

УДК 616.45-001.1/3:612.67/68:531.5

**Влияние гипергравитационного стресса на интенсивности газообмена, биосинтеза РНК и белка, терморегуляцию и выживаемость у животных разных видов**

**В. В. Фролькис, Х. К. Мурадян, А. Н. Тимченко, Т. Г. Мозжухина**

Институт геронтології АМН України, Київ

*Надійшла до редакції 07.03.97*

Вивчено вплив гіпергравітаційного стресу на виживання, газообмін, терморегуляцію та біосинтез РНК і білка у дорослих самців дрозофіл, мишей і щурів. Показано, що дрозофіли набагато переважали мишей і щурів за толерантністю до гіпергравітації. Вони повністю виживали при 5000g та приблизно на четвертину після 3-год сеансу при 20000g. У мишей та щурів при 10-хв експозиції LD50 складала 55—60g і 25g відповідно. В діапазоні помірних і сублетальних гіпергравітаційних навантажень інтенсивність газообміну у мишей і щурів збільшувалась, але прогресивно зменшувалась із збільшенням гіпергравітації в області летальних навантажень. В цій області суттєво зменшувались також температура тіла та інтенсивність синтезу тотальної РНК і білка в міокарді, лобній корі та гіпоталамусі. В мозочку, навпаки, інтенсивність біосинтетичних процесів збільшувалась. В постстресовий відновний період інтенсивність газообміну і температура тіла повертались до початкового рівня приблизно через 1—2 год.

Известно, что частотно-амплитудные характеристики большинства физических факторов — электрических и магнитных полей, световой и ионизирующей радиации, звука и вибрации — могут быть в той или иной степени модулированы, а их отрицательное влияние на биологические объекты может быть ослаблено с помощью различных экранирующих и защитных приспособлений. Гравитация же является неотъемлемым свойством любой материальной частицы и потому гравитационные поля «вездесущи и неуправляемы». По-видимому, этим же можно объяснить, почему гравитационные воздействия выделяются на фоне других факторов космического полета по степени и разнообразию оказываемых отрицательных эффектов на биологические объекты (Malacinski, Neff, 1984; Lee et al.,

1985; Le Bourg, Lints, 1989; Nicogossian et al., 1989; Miquel, Souza, 1991; Lints et al., 1993; Frolkis et al., 1995).

На видовые отличия влияния гравитационных факторов, по-видимому, первым обратил внимание Галилей, который еще в 1638 г. опубликовал работу «Трактат и математическая демонстрация в двух новых науках», в которой указывал, что относительная масса опорно-двигательного аппарата должна увеличиваться по мере увеличения размеров животного в большей степени, чем масса тела. Он обратил внимание на то, что такая зависимость, очевидно, справедлива только для наземных животных, но не для водоплавающих видов, находящихся, по существу, в условиях гипогравитации (Galileo, 1638). Более современные разработ-

ки в этой области убеждают, что должен существовать как верхний предел массы тела наземных животных (по различным оценкам до 20000 кг), так и предел их способности переносить краткосрочные или хронические состояния гипергравитации (ГГ) (Economos, 1979; Pacc, Smith, 1981). Интересно, что в условиях невесомости скорость роста клеток микроорганизмов или разных видов одноклеточных может увеличиваться в несколько раз, тогда как рост клеток многоклеточных видов при этом подавляется. На борту КА «Скайлэб» скорость роста клеток WI-38 из легких человека также заметно уменьшалась, что сопровождалось параллельным снижением потребления глюкозы (Hughes-Fulford, 1991). Однако следует отметить, что в большинстве случаев такие исследования и публикации носят спорадический и несистематизированный характер и до настоящего времени не существует сколь-нибудь общепринятой концепции ни о видовых отличиях толерантности к гравитации, ни о возможных ее детерминантах и путях модификации. Между тем эти вопросы являются необходимыми элементами фундамента космической биологии. Более того, их выяснение имеет не только познавательное значение, но могло способствовать решению целого ряда прикладных задач, в частности при поиске гравипротекторов — средств, которые позволяют повысить толерантность к ГГ и снизить возможные отрицательные последствия ГГ или невесомости.

Цель настоящей работы — изучить видовые отличия толерантности к короткосрочным ГГ-стрессам, которые неизбежно возникают в различных областях профессиональной деятельности, в частности при запуске и посадке космических аппаратов. В настоящей публикации нами представлены данные, полученные у наиболее распространенных в экспериментальной практике видов лабораторных животных — дрозофил, мышей и крыс. Выбор этих видов был обусловлен также тем, что они существенно отличаются по массе тела и, вероятно, по реакции на ГГ-стресс.

#### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использованы взрослые самцы дрозофил линии Oregon-R, мыши линии C57BL/6 и крысы линии Wistar.

ГГ-стресс моделировали центрифугированием в специальных контейнерах: дрозофил от 20 мин до 3 ч на центрифуге К-24; мышей и крыс в течение 10 мин на центрифуге К-70 (Германия). Величину ГГ (в единицах ускорения  $g$  свободного падения на

поверхности Земли) задавали изменением скорости вращения, которая контролировалась с помощью специального тахометра. Через 15, 30, 45, 60, 90 и 180 мин у подопытных животных измеряли интенсивность газообмена и температуру тела. При этом содержание кислорода и углекислого газа в исследуемых образцах воздуха определяли с помощью соответствующих блоков газоанализатора фирмы MINHARDT (Нидерланды), а ректальную температуру определяли с помощью электрического термометра с полупроводниковым датчиком, вмонтированным в тонкий шланг диаметром примерно 1 мм.

Интенсивность биосинтеза РНК и белка в условиях *in vitro* определяли по включению соответствующих меченых предшественников в суспензиях клеток, приготовленных из лобной коры головного мозга, гипоталамуса, мозжечка и левого желудочка миокарда, согласно Singh (1988). Интенсивность синтеза РНК оценивали по включению  $^{14}\text{C}$ -УТР, согласно работе Марелаф, Хуан (1987), а синтеза белка — по включению  $^3\text{H}$ -лейцина, согласно Клеменс (1987). Содержание белка в исследуемых образцах определяли по модифицированному методу Лоури (Markwell, 1978).

Полученные результаты обрабатывались с помощью стандартных методов статистики.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из известной зависимости об отрицательной корреляции между размерами тела и толерантностью к ГГ-нагрузкам (Economos, 1979; Pacc, Smith, 1981; Miquel, Souza, 1991), еще до начала экспериментов мы полагали, что дрозофилы окажутся более устойчивыми и в условиях нашей модели краткосрочного ГГ-стресса. Качественно это предположение оправдалось, а количественные данные, полученные на дрозофилах, превзошли все ожидания. Дрозофилы оказались не просто наиболее устойчивыми к ГГ: по этому параметру они превосходили мышей и крыс на несколько порядков, легко перенося ГГ в несколько тысяч  $g$  даже при увеличении экспозиции до нескольких часов. Если при 10-мин экспозиции мыши начинали погибать при 40 $g$ , а крысы и того меньше, то у дрозофил наиболее слабые по ГГ особи начинали погибать только при 10000 $g$ . Более того, даже при наиболее жестких из использованных нами режимов ГГ (20000 $g$ , 3 ч) выживало более четверти мух (рис. 1). Феноменальная устойчивость дрозофил к ГГ, по всей видимости, сохраняется и при хронических ГГ-нагрузках. По крайней мере, как было показано в одном из немногих опытов, проведен-

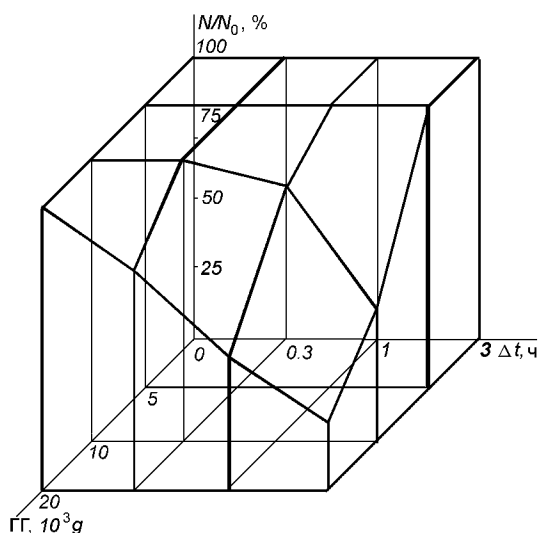


Рис. 1. Зависимость выживаемости  $N/N_0$  дрозофил от длительности экспозиции  $\Delta t$  и силы гипергравитации  $\Gamma$

ных еще до запуска первых спутников Земли, дрозофилы успешно завершали эмбриональные и куколочные этапы развития при ГГ, равной 5000g (Wunder, 1955). Такая высокая толерантность к ГГ, возможно, обусловлена как небольшими размерами тела (масса тела взрослой дрозофилы обычно составляет 0.5—1 мг), так и тем, что, будучи холоднокровными, они обладают сравнительно низким уровнем обмена и, вероятно, эволюционно более простыми и потому более устойчивыми к ГГ механизмами сохранения жизнеспособности. Какими бы ни были причины и объяснения такой толерантности дрозофил к ГГ, ясно, что в обозримом будущем для них не должны существовать гравитационные барьеры ни при космических экспедициях, ни при колонизации планет с более мощными гравитационными полями.

