

УДК 616.45-001.1/68.531.5

**Х. К. Мурадян, А. Н. Тимченко, Н. А. Утко,
Т. А. Бадова, В. В. Безруков**

Институт геронтології АМН України, Київ

**Терморегуляция, дыхательный коэффициент
и активность ключевых ферментов
антиоксидантной системы в печени и миокарде
крыс при остром гипергравитационном стрессе**

Надійшла до редакції 25.12.03

Вивчено вплив м'якої (2g) гіпергравітації різної тривалості на дихальний коефіцієнт, температуру тіла і коефіцієнт теплопровідності, а також активності супероксиддисмутази, каталази, глутатіон-пероксидази і глутатіон-редуктази у печінці та міокарді дорослих щурів. Показано, що м'яка гіпергравітація (2g), модельована центрифугуванням, викликає швидке зменшення температури тіла, яка досягає мінімуму на 2-4-ту год центрифугування і повертається до вихідного рівня протягом наступних 3 год відновлювального періоду. У ті ж строки динаміка коефіцієнт теплопровідності відрізняється змінами протилежної напрямленості — підвищення з наступним відновленням вихідного рівня. Нетривалий сеанс м'якої гіпергравітації (2g, 1 ч) не викликав статистично суттєвих змін активностей вивчених антиоксидантних ферментів. Результати лінійного кореляційного і регресійного аналізів свідчать про наявність додатної кореляційної залежності між температурою тіла і V_{O_2} на етапах як зменшення, так і відновлення температури. Дихальний коефіцієнт зменшується протягом всього досліджуваного періоду, що може бути наслідком підсилення термогенезу за рахунок переважного окислення жирних кислот. Аналіз отриманого матеріалу за допомогою тривимірного нелінійного плоттингу дозволяє зробити висновок, що до моменту завершення центрифугування температура тіла більша для особин, які встигають швидше активувати термогенез за допомогою окислення жирів.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что запуск и посадка космических аппаратов связаны со значительными ускорениями и сопряженными с ними гипергравитационными перегрузками. Влияние гравитационных факторов на организм развивается по механизму специфических стрессорных реакций, совокупность которых нередко называют гипергравитационным стрессом [1, 9]. В последние годы обращает на себя внимание еще один аспект этой проблемы, который делает изучение гипергравитационного стресса актуальным не только в начале и конце, но и во время длительных космических экспедиций. Ведь эволюция наземных животных и человека происхо-

дила в практически постоянном гравитационном поле Земли, вследствие чего эти виды не выработали приспособительных механизмов к изменениям гравитации и стали уязвимыми к действию не только гипергравитации, но и микрогравитации. Именно трудности, которые связаны с адаптацией человека к МГ во время полета и гипергравитации при запуске и посадке, являются основными факторами, лимитирующими продолжительность пилотируемых полетов. Не решив эту проблему, трудно представить участие человека в космических экспедициях даже на ближайшие планеты, включая планируемые полеты на Марс [18].

Несмотря на многочисленные нерешенные вопросы медико-биологического и технического характе-

ра, обнадеживающим здесь является консенсус о том, что искусственная гравитация в режимах хронической или периодической нормо- или гипергравитации, моделированная с помощью бортовой центрифуги или вращающихся вокруг собственной оси летательных аппаратов, может стать надежным средством минимизации отрицательных последствий продолжительного пребывания человека вне гравитационного поля Земли. Есть основание полагать, что сеансы гипергравитации могут индуцировать изменения, противоположные действию микрогравитации, тем самым способствуя быстрому восстановлению от негативного влияния невесомости [8].

Следует отметить, что идея о создании искусственной гравитации с помощью центробежных ускорений не нова и технически просто реализуема. Более того, в настоящее время для продолжительных космических полетов она по существу не имеет альтернатив [10]. Однако такая возможность еще мало изучена в общепрофилактическом плане и, по всей видимости, не лишена «сюрпризов». Например, выяснилось, что гипергравитационные стрессы могут быть сопряжены с нарушением терморегуляции и, возможно, равновесия между образованием и гашением свободных радикалов с последующим развитием окислительного стресса [16]. Вот почему наряду с анализом влияния гравитационных факторов на основные системы жизнеобеспечения организма — газообмен и терморегуляцию — важно выяснить характер влияния гипергравитации на состояние антиоксидантной системы.

