

ВОЗРАСТНЫЕ И СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ЭРИТРОЦИТОВ У ОНДАТРЫ (*ONDATRA ZIBETHICUS*)

© 2020 г. Е. П. Антонова^{1,*}, В. А. Илюха¹, А. Г. Кижина¹, Л. Б. Узенбаева¹,
Е. А. Хижкин¹, С. Н. Калинина¹, И. В. Баишникова¹, Э. Ф. Печорина¹

¹ Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ “Карельский научный центр РАН”, Петрозаводск, Россия

*e-mail: antonova88ep@mail.ru

Поступила в редакцию 06.02.2020 г.

После доработки 26.03.2020 г.

Принята к публикации 03.04.2020 г.

В процессе приспособления к полуводному образу жизни у ондатры (*Ondatra zibethicus*) сформировались многочисленные адаптации, направленные на поддержание гомеостаза. Целью работы являлось исследование антиоксидантной защиты мышечной ткани и морфометрических параметров эритроцитов у ондатры в зависимости от возраста и сезона года. Исследование было проведено на молодых животных, отловленных осенью, и взрослых — в весенний и осенний периоды на Северо-Западе России (Республика Карелия). Показана возрастная изменчивость некоторых изученных показателей у животных осенью: у взрослых ондатр активность каталазы в скелетной мышце ниже, а респираторная функция крови — выше за счет более низкой площади эритроцитов, чем у ювенильных особей. У взрослых ондатр наблюдались сезонные изменения показателей: в весенний период активности каталазы в сердце и супероксиддисмутазы в скелетной мышце были выше, а уровни низкомолекулярных антиоксидантов (α -токоферол и восстановленный глутатион) как в сердечной, так и скелетной мышце ниже, чем осенью. После продолжительного подледного периода жизни у ондатр весной в периферической крови обнаружены в основном зрелые формы эритроцитов, при этом их средний диаметр и площадь выше, чем у взрослых особей, отловленных осенью. Результаты исследования, как и данные, полученные на других видах, подтверждают участие антиоксидантной системы и эритроцитов в механизмах поддержания кислородного гомеостаза у ныряющих млекопитающих.

Ключевые слова: *Ondatra zibethicus*, адаптация, гипоксия, ныряние, антиоксидантная система, эритроциты

DOI: 10.31857/S0044452920050022

ВВЕДЕНИЕ

Переход млекопитающих из наземной среды обитания в водную сопровождается многочисленными морфологическими, физиологическими и биохимическими компенсаторными изменениями, направленными на увеличение продолжительности погружений и поддержание кислородного гомеостаза [1–4]. Наблюдаемые при погружении брадикардия и вазоконстрикция периферических сосудов приводят к снижению конвективной доставки кислорода и гипоксии в некоторых тканях, при этом после ныряния кровотоки восстанавливаются и наблюдается реоксигенация [1]. Как дефицит кислорода, так и его повышенное потребление может приводить к усиленной генерации активных форм кислорода (АФК) [2]. Уровень АФК в тканях регулируется как скоростью их генерации, так и антиоксидантной системой, которая включает низкомолекулярные антиоксиданты (восстанов-

ленный глутатион (GSH), α -токоферол и ретинол) и антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатион-зависимые пероксидазы и трансферазы) [3, 4]. Нарушение баланса между образованием кислородных радикалов и антиоксидантной защитой приводит к окислительному стрессу [2]. Анализ данных о механизмах устойчивости ныряющих млекопитающих к дефициту кислорода приводит к заключению, что, вероятнее всего, имеет место многофакторное влияние (возраст, сезон, особенности питания и поведения) на антиоксидантную систему. В основном подобные исследования выполнены на крупных морских млекопитающих (китообразные и различные виды тюленей) [2–4], в то время как сведения об адаптациях пресноводных ныряльщиков, также испытывающих гипоксию—реоксигенацию, крайне малочисленны и фрагментарны.

Среди полуводных млекопитающих особое место занимает ондатра (*Ondatra zibethicus* L., 1766) (Rodentia, Arvicolinae), которая, несмотря на небольшие размеры, может совершать погружения продолжительностью до 8–12 мин [5]. При значительном объеме исследований по анатомическим и физиологическим приспособлениям ондатры к нырянию ограничены работы по биохимическим адаптациям. Более того, на сегодняшний день нет четкого понимания того, каким образом формируются биохимические приспособления к смене кислородных условий у этого полуводного млекопитающего в онтогенезе. Полевые исследования показали [6], что продолжительность ныряния существенно не различается между неполовозрелыми (1–2 мес) и половозрелыми особями ондатры, однако у молодых животных наблюдается большее количество коротких погружений по сравнению со взрослыми [5]. Помимо возрастных, у ондатры выявлены сезонные изменения поведения [7], что обуславливает широкий спектр адаптивных приспособлений для поддержания гомеостаза. Во-первых, в подледный период ондатры наиболее толерантны к повышению CO_2 во вдыхаемом воздухе за счет увеличения сродства гемоглобина к O_2 [7]. Авторы связывают это с тем, что зимой в гнездовых камерах хаток обитает до 5 взрослых особей, что приводит к накоплению CO_2 и снижению уровня O_2 [7]. Во-вторых, поскольку ондатра не запасает пищу на зиму, она вынуждена быть активной подо льдом водоемов в зимне-весеннее время [5, 6, 8]. В таких условиях увеличивается продолжительность ныряний во время поиска корма, что в совокупности с другими факторами приводит к значительному росту запасов кислорода в крови и мышечной ткани у животных зимой по сравнению с особями, отловленными летом [6, 8].

