

УДК 57.02

## **Влияние нанобиокомпозита, полученного механохимическим синтезом из неплодовых частей облепихи, на сезонные адаптивные перестройки у джунгарских хомячков**

Д. В. ПЕТРОВСКИЙ<sup>1</sup>, В. В. МАК<sup>1</sup>, А. В. РОМАЩЕНКО<sup>1</sup>, Г. В. КОНЦЕВАЯ<sup>1</sup>, И. Е. КОЛОСОВА<sup>1</sup>, О. И. ЛОМОВСКИЙ<sup>2</sup>, П. ОДОНМАЖИГ<sup>4</sup>, Ж. АМГАЛАН<sup>4</sup>, М. П. МОШКИН<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск 630090 (Россия)

E-mail: dm\_petr@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup>Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения РАН, ул. Кутателадзе, 18, Новосибирск 630128 (Россия)

E-mail: lomov@solid.nsc.ru

<sup>3</sup>Томский государственный университет, ул. Ленина, 36, Томск 634050 (Россия)

E-mail: mmp@bionet.nsc.ru

<sup>4</sup>Институт химии и химической технологии АНМ, проспект Мира, 54-26, Уланбатор (Монголия)

E-mail: j\_amgalan@yahoo.com

(Поступила 28.12.11; после доработки 27.01.12)

### **Аннотация**

Исследовано влияние нанобиокомпозита, полученного методом твердофазного механохимического синтеза из неплодовых частей облепихи (серотонинсодержащий порошок на основе облепихи, ССПО), на иммунофизиологический статус джунгарских хомячков во время осеннего сокращения фотопериода. Показано, что добавка к пище ССПО в составе творага не влияет на количество потребляемого животными творага; не отменяет основные морфологические изменения, развивающиеся у животных при сокращении светового дня; не влияет на степень линьки животного. В то же время добавка ССПО способствует достоверному снижению массы тела, росту спонтанной активности животных в первые четыре недели эксперимента, сохранению “летнего типа” терморегуляции (большие затраты энергии на компенсацию воздействия холодом и преобладание химического термогенеза) и повышению гуморального иммунного ответа на введение эритроцитов барана.

**Ключевые слова:** серотонинсодержащий порошок, 5-гидрокситриптамин, облепиха, джунгарские хомячки, сезонные изменения, гуморальный иммунитет, энергообмен, спонтанная двигательная активность

### **ВВЕДЕНИЕ**

Для России, ВВП которой во многом зависит от эксплуатации северных месторождений, поддержание здоровья и работоспособности жителей приполярных и заполярных районов является не только социально, но и эконо-

мически значимой проблемой. Среди факторов, влияющих на психофизическое благополучие человека, существенное место занимает зимнее сокращение продолжительности светового дня, физиологические эффекты которого не может компенсировать искусственное освещение [1–3]. Это обусловлено

чрезвычайно высоким порогом чувствительности к световому воздействию нейрогормональных систем, регулирующих суточные ритмы физиологических функций. Ключевую роль в фотопериодической синхронизации биоритмов человека и других млекопитающих играет ночная секреция мелатонина. Однако, если для ее подавления для большинства видов животных достаточно 10–400 люкс [4], то необходимая интенсивность освещения для человека превышает 2000 люкс и сопоставима с освещенностью в ясный солнечный день [5]. Вместе с тем, согласно гигиеническим нормативам, освещенность наиболее ответственных рабочих зон составляет около 700 люкс, а интенсивность бытового освещения не превышает 300 люкс [6].

