

**Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка**

ТОЛСТУН ДЕНИС ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 612.68-019:612.22

**ВПЛИВ ГІПОКСИЧНО-ГІПЕРКАПНІЧНОГО СЕРЕДОВИЩА НА
ФІЗІОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ І СТАРІННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН**

03.00.13 - фізіологія людини і тварин

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ-2021

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в лабораторії фізіології ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України»

Науковий керівник: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Мурадян Хачік Казарович,
ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України»,
головний науковий співробітник лабораторії фізіології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Літовка Ірина Георгіївна,
Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України,
провідний науковий співробітник відділу клінічної патофізіології

доктор біологічних наук, професор
Гльїн Володимир Миколайович,
Національний університет фізичного виховання та спорту,
професор кафедри медико-біологічних дисциплін

Захист дисертації відбудеться «11» травня 2021 р. о 16-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. _____.

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.38.

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12.

Автореферат розісланий «_____» квітня 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38

доктор біологічних наук



К. О. Дворщенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Пошук засобів цілеспрямованої модуляції окисних процесів був і залишається актуальним завданням біології, медицини і, зокрема, геронтології [Bordini N., 2016; Thies F., 2016]. Адже процеси життєдіяльності організму енергозалежні, а, отже, контроль над перетворенням енергії відкриває реальні можливості управління ними. Саме енергія і температура — ті основоположні термодинамічні характеристики, які здатні модифікувати темпи і спрямованість практично всіх процесів у живих системах, включаючи процеси старіння [Lehmann G., 2013; Keil G., 2015]. Хоча деякі аспекти залишаються дискусійними, встановлено, що зниження температури тіла і енергетичних витрат сприяють уповільненню старіння й подовженню життя як пойкилотермних, так і гомойотермних організмів [Conti V., 2008; Tabarean I. et al., 2010; Xiao R. et al., 2015]. На жаль, тут залишаються невирішені питання, основним з яких є складність довготривалого зниження температури тіла і метаболізму у теплокровних. Багаторічний пошук засобів модифікації енергетичного обміну показав, що хронічне застосування хімічних модуляторів малоефективне через відносно швидке вироблення механізмів протидії, яке підсилюється інтоксикацією, спричиненою продуктами розпаду ксенобіотиків, якими є більшість інгібіторів метаболізму [Frolkis V., Muradian K., 1991].

В останні роки для досліджень в галузі геронтології широко застосовуються нетрадиційні організми-моделі, зокрема, голий землекоп (*Heterocephalus glaber*, ГЗ), природні якості якого дають уявлення про біологічні механізми успішного старіння. Він демонструє виключну стійкість до багатьох форм стресу, гіпоксії, репродуктивного старіння, серцево-судинних захворювань [Grimes K. et al., 2017; Xiao R. et al., 2017] та різних хвороб (саркопенія, діабет) [Singer M., 2011; Stoll E. et al., 2016], зокрема до злоякісних новоутворень [Seluanov A. et al., 2018]. Оскільки тривалість життя ГЗ приблизно на порядок вища [Buffenstein R., 2008; Csiszar A., 2007], а швидкість метаболізму і температура тіла (33-34 °C) істотно нижчі, ніж у споріднених видів, наприклад, у мишей [Nathaniel T. et al., 2012; Lewis K. et al., 2018], його вивчення може сприяти вирішенню проблем хронічного зниження рівня обмінних процесів і температури тіла.

На підставі порівняльного аналізу геномів ГЗ та миші, який виявив лише незначні відмінності ДНК, було зроблено припущення, що різниця в процесах старіння та довголіття зумовлена особливостями способу їхнього життя і фізіології [Kim E. et al., 2011]. Великі колонії ГЗ живуть в глибоких і погано вентильованих норах [Goldman B. et al., 1999], а в такому середовищі вміст CO₂ помітно зростає (до 10 %), а O₂ пропорційно зменшується [Bennett N., Faulkes S., 2000]. Тому є підстави вважати, що саме таке гіпоксичне і гіперкапнічне середовище (ГГС) сприяє зниженню інтенсивності обмінних процесів і температури тіла ГЗ [Honda S., 1993; Feng J., 2001; Forgan L., 2010]. Таке припущення викликає питання: що буде, якщо помістити мишей у газове середовище, аналогічне середовищу проживання ГЗ? Чи може середовище призвести до оптимізації метаболічних процесів і підвищенню стійкості до розвитку патології? Вже перші експерименти показали, що ГГС здатне

викликати суттєве зниження швидкості обмінних процесів. Це робить його багатообіцяючим і універсальним засобом як для управління фізіологічними процесами, так і для профілактики та лікування патологічних порушень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота була виконана згідно з планом науково-дослідних тем лабораторії фізіології ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України»: «Вивчити вплив штучної атмосфери на газообмін, антиоксидантну захист і тривалість життя лабораторії комах і ссавців» (№ д/р 0109U001716, 2009-2011 рр.), «Вивчити вплив штучної атмосфери на функціональні можливості і тривалість життя дрозофіл і мишей» (№ д/р 0112U000522, 2012-2014 рр.) і «Вивчення циркадного ритму комплексу поведінкових і метаболічних показників при старінні лабораторних тварин» (№ д/р 0115U000616, 2015-2017 рр.), в яких дисертант приймав участь як виконавець окремих фрагментів.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи — з'ясувати можливості зниження інтенсивності метаболічних процесів, уповільнення розвитку залежних від віку патологічних станів та старіння за допомогою газового середовища різного складу. Особлива увага була приділена вивченню впливу ГГС на розвиток діабету і загоєнню ран в якості прикладного застосування.

Для виконання поставленої мети були поставлені наступні завдання:

1. З'ясувати можливості модуляції швидкості газообміну і терморегуляції у мишей різного віку на моделі гострої ГГС, а також ГГС з посиленням чи послабленням гіпоксичним і гіперкапнічним компонентом за допомогою додавання до повітря N_2 , H_2 , He , Ar , O_2 і CO_2 .

2. Визначити вплив хронічної експозиції ГГС на інтенсивність газообміну, терморегуляцію, споживання їжі та води, масу тіла та окремих органів, склад крові і вміст лактату.

3. Оцінити рівень експресії генів, які активуються при стресі (*hsp-90*) і посиленні гліколізу (*ucp-2*).

4. Вивчити вплив ГГС на темпи загоєння ран.

5. Дослідити вплив ГГС на стійкість до розвитку діабету I типу.

6. Визначити можливості підвищення резистентності до стресу і подовження життя дрозофіл за допомогою штучної атмосфери різного складу.

Об'єкт дослідження — молоді, дорослі і старі миші лінії *CBA* і *C57Bl/6*, а також дрозофіли лінії *Oregon-R*.

Предмет дослідження — швидкість газообміну, температура поверхні тіла (ТПТ), споживання їжі та води, моторна активність, клітинний і біохімічний склад крові, лактат мозку, експресія генів *ucp-2* і *hsp-90*, тест толерантності до глюкози, стрептозотоцинова модель діабету, загоєння ран, стресостійкість і тривалість життя.