Цель настоящей работы — изучить влияние мягких гипергравитационных нагрузок ($2g$) различной продолжительности на дыхательный коэффициент (ДК), температуру тела (ТТ) и константу теплопроводности (КТ), а также активности таких ключевых ферментов антиоксидантной системы, как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза (ГП) и глутатион-редуктаза (ГР).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проведены с использованием 55 взрослых (9—10 мес.) самцов крыс линии Вистар. Гипергравитацию моделировали центрифугированием в течение 1, 2 и 4 ч при $2g$ на центрифуге собственной конструкции диаметром 3 м. Исследуемые физиологические и биохимические параметры измерялись до начала и сразу после завершения центрифугирования, а также в восстановительный период — через 5 и 7 ч после начала гипергравитационного стресса.

Дыхательный коэффициент определяли по соотношению скоростей потребления кислорода (V_{O_2}) и выделения углекислого газа (V_{CO_2}), которые измеряли с помощью соответствующих блоков газоанализатора фирмы Gebr. Mijhardt (Нидерланды).

Температуру тела измеряли ректально с помощью специально сконструированного электрического термометра с полупроводниковым датчиком, вмонтированным в тонкую (1 мм) гибкую пластмассовую трубку, как описано ранее в работе [1].

Константу теплопроводности КТ вычисляли с учетом скорости V_{O_2} , температуры тела ТТ и температуры воздуха ТВ по известной формуле $КТ = \text{ЭЭК} \cdot V_{O_2} / (ТТ - ТВ)$, где ЭЭК — энергетический эквивалент кислорода, равный 20.2 кДж/л. Константу теплопроводности выражали в единицах $\text{кДж} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{град}^{-1}$ [3].

Активность ферментов и содержание белка измеряли по общеизвестным методам в супернатантах печени и миокарда, для приготовления которых животные подвергались эвтаназии с помощью CO_2 , согласно рекомендациям Американской ветеринарной ассоциации. В рамках этой работы важно то, что такой способ эвтаназии не оказывает существенного влияния на активность указанных антиоксидантных ферментов [7]. Через 1 ч центрифугирования печень и миокард быстро извлекали, взвешивали, гомогенизировали в охлажденном 0.05 М фосфатном буфере и центрифугировали при нагрузке 10 000g и $4^\circ C$ в течение 20 мин.

Активность СОД (ед. $\cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг} \cdot \text{белка}^{-1}$) определяли по степени ингибирования реакции восстановления феррицитохрома-С супероксид-анион радикалом, который генерировался ксантин-ксантиноксидазной системой. За единицу принималась активность, необходимая для ингибирования реакции на 50 % [12].

Активность каталазы ($\text{мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг} \cdot \text{белка}^{-1}$) определяли по скорости разрушения H_2O_2 [2].

Активность глутатион-пероксидазы ($\text{нмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг} \cdot \text{белка}^{-1}$) определяли по скорости окисления NADPH в реакции с H_2O_2 в присутствии восстановленного глутатиона [14].

Активность глутатион-редуктазы ($\text{нмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг} \cdot \text{белка}^{-1}$) определяли по снижению уровня восстановленного НАДФ в системе, состоящей из 65 мкМ NADPH и 0.25 мМ окисленного глутатиона [15].

Содержание белка определяли по методу Лоури [11].

Все реактивы, использованные для измерения активностей ферментов, были приобретены у фирмы «Sigma-Aldrich» (США—Германия).

Полученные данные обрабатывали одно-, двух- и

трехмерными методами статистики с помощью пакета программ «Statistica-5».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая, что основными участниками космических экспедиций являются мужчины среднего возраста, то в настоящей работе были использованы зрелые самцы крыс, возраст которых (9—10 мес) примерно соответствует 1/3 их средней продолжительности жизни [4].