Вследствие недостаточной изученности влияния возраста и сезона на системы, участвующие в поддержании кислородного гомеостаза у полуводных млекопитающих, целью работы явилось исследование антиоксидантной защиты мышечной ткани и морфометрических параметров эритроцитов у ондатры, отловленных осенью (молодые и взрослые) и весной (взрослые).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и правил проведения работ с использованием экспериментальных животных. Объектами исследования являлись ондатры (*Ondatra zibethicus* L., 1766), пойманные в осенний (15.10–17.10) и весенний (30.04–01.05) периоды на оз. Миккильское в окрестностях п. Эс-сойла (Республика Карелия). Осенью выборка состояла из животных первой генерации (juv, возраст 5–6 мес; $5\sigma/6\varphi$, $m = 652.72 \pm 29.33$ г) и взрослых

ондатры (ad, возраст более 12 месяцев; $8\sigma/4\varphi$, 969.09 ± 59.23 г). Весной были отловлены только взрослые особи (ad, возраст более 12 месяцев; $3\sigma/2\varphi$, 840.00 ± 22.80 г).

В образцах сердечной и скелетной мышц были проанализированы активность антиоксидантных ферментов (СОД (КФ 1.15.1.1) и каталазы (КФ 1.11.1.6)), содержание восстановленного глутатиона (GSH) и α -токоферола. Для определения активности антиоксидантных ферментов гомогенаты тканей готовили в 0.05 М фосфатном буферном растворе (pH = 7.0), после чего центрифугировали при 6000 g в течение 15 мин. Активность антиоксидантных ферментов определяли спектрофотометрически: СОД – по модифицированной адренохромной методике [9], каталазы – по количеству разложенной перекиси водорода [10]. Содержание белка определяли по методу Лоури [11] с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина. За 1 усл. ед. активности СОД принимали количество фермента, способное затормозить реакцию автоокисления адреналина на 50%. Активность каталазы выражали в мкмоль H_2O_2 , разложенной за 1 мин. Активность ферментов рассчитывали на 1 мг белка.

Содержание GSH определяли по методу Элмана [12] и выражали в мкмоль/г ткани. Для этого гомогенаты тканей органов готовили в 0.02 М ЭДТА- Na_2 , после центрифугирования (в течение 15 мин при 5000 g) к супернатантам добавляли 50% ТХУ для осаждения белков, затем вновь центрифугировали (15 мин при 3000 g). В полученных супернатантах после добавления 0.4 М трис-буферного раствора и реактива Элмана (pH полной реакционной смеси составлял 8.0) спектрофотометрически ($\lambda = 412$ нм) определяли уровень GSH.

Концентрацию α -токоферола определяли методом ВЭЖХ [13]. Хроматографическое разделение α -токоферола осуществляли на микроколоночном жидкостном хроматографе “Милихром 6” с ультрафиолетовым детектором, элюентом служила смесь гексана с изопропанолом (98.5:1.5). Для построения калибровочных кривых использовали стандартный раствор α -токоферола (“Sigma”, США).

Периферическую кровь получали из хвостовой вены, после животных декапитировали. Свежеприготовленные и высушенные мазки крови окрашивались по Паппенгейму красителем-фиксатором Мая–Грюнвальда и красителем Романовского (MiniMed, Россия). Исследование проводилось с помощью светового микроскопа (Axioscop 40, Karl Zeiss) с цветной цифровой видеокамерой (Pixera 150ES). Производили микроскопическую съемку 10 полей зрения каждого препарата, полученного от исследуемых животных. Измерение морфометрических параметров эритроцитов (площади поверхности и диаметра) осуществлялось с применением методики NCR (nuclear-cytoplasmic ratio),