Все же с прикладной точки зрения опыты на лабораторных млекопитающих представляют больший интерес в силу их эволюционной близости к человеку. В наших опытах при 10-мин экспозиции 100-% выживаемость у мышей сохранялась до 30g, а у крыс, которые по массе превосходят мышей в 20—30 раз, безопасный для жизни диапазон ГГ был вдвое меньше и не превосходил 15g. Гибели половины подопытных особей (LD50) соответствовала ГГ около 55—60g для мышей и 25g для крыс. И наконец, практически полное вымирание подопытных мышей и крыс наблюдалось при 90g и 40g соответственно (рис. 2).

Отрицательная корреляционная зависимость между массой тела и толерантностью к ГГ-стрессу

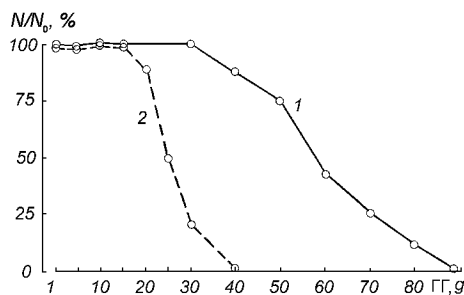


Рис. 2. Выживаемость  $N/N_0$  мышей (1) и крыс (2) после ГГ-стресса

в целом сохраняется и при анализе этого феномена на внутривидовом и популяционном уровне, то есть при сравнении отдельных особей, хотя при этом она не так отчетливо выражена, как при сравнении разных видов. Это представляется вполне естественным, учитывая, что отличия массы тела на популяционном уровне выражены в значительно меньшей степени, чем при сравнении разных видов. Так, при ГГ-стрессе 50g и выживаемости 75 % средняя величина массы тела выживших мышей составляет  $20.0 \pm 0.3$  г, а в группе погибших — несколько больше ( $21.3 \pm 0.6$  г). При увеличении ГГ до 60g выживаемость снижается до 33 %. Однако и при этом масса тела выживших ( $18.8 \pm 0.8$  г) несколько меньше, чем погибших ( $20.1 \pm 0.5$  г). Аналогичные результаты были характерны и для крыс. При 25g и выживаемости 50 % средняя величина массы тела выживших равнялась  $244 \pm 7$  г, а погибших —  $264 \pm 1$  г ( $P < 0.05$ ). При увеличении ГГ до 30g выживаемость снижается до 25 %. При этом масса тела выживших составляет  $240 \pm 10$  г, а погибших —  $258 \pm 4$  г. Из представленных данных следует, что во всех проанализированных случаях средние величины массы тела выживших животных были меньше, чем погибших, хотя эти отличия в каждом конкретном случае далеко не всегда были статистически значимыми.

Основными причинами гибели животных при краткосрочных сеансах ГГ, по-видимому, являются повреждение тонкой структуры и острая гипоксия в жизненно важных органах, прежде всего в миокарде и головном мозге. При этом главными причинами гипоксии считаются перераспределение кровотока и затруднения дыхательных движений вплоть до их полной остановки. Однако не все ГГ-нагрузки сопровождаются снижением интенсивности дыхания. Как видно из рис. 3, в диапазоне умеренных и сублетальных ГГ-нагрузок (примерно 30g для мышей и 15g для крыс) потребление кислорода и выделение углекислого газа несколько

