

УДК 612.67. 612.017

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ГОМЕОСТАЗА КРЫС ВИСТАР НА ХОЛОДОВОЙ СТРЕСС: ЗАКАЛИВАНИЕ, ИЛИ ДЕЗОРГАНИЗАЦИЯ?

© 2024 г. М. В. Кондашевская^{1, *}, К. А. Артемьева¹, В. В. Алексанкина¹, Е. Б. Манухина²,
член-корреспондент РАН Л. М. Михалева¹

Поступило 20.05.2024 г.

После доработки 15.06.2024 г.

Принято к публикации 17.07.2024 г.

Воздействие холода, особенно в сочетании с физическими нагрузками, является распространенным закалывающим мероприятием. Однако мало изучено влияние таких процедур на людей и животных в преклонном возрасте. В данном исследовании, проводимом с использованием показателя коэффициента стабильности гомеостаза, впервые представлена комплексная информация о реакции организма старых и молодых крыс Вистар на 20-минутное плавание в холодной воде. Изучено влияние на гормональную, гематологическую и морфофункциональную систему печени и тимуса. У старых интактных крыс обнаружены неблагоприятные возрастные изменения стабильности гомеостаза, которые затрудняют восстановление организма после холодового стресса и требуют задействования большего числа гомеостатических механизмов по сравнению с молодыми животными. Было обнаружено, что печень является наиболее уязвимым органом к холодовому стрессу. Сделан вывод о возможности применения процедур холодового закаливания в пожилом возрасте с учетом возрастных ограничений.

Ключевые слова: молодые и старые крысы, холодовой стресс, закаливание, адаптация, биоиндикаторы, коэффициент стабильности гомеостаза

DOI: 10.31857/S2686738924050086

ВВЕДЕНИЕ

Старение — разрушительный биологический процесс, который развивается с возрастом, обуславливает ограничение адаптационных возможностей организма, что часто является причиной формирования возрастной патологии. Н. Selye рассматривал старение и смерть с позиции истощения «адаптационной энергии» — объема энергии, запрограммированной при рождении и расходуемой для адаптации к регулярно изменяющимся условиям среды, то есть к стресс-факторам. Ученый считал, что адаптационную энергию можно восстановить, если сохранился потенциал ресурсов [1]. В настоящее время активно

изучаются механизмы старения, а также лекарственные и нелекарственные методы восстановления резервных возможностей организма человека и животных. Например, доказано, что физические упражнения являются эффективным средством оздоровления и повышения жизнеспособности пожилых людей [2]. Поскольку установлено, что дозированное влияние факторов среды, таких как гипоксия, физические нагрузки, высокие и низкие температуры, способно повышать устойчивость и резервные возможности организма при неблагоприятных воздействиях, исследователи продолжают изучать срочные и долговременные механизмы адаптации и способы сочетанного применения нагрузок [3, 4]. На сегодняшний день достаточно много работ по изучению влияния холодовых воздействий, проводимых в основном на молодых людях и животных, но чрезвычайно мало известно о реакции организма старых индивидов и особей [4, 5].

Цель работы: используя комплексный показатель — коэффициент стабильности гомеостаза, сравнить реакцию организма старых и молодых крыс Вистар на плавание в холодной воде.

¹Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

²ФГБНУ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

*e-mail: marivladiko@mail.ru

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в осенне-зимний период на 80 половозрелых самцах крыс Вистар в возрасте 3 мес (масса тела 200–220 г, $n = 40$) и 19 мес (масса тела 650–750 г, $n = 40$) (питомник Филиал «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» России). Животных содержали по 5 особей в клетке при естественном освещении и температуре 20–22°C. Доступ к воде и пище был свободным.

Для моделирования холодового воздействия в водной среде (ХВС) крыс погружали в емкость с холодной ($t = +4^\circ\text{C}$) водой, где они поодиночке свободно плавали в течение 20 мин, при температуре окружающего воздуха $+22^\circ\text{C}$.

Было проведено 2 серии экспериментов. Крыс серии 1 выводили из эксперимента путем декапитации под наркозом (диэтиловый эфир) через 1 час после ХВС: 1 группа – интактные молодые крысы ($n = 10$); 2 – молодые животные, подвергавшиеся ХВС ($n = 10$); 3 – старые интактные крысы ($n = 10$); 4 – старые особи, подвергавшиеся ХВС ($n = 10$). Крыс серии 2 выводили из эксперимента через 14 суток после ХВС, были сформированы группы, аналогичные серии 1 ($n = 40$).