Как следствие, у жителей Крайнего Севера или Антарктиды наблюдаются сезонные нарушения временной координации физиологических процессов (сезонные десинхронозы), сочетающиеся с изменениями обмена веществ и ряда психофизиологических процессов [3, 7]. Среди многообразия морфофункциональных отклонений, совпадающих по времени с наступлением полярной ночи, роль фотопериода однозначно доказана для сезонных аффективных расстройств (САР) – особой формы депрессии, характеризующейся снижением умственной и физической работоспособности, подавленным настроением, сонливостью и повышенным аппетитом [8, 9]. Согласно статистическим данным американских исследователей [10], частота проявлений САР возрастает пропорционально географической широте. В основе САР лежит обусловленное “световым дефицитом” нарушение баланса мелатонина и его предшественника – серотонина [11, 12]. Применение серотонинсодержащих препаратов в качестве самостоятельного профилактического средства или в сочетании со “светотерапией” снимает депрессивное состояние у многих пациентов [13, 14], но эти препараты применяют уже на стадии клинического проявления САР.

Возможно, более значимых результатов удастся достичь при воздействии на процессы обмена серотонина и мелатонина до начала формирования депрессивных симптомов. Однако широкое применение профилактических средств на основе серотонина ограниче-

но их высокой себестоимостью при производстве путем традиционного органического синтеза. Вместе с тем серотонин содержится в значительных количествах во многих видах растений, в частности в облепихе *Hippophae rhamnoides*, причем в неплодовых частях его содержание значительно больше, чем в ягодах [15]. Из побегов облепихи в Институте химии твердого тела и механохимии СО РАН (Новосибирск) методом твердофазного механохимического синтеза получен нанобиокомпозит – серотонинсодержащий порошок на основе облепихи (ССПО), который содержит водорастворимые соли 5-гидрокситриптамина (серотонин) и его производные [16].

Прямая экспериментальная проверка профилактики САР при применении серотонинсодержащих препаратов невозможна из-за отсутствия адекватных генотипов лабораторных животных, у которых депрессия формируется под влиянием сокращающегося фотопериода. О перспективности ССПО можно судить по результатам изучения сезонных перестроек на фоне этого препарата у видов животных с ярко выраженной фотопериодической регуляцией годовых биоритмов. К таким видам относится джунгарский хомячок *Phodopus sungorus*, который обитает в Западной Сибири и используется в качестве природного ресурса для биологических исследований в научных институтах Москвы, Германии и США. Для формирования комплекса морфофункциональных изменений, наблюдаемых у хомячков в осенний период, достаточно обеспечить сокращение продолжительности светового дня [17]. При этом регистрируется сезонная смена мехового покрова, инволюция гонад, изменение терморегуляции, подавление иммунитета [18–21].

Цель данного исследования – оценка влияния ССПО на процессы сезонной морфофункциональной перестройки у джунгарских хомячков при переходе от осеннего периода к зимнему. У половозрелых самцов исследованы следующие показатели, подверженные годовым колебаниям: изменения массы тела и массы генеративных органов, окраска шерстного покрова, суточные ритмы двигательной активности, показатели терморегуляции и гуморального иммунитета.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводились с 18 октября по 27 декабря 2011 г. Возраст самцов джунгарских хомячков *Phodopus sungorus* составлял 4–6 мес. До начала эксперимента животных в количестве 20 особей случайным образом разделяли на две группы (по 10 особей в каждой) и рассаживали в индивидуальные клетки, где они содержались в течение всего эксперимента в стандартных условиях вивария при естественном фотопериоде. Пищу (брикетированный корм фирмы “Чара”) и воду животные получали *ad libitum*. Подстилку (древесные опилки) меняли один раз в две недели.

В течение первых 7 сут (неделя 0, подготовительный этап) в дополнение к основному рациону все животные получали обезжиренный творог в количестве 3 г на животное, 5 раз в неделю, в 16.00–17.00 ч, при переходе от светлого времени суток к темному. В дальнейшем (недели 1–10) одна группа животных (контрольная группа, К) продолжала получать творог, а другая (экспериментальная группа, ССПО) – творог с добавкой ССПО. Использование творога с добавкой мелкоизмельченных обжаренных ядер семян подсолнечника, как предпочитаемых хомячками продуктов, позволяло не только дозированно вводить ССПО в рацион животных, но и контролировать количество потребляемой добавки. Пищевую добавку готовили в два этапа. Сначала 57 г обезжиренного творога смешивали с 3 г семечек и 30 г этой смеси использовали для кормления животных контрольной группы. Из оставшейся смеси брали 27 г и добавляли 3 г порошка ССПО, смесь тщательно перемешивали и использовали для кормления животных экспериментальной группы. Серотонинсодержащий порошок на основе облепихи содержит около 1 % 5-гидрокситриптамина [15]. В нашем исследовании дневная порция ССПО составляла 0.3 г для одного хомячка, что соответствует 3 мг 5-гидрокситриптамина. У всех животных регулярно контролировали потребление пищевой добавки путем взвешивания несъеденной части, оставшейся через 30 мин после начала кормления.