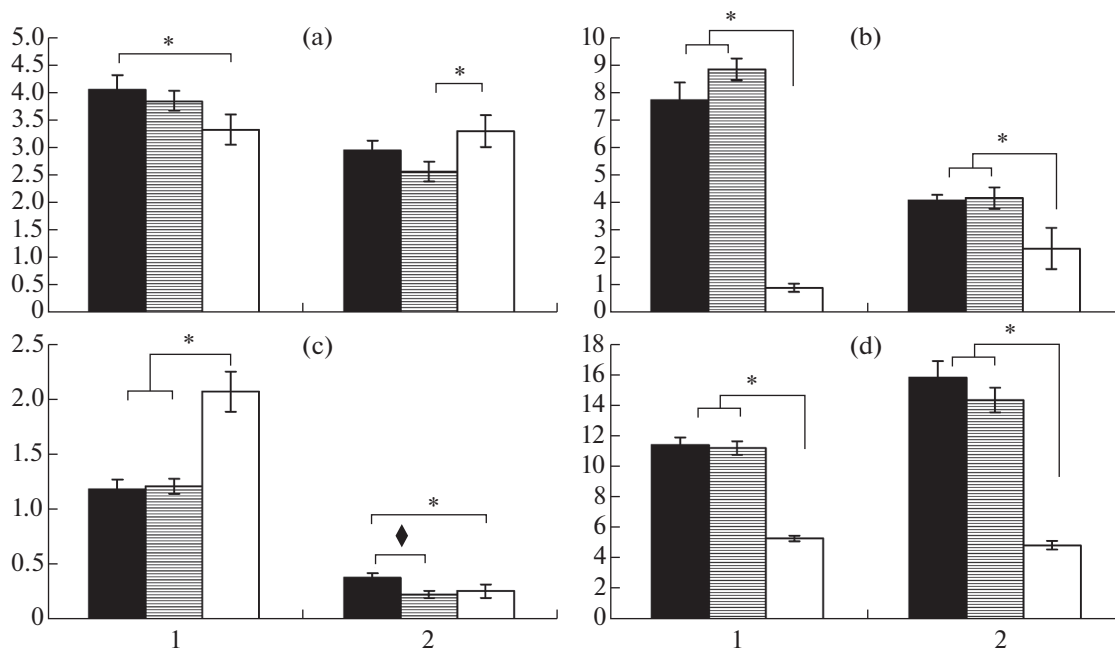


Рис. 1. Активность супероксиддисмутазы (а), содержание α -токоферола (б), активность каталазы (с) и уровень восстановленного глутатиона (д) в условных единицах в тканях у ондатр разного возраста и сезона отлова. Черные столбики — молодые ондатры (осень), столбики со штриховкой — взрослые животные (осень), белые столбики — взрослые ондатры (весна); 1 — сердце, 2 — скелетная мышца; ♦ — различия достоверны по сравнению с молодыми животными ($p < 0.05$); * — различия достоверны по сравнению с животными, отловленными весной ($p < 0.05$).

Fig. 1. Superoxide dismutase activity (a), levels of α -tocopherol (b), catalase activity (c) and glutathione levels (d) in tissues of muskrats of different ages and caught in different season. Black bars — juveniles (autumn), hatched bars — adults (autumn), white bars — adults (spring); 1 — heart, 2 — skeletal muscle; ♦ — significant difference vs. juveniles ($p < 0.05$); * — significant difference vs. animals caught in spring ($p < 0.05$).

входящей в пакет программного обеспечения “ВидеоТест 4.0”. Полученные данные обрабатывали общепринятыми статистическими методами, используя пакеты программ MS Excel и Statgraphics. Сравнение проводили с применением непараметрического U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного исследования выявлены возрастные изменения антиоксидантной защиты мышечной ткани ондатр (рис. 1). Достоверные различия по активности антиоксидантных ферментов и содержанию низкомолекулярных антиоксидантов между молодыми и взрослыми животными, отловленными осенью, наблюдались только в скелетной мышце — активность каталазы была ниже у половозрелых особей (рис. 1, с).

Помимо незначительных возрастных различий изученных показателей, нами были обнаружены сезонные: в сердце активность СОД была ниже (рис. 1, а), а каталазы выше у ондатр весной (рис. 1, с), чем у особей из осенней выборки. Напротив, в скелетной мышце активность СОД повышалась к весне

(рис. 1, а), а каталазы снижалась (между молодыми осенними и зимовавшими ондатрами) (рис. 1, с). При этом содержание α -токоферола (рис. 1, б) и GSH (рис. 1, д) как в сердечной, так и скелетной мышце было достоверно выше у животных, отловленных осенью, по сравнению с особями из весенней выборки (рис. 1, б, д).

В результате исследования нами были обнаружены некоторые особенности в морфологии клеток эритроцитов (рис. 2). На светооптическом уровне эритроциты у ондатр имеют свойственную большинству видов млекопитающих морфологию. У всех исследованных ондатр они, как правило, были представлены зрелыми формами (округлые, безъядерные нормоциты) (рис. 2, с), также иногда встречались полихроматофильные эритроциты, нормобласты (рис. 2, а) и клетки с включениями (базофильная пунктация и тельца Жолли) (рис. 2, б, д). Базофильная зернистость (остатки рибосом) в эритроцитах проявлялась в виде множества мелких голубых точек, диффузно расположенных в цитоплазме (рис. 2, д). Необходимо отметить, что в осенний период базофильная субстанция в эритроцитах встречалась почти у всех взрослых животных, в то время как у молодых ондатр она, как правило, отсутствовала (за исключением одной осо-