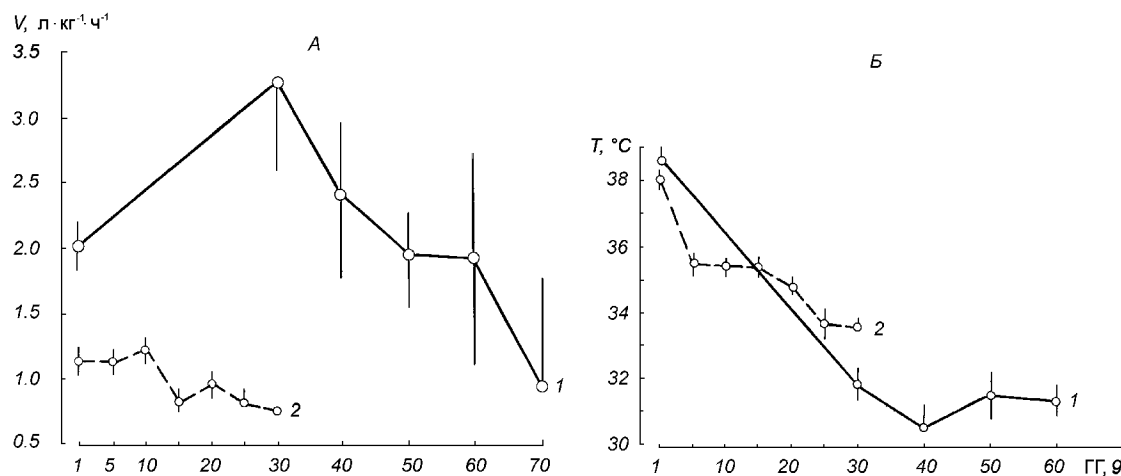


Рис. 3. Интенсивность выделения углекислого газа  $V$  и температура тела  $T$  у мышей (1) и крыс (2) после ГГ-стресса

увеличиваются, вероятно, из-за повышения нагрузки на опорно-двигательный аппарат и неизбежного возбуждения подопытных животных при центрифугировании. При более «жестких» ГГ-стрессах решающим фактором, видимо, становится затруднение дыхания, и по мере увеличения силы ГГ показатели газообмена прогрессивно снижаются. В диапазоне летальных ГГ-нагрузок примерно такая же динамика характерна для ректальной температуры тела, которая снижается, очевидно, вслед за снижением интенсивности газообмена (рис. 3). Основным отличием динамики температуры ядра тела от газообмена является отсутствие существенных видовых отличий и увеличения газообмена при сравнительно небольших силах ГГ.

Определенный интерес представляло изучение динамики интенсивности газообмена и ректальной температуры в постстрессовый период восстановления. Как следует из рис. 4, динамика интенсивности газообмена имела двухфазный характер: снижению газообмена при сеансе ГГ последовала фаза «избыточного» восстановления, очевидно направленная на компенсацию «кислородного долга», который возникает при центрифугировании. Эта фаза была относительно непродолжительной и примерно одинаковой для обоих исследованных видов: примерно через 1–2 ч после стресса наблюдалось практически полное восстановление исходного уровня как у мышей, так и у крыс. Восстановление ректальной температуры носило более монотонный характер и также мало различалось для обоих видов грызунов.

Как известно, в поддержании необходимого уровня метаболизма велика роль процессов пластической обеспеченности, биосинтеза нуклеиновых кис-

лот и белка. Вот почему в следующей серии опытов нами было изучено влияние ГГ-стресса на интенсивность биосинтеза тотальной РНК и белка в таких важных для сохранения жизнеспособности тканях, как левый желудочек миокарда, лобная кора, гипоталамус и мозжечок головного мозга. Оказалось, что у мышей сразу после краткосрочного сеанса ГГ (10 мин при 50g) вслед за интенсивностью газообмена и температуры тела синтез РНК и белка в большинстве тканей снижается. В наших опытах такое утверждение было справедливо по крайней мере для миокарда, коры и гипоталамуса (рис. 5). Вместе с тем в мозжечке интенсивность биосинтетических процессов после ГГ-стресса, вероятно, стимулировалась. Такое неожиданное увеличение уровня биосинтеза РНК и белка в мозжечке, возможно, связано с его особой ролью в координации движений, управлении работой опорно-двигательного аппарата и ориентации в пространстве, то есть систем, которые подвергаются наиболее выраженным изменениям при центрифугировании.