Гистологическое исследование

Фрагменты тимуса, печени и сердца фиксировали в забуференном нейтральном формалине ($\text{pH} = 7.4$) в течение 48 ч, заливали в парафин, изготавливали гистологические срезы толщиной 5 мкм. Срезы тимуса окрашивали гематоксилином и эозином, на микрофотографиях определяли среднюю оптическую плотность (ОП) клеток функциональных зон с помощью программы “ImageJ” 1.48d (Wayne Rasband (США)). Срезы печени и сердца окрашивали гистохимическим методом на содержание гликогена, используя реакцию ШИК (PAS) без докраски гематоксилином [6]. Оценку плотности окраски (содержание гликогена) производили на микрофотографиях с помощью программы “ImageJ”. Количество полей зрения для каждой группы составляло не менее 10 при увеличении 400.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Концентрацию гормонов определяли в периферической крови, полученной при декапитации из шейных сосудов. Вытекающую из шеи кровь собирали в пробирки с активатором свертывания (Xinle, Китай), центрифугировали при 200 g в течение 20 мин, отбирали сыворотку, в которой методом ИФА определяли концентрацию кортизола (IBL, Германия), общего тестостерона (DVC, Канада) и мелатонина (Cusabio, Китай). Для регистрации

использовали микропланшетный ИФА-анализатор «ANTHOS 2010» (Австрия).

Для определения показателей красной крови использовали свежую кровь, которую исследовали с помощью автоматического гематологического анализатора Mindray bc 2800 vet (Китай) с программным обеспечением Rat. Определяли: уровень гемоглобина в крови – HGB, число эритроцитов – RBC, среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците – MCHC, среднее содержание гемоглобина в эритроците – MCH.

Оценка изменений полученных показателей

Суммарную динамику изменений изучаемых показателей оценивали по коэффициенту стабильности гомеостаза (КСГ), который представляет собой сумму значений всех гормональных, гематологических и морфофункциональных параметров, взятых в процентном отношении к соответствующим значениям показателей интактных молодых крыс и отнесенных к общему числу изучаемых параметров (всего 12) [7, 8].

Статистический метод

Сравнение экспериментальных групп производили при помощи ANOVA, критерия Краскела–Уоллеса для множественных сравнений, U-критерия Манна–Уитни для парных сравнений и критерия χ^2 Пирсона. Данные получали в виде $M \pm SEM$ (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего), затем значения всех параметров выражали в процентном отношении к показателям интактных молодых животных, которые принимали за 100%. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Показатели гомеостаза старых и молодых крыс Вистар через 1 ч после ХВС

Холодовое воздействие не провоцировало изменения внешнего вида и массы тела крыс в какие-либо периоды эксперимента. Через 1 ч после ХВС у молодых и старых животных наблюдалось ожидаемое повышение уровня кортизола. Однако, у старых особей, подвергавшихся ХВС, уровень кортизола был ниже, чем у молодых в тех же условиях (рис. 1А). Уровень мелатонина у молодых животных при ХВС оказался достоверно значимо выше, чем у одновозрастных интактных, тогда как у старых крыс при ХВС содержание мелатонина не претерпевало изменений, оставаясь почти на 50% ниже уровня молодых интактных особей. Вызывали интерес изменения уровня анаболического гормона – тестостерона, который снижался после

ХВС у молодых крыс, но повышался у старых животных. В то же время, содержание тестостерона у интактных старых особей было значительно ниже, чем у аналогичной группы молодых (рис. 1А).

Значительную стабильность проявили показатели красной крови, которые не изменялись при ХВС у молодых крыс. В отличие от молодых интактных животных, старые интактные крысы характеризовались повышенным числом эритроцитов (RBC) в периферической крови, но пониженными значениями среднего содержания гемоглобина в эритроците (МСН). После ХВС у старых животных наблюдалось снижение RBC и средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСН) при повышении МСН (рис. 1В).

Морфологические признаки снижения энергетического резерва организма были выявлены при измерении ОП гистохимической окраски на гликоген у всех групп, подвергавшихся ХВС (рис. 1С). У интактных старых особей по сравнению с интактными молодыми крысами зарегистрированы более низкие значения уровня гликогена в печени.