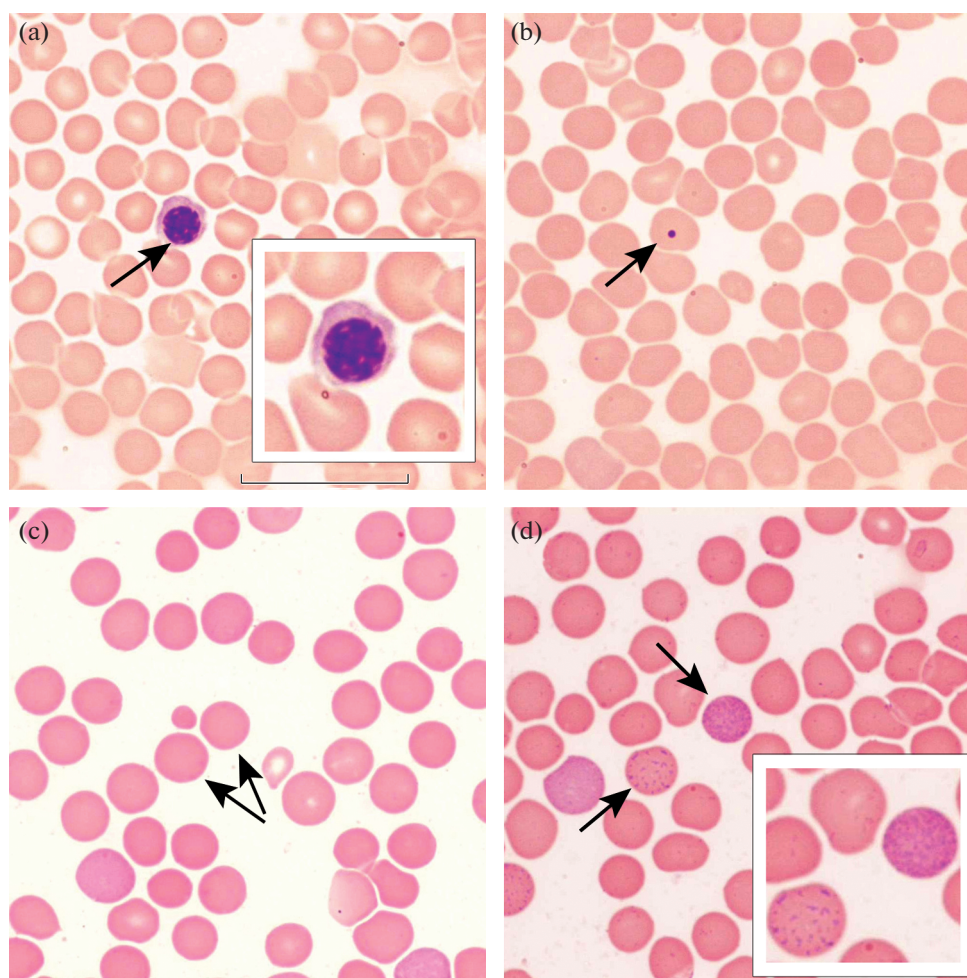


Рис. 2. Эритроциты ондатры: а — эритроциты молодых животных, отловленных осенью, стрелка указывает на оксифильный нормобласт; б — эритроциты взрослых животных, отловленных осенью, стрелка — клетка с включением (тельце Жолли); с — нормоциты у ондатр из весенней выборки (стрелка), d — эритроциты с базофильной пунктацией (стрелка) у животных, пойманных весной. Масштабный отрезок 25 мкм. Окраска по Паппенгейму, масляная иммерсия.

Fig. 2. Muskrat erythrocytes: a — juvenile animals caught in autumn; arrow indicates oxyphilic normoblast; b — adult animals caught in autumn; arrow points to the cell with an inclusion (Howell-Jolly body); c — normocytes (arrow) in animals caught in spring; d — erythrocytes with basophilic stippling (arrow) in animals caught in spring. Scale bar, 25 μm . Stained after Romanowsky (May-Grünwald, Pappenheim), oil immersion.

би). Практически у всех изученных животных в цитоплазме эритроцитов обнаружены остатки ядерного вещества (тельца Жолли) в виде однородных темно-фиолетовых сферических структур (рис. 2, b).

При исследовании морфометрических параметров эритроцитов периферической крови ондатр были выявлены достоверные внутривидовые различия (рис. 3). Так, например, в осенний период площадь эритроцитов у молодых ондатр была больше, чем у взрослых животных, но весной у половозрелых особей данный показатель был аналогичен молодым ондатрам, отловленным в октябре. Необходимо отметить, что у молодых животных из осенней и взрослых особей из весенней выборок преобладали эритроциты больших размеров (45—

55 μm^2), а у взрослых ондатр, пойманных осенью — более мелкие клетки (35—45 μm^2) (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Возрастные изменения изученных показателей. Адаптивные изменения физиологических систем, участвующих в поддержании кислородного гомеостаза, у разных видов ныряющих млекопитающих обнаруживаются, как правило, на тех стадиях онтогенетического развития, которые приурочены к началу активного плавания и ныряния. В природе способность к нырянию у ондатр существенно не увеличивается с возрастом или размером тела, и одно-двух месячные ондатры демонстрируют продолжительность ныряния, схожую с взрослыми

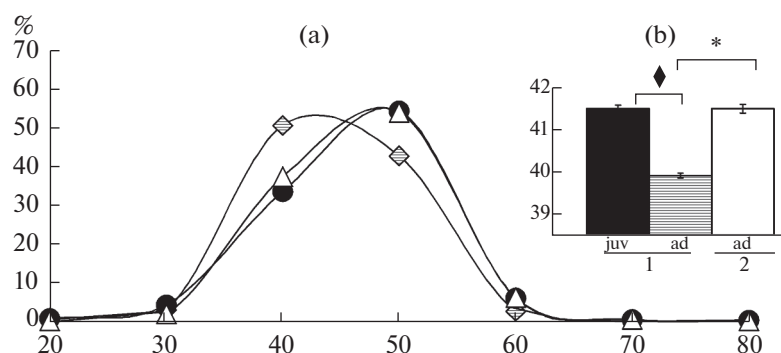


Рис. 3. Гистограмма распределения эритроцитов по площади (а) и ее средние значения (б) у ондатр разного возраста и сезона отлова. По вертикали — частота встречаемости эритроцитов определенного размера (%). По горизонтали — площадь поверхности эритроцита (мкм²); juv — молодые животные, ad — взрослые животные; ♦ — различия достоверны по сравнению с молодыми животными ($p < 0.05$); * — различия достоверны по сравнению с животными, отловленными весной ($p < 0.05$).

Fig. 3. Histogram of erythrocyte frequency distribution by their surface area (a) and its mean value ($M \pm SEM$) (b) in muskrats of different ages and caught in different seasons. Ordinate — occurrence frequency of erythrocytes of a certain size (%). Abscissa — erythrocyte surface area (μm²); juv — juvenile animals, ad — adult animals; ♦ — significant difference vs. juvenile animals ($p < 0.05$); * — significant difference vs. animals caught in spring ($p < 0.05$).

животными [6, 14]. Однако небольшой размер тела и низкая тепловая инерция ювенильных ондатр способствуют более частому водному переохлаждению и значительному снижению продолжительности погружения при гипотермии, по сравнению с половозрелыми особями [14]. Более того, из-за меньших запасов кислорода в скелетных мышцах молодые ондатры более зависимы от анаэробного метаболизма при нырянии [6] и, следовательно, уровень гипоксии тканей у них может быть выше, чем у тренированных животных. Именно в скелетной мышце мы обнаружили различия в антиоксидантной защите между животными разного возраста, отловленными осенью (рис. 1), — активность каталазы была выше у молодых ондатр, чем у взрослых. Возможно, это связано с более высоким уровнем миоглобина в скелетной мышце у последних [6]. Хорошо известно, что ныряющие млекопитающие отличаются от наземных видов более высоким содержанием миоглобина и сродством его к кислороду [5]. Помимо того, что миоглобин участвует в запасании кислорода, он, взаимодействуя с H₂O₂, обладает прямыми антиоксидантными свойствами [15].