Таким образом, проведенные нами исследования по изучению влияния ГГ, включающих весь диапазон нагрузок — от пороговых до летальных — на дрозофил, мышей и крыс, показали, что существуют отчетливые видовые отличия толерантности к ГГ-стрессу. По выживаемости при ГГ холоднокровные, вероятно, имеют большую устойчивость. По крайней мере, в наших опытах лабораторные дрозофилы полностью выживали при ГГ до 5000g и по этому параметру оказались на несколько порядков более устойчивее, чем млекопитающие. Среди последних мыши были примерно вдвое устойчивее к ГГ, чем крысы. По мере увеличения силы стресса

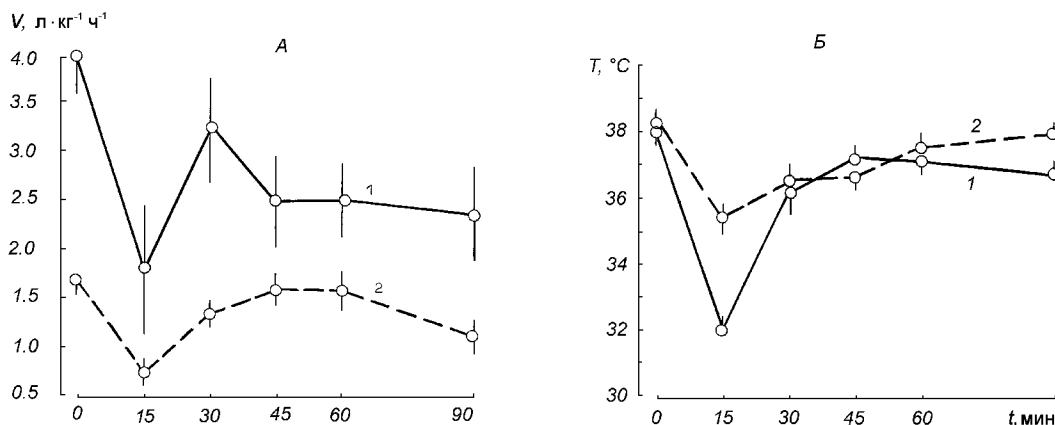


Рис. 4. Выделение углекислого газа  $V$  и температура тела  $T$  у мышей (1) и крыс (2) через время  $t$  после ГГ-стресса (10 мин при 50g и 25g соответственно)

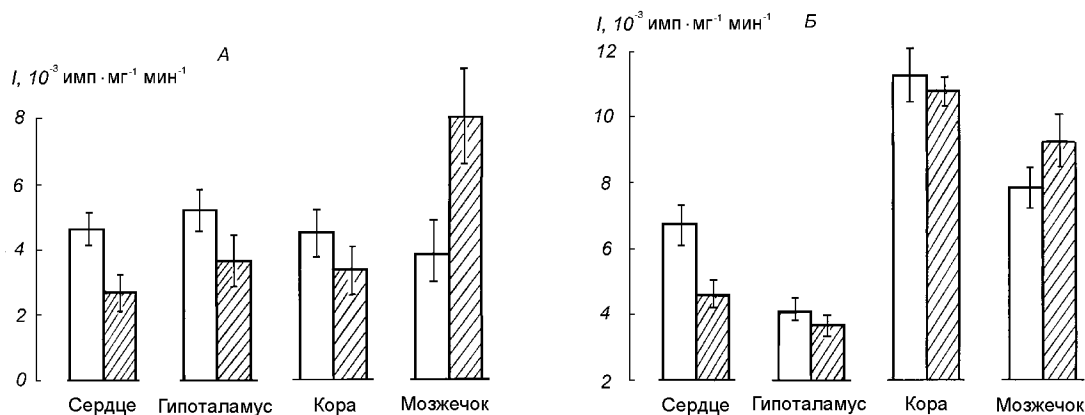


Рис. 5. Интенсивность  $I$  биосинтеза суммарной РНК (А) и белка (Б) в разных тканях мышей до (светлые столбики) и после (заштрихованные столбики) ГГ-стресса (10 мин при 50g)

интенсивность потребления кислорода увеличивается в области сублетальных нагрузок, но после достижения летальных величин газообмен и температура тела прогрессивно снижаются по мере увеличения силы ГГ. Постстрессовый восстановительный период для показателей газообмена и температуры тела сравнительно невелик (до 1—2 ч) и существенно не различается для обоих видов. В большинстве тканей эти изменения в метаболизме, по всей вероятности, сопровождаются параллельным снижением интенсивности биосинтеза нуклеиновых кислот и белка. Хотя, как показали данные по биосинтезу РНК и белка в мозжечке, в зависимости от функционального назначения тканей возможны количественно и качественно разные изменения уровня метаболических и пластических процессов. В целом полученные данные могут представить определенный интерес как для понимания

видовых отличий толерантности к ГГ-стрессу и возможных механизмов его развития, так и при последующей разработке конкретных экспериментальных моделей и поиске возможных гравипротекторов, на что и направлены основные наши усилия в настоящее время.