Для контроля линьки один раз в две недели с помощью цифрового фотоаппарата Canon фотографировали дорзальную часть тела жи-

вотных при стандартном освещении и стандартных значениях выдержки и диафрагмы. На полученных снимках с помощью встроенных функций программы для работы с цифровыми изображениями ImageJ определяли показатель серого цвета по всему телу (градации от 0 до 255): чем выше значения показателя, тем светлее шерсть и, соответственно, тем больше степень линьки животного.

Активность животных регистрировали непрерывно в течение всего эксперимента с использованием разработанной Д. В. Петровским системы автоматического мониторинга, основу которой составляли подключенные к компьютеру инфракрасные датчики движения; фиксировали суммарную активность за каждые 10 мин наблюдения.

На 9-й неделе эксперимента у всех животных исследовали функциональное состояние кардиореспираторной системы, оценивая максимальную аэробную производительность (МАП) по потреблению кислорода в тесте (охлаждение животных в течение 15 мин в гелиево-кислородной (80 : 20) среде (heliox) при температуре 8–10 °С) [22]. Животных помещали в аппарат, который каждую минуту автоматически регистрировал количество потребляемого животным кислорода. С помощью встроенного в аппарат специального термометра измеряли ректальную температуру тела животных (термометр вводили в прямую кишку на глубину 17 мм) до и после теста. На основании данных тестирования рассчитывали суммарные энергетические потери  $\Delta E$  у животных за время теста по формуле

$$\Delta E = OSk_e + \Delta TCM/1000$$

где  $OS$  – суммарное потребление кислорода за время теста, мл  $O_2$ ;  $k_e$  – пересчетный коэффициент, равный 20.36 Дж/мл  $O_2$  [23];  $\Delta T$  – изменение ректальной температуры за время теста;  $C$  – удельная теплоемкость, принятая равной теплоемкости воды, составляет 4200 Дж/(К · кг);  $M$  – масса тела животных, г. Удельные суммарные энергетические потери определяли как отношение суммарных энергетических потерь животного к его массе тела:  $\Delta E/M$ . Теплопроводность тела животных  $TC$  рассчитывали по формуле

$$TC = \Delta E / (t\Delta T_a M)$$

где  $t$  – продолжительность теста, с;  $\Delta T_a$  – разность между ректальной температурой

животного после теста и температурой в камере тестирования, которая поддерживалась постоянно в течение теста, °С.

Через 1 сут после определения аэробной производительности у животных оценивали величину гуморального иммунного ответа на стандартную дозу антигена. С этой целью им вводили внутрибрюшинно эритроциты барана (ЭБ): 0.5 мл 2 %-й суспензии ЭБ, содержащей  $4 \cdot 10^8$  кл./мл. На пике иммунной реакции (5-е сут после введения ЭБ) зверьков умерщвляли методом цервикальной дислокации и оценивали количество антителообразующих клеток селезенки (АОК) методом локального гемолиза в жидкой среде [24]. Показатели крови исследовали с использованием автоматического гематологического анализатора Nema-Screen18 (Hospitex Diagnostics, Италия).

Для статистической обработки данных использовали двухфакторный дисперсионный анализ. Средние значения приведены со стандартной ошибкой. Для нормально распределенных признаков влияние контролируемых факторов на изучаемые показатели оценивали с помощью многофакторного дисперсионного анализа ANCOVA. Для сравнения частот применяли критерий Yates corrected  $\chi^2$ . Два средних значения нормально распределенных признаков сравнивали по *t*-критерию Стьюдента, ненормально распределенных – с помощью критерия Манна – Уитни.