Результаты других исследований свидетельствуют о гетерохронности возрастных изменений антиоксидантного статуса тканей ныряющих млекопитающих [3, 4]. Так, например, в скелетных мышцах тюленя-хохлача (*Cystophora cristata*, Erxleben 1777) обнаружено, что у взрослых особей содержание GSH, пероксиредоксинов, активности СОД и глутатионпероксидазы (ГПО) были выше, а каталазы и глутатионредуктазы (ГР) ниже, чем у детенышей [4]. При этом продукция супероксидного радикала (O₂^{•-}) увеличивалась, а уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ), карбонилированных белков

и повреждений ДНК не изменялся с возрастом у этого вида [3]. Авторы предполагают [3, 4], что внутриклеточная продукция пероксида водорода (H₂O₂) поддерживается на необходимом физиологическом уровне в процессе онтогенеза тюленя-хохлача, потому что ГПО и пероксиредоксины снижают базальный уровень H₂O₂, в то время как активность каталазы растет в ответ на увеличение концентрации H₂O₂. В исследовании на болотной бурозубке (*Sorex palustris* Richardson, 1828), мелком полуводном млекопитающем, было показано, что активность антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза, ГПО) в скелетных мышцах у взрослых была выше, чем у молодых, при этом с возрастом выявлено увеличение содержания только одного маркера окислительного стресса — ПОЛ [16]. Схожие данные были получены на неадаптированных к нырянию лабораторных крысах — активность антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза, ГПО и ГР) и уровень ПОЛ в скелетных мышцах также увеличивались в ходе онтогенеза [17].

Несмотря на то что большое значение в адаптациях морских млекопитающих играют низкомолекулярные антиоксиданты [2–4], в нашем исследовании не обнаружено достоверных изменений содержания α-токоферола и GSH в мышечной ткани у ондатры с возрастом (рис. 1). Это может быть связано либо со становлением антиоксидантной системы у ондатры к 5–6 мес, либо с различиями в стратегиях антиоксидантной защиты у ныряльщиков. Ранее нами была обнаружена видоспецифичность связанных с нырянием изменений активности антиоксидантных ферментов и содержания GSH [18]. Более того, в исследовании Cantú-Medellín et al. [2] было показано, что в тканях морских ныряльщиков с наибольшей продолжительностью

погружения (кашалоты, *Kogia* spp.) по сравнению с поверхностным ныряльщиком (афалина, *Tursiops truncatus* Montagu, 1821) образование $O_2^{\cdot-}$, общий уровень GSH и содержание маркеров окислительного стресса были выше, а активность СОД — ниже. Авторы предполагают, что высокая активность СОД в тканях афалин по сравнению с кашалотами может привести к увеличению продукции H_2O_2 , которая, в свою очередь, влечет за собой серию каскадных реакций ПОЛ [2].

Пероксид водорода, как и некоторые продукты ПОЛ через различные сигнальные пути могут модифицировать экспрессию гена основного регулятора эритропоэза — эритропоэтина. Известно, что продукция эритропоэтина почками и печенью увеличивается в ответ на тканевую гипоксию, снижение гематокрита, артериальную гипоксемию или повышение сродства гемоглобина к кислороду [19]. Предполагают, что у ныряльщиков тканевая гипоксия стимулирует синтез эритропоэтина, который впоследствии способствует образованию эритроцитов для увеличения запасов O_2 в крови [5, 20]. Несмотря на преимущества хранения O_2 в крови, повышенные уровни гематокрита и эритроцитов вызывают увеличение вязкости крови, рост артериального давления и скорости свертывания крови. Действительно, высокое количество эритроцитов редко встречается у мелких млекопитающих, генетически адаптированных к гипоксии. В период погружения и вазоконстрикции периферических сосудов вязкость крови, как и размер клеток крови, приобретают дополнительную значимость. В результате проведенного исследования не обнаружено различий по количеству полихроматофильных эритроцитов и нормобластов между молодыми и взрослыми ондатрами в осенний период, однако площадь эритроцитов у ювенильных ондатр была больше, чем у взрослых животных (рис. 3). Известно, что форма и размер эритроцитов связаны с газотранспортной функцией клеток, и, возможно, обнаруженное нами преобладание более мелких эритроцитов в крови у пойманных осенью взрослых ондатр необходимо для увеличения диффузионной поверхности клетки и эффективного обеспечения тканей кислородом [21].

Сезонные особенности изученных показателей. Сезонные колебания температуры и доступности пищи оказывают значительное влияние на поведение ондатр. На Северо-Западе России с сентября по октябрь у животных начинается подготовка к длительному подледному образу жизни. Ондатры перемещаются на более глубокие части водоемов с запасами растительности и строят зимние убежища с дополнительными кормовыми хатками. Многочисленные визуальные или с использованием биотелеметрии наблюдения позволили установить, что в безледный период животные активны в основном в сумеречно-ночное время, а подо льдом —