Методи дослідження: фізіологічні, біохімічні, молекулярно-біологічні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Розроблено модель і вперше вивчено вплив гострої і хронічної збалансованої ГГС (в якій ΔP_{CO_2} приблизно дорівнює ΔP_{O_2}) на рівень метаболічних процесів, загоєння ран та розвиток діабету у мишей різного віку. Вивчено можливості підвищення стресостійкості

і подовження життя за допомогою штучної атмосфери на класичному генетичному та геронтологічному модельному організмі — дрозофілі. Показано, що короткострокова витримка у ГГС викликає дозо-залежне зниження швидкості газообміну (V_{O_2} і V_{CO_2}) і ТПТ мишей без суттєвих вікових відмінностей. При довготривалій витримці зниження метаболізму і ТПТ зберігається до кінця досліду (30 діб), що робить ГГС потужним засобом хронічного гіпометаболізму й гіпотермії. Разом зі зниженням інтенсивності метаболізму пропорційно знижується маса тіла, а також споживання їжі та води, що може бути перспективним засобом ослаблення негативних ефектів метаболічного синдрому і аналогом калорійного обмеження раціону. ГГС майже не викликає зміни клітинного і біохімічного складу крові та гормонів FT3 і FT4, проте суттєво знижує рівень глюкози у крові. Експресія білку роз'єднання окислення і фосфорилування (*ucp-2*) в гіпоталамусі і білку-шаперону теплового шоку (*hsp-90*) в тканинах серця істотно не змінюється. Показано зростання стійкості до розвитку діабету I типу на стрептозотоциновій моделі. ГГС має стимулюючий вплив на загоєння ран шкіри. При утриманні дрозофіл в гіпоксичних середовищах з додаванням H_2 , He і Ar підвищується життєздатність в стресових умовах і подовжується життя.

Практичне значення одержаних результатів. В роботі отримані дані про хронічний гіпометаболізм і гіпотермію, індуковані ГГС, що може стати основою для розробки підходів уповільнення темпів старіння і попередження вікової патології. Економізація метаболічних витрат, підвищення стійкості до стресорних впливів, сповільнення розвитку діабету I типу та пришвидшення загоєння ран у мишей може мати застосування в різних галузях біології та медицини — від лікування хвороб і забезпечення активного довголіття до використання в космонавтиці. Методичні підходи, розроблені в роботі, використовуються в експериментальних дослідженнях ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України».

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проведений пошук і аналіз вітчизняної і закордонної наукової літератури по напрямку дисертаційного дослідження, а також участь у розробці методичної концепції роботи; виконано експериментальні дослідження, аналіз і узагальнення отриманих результатів, статистична обробка даних, формулювання висновків роботи і підготовка матеріалів до друку.

Автор висловлює щиру подяку передчасно померлому старшому науковому співробітнику лабораторії фізіології А. Тимченку за допомогу в технічній організації експериментів, керівнику лабораторії ендокринології к.б.н. Т. Дубілей за допомогу в проведенні біохімічних аналізів та ПЛР, керівнику Центру з мультидисциплінарних досліджень проблем старіння в Університеті ім. Бен-Гуріона в Неgevі (Ізраїль) проф. В. Фрайфельду за участь в експериментах і аналізі загоєння ран, а також старшому науковому співробітнику лабораторії радіобіології, к.б.н. Н. Утко за допомогу в проведенні аналізу активності ферментів СОД і каталази.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідалися і обговорювалися на: конференції молодих учених «Актуальні

проблеми геронтології і геріатрії», присвяченій пам'яті В. В. Фролькіса (Київ, 24 січня 2009); XVIII з'їзді фізіологів України (Одеса, 20 травня 2010); V Всеукраїнському конгресі геронтологів і геріатрів України (Київ, 5 жовтня 2010); конференції молодих учених «Актуальні проблеми геронтології і геріатрії», присвяченій пам'яті В. В. Фролькіса (Київ, 26 січня 2011); III міжнародній конференції «Дрозофіла в експериментальній генетиці і біології» (Канів, 11–16 травня 2012); II International Symposium «Molecular Mechanisms of Synaptic Transmission Regulation» In memory of Professor V. Skok (1932 – 2003) Kiev, Ukraine, 6 – 9 October 2012; міжнародній науково-практичній конференції «Прискорене старіння: механізми, діагностика, профілактика» (Київ, 4–5 жовтня 2012); VI конгресі патофізіологів України «Від експериментальних досліджень до клінічної патофізіології» (Ялта, 3–5 жовтня 2012); конференції молодих учених «Актуальні проблеми геронтології і геріатрії» (Київ, 25 січня 2013); 8th European Congress of Biogerontology (March 10–13, 2013, Israel); міжнародній науково-практичній конференції «Здоров'я и медицина для всех возрастов» (Курськ, 21–22 травня 2013); XIX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П. Г. Костюка (Львів, 24–26 травня 2015); V міжнародній конференції «Дрозофіла в експериментальній генетиці і біології» (Київ, 12-14 травня 2016); VI Всеукраїнському конгресі геронтологів і геріатрів України (Київ, 19–21 жовтня 2016); міжнародному симпозиумі «Expert's opinion on current approaches in anti-ageing medicine and gerontology» (Женева, Швейцарія, 27 травня 2017); конференції «Aging and Rejuvenation Conference» (Рим, Італія, 10-12 вересня 2018), I конференції «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, 18 жовтня 2018); II конференції «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, 21 листопада 2019); III конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, 19 листопада 2020).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковані 26 наукових праць, у тому числі 7 статей у спеціалізованих наукових журналах, 6 — у фахових виданнях, серед яких 1 включена до міжнародної наукометричної бази даних «Scopus», 18 тез доповідей на конгресах, з'їздах, конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, викладення результатів дослідження, обговорення результатів, висновків і списку використаних джерел, який включає 284 посилання. Робота викладена на 192 сторінках машинописного тексту, містить 7 таблиць, 70 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження

Об'єкти дослідження. Молоді (3-4 місяця), дорослі (8-12 місяців) і старі (24-26 місяців) миші лінії C57Bl/6 або CBA, які утримувались в стандартних умовах віварію ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України» при фіксованому світловому режимі 12:12 год з вільним доступом до

води та їжі *ad libitum*. Культура дрозofil лінії Oregon-R підтримувалась в лабораторії фізіології ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України» згідно із загальноприйнятими методиками.

Всі експерименти на тваринах було виконано з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (European convention, Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2016), а також норм біоетики і біологічної безпеки.

Гострі експозиції ГГС. 70 молодих мишей лінії CBA, 70 молодих та 70 старих мишей C57Bl/6 переносили зі стандартних клітин і тримали у 3-літрових банках індивідуально протягом 2 годин для звикання до нових умов. Після періоду адаптації банки герметично закривали на 3 години, що призводило до поступового збільшення CO₂ до 7-9 % і пропорційного зменшення вмісту O₂. Проби повітря для вимірювання CO₂ і O₂ відбиралися через кожні 30 хв. В той же час реєстрували кількість рухомих та сплячих мишей. ТПТ вимірювали відразу після завершення 3-х годинної витримки в ГГС.

Хронічний вплив ГГС. Були проведені дві незалежні серії дослідів по хронічному утриманню в ГГС. У першій серії були вивчені тільки неінвазивні параметри у молодих, дорослих і старих мишей C57Bl/6 протягом 90 днів. У другій серії дослідів 50 молодих мишей утримували в ГГС і виводили з експерименту для біохімічних і ПЛР-аналізів на 0, 1, 10, 20 і 30 добу експозиції. У хронічних серіях експериментів мишей утримували в стандартних клітках, вміщених в прозорі пластикові кювети з кришками. Отвори для обміну повітря кювет регулювали, щоб P_{O₂} і P_{CO₂} підтримувалися на рівні 10±2 %. Вміст O₂ і CO₂ в повітрі контролювали за допомогою газоаналізатору (Gerb. Minnhardt, Нідерланди). Клітки чистили через день одночасно із заміною їжі і води (*ad libitum*) та зважуванням мишей. Контрольні тварини піддавалися таким же процедурам, але вони утримувалися у відкритих кюветах.

Штучну атмосферу (ША) для дрозofil створювали за допомогою шприців об'ємом 100 мл, у які ставили пробірку з дрозofiлами й через отвір для голки вносили необхідну кількість газів — N₂, He, Ar. Підрахунок особин, що вижили, а також зміну поживного середовища і ША здійснювали через день.

