beeton C. et al. Early joint erosions and serum levels of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in rheumatoid arthritis // *Arth. Rheumat.* – 2001. – V. 44. – P. 2263–74.
82. Curtis L.K. Reversing atherosclerosis? // *New Eng. J. Med.* – 2009. – V. 360. – P. 1144–6.
83. Damert A, Ikeda E, Risau W. Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-induciblefactor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells // *Biochem J.* – 1997. – V. 327. № 2. – P. 419–423.
84. Dave K.R., Christian S.L., Perez-Pinzon M.A. et al. Neuroprotection: lessons from hibernators // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2012. – V. 162. – P. 1–9.
85. Davis R.W. A review of the multi-level adaptations for maximizing aerobic dive duration in marine mammals: from biochemistry to behavior // *J. Comp. Physiol. B.* – 2014. – V. 184. – P. 23–53.
86. Dhalla N.S., Elmoselhi A.B., Hata T. et al. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury // *Cardiovascular Research.* – 2000. – V. 47. – P. 446–456.

87. Dietz M., Kalko E.K.V. Seasonal changes in daily torpor patterns of free-ranging female and male Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*) // J. Comp. Physiol. B. – 2006 – V. 176. – P. 223–231
88. Dirmeier R., O'Brien K.M., Engle M. et al. Exposure of yeast cells to anoxia induces transient oxidative stress. Implications for the induction of hypoxic genes // J. Biol. Chem. – 2002 – V. 277. № 38. – P. 34773–84
89. Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M. et al. Free radical induced damage to DNA: Mechanisms and measurement // Free Radic. Biol. Med. – 2002– V. 32. – P. 1102–1115.
90. Dowling D.K., Simmons L.W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution // Proc. Biol. Sci. – 2009. – V. 276. – P. 1737–1745.
91. Drew K.L., Buck C.L., Barnes B.M. et al. Central nervous system regulation of mammalian hibernation: implications for metabolic suppression and ischemia tolerance // J. Neurochem. – 2007. – V. 102. – P. 1713–1726.
92. Drew K.L., Harris M.B, Lamanna J.C. et al. Hypoxia tolerance in mammalian heterotherms // Am J. Exp. Biol. – 2004. – V. 207. – P. 3155–162.
93. Drew K.L., Toien O., Rivera P.M. et al. Role of the antioxidant ascorbate in hibernation and warming from hibernation // Comp. Biochem. Physiol. – 2002. – V. 133. – P. 483–492.
94. Duranteau J., Chandel N.S., Kulisz A., et al. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes // J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273. – P. 11619–11624.
95. Eddy S.F., Storey K.B. p38^{MAPK} regulation of transcription factor targets in muscle and heart of hibernating bats, *Myotis lucifugus* // Cell. Biochem. Function. – 2007. – V. 25. – P. 759–765.
96. Elsner R., Oyaseter S., Almaas R. et al. Diving seals, ischemia-reperfusion and oxygen radicals // Comp. Biochem. Physiol. – 1998. – V. 119. №4. – P. 975–980.