Проведенные исследования подтвердили известные данные о том, что у грызунов даже мягкий гипергравитационный стресс (2g) может вызвать существенное снижение температуры тела [5, 6, 13, 17]. Такое снижение легко обратимо и обычно устраняется в течение нескольких часов пост-стрессового восстановительного периода. В наших опытах температура достигала минимума к 2–4 ч гипергравитационного стресса (до 32—33 °С), но в течение трех часов восстановительного периода этот показатель практически возвращался к исходному уровню.

Интенсивность продукции тепла, как известно, определяется уровнем окислительных процессов, и следовательно, между температурой тела и скоростью потребления кислорода (V_{O_2}) может быть положительная коррелятивная связь. Представлялось интересным выяснить, изменяется ли характер такой зависимости на этапах понижения и повышения температуры тела. Как видно из линий регрессии и соответствующих им коэффициентов корреляции, положительная корреляция между температурой тела и V_{O_2} сохраняется на всех изученных этапах гипергравитационного стресса (рис. 1). Только в группе крыс через 1–2 ч после начала гипергравитации (рис. 1, б) такая зависимость была ниже общепринятого уровня достоверности и свидетельствовала только о тенденции к положительной корреляции ($r = 0.43$, $P = 0.1$).

Так как при гипергравитационном стрессе интенсивность газообмена мало изменяется (данные не представлены), то можно было допустить, что вызванное гипергравитацией снижение температуры тела прежде всего является следствием усиления теплопотерь. Обоснованность такого предположения можно было количественно оценить, например, с помощью коэффициента теплопроводности. Результаты однофакторного дисперсионного анализа свидетельствуют, что гипергравитация оказывает высоко достоверное влияние на константу теплопроводности ($P < 0.00001$). При этом динамика изменений константы теплопроводности по сущест-

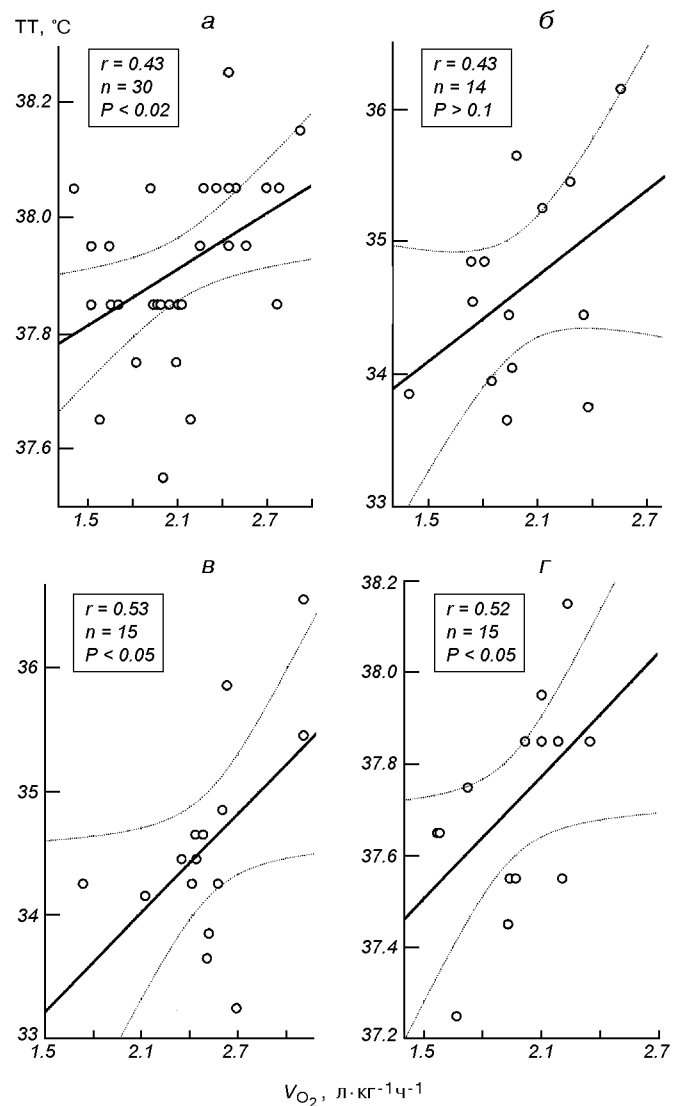


Рис. 1. Линейная регрессионная зависимость между температурой тела ТТ и скоростью потребления кислорода V_{O_2} в группе контрольных крыс (а), через 1–2 ч (б) и 4 ч (в) центрифугирования и 3 ч восстановительного периода (г)