Vo₂ і Vco₂. У піддослідних тварин визначали швидкість продукції CO₂ (V_{CO₂}, мл·г⁻¹·год⁻¹) і споживання O₂ (V_{O₂}, мл·г⁻¹·год⁻¹) за допомогою газоаналізатора Gerb. Minnhardt (Нідерланди).

Температуру поверхні тіла вимірювали дистанційним термометром UNI-T UT912 (Австрія), що оцінює інтенсивність інфрачервоного випромінювання від шкіри. Було встановлено, що між ректальною температурою тіла і ТПТ існує високо достовірна позитивна кореляційна залежність (r=0,85; P<0,001), тому ТПТ достатньо об'єктивно відображає температуру ядра тіла. Надалі від вимірювання ректальної температури тіла відмовилися через травматичність методу.

Рівні споживання їжі і води (у % від маси тіла за день) оцінювалися за різницею маси їжі і води до і після процедури заміни їжі та води. Кількість

подрібненої і змішаної з тирсою їжі вимірювали окремо і враховували при розрахунку споживання їжі.

Аналіз експресії генів проводили за процедурою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR). Тотальну РНК екстрагували зі зразків тканини з використанням набору для екстракції РНК Рібозоль-А. РНК піддавали зворотній транскрипції в кДНК з використанням RT-набору Reverta-L-100 відповідно до інструкцій виробника (AmpliSens). Праймери для аналізованих генів були синтезовані Metabion International AG (Німеччина). В усіх qPCR аналізах експресію гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази використовували в якості контрольного гена. Ампліфікацію ПЛР у реальному часі проводили з використанням системи Chromo4 (Bio-Rad, США). Специфічність продуктів RT-PCR підтверджували шляхом перевірки кривих плавлення. Для розрахунку змін експресії використовували метод $\Delta\Delta C_t$.

Пероральний тест толерантності до глюкози (ПТТГ) проводили у контрольних і піддослідних мишей на 8 добу утримання в ГГС. Глюкозу вводили перорально (2 г/кг маси тіла) після нічного 10-годинного голодування. Через 15, 30, 60 і 120 хв після введення глюкози з кінчика хвоста брали проби крові для вимірювання глюкози за допомогою глюкометра (ACON, США).

Аналіз плазми крові. Цільну кров збирали після 6-годинного голодування шляхом вилучення очних яблук під гексобарбіталовим наркозом. Вміст глюкози, тригліцеридів, загального холестерину і гемоглобіну в сироватці крові вимірювали з використанням набору для аналізів (Filicet Diagnostics, Україна).

FT3 і FT4 (вільний трийодтиронін і вільний тироксин) вимірювали в плазмі крові за допомогою набору для імуноферментного аналізу («Діагностичні системи», Росія).

Лактам вимірювали у заморожених зразках мозку. Їх гомогенізували в 7 об'ємах крижаної 7 % оцтової кислоти; рН гомогенатів доводили до 7,0 додаванням 8М КОН і центрифугували при 13000g протягом 10 хвилин. Рівні лактату в надосадовій рідині визначали за допомогою набору (Corma, Польща), відповідно до рекомендацій виробника. Результати були скориговані на вміст білка (PrAT «Реагент», Україна).

Стрептозотоцинову модель діабету I типу ініціювали у 20 молодих мишей лінії C57Bl/6 п'ятьма щоденними внутрішньовенними ін'єкціями стрептозотоцину (Aldrich-Sigma) в загальній дозі 200 мг/кг (5x40 мг/кг). Вміст глюкози один раз на тиждень вимірювали глюкометром (ACON, США) в крові, отриманій з кінчика хвоста. Контрольні миші з діабетом дихали звичайним повітрям, а піддослідні знаходились у ГГС з 9 до 17 години дня. Вміст глюкози у кожній тварини до початку експериментів приймався за 100 %.

Оцінювання швидкості загоєння ран була проведена відповідно до методики Yanai [Yanai H. et al. 2015]. 12 мишей лінії CBA наркотизували за допомогою внутрішньоочеревинного введення гексобарбіталу (70 мг/кг), після чого на поверхні поголеного черепа в районі тим'яної кістки 8-мм трепаном (*Skin Punch Biopsy*) на повну товщину шкіри прорізували рану з видаленням цієї ділянки шкіри. Процес загоєння ран після операції фіксували цифровим

фотоапаратом (Canon IXУ, 4 М). Кількісне оцінювання раневої поверхні проводили з використанням програмного забезпечення NIH Image v1.43.

Спонтанну рухову активність дрозofil оцінювали після серійного 10-кратного фотографування з витримкою 1,3 с. Імаго за такої витримки залишають на фотографії характерний слід із траєкторією руху. Рухову активність виражали у відсотках особин, що рухаються, від загального числа імаго. У мишей рухову активність оцінювали 3–4 рази візуально, розділивши тварин на три категорії — сплячі, несплячі, і ті, що рухаються.

Кислотно-лужна рівновага. Стан кислотно-лужної рівноваги оцінювали за рН гомогенатів і за результатами рН-метричного титрування. Тканину імаго (близько 20 мг) подрібнювали в гомогенізаторі типу "скло-скло". Отриманий гомогенат двічі промивали у 0,5 мл бідистильованої води і титрували за допомогою 0,02н HCl або 0,01н NaOH. За зрушеннями рН стежили за допомогою рН-метру Oakton pH 100 Series (США).

Тепловий шок (ТШ). Дрозofil 25-30 хвилин, в залежності від популяції, утримували в конвекційному повітряному термостаті за температури $38 \pm 0,2$ °С. Вживаність оцінювали за кількістю живих мух через 24 години після стресу.

Ультрафіолетовий стрес проводили УФ-С лампою Philips (256 нм, 50 W) з потужністю УФ-випромінювання 15W. Опромінення дрозofil проводили у кварцових кюветах. Тривалість витримки становила від 15 с до 60 хв.

Активність супероксиддисмутази (СОД, ЄС 1.15. 1.1) у гомогенатах дрозofil визначали за методом McCord & Fridovich [McCord J., Fridovich I., 1969]. Інкубаційна суміш містила 50 мкл ксантину, цитохром С і 100 мкл 1 % гомогенату дрозofil. Реакцію запускали додаванням 20 мкл ксантин оксидази. Оптичну щільність вимірювали на довжині хвилі 550 нм на спектрофотометрі μ -Quant MQX-200 (Biotech, США). Про активність СОД судили за ступенем інгібування відновлення цитохрому С. Активність СОД виражали в умовних одиницях на 1 мг маси тіла за 1 хв ($\text{ум.од.} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$). За умовну одиницю СОД приймали активність, що інгібувала відновлення цитохрому С на 50 %.

Активність каталази (ЄС 1.11. 1.6) визначали за методом Aebi [Aebi H., 1984]. Інкубаційна суміш містила 0,1 мл 0,03% перекису водню і 10 мкл 1 % гомогенату дрозofil. Активність каталази оцінювали за швидкістю утилізації перекису водню, експонентне зниження концентрації якого спостерігали на довжині хвилі 240 нм на спектрофотометрі μ -Quant MQX-200 (Biotech, США). Активність каталази виражали в мкмоль утилізованого H_2O_2 на 1 мг маси тіла і 1 хв ($\text{мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$).

Методи статистичної обробки результатів. Статистичну обробку даних, побудову графіків і розрахунок функцій проводили за допомогою програми Microsoft «Statistica-6». Вірогідність відмінностей груп оцінювали за допомогою непараметричних критеріїв або двофакторного ANOVA. Вірогідність кореляції оцінювали за допомогою параметричного коефіцієнта кореляції Пірсона і непараметричного рангового коефіцієнта Спірмана. Крім парної лінійної кореляції і регресії були використані методи багатомірної і нелінійної статистики.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив гострої ГГС на інтенсивність газообміну та ТПТ у молодих і старих мишей. В обох вікових групах інтенсивність газообміну прогресивно знижується при збільшенні тривалості витримки у ГГС, тобто в міру зниження концентрації O_2 і збільшення CO_2 в повітрі.