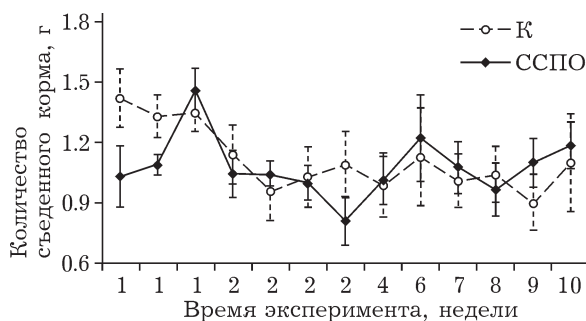


Рис. 1. Потребление пищевой добавки животными контрольной (К) и экспериментальной (ССПО) групп в течение эксперимента (в 1-ую неделю потребление пищи контролировали в течение 3 сут, во 2-ую – в течение 4 сут, в последующие – 1 раз в неделю).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что количество творога, съеденного животными через 30 мин после начала кормления, не зависит от добавки ССПО (рис. 1). Согласно данным двухфакторного дисперсионного анализа, ни группа животных, ни день эксперимента, ни взаимодействие этих факторов не влияют на количество съеденной пищевой добавки:  $F_{1,219} = 0.37$ ;  $p = 0.55$ ;  $F_{12,219} = 0.31$ ;  $p = 0.10$ ;  $F_{12,219} = 0.15$ ;  $p = 0.73$  соответственно. В среднем животные контрольной и экспериментальной групп потребляли творога с добавкой ССПО в количестве  $(1.11 \pm 0.04)$  и  $(1.08 \pm 0.04)$  г/сут соответственно. При таком потреблении ССПО хомячки получали 0.11 мг серотонина в сутки. Выживаемость животных группы К составила 100 %, группы ССПО – 70 %. В разные сроки от начала эксперимента умерло три хомячка (7/10), но межгрупповые различия в смертности животных были не достоверны: Yates corrected  $\chi^2 = 1.57$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.21$ .

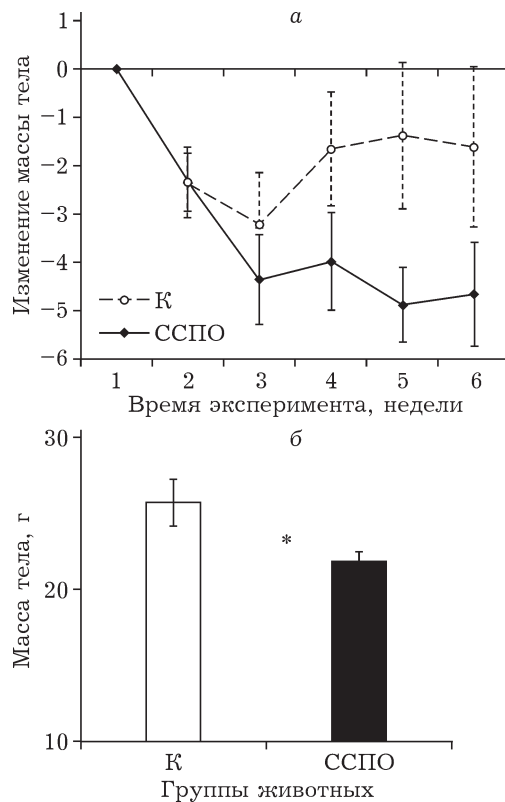


Рис. 2. Динамика массы тела у животных контрольной (К) и экспериментальной (ССПО) групп: а – изменение массы, б – масса тела при забое. \*  $p = 0.04$  – достоверные различия между группами (критерий Манна – Уитни).