97. Encarnacao J.A., Baulechner D., Becker N.I. Seasonal variations of wing mite infestations in male Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*) in comparison to female and juvenile bats // *Acta Chiropt.* – 2012. – V. 14. – P. 153–159.
98. Fish F.E., Baudinette R.V. Energetics of locomotion by the Australian water rat (*Hydromys chrysogaster*): comparison of swimming and running in a semiaquatic mammal // *J. Exp. Biol.* – 1999. – V. 202. – P. 353–363.
99. Fish F.E. Biomechanics and energetics in aquatic and semiaquatic mammals: platypus to whale // *Physiol. Biochem. Zool.* – 2000. – V. 73. – P. 683–698.
100. Flögel U., Gödecke A., Klotz L. et al. Role of myoglobin in the antioxidant defense of the heart // *FASEB J.* – 2004. – V. 18. – P. 1156–1158.
101. Freanzini L., Ardigo D., Zavaroni I. Dietary antioxidant and glucose metabolism // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Met. Care.* – 2008. – V. 11. – P. 471–6.
102. Fridovich I. Superoxide dismutases // *Ann. Rev. Biochem.* – 1975. – V. 44. № 1. – P. 147–159.
103. Fukui T., Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases // *Antioxid. Redox Signal.* – 2011. – V. 15. – P. 1583–1606.
104. Fuson A.L., Cowan D.F., Kanatous S.B. et al. Adaptations to diving hypoxia in the heart, kidneys and splanchnic organs of harbor seals (*Phoca vitulina*) // *J. Exp. Biol.* – 2003. – V. 206. – P. 4139–4154.
105. George S.B., Choate J.R., Genoways H.H. Mammalian species: *Blarina brevicauda* // *Am. Soc. Mammal.* – 1986. – V. 261. – P. 1–9.
106. Giussani D.A., Camm E.J., Niu Y. et al. Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress // *PLoS ONE.* – 2012. – V. 7: e31017.
107. Gottlieb R. Cytochrome P450: major player in reperfusion injury // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2003. – V. 420. – P. 262–267.

108. Graf P.M., Wilson R.P., Cohen Sanchez L.G. et al. Diving behaviour of the Eurasian beaver (*Castor fiber*) / Book of abstracts. 6 th International Beaver Symposium. Croatia. 2012. – P. 13.
109. Gutteridge J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage // *Clinical Chemistry*. – 1995. – V. 41. №12. – P. 1819–1828.
110. Gutteridge J.M.C. Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence // *Free Radic. Res. Commun.* – 1993. – V. 19. – P. 141–158.
111. Gusztak R.W. Diving physiology and aquatic thermoregulation of the American water shrew (*Sorex palustris*) / MSc thesis, University of Manitoba. – 2008.
112. Guzy R.D., Schumacker P.T. Oxygen sensing by mitochondria at Complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia // *Exp. Physiol.* – 2006. – V. 91. – P. 807–819.
113. Haddad J.J. Antioxidant and pro-oxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors // *Cell Signal*. – 2002. – V. 14. – P. 879–897.
114. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine* // Oxford Univ. Press, London. – 1999.
115. Harman D. Free-radical theory of aging. Increasing the functional life span // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1994. – V. 717. – P. 1–15.
116. Heldmaier G., Ortman S., Elvert R. Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2004. – V. 141. – P. 317–329.
117. Hendgen-Cotta U.B., Kelm M., Rassaf T. Myoglobin functions in the heart // *Free Radic. Biol. Med.* – 2014. – V. 73. – P. 252–9.
118. Hermes-Lima M., Moreira D.C., Rivera-Ingraham G.A. et al. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal

- two decades later // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2015. – V. 89. – P. 1122–1143.
119. Hermes-Lima M., Zenteno-Savin T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2002. – V. 133. – P. 537–556.
120. Hindle A.G., Horning M., Mellish J.A.E. et al. Diving into old age: muscular senescence in a large-bodied, long-lived mammal, the weddell seal (*Leptonychotes weddellii*) // *J. Exp. Biol.* – 2009 – V. 212. №6. – P. 790.
121. Hindle A.G., Lawler J.M., Campbell K.L. et al. Muscle aging and oxidative stress in wild-caught shrews // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* – 2010. – V. 155. №4. – P. 427–434.
122. Hindle A.G., Senkiw R.W., MacArthur R.A. Body cooling and the diving capabilities of muskrats (*Ondatra zibethicus*): A test of the adaptive hypothermia hypothesis // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2006. – V. 144A. – P. 232–241.
123. Hochachka P.W., Somero G.N. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution* // Oxford University Press, New York. – 2002.
124. Hudson N.J., Franklin C.E. Maintaining muscle mass during extended disuse: aestivating frogs as a model species // *J. Exp. Biol.* – 2002. – V. 205. – P. 2297–2303.
125. Hulbert A.J., Pamplona R., Buffenstein R. et al. Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals // *Physiol. Rev.* – 2007. – V. 87. – P. 1175–1213.
126. Hut R.A., Barnes B.M., Daan S. Body temperature patterns before, during, and after semi-natural hibernation in the European ground squirrel // *J. Comp. Physiol.* 2002. – V. 172B. – P. 47–58.
127. James R.S., Staples J.F., Brown J.C.L. et al. The effects of hibernation on the contractile and biochemical properties of skeletal muscles in the thirteen-lined