На рис. 1 наведено корелятивні залежності між VO_2 , V_{CO_2} і тривалістю витримки молодих і старих самців мишей лінії C57Bl/6 в умовах гострої ГГС.

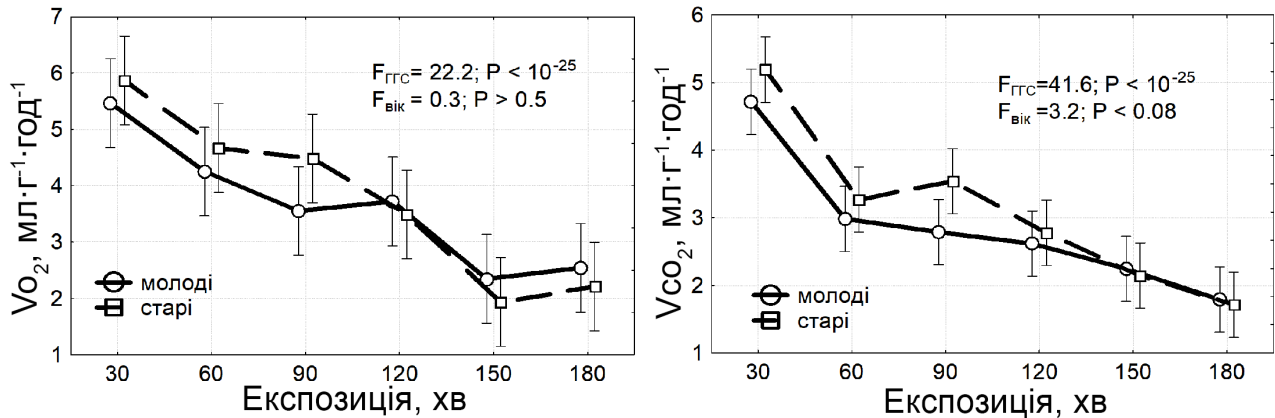


Рис. 1. Залежність VO_2 і V_{CO_2} від тривалості витримки в гострій ГГС у молодих і старих мишей лінії C57Bl/6.

За результатами двофакторного ANOVA, критерій Фішера щодо впливу ГГС ($F_{ГГС}$) на швидкість газообміну був високо достовірним ($p < 10^{-25}$), а F-критерій вікових відмінностей ($F_{вік}$) — недостовірним ($p > 0,05$). Припускалося, що старі тварини важче адаптуються до ГГС і у них буде інша динаміка VO_2 і V_{CO_2} в ГГС, але в жодному з наступних дослідів вікових відмінностей не було.

Між V_{CO_2} і вмістом CO_2 у середовищі існувала високо достовірна негативна кореляційна залежність, практично однотипна у молодих і старих груп мишей (рис. 2).

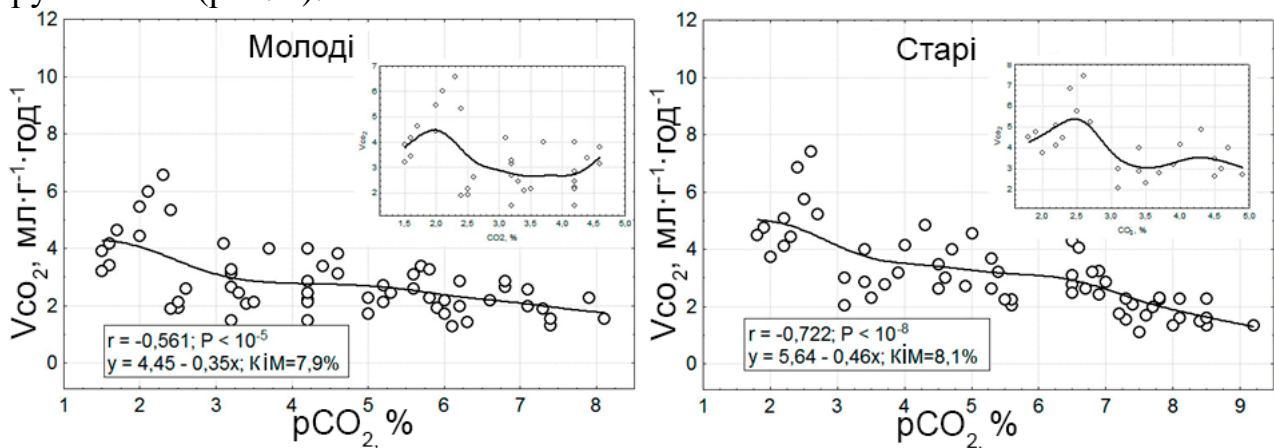


Рис. 2. Залежність V_{CO_2} від pCO_2 у молодих і старих мишей в умовах гострої ГГС.

Судячи з рівнянь лінійної регресії, інгібуючий вплив CO_2 на V_{CO_2} мало змінюється при старінні та становить 7,8 % у молодих і 8,1 % у старих мишей. Тобто V_{CO_2} знижується приблизно на 8 % на кожен відсоток підвищення вмісту

CO₂ в ГГС. Ця величина, по суті, є кількісною мірою інгібіторного ефекту CO₂ і може вважатися коефіцієнтом інгібування метаболізму.

На наступному етапі досліджень ми з'ясували, що має сильніший інгібуючий ефект на метаболізм: гіпоксія чи гіперкапнія? Для цього посилили гіпоксичний компонент ГГС за допомогою попереднього додавання до повітря 25 % за об'ємом N₂, H₂, He і Ar, в результаті чого з початку дослідів вміст pO₂ в повітрі знижувався приблизно з 20,9 % до 15,6 %. Щоб послабити гіпоксію на початку дослідів в кювету додавали 5 % pO₂, в результаті чого парціальний тиск кисню на початку експерименту становив 25,9 %, а у кінці — 15,9 % (в середньому 20,9 %, як у повітрі). Гіперкапнічний компонент ГГС посилювали попереднім додаванням 3 % CO₂ (рис. 3).

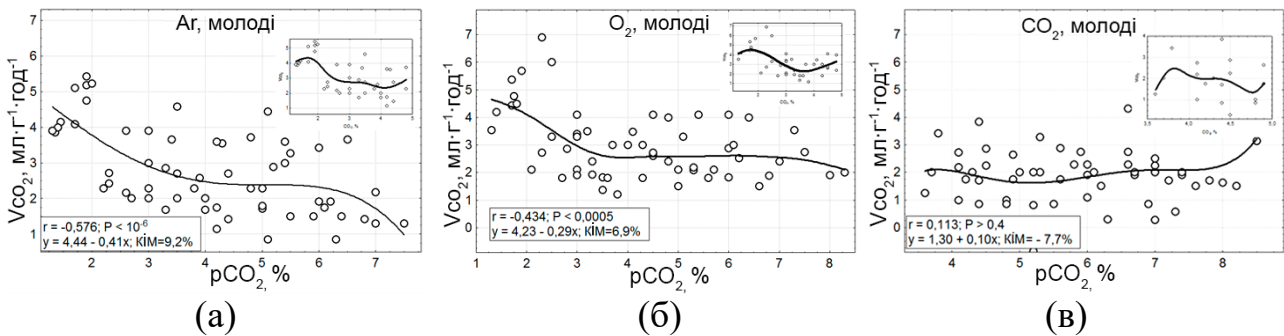


Рис. 3. Вплив ГГС на Vco₂ при посиленні (а) або послабленні (б) гіпоксичного компонента попереднім додаванням відповідно 25 % Ar або 5 % O₂ і при посиленні гіперкапнічного компонента при додаванні 3 % CO₂ (в).