круглосуточно [7, 8]. Ондатры с ноября по апрель проводят в жилищах почти такое же время, что и в летние месяцы, однако в подледный период в хатках уровень CO_2 выше и может достигать 10%, а уровень O_2 снижаться до 18% [7, 8]. Лишь немногие виды в природе сталкиваются с более серьезными сезонными изменениями концентрации CO_2 в норах, чем *O. zibethicus* в северных широтах [7]. Зимой по сравнению с летним периодом ондатры более толерантны к повышению CO_2 во вдыхаемом воздухе: выявлено увеличение сродства гемоглобина к O_2 (улучшение связывания O_2 в легких) и изменение эффекта Бора (эффективная отдача O_2 в тканях) [5, 7]. Более того, в зимне-весеннее время ондатры реже покидают жилище, но при этом продолжительность погружений возрастает по сравнению с летом [5, 6]. Ранее было обнаружено [8], что у ондатр, отловленных в феврале, запасы кислорода в крови и мышечной ткани на 41.7% выше, чем у летних особей. Эти значительные изменения происходят за счет достоверного увеличения размеров сердца и легких, гематокрита, концентрации Hb, объема крови, кислородной емкости крови и содержания миоглобина в скелетных мышцах животных в зимний период [8]. Во время поисковых и кормовых погружений животного низкая температура воды зимой приводит к усилению вазоконстрикции периферических сосудов и, как следствие, к гипоксии тканей и возможному окислительному стрессу. В результате нашего исследования выявлена сезонная изменчивость активности антиоксидантных ферментов у ондатр: в сердце активность каталазы, а в скелетной мышце активность СОД повышались к весне. Наряду с этим уровень низкомолекулярных антиоксидантов (α -токоферол и GSH) как в сердечной, так и скелетной мышце был выше у животных, пойманных осенью, по сравнению с особями из весенней выборки. Более низкое содержание α -токоферола в мышечных тканях ондатр, отловленных весной, может быть следствием ухудшения качества растительной пищи в этот период, а обнаруженная тканеспецифичность сезонных изменений активности ферментов — с различиями в энергообеспечении сердечной и скелетной тканей. При продолжительном нырянии грызунов ток крови перенаправляется в коронарные, бронхиальные и церебральные артерии и наблюдаются уменьшение притока крови к скелетным мышцам и дефицит O_2 [22], что приводит к увеличению в крови количества лактата, вырабатываемого в мышцах в результате анаэробного гликолиза. Схожие изменения в лактатдегидрогеназной системе выявлены при интенсивных физических нагрузках млекопитающих, в том числе у человека [23]. Необходимо отметить, что эритроциты участвуют в транспортировке лактата от клеток-продуцентов к клеткам-потребите-

лям, причем роль этих клеток возрастает у тренированных людей [23].

Ранее было показано увеличение запасов O_2 в крови у ондатр в зимний период [6–8], в том числе за счет повышения гематокрита и количества эритроцитов, также отмечено уменьшение объема эритроцитов у зимних животных по сравнению с летними [6]. В нашем исследовании мы не выявили активизации эритропоэза у ондатр (судя по количеству полихроматофильных эритроцитов), отловленных весной. Однако средний диаметр и площадь эритроцитов у них были выше, чем у взрослых животных осенью. Обнаруженные противоречия могут быть связаны со временем сбора проб, так, в исследованиях MacArthur и соавторов ондатр отлавливали в январе и феврале, когда температура воздуха была значительно ниже 0°C [6, 8]. Возможно, что более мелкие эритроциты у ондатр зимой способствуют повышению респираторной функции крови [21]. Данные результаты подтверждаются и другими исследованиями [24, 25]: у мелких грызунов (*Mus musculus* и *Myodes glareolus* Schreber, 1780) также были обнаружены увеличение кислородной емкости крови и уменьшение размеров эритроцитов в зимний период. Однако весной диаметр эритроцитов у этих видов увеличивался и достигал максимума в летние месяцы. Темботова с соавт. предполагают [25], что процесс замещения мелких эритроцитов, имеющих в кровотоке у грызунов в зимний период на крупные в летний сезон, происходит постепенно в течение 3–4 мес, начиная с конца зимы, а противоположное явление наблюдается осенью, начиная с конца лета. В нашем исследовании мы также обратили внимание на наличие эритроцитов разных размеров в препаратах крови ондатр, отловленных весной (рис. 2, с).

Интересно, что в некоторых работах на морских млекопитающих отмечено стимулирующее влияние продолжительности и глубины погружения на средний объем эритроцита. Например, ранее было обнаружено, что только один гематологический показатель (средний объем эритроцита) положительно коррелирует с максимальной продолжительностью погружения, развивающейся в ходе онтогенеза обыкновенного тюленя (*Phoca vitulina* L., 1758) [20]. Схожая зависимость наблюдалась при искусственном вскармливании детенышей южных слонов (*Mirounga leonina* L., 1758), у которых с началом активных погружений (возраст 3 недели) происходило увеличение среднего объема эритроцита [26]. Тем не менее у диких детенышей обыкновенного тюленя не обнаружено значительного увеличения среднего объема эритроцита в раннем постнатальном онтогенезе [27]. Согласно данным литературы, более крупные эритроциты чаще подвержены деформируемости, что обусловлено несколькими параметрами, в частности, такими как отношение площади поверхности клетки к ее объему и эластичность клеточной мембраны [28].