Кроме того, в отличие от молодых, после ХВС у старых животных снижалось содержание гликогена в миокарде (рис. 1С).

По сравнению с молодыми интактными крысами тимус старых крыс характеризовался существенным уменьшением клеточного состава всех функциональных зон. После ХВС у молодых и старых крыс наблюдалось утолщение субкапсулярной зоны. Вместе с тем, у старых животных увеличивалось заполнение клетками коркового вещества (1D).

Показатели гомеостаза старых и молодых крыс Вистар через 14 сут после ХВС

Судя по всем показателям, приведенным на рис. 2, кроме уровня ОП гликогена в печени, который оставался ниже нормы, организм молодых крыс возвратился к исходному состоянию через 14 сут после стресса (рис. 2). При этом у старых животных после ХВС наблюдалось снижение содержания мелатонина и показателя красной крови МСН

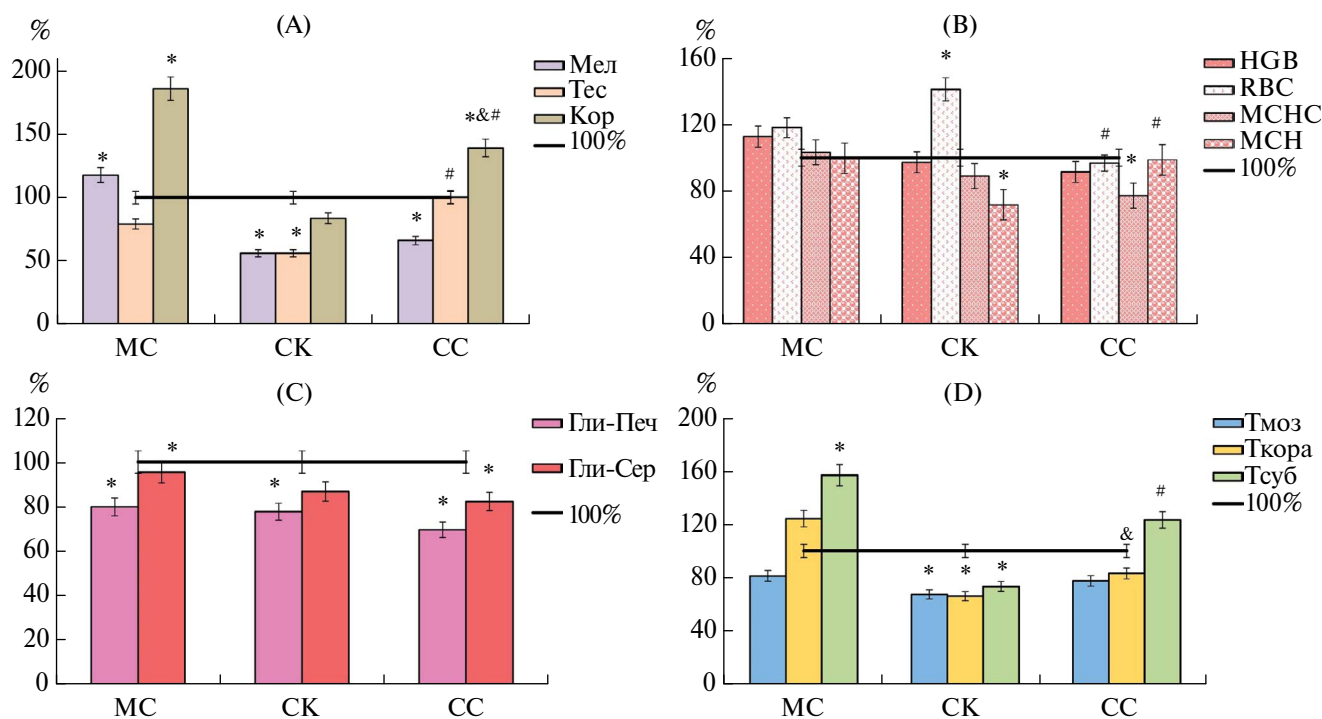


Рис. 1. Значения гормональных, гематологических и морфофункциональных параметров гомеостаза крыс через 1 ч после холодового воздействия водной среды (ХВС) в процентном отношении к показателям интактных молодых животных (показатели интактных животных приняты за 100%).