- ground squirrel, *Ictidomys tridecemlineatus* // J. Exp. Biol. – 2013. – V. 216. – P. 2587–2594.
128. Jelkmann W., Oberthur W., Kleinschmidt T., Braunitzer G. Adaptation of hemoglobin function to subterranean life in the mole, *Talpa europaea* // Respir. Physiol. – 1981. – V. 46. – P. 7–16.
129. Jiang B.H., Semenza G.L., Bauer C. et al. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension // Am. J. Physiol. – 1996. – V. 271. – P. 1172–1180.
130. Johnson P., Elsner R., Zenteno-Savín T. Hypoxia-inducible factor in ringed seal (*Phoca hispida*) tissues // Free Radic. Res. – 2004. – V. 38. – P. 847–854.
131. Jones D.R., West N.H., Bamford O.S. et al. The effect of the stress of forcible submergence on the diving response in muskrats (*Ondatra zibethica*) // Can. J. Zool. – 1982. – V. 60. – P. 187–193.
132. Kevin L.G., Novalija E., Stowe D.F. Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice // Anesth. Analg. – 2005. – V. 101. – P. 1275–1287.
133. Kim W.S., Han J., Hwang S. et al. An update on niche composition, signaling and functional regulation of the adipose -derived stem cells // Expert Opin. Biol. Ther. – 2014. – V. 14. № 8. – P. 1–12.
134. Koh M.Y., Spivak-Kroizman T.R., Powis G. HIF-1 regulation: Not so easy come, easy go // Trends Biochem. Sci. – 2008. – V. 33. № 11. – P. 526–534.
135. Kuhnen G. O₂ and CO₂ concentrations in burrows of euthermic and hibernating golden hamsters // Comp. Biochem. Physiol. – 1986. – V. 84A. №3. – P. 517–522.
136. Kwon H.S., Kim D.R., Yang E.G. Inhibition of VEGF transcription through blockade of the hypoxia inducible factor-1- α -p300 interaction by a small molecule // Bioorganic, medicinal chemistry letters. – 2012. – V. 22. – P. 5249–5252.

137. Labinskyy N., Csiszar A., Orosz Z. et al. Comparison of endothelial function, $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 production, and vascular oxidative stress resistance between the longest-living rodent, the naked mole rat, and mice // *Am. J. Physiol.* – 2006. – V. 291. – P. 2698–2704.
138. Laroux F.S., Pavlick K.P., Hines I.N. et al. Role of nitric oxide in inflammation // *Acta Physiol. Scand.* – 2001– V. 173. – P. 113–118.
139. Larson J., Drew KL, Folkow LP. et al. No oxygen? No problem! Intrinsic brain tolerance to hypoxia in vertebrates // *J. Exp. Biol.* – 2014 . – V. 217. №7. – P. 1024–39.
140. Lee M., Choi I., Park K. Activation of stress signaling molecules in bat brain during arousal from hibernation // *J. Neurochem.* – 2002. – V. 82. №4. – P. 867–873.
141. Lewis K.N., Andziak B., Yang T., Buffenstei R. The Naked Mole-Rat Response to Oxidative Stress: Just Deal with It // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2013. – V. 19. №12. – P. 1388–99.
142. Li J.M., Shah A.M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2004. – V. 287. № 5. – P. 1014–1030.
143. Li Y., Zhou C., Calvert J.W. et al. Multiple effects of hyperbaric oxygen on the expression of HIF-1 alpha and apoptotic genes in a global ischemia-hypotension rat model // *Exp. Neurol.* – 2005. – V. 191. № 1. – P. 198–210. □
144. Lilley T.M., Stauffer J., Kanerva M. et al. Interspecific variation in redox status regulation and immune defence in five bat species: the role of ectoparasites // *Oecologia.* – 2014. – V. 175. №3. – P. 811–23.
145. Lipton P. Ischemic cell death in neurons // *Physiol. Revs.* – 1999– V. 79. – P. 1431–1568.