На фоне изменения продолжительности светового дня у животных обеих групп развивались типичные сезонные морфофункциональные изменения. В частности, отмечалось осветление шерстного покрова (влияние времени регистрации  $F_{5,99} = 11.25$ ;  $p = 0.001$ ), одинаково выраженное в обеих группах ( $F_{1,99} = 0.09$ ;  $p = 0.76$ ). В то же время наблюдаются различия в изменениях массы тела (рис. 2, а). Так, согласно данным двухфакторного дисперсионного анализа, добавка ССПО способствует более быстрому снижению массы по сравнению с контролем ( $F_{1,85} = 8.04$ ;  $p = 0.006$ ), что проявляется в достоверных различиях между группами при взвешивании в конце эксперимента (см. рис. 2, б).

Использование установки для автоматической регистрации двигательной активности позволило изучить спонтанную двигательную активность у животных в течение всего эксперимента. В связи с тем, что хомячки ведут ночной образ жизни, у них анализировали изменение средненочной активности за неделю. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил влияние добавки ССПО на активность животных ( $F_{1,135} = 5.96$ ;  $p = 0.02$ ); эффекты времени и взаимодействия факторов были не достоверными ( $F_{7,135} = 1.54$ ;  $p = 0.16$  и  $F_{7,135} = 1.08$ ;  $p = 0.38$  соответственно). В первые недели животные экспериментальной группы (ССПО) демонстрировали подъем активности, достигавший пиковых значений на 1–4-й неделе от начала эксперимента (рис. 3). У хомячков контрольной группы активность практически не изменялась.

Добавка ССПО в пищу существенно влияет на энергетический обмен животных в тесте охлаждения в гелиево-кислородной среде

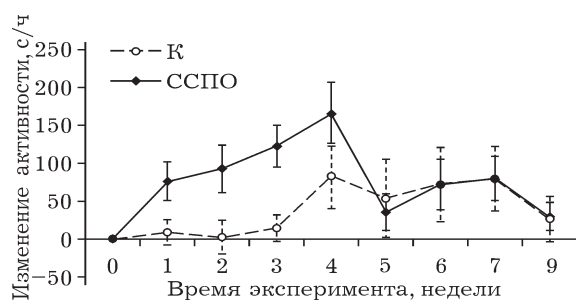


Рис. 3. Динамика изменения спонтанной активности (средненочной за неделю) у животных контрольной (К) и экспериментальной (ССПО) групп.

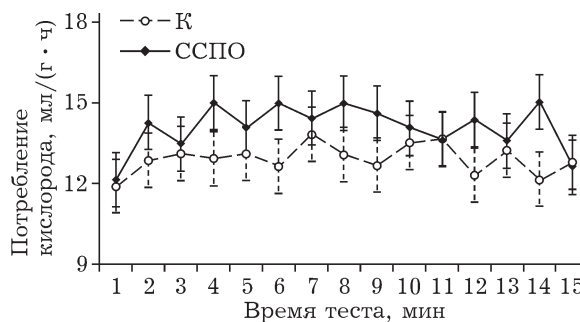


Рис. 4. Динамика потребления кислорода в тесте охлаждения в гелиево-кислородной среде в течение 15 мин у животных контрольной (К) и экспериментальной (ССПО) групп.

при температуре 8–10 °С в течение 15 мин. Дисперсионный анализ с повторными измерениями (ANOVA repeated measure) показал статистически значимое влияние добавки ССПО на потребление кислорода в течение теста ( $F_{1,240} = 14.56$ ;  $p = 0.001$ ; рис. 4). Наряду с общим более высоким энергообменом, у животных, получавших ССПО, наблюдали достоверно меньше кратковременных (1–2 мин) снижений энергетического метаболизма в течение теста. Это выражалось в том, что минимальные значения потребления кислорода со 2-й по 14-ую минуту теста составляли ( $10.9 \pm 0.8$ ) и ( $8.5 \pm 0.7$ ) мл/г массы тела для животных экспериментальной и контрольной групп соответственно ( $p = 0.03$ , критерий Манна – Уитни). Расчет удельных энергетических потерь показал, что у животных экспериментальной группы (рис. 5, а) они возрастают, и это может быть связано с повышением теплопроводности тела (см. рис. 5, б). При этом у хомячков данной группы температура тела после теста была достоверно ниже по сравнению с животными контрольной группы (см. рис. 5, в). Корреляции между изменением температуры тела хомячков и потреблением ими кислорода в ходе теста также в значительной степени зависели от добавки ССПО в пищу. Если у животных контрольной группы не выявлено достоверной взаимозависимости между этими показателями (рис. 6, а), то у животных экспериментальной группы изменение температуры достоверно коррелировало с потреблением кислорода (см. рис. 6, б). Наибольшее потребление кислорода в течение теста отмечено у животных с минимальным снижением температуры. Вся совокуп-