1А – гормональный фон: Мел – мелатонин, Тес – тестостерон, Кор – кортизол; 1В – показатели красной крови: HGB – уровень гемоглобина в крови, RBC – число эритроцитов, МСНС – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, МСН – среднее содержание гемоглобина в эритроците; 1С – значения оптической плотности (ОП) окраски на гликоген в печени (Гли-Печ) и сердце (Гли-Сер); 1D – значения ОП клеток функциональных зон тимуса: Тмоз – мозговое вещество, Ткора – корковое вещество, Тсуб – субкапсулярная зона. MC – молодые крысы после ХВС, CK – старые интактные крысы, CC – старые животные после ХВС. * $p < 0.05$ по сравнению с интактными молодыми крысами (МК); & $p < 0.05$ сравнение MC и CC; # $p < 0.05$ сравнение CK и CC (по критерию χ^2 Пирсона).

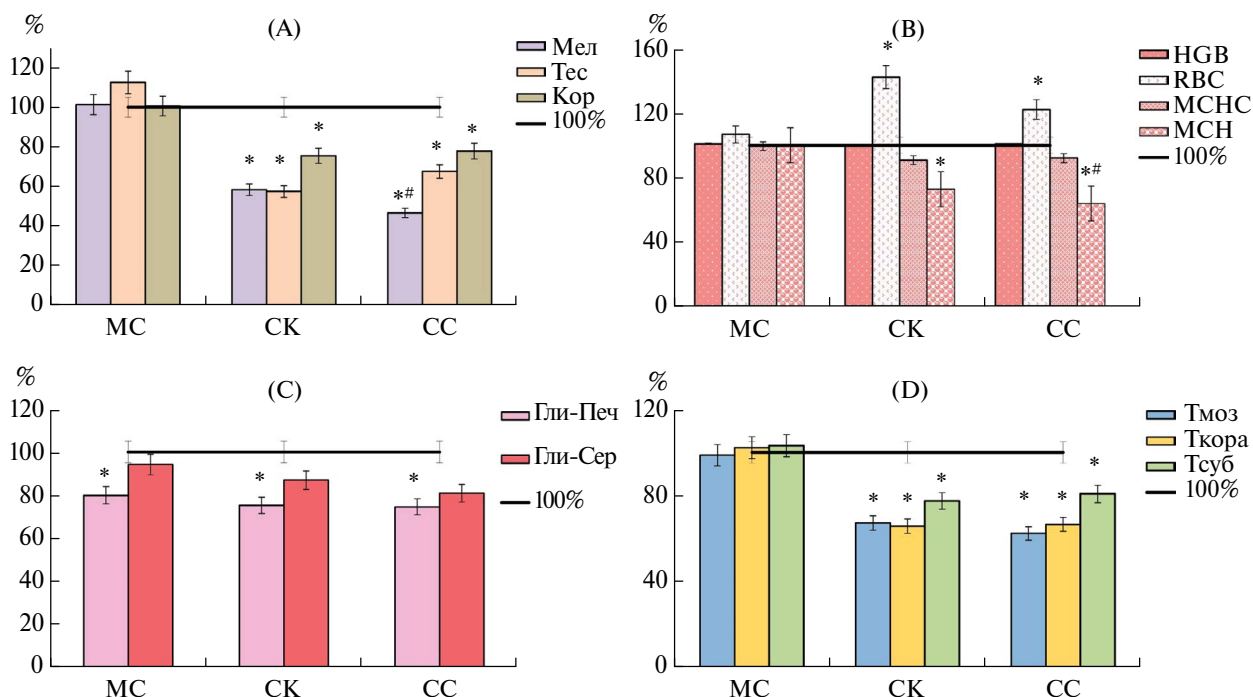


Рис. 2. Значения гормональных, гематологических и морфофункциональных параметров гомеостаза крыс через 14 суток после холодного воздействия водной среды в процентном отношении к показателям intactных молодых животных (показатели intactных животных приняты за 100%). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

в то время, как все остальные параметры гомеостаза, включая уровень гликогена печени, достигали своего исходного уровня (рис. 2).