ву противоположна динамике температуры тела. Так, если при гипергравитационном стрессе температура сначала снижается, а потом возвращается к норме, то константа теплопроводности, напротив, сначала увеличивается, а потом уменьшается к исходным величинам (рис. 2).

Быстрое восстановление температуры тела, очевидно, объясняется усилением термогенеза, при котором изменяется соотношение между окислением углеводов и жирных кислот в сторону повышения доли последних. Поэтому при гипергравитаци-

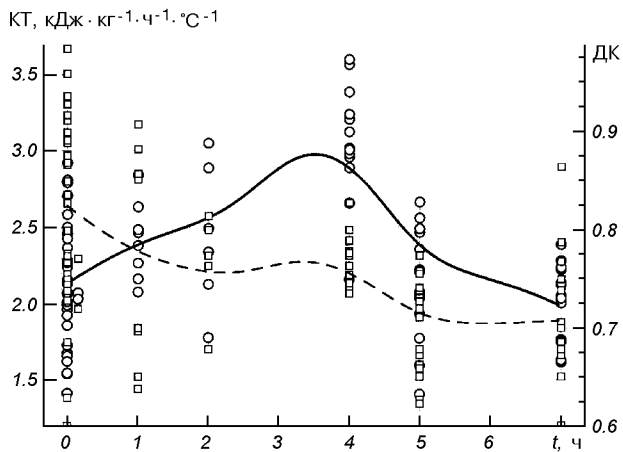


Рис. 2. Динамика константы теплопроводности КТ (кружки и сплошная линия) и дыхательного коэффициента ДК (квадратики и штрихи) в разные сроки гипергравитационного стресса (1—4 ч) и восстановительного периода (5—7 ч)

онном стрессе следовало ожидать снижение дыхательного коэффициента ДК. Предположение о влиянии гипергравитации на ДК подтверждается как его динамикой, так и результатами дисперсионного анализа ($P < 0.0001$). Из приведенного на рис. 2 графика следует, что дыхательный коэффициент прогрессивно снижается в течение всего исследуемого срока, и к 7 ч достигает величин, которые статистически значимо ниже нормы и характерны для окисления жиров и/или накопления продуктов неполного окисления (рис. 2).

Казалось, такие изменения окислительных процессов должны были отразиться на антиоксидантной

ситуации и активности ключевых ферментов гашения свободных радикалов кислорода. Действительно, представленные на рис. 3 данные свидетельствуют, что под влиянием даже короткого периода мягкой гипергравитации (2g, 1 ч) происходят заметные изменения активностей СОД, каталазы, ГП и ГР как в печени, так и миокарде крыс. Однако из-за разброса данных и, вероятно, сравнительно небольших групп исследованных животных ни в одном из исследованных случаев отличия между контрольными и подопытными группами не были статистически достоверными (рис. 3).

Определенный интерес представляло изучение взаимосвязей между температурой тела, константой теплопроводности и дыхательным коэффициентом на разных этапах гипергравитационного стресса с помощью трехмерного нелинейного плоттинга. Как следует из рис. 4, а, в группе контрольных крыс зависимость температуры тела ТТ от дыхательного коэффициента ДК и константы теплопроводности КТ описывается вогнутой поверхностью, основание которой примерно совпадает с диагонально горизонтальной плоскости, т. е. температура тела одновременно зависит от обоих указанных переменных. Через 4 ч гипергравитационного стресса аналогичная зависимость (рис. 4, б) принимает форму выпуклой поверхности, которая имеет максимум при значениях ДК ≈ 0.75 , что соответствует преимущественному окислению жирных кислот. По всей видимости, при гипергравитационном стрессе температура выше у особей, у которых раньше происходит включение термогенеза за счет преимущественного окисления жиров. Другой отличительной особенностью этой поверхности является то, что она параллельна оси КТ, т. е. к моменту