146. Lock R., Dahlgren C. Characteristics of the granulocyte chemiluminescence reaction following an interaction between human neutrophils and *Salmonella typhimurium* bacteria // APMIS. – 1988. – V. 96. №4. – P. 299–305.
147. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – P. 265–275.
148. Lyman C.P., O'Brien R.C., Greene G.C. et al. Hibernation and longevity in the Turkish hamster *Mesocricetus brandti* // Science. – 1981. – V. 212. – P. 668–670.
149. Maharjan B.R., Jha J.C., Adhikari D. et al. Oxidant stress antioxidant status and lipid profile in ischemic heart disease patients from western Nepal // Nepal. Med. J. – 2008. – V. 10. – P. 20–4.
150. MacArthur R.A. Aquatic thermoregulation in the muskrat (*Ondatra zibethicus*): energy demands of swimming and diving // Can. J. Zool. – 1984. – V. 62. – P. 241–248.
151. MacDonald J.A., Storey K.B. Regulation of ground squirrel Na⁺ K⁺ -ATPase activity by reversible phosphorylation during hibernation // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1999. – V. 254. – P. 424–9.
152. Maistrovski Y., Biggar K.K., Storey K.B. HIF-1 α regulation in mammalian hibernators: role of non-coding RNA in HIF-1 α control during torpor in ground squirrels and bats // J. Comp. Physiol. B. – 2012. – V. 182. №6. – P. 849–59.
153. Mansfield K.D., Guzy R.D., Pan Y. et al. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation // Cell Metab. – 2005. – V. 1. – P. 393–399.
154. Marklund S.L., Karlsson K. Extracellular-superoxide dismutase, distribution in the body and therapeutic implications // Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine. – N.Y.: Plenum Press. – 1990. – P. 1–4.

155. Martin R., Fitzl G., Mozet C. et al. Effect of age and hypoxia/reoxygenation on mRNA expression of antioxidative enzymes in rat liver and kidneys // *Exp. Gerontol.* – 2002. – V. 37. №12. – 1481–7.
156. Masson N., Willam C., Maxwell P.H. et al. Independent function of two destruction domains in hypoxiainducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation // *EMBO J.* – 2001. – V. 20. – P. 5197–5206.
157. Maurice M.M., Nakamura H., Vander Voort E.A.M. et al. An altered redox state in hyporesponsiveness of synovial T cells in rheumatoid arthritis // *J Immunol.* – 1997. – V. 158. – P. 1458–65.
158. McCord J.M., Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein) // *J. Biol. Chem.* – 1969– V. 244. – P. 6049–6055.
159. McCulloch P.F. Animal models for investigating the central control of the mammalian diving response // *Front. Physiol.* – 2012. – V. 3. – P. 1–16.
160. McGeer P.L., McGeer E.G. Mechanisms of cell death in Alzheimer disease immunopathology // *J. Neural. Transm. Suppl.* – 1998. – V. 54. – P. 159–166.
161. McIntyre I.W, Campbell K.L., MacArthur C.A. Body oxygen stores, aerobic dive limits and diving behaviour of the star-nosed mole (*Condylura cristata*) and comparisons with non-aquatic talpids // *J. Exp. Biol.* – 2002. – V. 205. – P. 45 – 54.
162. Meral A., Tuncel P., Surmen-Gur E. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia // *Pediatr Hematol Oncol.* – 2000. – V. 17. – P. 687–693.
163. Misra H.P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase // *J. Biol. Chem.* – 1972. – V. 247. – P. 3170 – 3175.
164. Mongkolsuk S., Helmann J.D. Regulation of inducible peroxide stress responses // *Mol. Microbiol.* – 2002. – V. 45. – P. 9–15.