Показатели возрастной и ситуационной вариабельности коэффициента стабильности гомеостаза крыс Вистар через 1 ч и 14 суток после ХВС

На рисунке 3 видно, что абсолютные показатели коэффициента КСГ у intactных старых крыс были гораздо ниже, чем у молодых intactных особей. Интересно отметить, что через 1 ч примененный нами однократный стресс в виде ХВС индуцировал повышение КСГ как у молодых, так и у старых животных. Тем не менее, через 14 сут после ХВС значения КСГ достигли своего исходного возрастного уровня (рис. 3).

В данной работе проведено исследование реакции гомеостаза молодых и старых крыс Вистар на однократный 20-минутный холодный стресс в водной среде (ХВС, $t = +4^{\circ}\text{C}$) через 1 час и 14 суток. Изучали гормональные показатели важнейших катаболических и анаболических гормонов (кортизола, мелатонина, тестостерона), показатели красной крови, содержания гликогена в печени и сердце, а также клеточного состава функциональных зон главного органа иммунной системы — тимуса. Вычисляли вариабельность

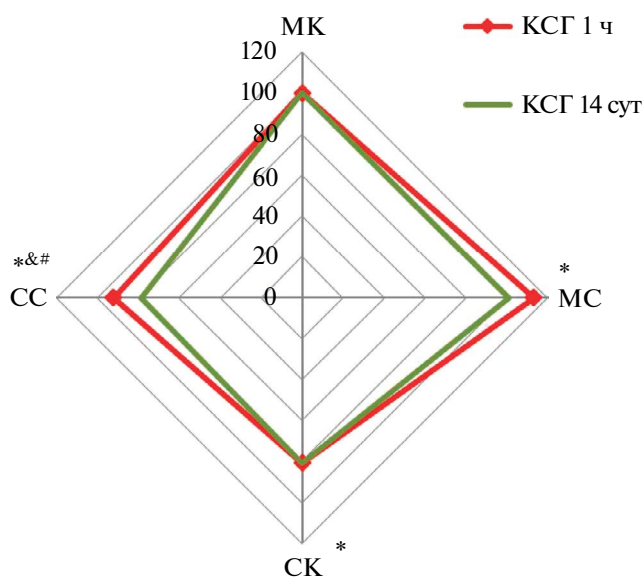


Рис. 3. Возрастная и ситуационная вариабельность коэффициента стабильности гомеостаза (КСГ) у молодых и старых крыс Вистар через 1 ч и 14 сут после холодного воздействия водной среды (ХВС). МК — молодые intactные крысы, МС — молодые особи после ХВС, СК — старые intactные крысы, СС — старые животные после ХВС. * $p < 0.05$ по сравнению с нормой МК; $^{\&}p < 0.05$ сравнение МС и СС; $^{\#}p < 0.05$ сравнение СК и СС (по критерию χ^2 Пирсона).

коэффициента стабильности гомеостаза (КСГ) в зависимости от возраста и промежутка времени после ХВС. Особо следует отметить, что впервые нами зарегистрировано повышение КСГ у молодых и старых крыс через 1 час после воздействия ХВС. Вероятно, использованная разновидность и длительность стресса способствовали мобилизации защитных сил организма животных, в результате чего адаптация пошла по пути эустресса, то есть полезного стресса. Следовательно, у всех животных оказалось достаточно защитных ресурсов для преодоления последствий воздействия ХВС, в связи с чем применяемые в нашем эксперименте условия охлаждения можно считать закаливающей адаптацией к стрессу.

У молодых крыс возможными причинами развития эустресса стало повышение уровня кортизола и мелатонина. О протекторных механизмах кортизола при стрессе достаточно много известно. Судя по общей реакции КСГ — его повышению, усиление секреции кортизола не вышло за рамки допустимого, и нарушения эффективности ответа на стресс не произошло. Вместе с тем, в научной литературе нередко появляются сведения о негативном влиянии кортикостерона, или кортизола на выработку важного анаболического гормона, тестостерона у молодых животных, что мы и обнаружили в нашем эксперименте. Тем не менее, снижение выработки тестостерона не привело к развитию дистресса [9, 10]. Повышение у молодых особей уровня мелатонина, вероятно, обеспечило защиту от развития оксидативного стресса, так как в настоящее время сформировалось мнение о направленном влиянии этого гормона на инактивацию активных форм кислорода (АФК), перепроизводство которых митохондриями обычно наблюдается при стрессе. Достаточно давно установлено, что избыток митохондриальных АФК отрицательно влияет на гомеостаз организма животных и человека [11]. Устойчивость показателей красной крови — наиболее важного звена гомеостаза, очевидно, сыграла протекторную роль в защите от дистресса молодых крыс. Также имело свое положительное значение то, что ОП клеточного состава тимуса и содержания гликогена в сердце практически не отличались от таковых у интактных животных. Снижение показателей ОП гликогена в печени при стрессе, вероятно, явилось отражением расхода энергетических запасов на интенсификацию многочисленных метаболических процессов в организме. Необходимо отметить, что значения ОП гликогена печени, в отличие от остальных параметров, не вернулись к норме даже через 14 суток после стресса.