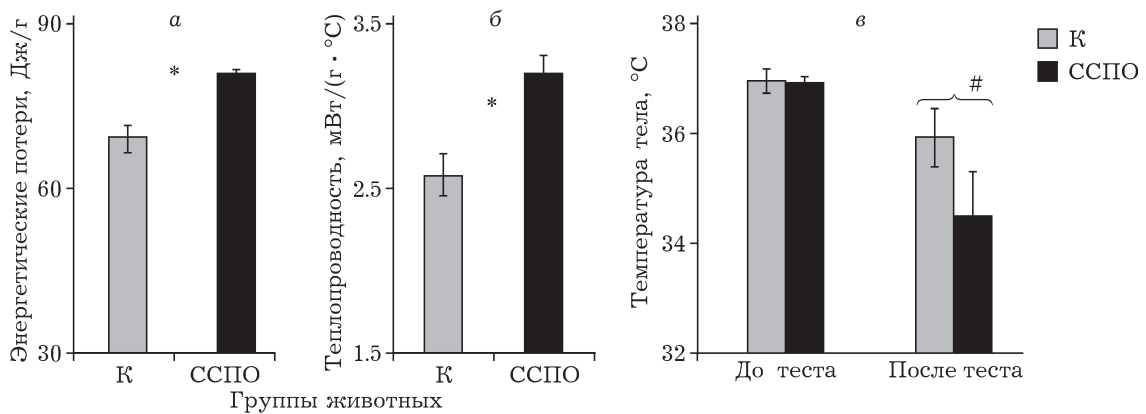


Рис. 5. Энергетические потери у животных контрольной (К) и экспериментальной (ССПО) групп в тесте охлаждения в гелиево-кислородной среде в течение 15 мин: а – суммарные энергетические потери за время теста; б – теплопроводность тела; в – температура тела до и после теста. \* $p = 0.005$ ; #  $p = 0.02$  – достоверные различия между группами ( $t$ -тест Стьюдента).

ность данных свидетельствует о разных механизмах регуляции температуры тела у животных сравниваемых групп. У хомячков, получавших добавку ССПО, образование тепла усиливается путем интенсификации обменных процессов, т. е. преобладает характерный для лета “химический” термогенез. У животных контрольной группы наблюдается более адекватная для зимнего времени “физическая” терморегуляция, осуществляемая путем изменения отдачи тепла организмом.

Согласно результатам исследований, показатели “красной” крови (количество эритроцитов, средний объем эритроцита, гематокрит, уровень гемоглобина, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците) и “белой” крови (количество лейкоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов, тромбоцитов, тромбоциты) у животных исследованных групп не отличались.