165. Montesa M.J.P., Rico M.A.G., Salguero M.A.S. et al. Study of oxidative stress in advanced kidney disease // *Nefrologica*. – 2009. – V. 29. – P. 464–73.
166. Morin P., Storey K.B. Antioxidant defense in hibernation: cloning and expression of peroxiredoxins from hibernating ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus* // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2007. – V. 461. – P. 59–65.
167. Morrison P., Ryser F. A., Dawe A. R. Studies on the physiology of the masked shrew, *Sorex cinereus* // *Physiol. Zool.* – 1959. – V. 32. – P. 256–271.
168. Munshi-South J., Wilkinson G.S. Bats and birds: Exceptional longevity despite high metabolic rates // *Ageing Research Reviews*. – 2010. – V. 9. – P. 12–19.
169. Murphy K., Travers P., Walport M. Janeway's Immunobiology // 7th Edn. Garland Science, London. – 2007.
170. Musacchia X.J., Steffen J.M., Fell R.D. Disuse atrophy of skeletal muscle: animal models // *Exerc. Sport Sci. Rev.* – 1988. – V. 16. – P. 61–87.
171. Nagel A. Sauerstoffverbrauch, Temperaturregulation und Herzfrequenz bei europäischen Spitzmäusen (*Soricidae*) // *Z. Säugetierkunde*. – 1985. – V. 50. – P. 249–266.
172. Noren S.R. Williams T.M. Body size and skeletal muscle myoglobin of cetaceans: adaptations for maximizing dive duration // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2000. – V. 126. – P. 181–191
173. Nowell M.M., Choi H., Rourke B.C. Muscle plasticity in hibernating ground squirrels (*Spermophilus lateralis*) is induced by seasonal, but not low temperature, mechanisms // *J. Comp. Physiol.* – 2011. – V. 181. – P. 147–164.
174. Ohta H., Okamoto I., Hanaya T. et al. Enhanced antioxidant defense due to extracellular catalase activity in Syrian hamster during arousal from hibernation // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2006. – V. 143C. – P. 484–491.
175. Okamoto I., Kayano T., Hanaya T. et al. Up-regulation of an extracellular superoxide dismutase-like activity in hibernating hamsters subjected to oxidative

- stress in mid- to late arousal from torpor // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2006. – V. 144C. – P. 47–56.
176. O'Rourke J.F., Tian Y.M., Ratcliffe P.J. et al. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: Comparison with hypoxia-inducible factor-1 α // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – P. 2060–2071.
177. Oshikawa J., Urao N., Kim H.W. et al. Extracellular SOD-derived H₂O₂ promotes VEGF signaling in caveolae/lipid rafts and post-ischemic angiogenesis in mice // *PLoS One.* – 2010. – V. 5. №4. – P. 1–14.
178. Ozaki Y., Ohashi T., Niwa Y. Oxygen radical production by neutrophils from patients with bacterial infection and rheumatoid arthritis // *Inflammation.* – 1986. – V. 10. – P. 119–130.
179. Page M.M., Peters C.W., Staples J.F. et al. Intracellular antioxidant enzymes are not globally upregulated during hibernation in the major oxidative tissues of the 13-lined ground squirrel *Spermophilus tridecemlineatus* // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2009. – V. 152A. – P. 115–122.
180. Peters R. *The Ecological implications of body size* // Cambridge: Univ. Press. – 1983. – 329 p.
181. Pialoux V., Mounier R. Hypoxia-induced oxidative stress in health disorders // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2012. – V. 2012. – P. 1–2.
182. Powers S.K., Kavazis A.N., McClung J.M. Oxidative stress and disuse muscle atrophy // *J. Appl. Physiol.* – 2007. – V. 102. – P. 2389–2397.
183. Raja-aho S., Kanerva M., Eeva T. et al. Seasonal variation in the regulation of redox state and some biotransformation enzyme activities in the barn swallow (*Hirundo rustica* L.) // *Physiol. Biochem. Zool.* – 2012. – V. 85. № 2. – P. 148–158.
184. Ratcliffe P.J. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? // *J. Clin. Invest.* – 2007. – V. 117. № 4. – P. 862–865.