При анализе показателей старых крыс нами установлено снижение КСГ с возрастом у интактных животных, что уже отмечалось в работе И.А. Виноградовой и соавт. [8]. По сравнению с молодыми интактными особями у старых животных

зарегистрировано снижение уровня всех исследуемых гормонов, содержания гликогена в печени, числа клеток во всех функциональных зонах тимуса. Не выявлено возрастных различий лишь по ОП гликогена в сердце. В то же время, число эритроцитов в периферической крови старых интактных крыс оказалось повышенным, а показатель МСН — сниженным. Аналогичные возрастные изменения зафиксированы в работе О.К. Мустафиной и соавт. [12].

Как известно, старение сопровождается нарушением регуляции адаптационных процессов [13]. Однако, в нашем эксперименте КСГ у старых крыс после ХВС оказался повышенным. Вероятно, такой эффект был достигнут тем, что в ответ на стресс наблюдалось повышение не только уровня кортизола, но и секреции тестостерона. В работах с применением экзогенного тестостерона часто сообщается, что в организме старых животных и людей наблюдается индукция адаптивной защитной реакции, в частности через изменение экспрессии генов [14, 15]. Анаболические свойства тестостерона способствуют усилению синтеза аминокислот, нуклеотидов, полисахаридов, белков, АТФ, необходимых для осуществления защитных адаптивных реакций. Особенно хорошо известно стимулирующее действие тестостерона на нервную мышечную систему, в том числе и на миокард [16]. Возможно, подъем уровня тестостерона через 1 час после стресса способствовал возвращению к исходным значениям уровня гликогена в миокарде и печени через 14 суток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данном исследовании установлены существенные неблагоприятные возрастные инволюционные изменения коэффициента стабильности гомеостаза у интактных старых крыс Вистар. Использование данного параметра позволило обнаружить, что в ответ на однократный 20-минутный холодовой стресс ($t = +4^{\circ}\text{C}$) в водной среде, через 1 час у старых и молодых животных сформировался позитивный адаптивный процесс — эустресс, свидетельствующий о закаливании организма. Организм молодых животных справился с повышенной нагрузкой, используя меньшее число гомеостатических механизмов. Напряжение организма старых крыс обусловило интенсификацию секреции тестостерона и наращивание клеточного состава тимуса. Как у молодых, так и у старых животных наиболее чувствительным и уязвимым к стрессу органом оказалась печень. Сделан вывод о возможности применения процедур холодового закаливания людей в пожилом возрасте с учетом возрастных ограничений. Однако, после холодовой процедуры не рекомендуется