Посилення гіпоксичного компоненту ГГС за допомогою попереднього додавання 25 % N₂, H₂, He або Ar у всіх випадках призводило до мінімальних відмінностей від аналогічних дослідів без посилення гіпоксії (див. рис. 2 і рис. 3а). Тому на рис. 3 представлені тільки дані з додаванням Ar. Ослаблення гіпоксичного компонента також не призводило до принципових змін динаміки Vco₂ (рис. 3б). І тільки посилення гіперкапнічного компонента ГГС додаванням 3 % CO₂ призводило до різкого зниження Vco₂ до рівня, характерного для кінця витримки в ГГС (рис. 3в). Отримані результати дозволяють припустити, що саме вплив гіперкапнії є домінуючим для інгібування метаболізму.

До кінця тригодинної витримки у всіх випробуваних варіантах ГГС спостерігалось достовірне зниження не тільки інтенсивності газообміну, але і ТПТ. У дослідях без попереднього додавання газів ТПТ у молодих мишей після сеансу знизилася з 29,6±0,6 °C до 27,7±0,6 °C, у старих мишей – з 29,7±0,5 °C до 27,5±0,5 °C. Як показують результати аналізу за ANOVA, ГГС призводить до достовірного зниження ТПТ (p<10⁻⁹) без вікових відмінностей (p>0,9). Гіпотермія у мишей у ГГС може бути зумовлена недостатністю теплопродукції, спричиненої майже двократним зниженням Vco₂ і Vo₂.

Вплив хронічного ГГС. Vo₂ і Vco₂ мишей при хронічному утриманні в умовах ГГС, як і у гострих дослідях, демонстрували стійке зниження (рис. 4).

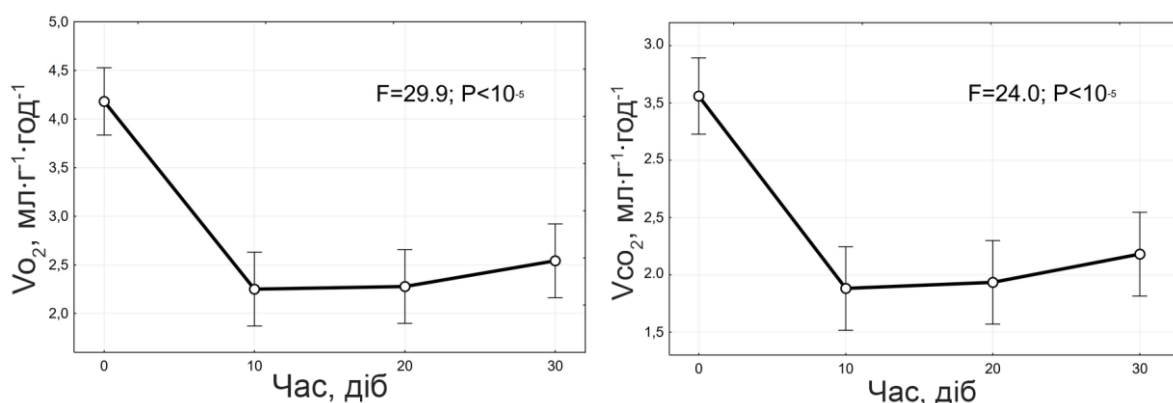


Рис. 4. V_{O_2} і V_{CO_2} (середнє значення \pm стандартне відхилення) молодих мишей C57Bl/6 при утримуванні в умовах хронічного ГГС.

V_{O_2} і V_{CO_2} мишей при хронічному ГГС стабілізувалися на рівні приблизно на 30-50 % нижче, ніж у контрольній групі. За даними однофакторного аналізу ANOVA, ефект ГГС був статистично високо достовірним ($p < 10^{-9}$) (рис. 4).

ТПТ у хронічному ГГС знизилася приблизно на 2,5-3,5 °C (рис. 5).

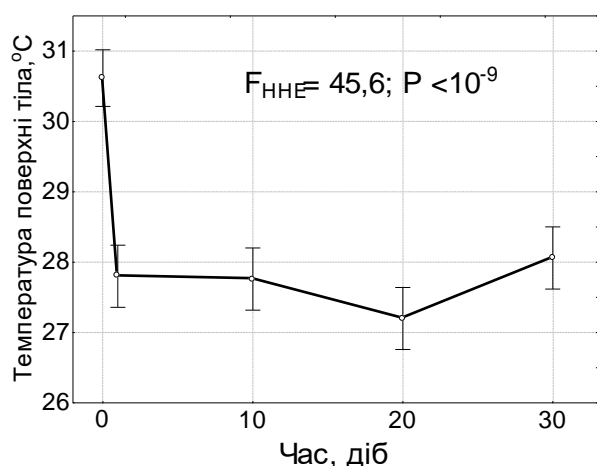


Рис. 5. Температура поверхні тіла (середнє значення \pm стандартне відхилення) молодих мишей C57Bl/6 при утримуванні в хронічному ГГС.

Споживання їжі і води помітно знижувалось у всіх вікових групах упродовж вивченого періоду хронічного ГГС (рис. 6).

Згодом показники стабілізувалися на рівні приблизно на 30-50 % нижче контрольного рівня без вікових відмінностей. З огляду на це ГГС можна розглядати як модель «добровільного» калорійно-обмеженого раціону, оскільки експериментальні тварини скорочували споживання їжі в режимі годування *ad libitum*.

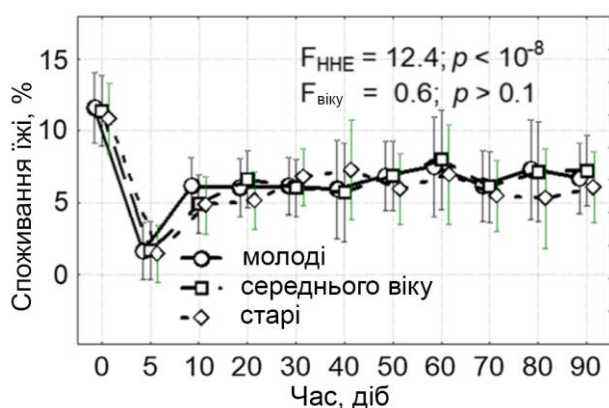


Рис. 6. Споживання їжі (у відсотках від маси тіла) у молодих, дорослих і старих мишей лінії C57Bl/6 при утримуванні в хронічному ГГС.

ГГС стабілізує споживання їжі на рівні найбільш ефективних моделей калорійно-обмеженого раціону. Однак у звичайних (примусових) калорійно-обмежених дієтах тварини зазвичай переїдають у порівняно короткі періоди наявності їжі, після чого голодують до наступного годування. У випадку з ГГС такі явища унеможливаються.

Маса тіла — високоінформативний показник, який підкреслює інтегральні ефекти всіх анаболічних та катаболічних процесів. Індуковані ГГС зміни маси тіла добре збігаються зі споживанням їжі та швидкістю газообміну (V_{O_2} та V_{CO_2}) (рис. 7).