185. Reed L.J. A trail of research from lipoic acid to alpha-keto acid dehydrogenase complexes // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 38329–38336.
186. Renault V., Thornell L.E., Butler-Browne G et al. Human skeletal muscle satellite cells: aging, oxidative stress and the mitotic clock // *Exp. Gerontol.* – 2002. – V. 37. – P. 1229–1236.
187. Resende R., Moreira P.I., Proenca T. et al. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – V. 44. – P. 2051–7.
188. Robinson D. The muscle hemoglobin of seals as an oxygen store in diving // *Science.* – 1939. – V. 22. – P. 276–277.
189. Sanz A., Stefanatos R.K. The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view // *Curr. Aging Sci.* – 2008. – V. 1. №1. – P. 10–21.
190. Sathyapriya K., Vijayachandrika V., Paxameswari C.S. Antioxidant status in polycystic end stage renal renal diseased patients and antihemolytic effect of *Boerhaavia diffusa* // *Ind. J. Biochem. Biophys.* – 2009. – V. 46. – P. 272.
191. Schaefer V.H., Sadleir R.M.F.S: Concentrations of carbon dioxide and oxygen in mole tunnels // *Acta Theriol.* – 1979. – V. 24. – P. 267–276.
192. Schleicher E., Friess U. Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis // *Kid. Int.* – 2007. – V. 72. – P. 17–26.
193. Schmidt H., Hangmann J., Shams I. et al. Molecular evolution of antioxidant and hypoxia response in long-lived, cancer-resistant blind mole rats: The Nrf2-Keap1 pathway // *Gene.* – 2016. – V. 577. №2. – P. 293–8.
194. Scholander P.F. Experimental investigations on the respiratory function in diving animals and birds // *Hvalradets Skrifter.* – 1940. – V. 22. – P. 1–131.
195. Schülke S., Dreidax D., Malik A. et al. Living with stress: regulation of antioxidant defense genes in the subterranean, hypoxia-tolerant mole rat, *Spalax* // *Gene.* – 2012. – V. 500. №2. – P. 199–206.

196. Selman C., McLaren J.S., Himanka M.J. et al. Effect of long-term cold exposure on antioxidant enzyme activities in a small mammal // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – V. 28. – P. 1279–1285.
197. Semenza G.L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia // *J. Appl. Physiol.* – 2000. – V. 88. – P. 1474–1480.
198. Semenza G.L. Oxygen dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1 // *Biochem. J.* – 2007. – V. 405. №1. – P. 1–9.
199. Serdar Z., Aslan K., Dirican M. et al. Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease // *Clin. Biochem.* – 2006. – V. 48. – P. 1–11.
200. Serrano M., Blasco M.A. Cancer and aging: convergent and divergent mechanisms // *Nature.* – 2007. – V. 8. – P. 715–22.
201. Shavlakadze T., Grounds M.D. Of bears, frogs, meat, mice and men: insight into the complexity of factors affecting skeletal muscle atrophy/hypertrophy and myogenesis/adipogenesis // *Bio Essays.* – 2006. – V. 28. №10. – P. 994–1009.
202. Skulachev V.P., Anisimov V.N., Antonenko Y.N. et al. An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 1787. №5. – P. 437–61.
203. Sohal R.S., Ku H.H., Agarwal S. Biochemical correlates of longevity in two closely related rodent species // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – V. 196. – P. 7–11.
204. Sohal R.S., Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging // *Science.* – 1996. – V. 273. – P. 59–63.
205. Soria-Valles C., Caballero B., Vega-Naredo I. et al. Antioxidant responses to variations of oxygen by the Harderian gland of different species of the superspecies *Spalax ehrenbergi* // *Can. J. of Zoology.* – 2010. – V. 88. №8. – P. 803–807.