Для активации специфического иммунного ответа использовали внутрибрюшинное

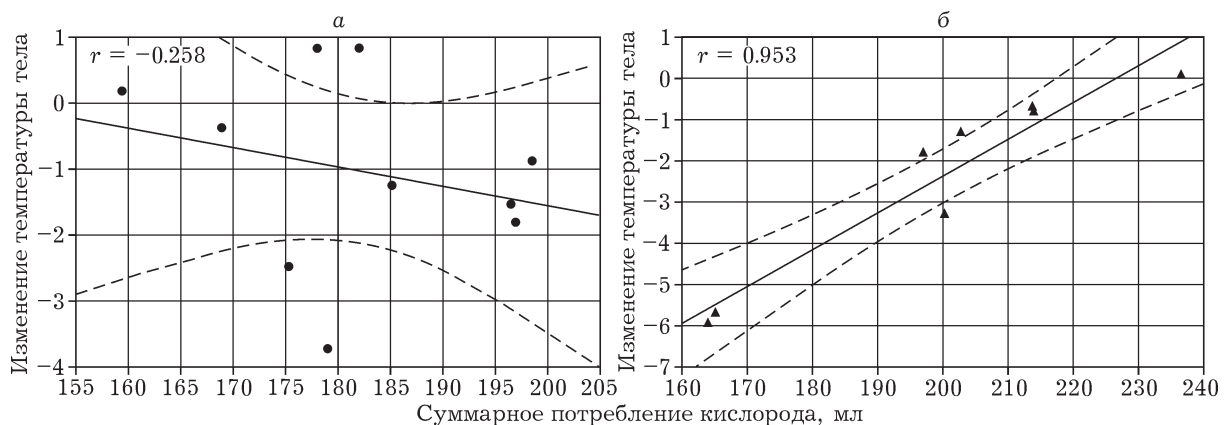


Рис. 6. Корреляции между изменением температуры тела и потреблением кислорода в ходе теста охлаждения в гелиево-кислородной среде в течение 15 мин у животных контрольной (а) и экспериментальной (б) групп.

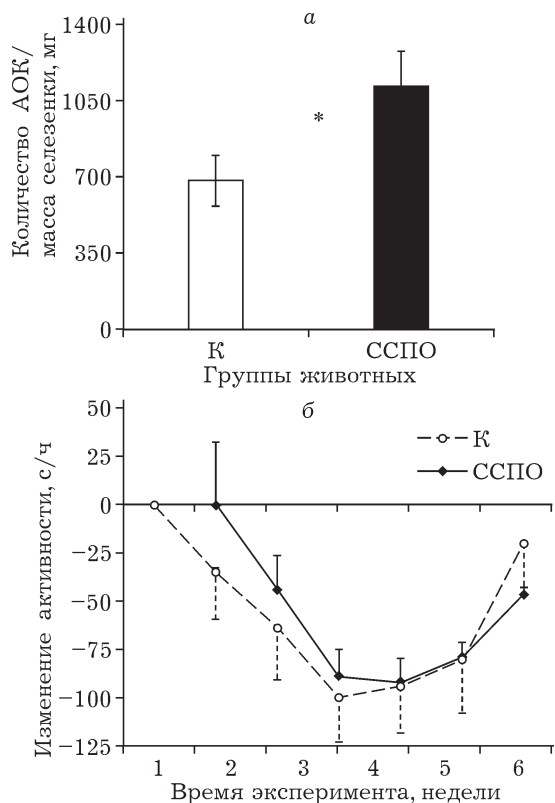


Рис. 7. Величина иммунного ответа (а) и изменение спонтанной двигательной активности (б) у животных контрольной (К) и экспериментальной (ССПО) групп в ответ на введение ЭБ. \* $p = 0.05$  – достоверные различия между группами (критерий Манна–Уитни).

введение нереплицируемых антигенов (ЭБ) животным обеих групп. В обеих группах введение антигена приводило к снижению активности животных, что является одним из проявлений болезненного поведения (рис. 7, б). Вместе с тем величина иммунного ответа, оцененная по числу АОК, у животных экспериментальной группы оказалась в 1.6 раза выше по сравнению с контролем (см. рис. 7, а).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, добавка в рацион джунгарских хомячков серотонинсодержащего вещества (нанобиокомпозиата, полученного методом твердофазного механохимического синтеза из неплодовых частей облепихи) в составе творога не отменяет основные морфологические изменения, развивающиеся у животных при сокращении светового дня и не

влияет на степень линьки животного. Вместе с тем введение в рацион данного механохимического препарата способствует достоверному снижению массы тела животных, повышению спонтанной активности животных в первые четыре недели эксперимента, сохранению “летнего типа” терморегуляции (проявляется в больших затратах энергии на компенсацию воздействия холодом и в преобладании химического термогенеза), а также повышению иммунного ответа на введение ЭБ. Иными словами, получаемый с пищей серотонин тормозит развитие функциональных изменений, которые характерны для этих животных при сокращении продолжительности светового дня. Влияние исследуемого серотонинсодержащего вещества на программу сезонных адаптаций свидетельствует о целесообразности его испытаний в качестве профилактического средства сезонных аффективных расстройств.