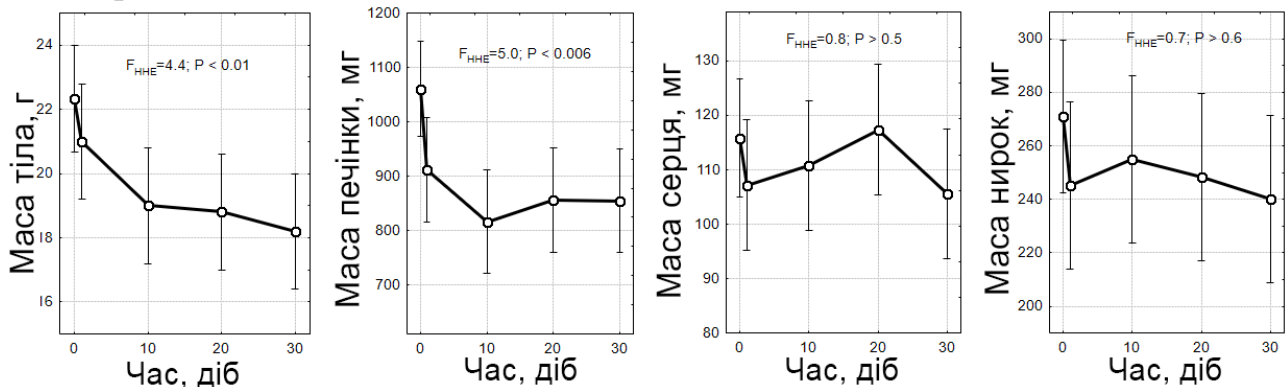


Рис. 7. Маса тіла, печінки, серця й нирок (середнє значення \pm стандартне відхилення) молодих мишей C57Bl/6 при утримуванні в хронічному ГГС.

У той час, як маса тканин зі слабо проліферуючим типом клітин (серця, нирок, легень і підшлункової залози) достовірно не змінилася ($p > 0,1$), маса тіла і печінки зменшилася приблизно на 20 % ($p < 0,01$), що може бути зумовлено утилізацією жирових запасів із відповідних структур (рис. 7).

Отримані результати свідчать про унікальну потужність моделі хронічного гіпометаболізму і гіпотермії. Те, що енергія і температура керують усіма аспектами діяльності клітини і організму, дає підставу припустити можливість широкого застосування ГГС у різних галузях біології і медицини.

Пов'язані з метаболізмом і жировим обміном показники — глюкоза плазми крові, загальний холестерин і тригліцериди, а також вміст гемоглобіну і еритроцитів показали порівняно невеликі зміни упродовж всього періоду хронічної експозиції. Вміст загального холестерину, тригліцеридів і гемоглобіну істотно не змінився, тоді як рівень глюкози знизився на 34 % на 10-у добу ($p < 0,03$), але згодом відновився (дані не представлені). Показники вільного трийодтироніну (FT3) і тироксину (FT4) плазми крові знижувалися протягом перших діб ГГС, але згодом нормалізувались.

Пероральний тест толерантності до глюкози (ПТТГ) проводили у мишей після 10-годинного нічного голодування. Рівень вмісту глюкози визначали в крові, взятої з кінчика хвоста, у двох груп мишей: контрольних і тих, що 8 діб утримували в ГГС (рис. 8).

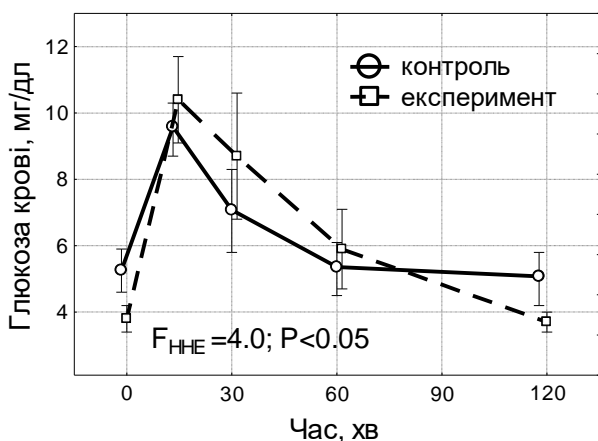


Рис. 8. Рівень глюкози в крові (середнє значення \pm стандартне відхилення) при ПТТГ контрольних і утримуваних 8 діб в ГГС молодих мишей лінії C57Bl/6.

Вміст глюкози в крові мишей в ГГС був приблизно на 30 % нижче, ніж

в групі контрольних мишей на початку і після 2 год випробувань (рис. 8). Хоча поверхні під кривими утилізації глюкози істотно не розрізнялися ($p > 0,5$), проте повне відновлення вихідного рівня глюкози в мишей у ГГС відбувалося повільніше в порівнянні з контрольними тваринами. Зниження цукру крові може бути результатом компенсаторного посилення гліколізу і утилізації глюкози у відповідь на ослаблення окисного фосфорилування (рис. 8).

Лактат є кінцевим продуктом гліколізу й підвищення його рівня свідчить про активацію гліколітичних процесів. У хронічних експериментах концентрація лактату мозку зростала до кінця ГГС, що може бути компенсаторною відповіддю на гіпоксичне і гіперкапнічне навантаження (рис. 9).

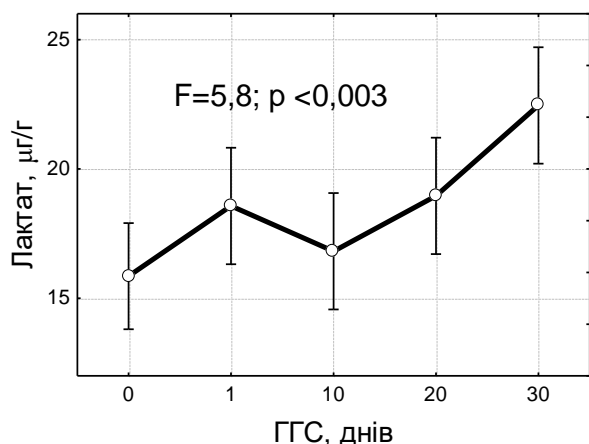


Рис. 9. Концентрація лактату (середнє значення \pm стандартне відхилення) в мозку мишей лінії C57Bl/6 упродовж 30 днів утримування в ГГС.

Стрептозотоцинова модель діабету I типу. Знижений вміст глюкози в крові мишей та зростання лактату у мозку в умовах ГГС дає змогу припустити, що хронічна гіпоксія і

гіперкапнія й пов'язана з нею посилена утилізація глюкози завдяки компенсаторній активації гліколізу може бути ефективним немедикаментозним засобом нормалізації рівня глюкози і лікування діабету. В досліді у мишей індукували хімічне руйнування β -клітин підшлункової залози за допомогою стрептозотоцину. У цій серії мишей утримували в ГГС не цілодобово, а тільки 8 годин у світлу пору доби (з 9 до 17 години). З огляду на те, що миші — нічні тварини, це відповідає нічному сну людини. Вміст глюкози міряли в крові з кінчика хвоста раз на тиждень. Результати показано на рис. 10.

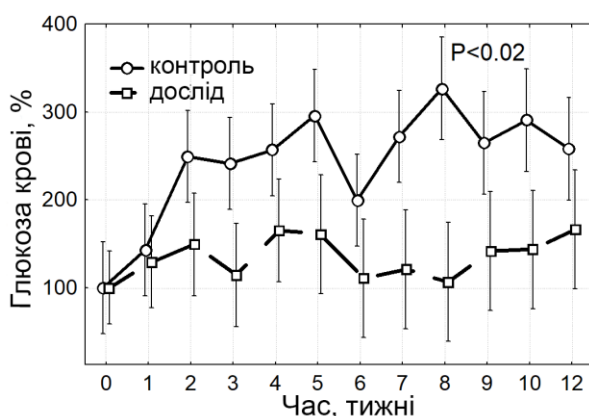


Рис. 10. Рівень глюкози в крові (середнє значення \pm стандартне відхилення) мишей лінії C57Bl/6 з індукованим діабетом I типу при диханні повітрям і у «м'яких» умовах ГГС (8 годин на добу). За 100 % прийнято рівень глюкози до початку дослідів.

Вміст глюкози в крові мишей у ГГС істотно нижчий, ніж у групі контрольних тварин. Відмінності зберігалися упродовж 12 тижнів спостережень ($p < 0,02$) (рис. 10).