206. Stadtman E.R. Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems, implication in protein turnover, aging and neutrophil unction // Trends Biochem. Sci. – 1986. – V. 11. – P. 11–12.
207. Stahl W.R. Scaling of respiratory variables in mammals // J. Appl. Physiol. – 1967. – V. 22. – P. 453–460.
208. Stewart J.M., Woods A.K., Blakely J.A. Maximal enzyme activities, and myoglobin and glutathione concentrations in heart, liver and skeletal muscle of the Northern Short-tailed shrew (*Blarina brevicauda*; Insectivora: Soricidae) // Comp. Biochem. Physiol. B. – 2005. – V. 141. – P. 267–273.
209. Stroka D.M., Burkhardt T., Desbaillets I. et al. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia // FASEB Journal. – 2001. – V. 15. – P. 2445–2453.
210. Storey K.B. Metabolic regulation in mammalian hibernation: enzyme and protein adaptations // Comp. Biochem. Physiol. – 1997. – V. 118. – P. 1115–1124.
211. Storey K.B. Out cold: biochemical regulation of mammalian hibernation – a mini-review // Gerontology. – 2010. – V. 56. – P. 220–230.
212. Storey K.B. Biochemical regulation of carbohydrate metabolism in hibernating bats / Living in a Seasonal World: Thermoregulatory and Metabolic Adaptations // T. Ruf, C. Bieber, W. Arnold, E. Millesi. – 2012. – Chapter 36. – P. 411–421.
213. Storey K.B. Regulation of hypometabolism: insights into epigenetic controls // J. Exp. Biol. – 2015. – V. 218. – P. 150–159.
214. Storey K.B., Storey J.M. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. – 2004. – V. 79. – P. 207–233.
215. Storey K.B., Storey J.M. Metabolic rate depression: the biochemistry of mammalian hibernation // In: Makowski GS (ed) Advances in clinical chemistry. Elsevier Inc. – 2010. – P. 77–108.

216. Sugden M.C., Holness M.J. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2003. – V. 284. – P. 855–862.
217. Stuart J.A., Maddalena L.A., Merilovich M. et al. A midlife crisis for the mitochondrial free radical theory of aging // *Longev. Healthspan.* – 2014. – V. 3. – 4 pp.
218. Uchida K. Lipid peroxidation and redox-sensitive signaling pathways // *Curr. Atheroscler. Rep.* – 2007. – V. 9. №3. – 216–221.
219. Tafani M., Sansone L., Limana F. et al. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2016. – V. 2016. – P. 1–18.
220. Tan D.X., Manchester L.C., Sainz R.M. et al. Physiological ischemia/reperfusion phenomena and their relation to endogenous melatonin production: a hypothesis // *Endocrine.* – 2005. – V. 27. – P. 149–158.
221. Tessier S.N., Storey K.B. Expression of myocyte enhancer factor-2 and downstream genes in ground squirrel skeletal muscle during hibernation // *Mol. Cell. Biochem.* – 2010. – V. 344. – P. 151–162.
222. Toien O., Drew K.L., Chao M.L. et al. Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels // *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* – 2001. – V. 281. – P. 572–583.
223. Tretter L., Sips L., Adam-vizzi I. Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease // *Neurochem. Res.* – 2004. – V. 29. – P. 569–77.
224. Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species // *J. Physiol.* – 2003. – V. 552. – P. 335–344.
225. Valdivieso D., Conde E., Tamsitt J.R. Lactate dehydrogenase studies in Puertorican bats // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1968. – V. 27. – P. 133–138.