Работа выполнена при поддержке проекта № 4 “Прогрессивная механохимическая технология углубленной переработки облепихи”, выполняемого СО РАН совместно с Академией наук Монголии и Министерством образования, культуры и науки Монголии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Мошкин М. // Физиология человека. 1984. № 1. С. 126.
- 2 Wurtman R. // The Yale Journal of Biology and Medicine. 1985. Vol. 58, No. 6. P. 547.
- 3 Бернс Дж., Мошкин М. // Журн. общей биологии. 1998. Т. 59, № 4. С. 377.
- 4 McCormack C. // J. Biol. Rhythms. 1990. Vol. 5, No. 2. P. 107.
- 5 Lewy A., Wehr T., Goodwin F., Newsome D., Markey S. // Science. 1980. Vol. 210. P. 1267.
- 6 СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03, утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 6 апреля 2003 г. Москва. 2003.
- 7 Деряпа Н., Мошкин М., Посный В. Проблемы медицинской биоритмологии. Медицина, Москва. 1985.
- 8 Roeklein K., Rohan K. // Psychiatry (Edgmont). 2005. Vol. 2, No. 1. P. 20.
- 9 Rintamäki R., Grimaldi S., Englund A., Haukka J., Partonen T., Reunanen A., Aromaa A., Lönnqvist J. // PLoS One. 2008. Vol. 3, No. 1. e1482.
- 10 Rosen L., Targum S., Terman M., Bryant M., Hoffman H., Kasper S., Hamovit J., Docherty J., Welch B., Rosenthal N. // Psychiatry Res. 1990. Vol. 31, No. 2. P. 131.
- 11 Miller A. // Alternative Medicine Rev. 2005. Vol. 10, No. 1. P. 5.
- 12 Levitan R. // Dialogues in Clinical Neurosci. 2007. Vol. 9, No. 3. P. 315.
- 13 Lam R., Zis A., Grewal A., Delgado P., Charney D., Krystal J. // Arch. Gen. Psychiatry. 1996. No. 53. P. 41.

- 14 Westrin A., Lam R. // *Annals of Clin. Psychiatry*. 2007. Vol. 19, No. 4. P. 239.
- 15 Петрова М., Меньшиков Г. // *Журн. общей химии*. 1961. Т. 31, № 7. С. 2413.
- 16 Рожанский О., Ломовский О., Королев К., Потапов Л. // *Сиб. вестн. сельскохоз. науки*. 2010. № 8. С. 34.
- 17 Scherbarth F., Steinlechner S. // *J. Comparative Physiology, B*. 2010. Vol. 180, No. 7. P. 935.
- 18 Новиков Е., Петровский Д., Кондратюк Е., Литвинова Е., Мошкин М. // *Зоол. журн.* 2004. Т. 83, № 2. С. 480.
- 19 Zysling D., Demas G. // *J. Comparative Physiol., B*. 2007. Vol. 177. P. 339.
- 20 Prendergast B. // *Psychoneuroendocrinology*. 2008. Vol. 33, No. 4. P. 540.
- 21 Greives T., French S., Zysling D., Garcia N., Demas G. // *J. Comparative Physiol., B*. 2010. Vol. 180, No. 2. P. 267.
- 22 Moshkin M., Novikov E., Kolosova I., Surov A., Telitsina A., Osipova O. // *J. Mammology*. 2002. Vol. 82, No. 3. P. 458.
- 23 Шмидт-Ниельсен К. *Физиология животных*. М.: Мир, 1982.
- 24 Cunningham A. // *Nature*. 1965. Vol. 207. P. 1106.