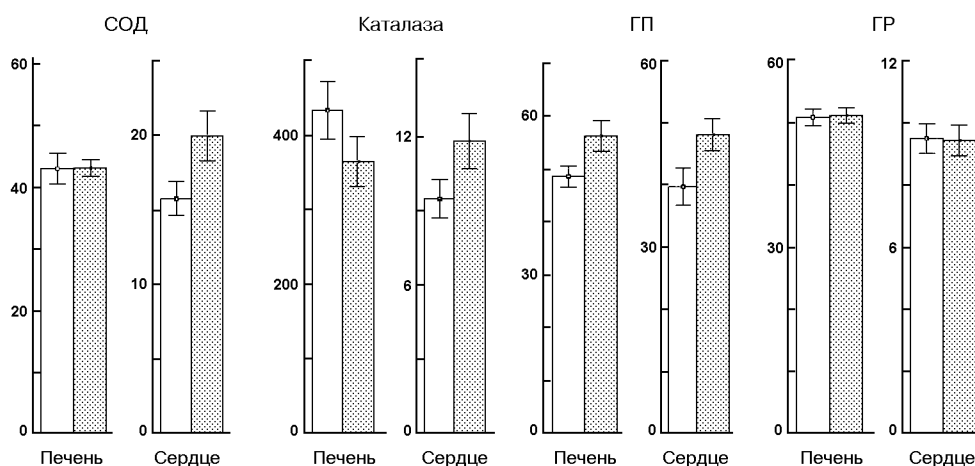


Рис. 3. Активность супероксиддисмутазы (СОД, ед. $\cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$), каталазы (мкмоль $\cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$), глутатион пероксидазы (ГП, нмоль $\cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$) и глутатион редуктазы (ГР, нмоль $\cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$) в печени и миокарде до (светлые столбики) и после (темные столбики) гипергравитационного стресса (2g, 1 ч)