226. Valko M., Rhodes C.J., Marcol Izakonic M., Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer // *Chem. Biol. Interact.* – 2006. – V. 160. – P. 1–40.
227. Van de Crommenacker J., Richardson D.S., Koltz A.M. et al. Parasitic infection and oxidative status are associated and vary with breeding activity in the Seychelles warbler // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* – 2012. – V. 279. – P. 1466–1476.
228. Van Muiswinkel F.L., Kuiperij H.B. The Nrf2-ARE signalling pathway: promising drug target to combat oxidative stress in neurodegenerative disorders // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* – 2005. – V. 4. – P. 267–281.
229. Vázquez-Medina J.P., Zenteno-Savin T., Elsner R. Antioxidant enzymes in ringed seal tissues: Potential protection against dive-associated ischemia/reperfusion // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2006. – V. 142. – P. 198–204.
230. Vázquez-Medina J.P., Zenteno-Savín T., Elsner R. Glutathione protection against dive-associated ischemia/reperfusion in ringed seal tissues // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* – 2007. – V. 345. – P. 110–118.
231. Vázquez-Medina J.P., Sonanez-Organis J.G., Burns J.M. et al. Antioxidant capacity develops with maturation in the deep diving hooded seal // *J. Exp. Biol.* – 2011. – V. 214. – P. 2903–2910.
232. Vázquez-Medina J.P., Zenteno-Savín T., Elsner R. et al. Coping with physiological oxidative stress: a review of antioxidant strategies in seals // *J. Comp. Physiol. B.* – 2012. – V. 182. № 6. – P. 741–750.
233. Venditti P., Costagliola I.R., DiMeo S. H₂O₂ production and response to stress conditions by mitochondrial fractions from rat liver // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2002. – V. 34. – P. 115–125.

234. Vornanen M. Basic functional properties of the cardiac muscle of the common shrew (*Sorex araneus*) and some other small mammals // J. Exp. Biol. – 1989. – V. 145. – P. 339–351.
235. Wang L.C.H., Wolowyk M.W. Torpor in mammals and birds // Can. J. Zool. – 1988. – V. 66. – P. 133–137.
236. Weisiger R.A., Fridovich I. Superoxide dismutase. Organelle specificity // J. Biol. Chem. – 1973. – V. 248. – P. 3582–3592.
237. Welker A.F., Moreira D.C., Campos E.G. et al. Role redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability // Comp. Biochem. Physiol. – 2013. – V. 165. – P. 384–404.
238. Wenger R.H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression // The FASEB Journal. – 2002. – V. 16. – P. 1151–1162.
239. Wikel S.K. Modulation of the host immune system by ectoparasitic arthropods—blood-feeding and tissue-dwelling arthropods manipulate host defenses to their advantage // Bioscience. – 1999. – V. 49. – P. 311–320.
240. Wilhelm Filho D., Althoff S.L., Dafre A.L. et al. Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats // Comparative Biochemistry and Physiology. – 2007. – V. 146C. – P. 214–220.
241. Wilhelm Filho D., Sell F., Ribeiro L. et al. Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals // Comp. Biochem. Physiol. – 2002. – V. 133. №3. – P. 885–892.
242. Wilkinson G.S., South J.M. Life history, ecology and longevity in bats // Aging Cell. – 2002. – V. 1. – P. 124–131.
243. Wright T.J., Davis R.W. Myoglobin oxygen affinity in aquatic and terrestrial birds and mammals // J. Exp. Biol. – 2015. – V. 218. – P. 2180–2189.

244. Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC -SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – V. 33. – P. 337–349.
245. Zenteno-Savín T., Clayton-Hernandez E., Elsner R. Diving seals: are they a model for coping with oxidative stress? // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2002. – V. 133C. №4. – P. 527–536.
246. Zepeda A.B., Pessoa A.Jr., Castillo R.L. et al. Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS // *Cell. Biochem. Funct.* – 2013. – V. 31. №6. – P. 451–459.