Работа проведена при частичной финансовой поддержке Национального космического агентства Украины.

Клеменс М. Трансляция эукариотических матричных РНК в бесклеточных экстрактах // Транскрипция и трансляция. Методы / Под ред. В. Хаймса, С. Хигенса. — М.: Мир, 1987.—С. 327—362.

Марелаф У., Хуан Р. Транскрипция РНК в изолированных ядрах // Транскрипция и трансляция. Методы / Под ред. В. Хаймса, С. Хигенса. — М.: Мир, 1987.—С. 111—157.

Economos A. C., Miquel J., Ballard R. W., et al. Effects of stimulated increased gravity on the rate of aging of rats. Implications for the rate of living theory of aging // Arch.

- Geront. and Geriatrics.—1983.—1.—P. 349—363.
- Frol'kis V. V., Muradian Kh. K., Timchenko A. N. Hypergravity stress: species- and age-peculiarities of oxygen consumption, thermoregulation, and survival // III European Congress of Gerontology: Abstracts (Amsterdam, 30 August—2 September, 1995). — Amsterdam, 1995.—N 086.0078.
- Galileo G. Discorsi e dimostrazioni matematiche intorno a due nuove science. 1638 // Цитируется по Miquel, Souza (1991).
- Hughes-Fulford M. Altered cell function in microgravity // Exp. Gerontol.—1991.—26, N 2/3.—P. 247—256.
- Le Bourg E., Lints F. A. Hypergravity and aging in *Drosophila melanogaster*. 2. Longevity // Gerontology.—1989.—35.—P. 244—252.
- Lee R. E., Bryant E. H., Baust J. G. Fecundity and longevity of housefly after spaceflight // *Experientia*.—1985.—41.—P. 1191—1192.
- Lints F. A., Bullens P., Le Bourg E. Hypergravity and longevity in *Drosophila melanogaster*. 7. New longevity data // Exp. Gerontol.—1993.—28.—P. 611—615.
- Malacinski G. M., Neff A. W. The influence of gravity in the process of development of animal systems // *Adv. Space Res.*—1984.—4.—P. 314—323.
- Markwell M. A., Haas S. H., Bieber L. L., Tolbert N. F. Modification of Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples // *Anal. Biochem.*—1978.—85, N 1.—P. 206—210.
- Miquel J., Souza K. A. Gravity effects on reproduction, development, and aging // *Advances in Space Biology and Medicine*.—1991.—1.—P. 71—97.
- Nicogossian A. E., Yuntoon C. L., Pool S. L. *Space Physiology and Medicine*. — Philadelphia: Lea & Febiger, 1989.—478 p.
- Pace N., Smith A. H. Gravity and metabolic scale effects in mammals // *The Physiologist*.—1981.—24.—P. S37—40.
- Singh N. P. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells // *Exp. Cell Res.*—1988.—175.—P. 184—191.
- Wunder C. C. Gravitational aspects of growth of fruit fly larvae // *Proc. Soc. for Exp. Biol. and Med.*—1955.—89.—544 p.

---

**EFFECTS OF HYPERGRAVITY STRESS ON INTENSITIES OF GASEOUS EXCHANGE, RNA AND PROTEIN SYNTHESIS, THERMOREGULATION, AND SURVIVAL OF ANIMALS OF DIFFERENT SPECIES**

**V. V. Frol'kis, Kh. K. Muradian,  
F. N. Timchenko, and T. G. Mozhukhina**

The effects of hypergravity (HG) stress on survival, gaseous exchange, thermoregulation, and synthesis of total RNA and protein were studied in adult male *Drosophila*s, mice, and rats. *Drosophila*s had much higher HG tolerance (up to 20000 g) compared to mice and rats, for whom LD50 were 55—60g and 25g, correspondingly at a 10-minute exposure. In the groups of mice and rats, the gaseous exchange increased in the range of mild and sublethal HG, but it decreased in the lethal range of HG stress. In this range the body temperature, as well as RNA and protein synthesis in myocardium, frontal cortex, and hypothalamus also decreased; by contrast, synthesis processes increased in cerebellum. In the post-stress period the gaseous exchange and body temperature recovered in about 1–2 hours.