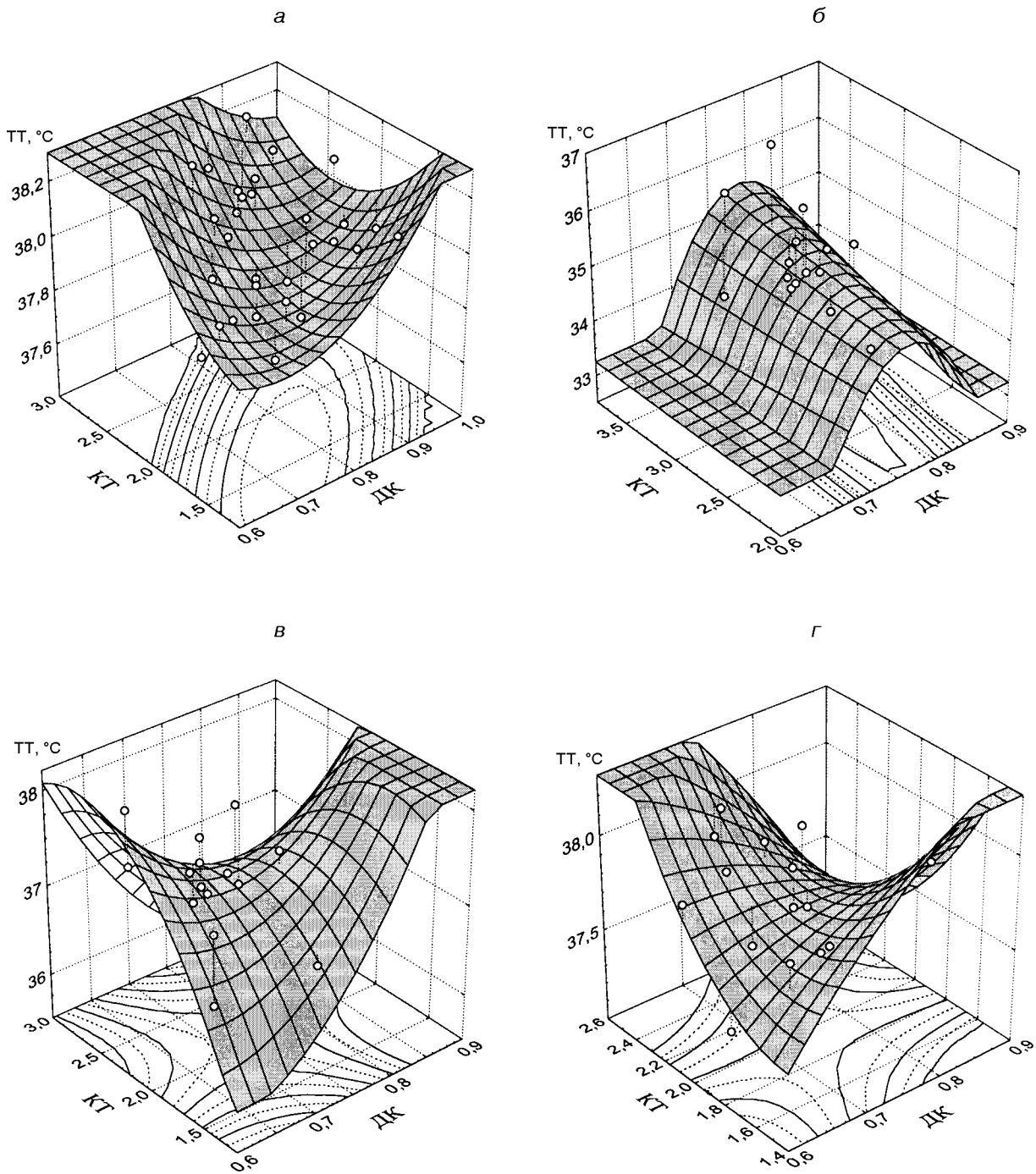


Рис. 4. Трехмерные нелинейные зависимости температуры тела ТТ (°C) от константы теплопроводности КТ ($\text{кДж} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$) и дыхательного коэффициента ДК в группе контрольных крыс (а), через 1—2 ч (б) и 4 ч (в) центрифугирования и 3 ч восстановительного периода (г)

завершения центрифугирования температура практически не зависит от изменений теплопроводности (рис. 4, б). После переходной формы к первому часу восстановительного периода

(рис. 4, в) к третьему часу восстановления поверхность начинает приобретать вогнутые очертания (рис. 4, г), характерные для контрольных животных (рис. 4, а).

Таким образом, мягкий гипергравитационный стресс различной продолжительности, моделированный центрифугированием при 2g, индуцировал существенные изменения температуры тела, дыхательного коэффициента и константы теплопроводности, но не активностей СОД, каталазы, ГП и ГР в печени и миокарде взрослых крыс. При этом динамика изменений температуры тела характеризовалась фазой снижения до 2—4 ч центрифугирования и восстановления в течение 3 ч пост-стрессового периода. Изменения константы теплопроводности укладывались в те же временные интервалы с той лишь принципиальной разницей, что динамика константы теплопроводности отличалась противоположной направленностью — повышение с последующим восстановлением исходного уровня. При этом дыхательный коэффициент прогрессивно снижался в течение всего исследуемого периода, достигая уровня, который характерен для окисления жирных кислот и/или накопления продуктов неполного окисления. То, что дыхательный коэффициент, в отличие от температуры тела и константы теплопроводности, не возвращается к исходному уровню к концу исследуемого срока, может свидетельствовать о том, что к 7 ч не все функциональные системы подопытных животных успевают восстанавливаться от гипергравитационного стресса. Вероятно, об этом свидетельствуют и данные трехмерного плоттинга, согласно которым к концу исследуемого срока поверхность отклика лишь начинает приобретать очертания, характерные для контрольной группы.