Зміни P_{CO_2} і, особливо, P_{O_2} можуть спричиняти порушення нормального потоку електронів через електрон-транспортний ланцюг (ЕТЦ) мітохондрій, оскільки електрони, що в кінці ЕТЦ втратили надлишок енергії, мають бути

утилізовані молекулою O_2 з утворенням води. Нестача O_2 , спричинена гіпоксією, може уповільнити процес утилізації таких відпрацьованих електронів і підсилити утворення вільних радикалів і роз'єднання окислення і фосфорилування. Тому ми очікували, що ГГС призведе до зміни експресії генів, які кодують білки роз'єднання і фосфорилування, зокрема, *ucp-2* [Tian X., 2018]. Однак проведений нами аналіз результатів ПЛР свідчить про стійку стабільність експресії *ucp-2* упродовж всього періоду спостережень (рис. 11).

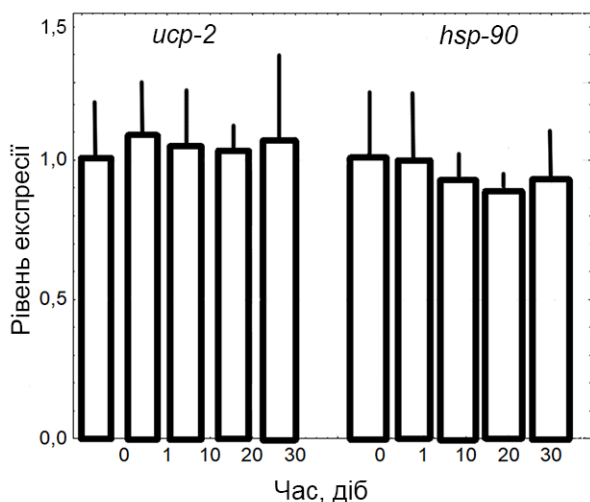


Рис. 11. Експресія *ucp-2* в гіпоталамусі і *hsp-90* в серці мишей лінії C57Bl/6 протягом 30 діб експозиції в ГГС.

Гіпоксія і гіперкапнія є сильними факторами стресу, які могли активувати відповідні молекулярні механізми, зокрема, посилити експресію одного з найбільш важливих стрес білків — *hsp-90* [Condelli V., 2019]. Експресію цього гену ми оцінювали в серці, оскільки вважали, що серцево-судинна система

буде більше інших напружуватися при ГГС. Всупереч нашим очікуванням, експресія *hsp-90*, як і *ucp-2*, зазнала лише незначних змін ($p > 0,5$).

Загоєння ран в умовах хронічного ГГС оцінювали у молодих мишей C57Bl/6. Відповідно до загальноприйнятої методики [Yanaï H. et al., 2015] у піддослідних тварин на поголеній поверхні черепа 8-мм трепаном (*Skin Punch Biopsy*) на повну товщину шкіри прорізували рану з видаленням цієї ділянки шкіри. Краї рани залишали відкритими та щоденно фіксували процес загоєння за допомогою цифрового фотоапарату. Результати наведено на рис. 12.

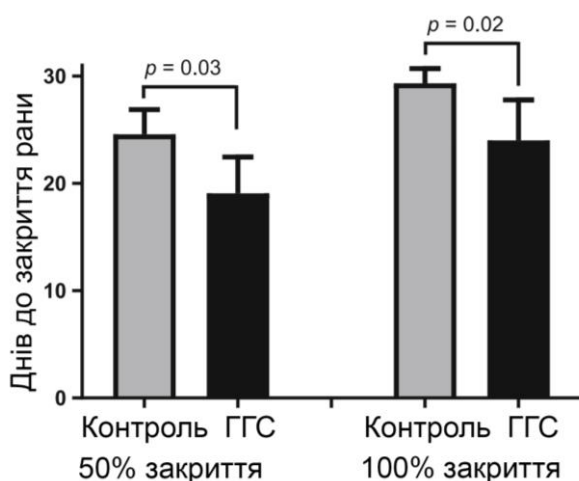


Рис. 12. Швидкість загоєння ран шкіри у молодих самців мишей C57Bl/6 ($n=6$ у кожній групі) під час хронічного впливу ГГС. Представлені середнє і стандартне відхилення часу 50 % і повного загоєння ран.

ГГС сприяла значному прискоренню загоєння ран шкіри голови у молодих тварин. 50 % закриття ран відбулося на $19,7 \pm 3,3$ день у піддослідних мишей та на $25 \pm 2,4$ день у контрольних мишей ($p=0,03$). Повне закриття рани відбулось на $24 \pm 3,8$ день у піддослідних та на $29,2 \pm 1,6$ день у контрольних мишей ($p=0,02$). Таке достовірне прискорення загоєння ран у мишей частково можна пояснити посиленням процесів гліколізу і мобілізацією мезенхімальних стовбурових

клітин у відповідь на ГГС [Lee S. et al., 2009; Hu Z. et al., 2018; Shojaei A. et al., 2019]. Аналогічно, ГГС може прискорювати загоєння ран, стимулюючи проліферацію клітин [Tsuji T. et al., 2013].

Вікова динаміка смертності і ТЖ дрозоділ в ША. Численними дослідженнями показано, що «м'яке» пригнічення мітохондріального окислення може уповільнити швидкість обмінних процесів і подовжити життя короткоживучих лабораторних тварин [Feng J., 2001; Copeland J., 2009]. У наших дослідах додавання 10 % N_2 до повітря не впливали на виживаність дрозоділ, в той же час, додавання 20 % N_2 призводило до достовірного покращення вікової динаміки смертності дрозоділ ($p < 0,04$).

У дослідах з додаванням до повітря He показано, що відмінності вікової динаміки смертності від контролю стають високо достовірними у самців і самок при додаванні 20 та 33 % He до повітря ($p < 10^{-5}$ і 10^{-6} відповідно) (рис. 13).

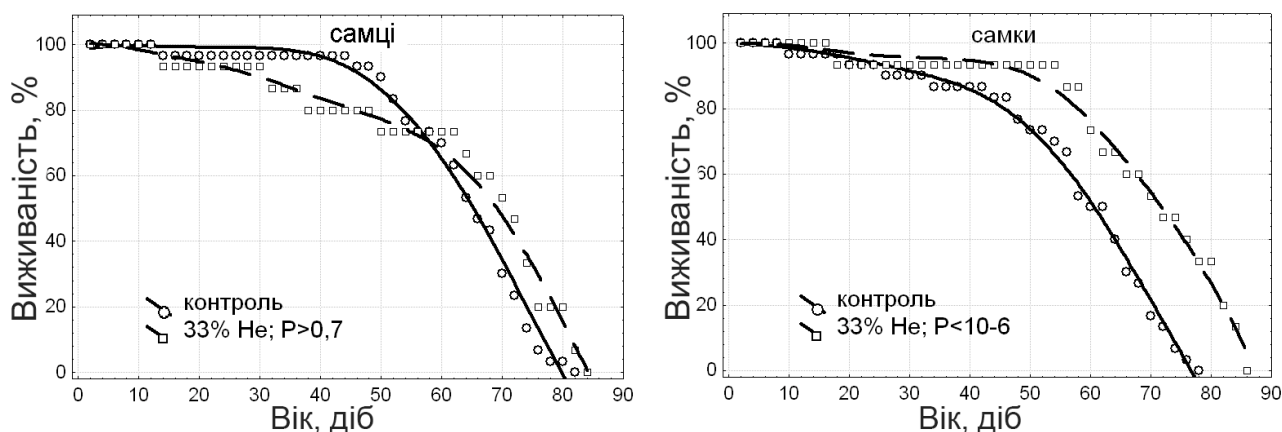


Рис. 13. Вплив гіпоксичної атмосфери, створеної додаванням до повітря 33 % He, на вікову динаміку виживаності самців і самок дрозоділ. Статистичну значущість розходжень між контрольними і експериментальними групами оцінювали за допомогою непараметричного критерію Вілкоксона (Wilcoxon).