При этом немаловажную роль в этих процессах играет α -токоферол, который является необходимым компонентом мембран эритроцитов и, участвуя в антиоксидантной защите, увеличивает их структурно-функциональную стабильность. Наряду с этим было показано, что особое значение α -токоферол имеет при гипотермии, способствуя снижению окислительного стресса [29]. Учитывая указанные факты и снижение в тканях ондатры в весенний период уровня α -токоферола, можно сделать предположение о высокой устойчивости эритроцитов. В исследуемых нами образцах крови признаков деформированности и изменения морфологии поверхности эритроцитов, как правило, не обнаружено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования выявлены незначительные различия в антиоксидантной защите мышечной ткани между молодыми и взрослыми животными в осенний период, что, возможно, связано со становлением антиоксидантной системы. У животных из осенней выборки установлено преобладание более мелких эритроцитов в крови у взрослых ондатр по сравнению с ювенильными животными, что, вероятно, необходимо для увеличения диффузионной поверхности клетки. При изучении сезонных изменений антиоксидантного статуса мышечной ткани у этого полуводного вида отмечены снижение содержания низкомолекулярных антиоксидантов и тканеспецифическое увеличение активности антиоксидантных ферментов к весне. Несмотря на обнаруженные ранее многочисленные приспособления ондатр к зимним условиям обитания [6–8], весной нами в периферической крови ондатр не выявлено активизации эритропоэза: эритроциты представлены, как правило, зрелыми формами, при этом их средняя площадь была выше, чем у взрослых особей в осенний период.

Таким образом, возрастные и сезонные изменения антиоксидантной защиты сердечной и скелетной мышцы и морфометрических параметров эритроцитов, по-видимому, являются компенсаторными механизмами у адаптированной к полуводному образу жизни ондатры. Полученные результаты дополняют имеющиеся сведения по регуляции поддержания постоянства внутренней среды ныряющих млекопитающих, однако существует еще много нерешенных вопросов в этой области исследований, в частности, большое значение приобретают молекулярно-генетические механизмы активации антиоксидантной системы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального ис-

следовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”. Авторы выражают признательность сотрудникам лаборатории зоологии ИБ КарНЦ РАН В.В. Белкину, А.Е. Якимовой, К.Ф. Тирро-нену и Д.В. Панченко за помощь в отлове животных в природе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0218-2019-0073).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Allen K.N., Vázquez-Medina J.P. Natural tolerance to ischemia and hypoxemia in diving mammals: a review. *Front. Physiol.* 10: 1–10. 2019. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01199>
2. Cantú-Medellín N., Byrd B., Hohn A., Vázquez-Medina J.P., Zenteno-Savín T. Differential antioxidant protection in tissues from marine mammals with distinct diving capacities. Shallow/short vs. deep/long divers. *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* 158: 438–443. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.029>
3. Vázquez-Medina J.P., Olguín-Monroy N.O., Maldonado P.D., Santamaría A., Königsberg M., Elsner R., Hammill M.O., Burns J.M., Zenteno-Savín T. Maturation increases superoxide radical production without increasing oxidative damage in the skeletal muscle of hooded seals (*Cystophora cristata*). *Can. J. Zool.* 89: 206–212. 2011. <https://doi.org/10.1139/Z10-107>
4. Vázquez-Medina J.P., Soñanez-Organis J.G., Burns J.M., Zenteno-Savín T., Ortiz R.M. Antioxidant capacity develops with maturation in the deep-diving hooded seal. *J. Exp. Biol.* 214: 2903–2910. 2011. <https://doi.org/10.1242/jeb.057935>
5. MacArthur R.A., Weseen G.L., Campbell K. L. Diving experience and the aerobic dive capacity of muskrats: does training produce a better diver? *J. Exp. Biol.* 206: 1153–1161. 2003. <https://doi.org/10.1242/jeb.00221>
6. MacArthur R.A., Humphries M.M., Fines G.A., Campbell K. L. Body oxygen stores, aerobic dive limits, and the diving abilities of juvenile and adult muskrats (*Ondatra zibethicus*). *Physiol. Biochem. Zool.* 74: 178–190. 2001. <https://doi.org/10.1086/319662>
7. MacArthur R.A. Seasonal changes in hematological and respiratory properties of muskrat (*Ondatra zibethicus*) blood. *Can. J. Zool.* 62 (4): 537–545. 1984. <https://doi.org/10.1139/z84-080>
8. MacArthur R.A. Seasonal changes in the oxygen storage capacity and aerobic dive limits of the muskrat (*Ondatra zibethicus*). *J. Comp. Physiol. B.* 160: 593–599. 1990. <https://doi.org/10.1007/BF00258987>
9. 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.* 247: 3170–3175. 1972.
10. Beers R.F., Sizer I.N. A spectral method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195 (1): 133–140. 1952.
11. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1): 265–275. 1951.
12. Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total, protein-bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25: 192–205. 1968. DOI: (68)90092-4. <https://doi.org/10.1016/0003-2697>
13. Скурихин В.Н., Двинская Л.М. Определение α -токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии. С.-хоз. биол. 4: 127–129. 1989. [Skurikhin V.N., Dvinskaya L.M., Determination of α -tocopherol and retinol in blood plasma of agricultural animals by microcolumn highperformance liquid chromatography. S.-kh. Biol. 4: 127–129. 1989. (In Russ)]
14. 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., Part A: Mol. Integr. Physiol.* 144: 232–241. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.001>
15. Hendgen-Cotta U.B., Kelm M., Rassaf T. Myoglobin functions in the heart. *Free Radic. Biol. Med.* 73: 252–9. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.005>
16. Hindle A.G., Lawler J.M., Campbell K.L. et al. Muscle aging and oxidative stress in wild-caught shrews. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 155 (4): 427–434. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.01.007>
17. Ji L.L., Dillon D., Wu E. Alteration of antioxidant enzyme with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.* 258: 918–923. 1990. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1990.258.4.R918>
18. Sergina S., Antonova E., Ilyukha V., Łapiński S., Lis M., Niedbala P., Unzhakov A., Belkin V. Biochemical adaptations to dive-derived hypoxia/reoxygenation in semi-aquatic rodents. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 2015. Vol. 190. P. 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.08.012>
19. Ratcliffe P.J., Ebert B.L., Firth J.D., Gleadle J.M., Maxwell P.H., Nagao M., et al. Oxygen regulated gene expression: erythropoietin as a model system. *Kidney Int.* 51: 514–526. 1997. <https://doi.org/10.1038/ki.1997.72>