1. Тимченко А. Н., Мозжухина Т. Г., Мурадян Х. К. Влияние гипергравитационного стресса на выживаемость, газообмен, терморегуляцию и синтез РНК и белка у мышей разного возраста // Пробл. стар. долголет.—1996.—6, № 2.—С. 145—150.
2. Aebi H. Catalase *in vitro* // Meth. Enzymol.—1984.—105.—P. 121—126.
3. Balmagia T., Rosovsky S. J. Age-related changes in thermoregulation in male albino rats // Exp. Gerontol.—1983.—18, N 4.—P. 199—210.
4. Frolkis V. V., Muradian Kh. K. Life span prolongation. — Boca Raton: CRC Press, 1991.—421 p.
5. Fuller P. M., Jones T. A., Jones S. M., Fuller C. A. Neurovestibular modulation of circadian and homeostatic regulation: vestibulohypothalamic connection? // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.—2002.—99, N 24.—P. 15723—15728.
6. Fuller P. M., Warden C. H., Barry S. J., Fuller C. A. Effects of 2-G exposure on temperature regulation, circadian rhythms, and adiposity in UCP2/3 transgenic mice // J. Appl. Physiol.—2000.—89, N 4.—P. 1491—1498.
7. Godin D. V., Garnett M. E. Effects of various anesthetic regimens on tissue antioxidant enzyme activities // Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.—1994.—83, N 1.—P. 93—101.

8. Iwasaki K. I., Sasak I., Hirayangi K., Yajima K. Usefulness of daily +2Gz load as a countermeasure against physiological problems during weightlessness // Acta Astronaut.—2001.—49, N 3—10.—P. 227—235.
9. Kumei Y., Shimokawa R., Kimoto M., et al. Gravity stress elevates the nociceptive threshold level with immunohistochemical changes in the rat brain // Acta Astronaut.—2001.—49, N 3—10.—P. 381—390.
10. Lackner J. R., DiZio P. Artificial gravity as a countermeasure in long-duration space flight // J. Neurosci. Res.—2000.—62.—P. 169—176.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. H., Farr A. L., Randall J. R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.—1951.—193.—P. 265—275.
12. McCord J. M., Fridovich I. J. M. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein) // 1969.—24, N 22.—P. 6049—6055.
13. Monson C. B., Horowitz J. M., Horowitz B. A. Core temperature is regulated, although at a lower temperature, in rats exposed to hypergravitic fields // J. Therm. Biol.—1988.—13, N 3.—P. 93—101.
14. Paglia D. E., Valentine W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase // J. Clin. Med.—1967.—70.—P. 158—169.
15. Roos D., Weening R. S., Voetman A. A., et al. Protection of phagocytic leukocytes by endogenous glutathione: studies in a family with glutathione reductase deficiency // Blood.—1979.—53.—P. 851—866.
16. Stein T. F. Space flight and oxidative stress // Nutrition.—2002.—18, N 10.—P. 867—871.
17. Wade C. E., Moran M. M., Oyama J. Resting energy expenditure of rats acclimated to hypergravity // Aviat. Space Environ. Med.—2002.—73, N 9.—P. 859—864.
18. Young L. R. Artificial gravity consideration for a Mars exploration mission // Annals N. Y. Acad. Sci.—1999.—871.—P. 367—378.

THERMOREGULATION, RESPIRATION QUOTIENT AND KEY ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES IN THE LIVER AND HEART OF RATS UNDER HYPERGRAVITY STRESS

Kh. K. Muradian, A. N. Timchenko, N. A. Utko,
T. A. Badova, V. V. Bezrukov

Effects of mild hypergravity stress (2g) on respiration quotient, body temperature and coefficient of thermoconductivity, as well as activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in the liver and heart of male Wistar rats are studied. Hypergravity stress, modelled by centrifugation, induced a significant decline of body temperature which reached the minimal level at 2-4 h and almost returned to the normal values within 3 h of the post-hypergravity recovery period. Thermoconductivity exhibited almost opposite dynamics, namely, increase followed by normalization. Results of linear regression and correlation analyses demonstrated positive correlation between body temperature and V_{O_2} during the both phases of body temperature decrease and recovery. Respiration quotient declined progressively within the whole investigated period, which can be a result of enhancing thermogenesis due to preferential oxidation of fatty acids. The data of 3D non-linear plotting indicated that body temperature could be higher in the individuals which manage quicker switching on fatty acid oxidation during the centrifugation.