употребление крепких напитков и острой пищи, негативно действующих на печень. Все процедуры закаливания рекомендуется осуществлять под систематическим контролем лечащего специалиста.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках Госзадания лаборатории патологии клетки НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского № 1023100400015-7-3.1.9, а также Госзадания лаборатории регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии № FGFU-2022-0011.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные процедуры проводили согласно требованиям и международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, используемых для экспериментальных и научных целей. Исследование одобрено Комитетом по биоэтике Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (протокол № 34 от 22 апреля 2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Selye H.* Experimental evidence supporting the conception of «adaptation energy» // *Am. J. Physiol.* 1938. V. 123. P. 758–765.
2. *Багнюк И.С.* Физкультура для людей среднего и пожилого возраста // *Вопросы экспертизы и качества медицинской помощи.* 2023. № 2. С. 6–8.
3. *Negaresh R., Ranjbar R., Habibi A. et al.* The effect of resistance training on quadriceps muscle volume and some growth factors in elderly and young men // *Adv Gerontol.* 2017. V. 30. № 6. P. 880–887.
4. *Ajjimaporn A., Chaunchaiyakul R., Pitsamai S. et al.* Effect of cold shower on recovery from high-intensity cycling in the heat // *J Strength Cond Res.* 2019. V. 33. № 8. P. 2233–2240.
5. *Сонькин В.Д., Якушкин А.В., Акимов Е.Б. и др.* Физиологический анализ перекрестной адаптации к холодовым воздействиям и физическим нагрузкам // *Физиология человека.* 2014. Т. 40. № 6. С. 98–113.
6. *Bezborodkina N.N., Okovityi S.V., Kudryavtsev B.N.* Postprandial Glycogen Content Is Increased in the Hepatocytes of Human and Rat Cirrhotic Liver // *Cells.* 2021. V. 10. P. 976.
7. *Хавинсон В.Х., Морозов В.Г.* Применение пептидов тимуса в качестве геропротекторных средств // *Пробл. старения и долголетия.* 1991. Т. 1. № 2. С. 123–128.
8. *Виноградова И.А., Букалев А.В., Забежинский М.А. и др.* Влияние светового режима и мелатонина на гомеостаз, продолжительность жизни и развитие спонтанных опухолей у самок крыс // *Успехи геронтол.* 2007. Т. 20. № 4. С. 40–47.
9. *Maeda N., Fujiki J., Hasegawa Y. et al.* Testicular induced corticosterone synthesis in male rats under fasting stress // *Steroids.* 2022. V. 177. P. 108947.
10. *Angelier F, Wingfield JC.* Importance of the glucocorticoid stress response in a changing world: theory, hypotheses and perspectives // *Gen Comp Endocrinol.* 2013. V. 190. P. 118–28.
11. *Zhang B., Pan C., Feng C. et al.* Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation // *Redox Rep.* 2022. V. 27. № 1. P. 45–52.
12. *Мустафина О.К., Трушина Э.Н., Шумакова А.А. и др.* Гематологические показатели у крыс Вистар разного возраста, содержащихся на полусинтетическом полноценном виварном рационе // *Вопр. Питания.* 2013. № 2. С. 10–16.
13. *Lissek Th.* Aging, adaptation and maladaptation // *Front Aging.* 2023. V. 4. P. 1256844.
14. *Moreau KL, Babcock MC, Hildreth KL.* Sex differences in vascular aging in response to testosterone // *Biol Sex Differ.* 2020. V. 11. № 1. P. 18.
15. *Calabrese V, Scapagnini G., Davinelli S. et al.* Sex hormonal regulation and hormesis in aging and longevity: role of vitagenes // *J Cell Commun Signal.* 2014. V. 8. № 4. P. 369–84.
16. *Crewther B.T., Cook C., Cardinale M. et al.* Two emerging concepts for elite athletes: the short-term effects of testosterone and cortisol on the neuromuscular system and the dose-response training role of these endogenous hormones // *Sports Med.* 2011. V. 41. № 2. P. 103–23.

AGE PECULIARITIES OF HOMEOSTASIS RESPONSE IN WISTAR RATS TO COLD STRESS: HARDENING OR DISORGANIZATION?

**M. V. Kondashevskaya^{a, #}, K. A. Artemyeva^a, V. V. Aleksankina^a, E.B. Manukhina^b,
and Corresponding Member of the RAS L. M. Mikhaleva^a**

*^aAvtsyn Research Institute of Human Morphology Federal State Budgetary Scientific Institution
“Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russian Federation*

*^bFederal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Moscow, Russian Federation*

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

Cold exposure, especially in combination with physical activity, are common hardening procedures. However, the effects of such procedures in old age have been little studied. This study, conducted using the homeostasis stability coefficient indicator, provides for the first time comprehensive information on the body response of old and young Wistar rats to a 20-minute swim in cold water. The effects of hormonal, hematological and morphofunctional systems have been studied. Unfavorable age-related changes in the stability of homeostasis were discovered in old rats, which complicate its recovery after cold stress and require the involvement of a greater number of homeostatic mechanisms compared to young animals. The liver was found to be the most vulnerable organ to cold stress. It is concluded that it is possible to use cold hardening procedures in old age, considering age restrictions.

Keywords: young and old Wistar rats, swimming in cold water, homeostasis stability coefficient