20. Thomas A., Ono K. Diving related changes in the blood oxygen stores of rehabilitating harbor seal pups (*Phoca vitulina*). PLoS One. 10 (6): 1–16. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128930>
21. Holland R.A., Forster R.E. The effect of size of red cells on the kinetics of their oxygen uptake. J. Gen. Physiol. 49 (4): 727–42. 1966. <https://doi.org/10.1085/jgp.49.4.727>
22. Галанцев В.П., Камардина Т.А., Коваленко Р.И. Реакции сердечно-сосудистой системы и биоэнергетический метаболизм в связи с адаптацией к апноэ. Физиол. ж. им. И.М. Сеченова. 80 (90): 117–123. 1994. [Galancev V.P., Kamardina T.A., Kovalenko R.I. Cardiovascular system reactions and bioenergy metabolism in relation to adaptation to apnea. Fiziol. Zh. im. I.M. Sechenova. 80 (90): 117–123. 1994. (In Russ)].
23. Opitz D., Lenzen E., Opiolka A., Redmann M., Hellmich M., Bloch W., Brixius K., Brinkmann C. Endurance training alters basal erythrocyte MCT-1 contents and affects the lactate distribution between plasma and red blood cells in T2DM men following maximal exercise. Can. J. Physiol. Pharmacol. 93 (6): 413–9. 2015. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0467>
24. Tarakhtii E.A., Davydova Yu.A. Seasonal variation in hematological indices in bank vole (*Clethrionomys glareolus*) in different reproductive states // Biology Bulletin. 34 (1): C. 9–19. 2007. <https://doi.org/10.1134/S1062359007010025>
25. Темботова Э.Ж., Емкушева М.М., Темботова Ф.А. Сезонная динамика показателей периферической крови домового мыши (Mammalia, Rodentia) в горах Центрального Кавказа. Вестник Адыгейского государственного университета. Сер. Естественно-математические и технические науки. 4 (147): 71–76. 2014. [Tembotova E.Z., Emkuzheva M.M., Tembotova F.A. Seasonal dynamics of house mouse (Mammalia, Rodentia) blood parameters under mountain conditions of the Central Caucasus. Vestnik Adygeyskogo gosudarstvennogo universiteta. Ser. Yestestvenno-matematicheskiye i tekhnicheskiye nauki. 4 (147): 71–76. 2014. (In Russ)].
26. Bryden M., Lim G. Blood parameters of the southern elephant seal (*Mirounga leonina*) in relation to diving. Comp. Biochem. Physiol. 28: 139–148. 1969. DOI: (69)91328-0. <https://doi.org/10.1016/0010-406X>
27. Clark C.A., Burns J.M., Schreer J.F., Hammill M.O. A longitudinal and cross-sectional analysis of total body oxygen store development in nursing harbor seals (*Phoca vitulina*). Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol. 177: 217–27. 2007. <https://doi.org/10.1007/s00360-006-0123-6>
28. Novozhilov A.V., Katyukhin L.N. Dynamics of hematological blood parameters of white rats in postnatal ontogenesis. J. Evol. Biochem. Physiol. 44 (6): 724–734. 2008. <https://doi.org/10.1134/S0022093008060094>
29. Klichkhanov N.K., Ismailova J.G., Astaeva M.D., Chalabov Sh.I. Influence of vitamins C and E on free radical processes in blood rats in acute moderate hypothermia. Biology Bulletin. 46: 536–543. 2020. <https://doi.org/10.1134/S1062359019060086>

AGE-RELATED AND SEASONAL CHANGES IN MUSCLE ANTIOXIDANT DEFENSE AND ERYTHROCYTE MORPHOMETRIC PARAMETERS OF A MUSKRAT *ONDATRA ZIBETHICUS*

E. P. Antonova^{a, #}, V. A. Ilyukha^a, A. G. Kizhina^a, L. B. Uzenbaeva^a, E. A. Khizhkin^a,
S. N. Kalinina^a, I. V. Baishnikova^a, and E. F. Pechorina^a

^a Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia

[#]e-mail: antonova88ep@mail.ru

During adaptation to a semi-aquatic mode of life, the muskrat (*Ondatra zibethicus*) developed numerous biochemical adaptations to maintain homeostasis. The aim of the study was to explore age-related and seasonal changes in muscle tissue antioxidant defenses and erythrocyte morphometric parameters in the muskrat. Animals were caught in autumn (juveniles and adults) and spring (adults) in the North-West of Russia (Republic of Karelia). Some physiological and biochemical parameters of animals caught in autumn showed an age-related variability: in adult animals (most adapted to diving), as compared to juveniles, catalase activity in skeletal muscles was lower, while the respiratory function of blood was higher (due to a lower total surface area of erythrocytes). Adult muskrats demonstrated seasonal changes in some parameters studied: in spring, activities of catalase in the heart and superoxide dismutase in skeletal muscles were higher, while levels of low-molecular-weight antioxidants (α -tocopherol and glutathione) both in cardiac and skeletal muscles were lower, compared to animals caught in autumn. After a long winter (ice-fishing) season, the blood of animals caught in spring contained mainly mature erythrocyte forms (normocytes), with their average diameter and surface area being larger than in adult muskrats caught in autumn. Our findings, as well as data obtained on other species, support the involvement of the antioxidant system and erythrocytes in the mechanisms that maintain oxygen homeostasis in diving mammals.

Keywords: *Ondatra zibethicus*, adaptation, hypoxia, diving, antioxidant system, erythrocytes