Слід зазначити, що приблизно до такого типу зміни динаміки смертності та збільшення ПЖ приводили й інші наші досліди, зокрема, з концентраціями N_2 , He і Ar, що поступово зростали і знижувалися. Гіпоксичні атмосфери, як правило, призводили до зниження швидкості газообміну (до 10–20 %), нерідко пропорційно подовженню тривалості життя.

Активність супероксиддисмутази. У молодих і старих імаго дрозоділ активність СОД знижувалася до 3 доби, але вірогідно збільшувалася до 5–10 доби без вірогідних вікових відмінностей.

Активність каталази. В атмосфері з додаванням N_2 активність каталази почала зростати вже до 5 доби. Однак, результати аналізу за ANOVA були практично такими ж, як при СОД — високо достовірний F експозиції ($p < 0,001$) у сполученні із вкрай низькими значеннями вікових критеріїв.

Утримання дрозоділ в оптимальних умовах штучної атмосфери призводило до покращення виживаності в стресових умовах, модельованих УФ-опроміненням і тепловим шоком (дані не представлені).

ВИСНОВКИ

У дисертації наведене теоретичне узагальнення й нове вирішення проблеми зниження інтенсивності обмінних процесів і температури тіла теплокровних тварин за допомогою гіпоксично-гіперкапнічного середовища. Така модель проста у виконанні і надійна в експлуатації, адже створюється самими біологічними об'єктами із застосуванням мінімуму технічних засобів. ГГС є своєрідною моделлю «добровільного» калорійного обмеження раціону і зниження надмірної ваги. Крім того, ГГС суттєво збільшує швидкість загоєння ран і знижує рівень глюкози у крові при стрептозотоциновій моделі розвитку діабету. На основі результатів зроблені наступні висновки:

1. ГГС — це потужна модель хронічного гіпометаболізму і гіпотермії. Вона дає змогу у 1,5-3 рази зменшити швидкість споживання O_2 і продукції CO_2 , а також достовірно знизити температуру поверхні тіла на $\sim 2^\circ C$ у мишей різного віку та ліній як у гострому, так і в хронічному експерименті.
2. Хронічне утримування мишей в ГГС супроводжуються зниженням споживання їжі і води, а також маси тіла, що може бути розглянуто як модель «добровільного» обмеження раціону. У той час як маса тканин зі слабо проліферуючим типом клітин (серця, нирок, легень і підшлункової залози) достовірно не змінилася ($p > 0,1$), маса тіла й печінки зменшилися приблизно на 20 % ($p < 0,01$).
3. ГГС не впливає на експресію генів, які зазвичай активуються при стресі (*hsp-90*) та роз'єднанні окиснення і фосфорилування (*ucp-2*).
4. ГГС значно прискорює закриття молодою шкірою круглої рани голови. 50 % закриття ран відбулося на $19,7 \pm 3,3$ день у піддослідних мишей та на $25 \pm 2,4$ день у контрольних мишей ($p = 0,03$). Повне закриття рани відбулося на $24 \pm 3,8$ день у піддослідних і на $29,2 \pm 1,6$ день у контрольних мишей ($p = 0,02$).
5. ГГС перешкоджає розвитку діабету I типу (стрептозотоцинова модель). Рівень глюкози в крові мишей у ГГС був істотно нижчим (110-160 %), ніж у контрольних мишей з діабетом (до 250-300 %) протягом 12 тижнів спостережень ($p < 0,02$).
6. Утримування дрозофіл в штучних атмосферах з додаванням до повітря оптимальних концентрацій N_2 , He і Ar призводить до уповільнення газообміну і підвищення виживаності в стресорних умовах.

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Толстун ДА. Циркадные ритмы метаболического гомеостата у мышей разного возраста. Пробл. старения и долголетия. 2012;21(1):42-49.
2. Толстун ДА. Влияние искусственной атмосферы, моделированной гелием и аргоном на развитие и стрессоустойчивость *Drosophila melanogaster*. Таврич. медико-биол. вестн. 2012;15(3/1):336-340.
3. Безруков ВВ, Толстун ДА. Влияние естественного и аномального режима освещения на уровень газообмена и спонтанную двигательную активность у мышей разного возраста. Пробл. старения и долголетия. 2012;21(3):298-304.

(Дисертант самостійно провів усі експерименти, та більшу частину обробки їх результатів, аналізу та написання статті).

4. Толстун ДА. Влияние обогащенной гелием атмосферы на скорость продукции углекислого газа, двигательную активность и кислотно-щелочное равновесие у дрозофил разного возраста. Пробл. старения и долголетия. 2013;22(4):347-352.

Статті в іноземних виданнях:

5. Timchenko AN, Tolstun DA, Muradian HK, Bezrukov VV. Midnight siesta and circadian rhythms of related metabolic and behavioral variables in aging. J Vet Sci Med Diagn. 2014;3(3). (Дисертант самостійно провів усі експерименти, та більшу частину обробки їх результатів, аналізу та написання статті).

6. Muradian KK, Tolstun DA, Paier AG, Popa-Wagner A, Fraifeld VE. Embryonic Stem Cells, Telomeres and Aging. J. Ageing Restor Med. 2019;2(3):115-123. (Дисертант приймав участь у аналізі літератури та написанні статті).

7. Tolstun D, Knyazer A, Tushynska T, Dubiley T, Bezrukov V, Fraifeld V, Muradian K. Metabolic remodelling of mice by hypoxic-hypercapnic environment: imitating the naked mole-rat. Biogerontology. 2019;21:143-153. (Дисертант самостійно провів експерименти з утримання мишей, частину біохімічних та молекулярних проб, частину обробки отриманих результатів).

Статті в інших виданнях:

8. Толстун ДА. Влияние искусственной атмосферы, моделированной гелием, на развитие и стрессоустойчивость *Drosophila melanogaster*. III международная конференция «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии». 2012 май 11-16; Канев. 2012; 36-39.

9. Толстун ДА, Мурадян ХК, Тимченко АН. Дыхательный гормезис при старении и продлении жизни. Мат. междунар. научн.-практ. конф. «Здоровье и медицина для всех возрастов». 2013 май 21-22; Курск, РФ. Курск: КГМУ. 2013; 279-284. (Дисертант самостійно провів усі експерименти, та більшу частину обробки їх результатів, аналізу та підготовку статті до друку).

Тези наукових доповідей:

10. Толстун ДА. Газообмен и рН у *D. melanogaster*, инкубированных при разных температурах в искусственной атмосфере разного состава: Матеріали конференції молодих вчених «Актуальні проблеми геронтології і геріатрії», присвяч. пам'яті акад. В. В. Фролькіса; 2009 Січ 24; Київ. 2009:103-104.

11. Толстун ДА, Безруков ВВ, Тимченко АН, Утко НА, Мурадян ХК. Искусственная атмосфера: влияние разных концентраций азота, гелия и аргона на выживаемость и темпы развития дрозофил: Матер. XVIII з'їзду Українського фізіологічного товариства; 2010 Трав 20-22; Одеса. 2010;56(2):219.

12. Толстун ДА, Тимченко АН, Безруков ВВ, Мурадян ХК. Влияние гипоксии, моделированной аргоном, гелием и азотом, на развитие, старение и продолжительность жизни дрозофил: V Нац. конгр. геронтологів і геріатрів України: 2010 Жовт 12-14; Київ. Пробл. старения и долголетия. 2010;19(3):255.

- 13. Толстун ДА, Мурадян ХК, Тимченко АН.** Влияние гипоксии, моделированной гелием, на развитие и стрессоустойчивость дрозофил. Матеріали Х конференції молодих вчених «Актуальні проблеми геронтології і геріатрії», присвяч. пам'яті акад. В. В. Фролькіса; 2011 Січ 26; Київ: ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України». 2011:57.
- 14. Толстун ДА.** Влияние искусственной атмосферы, моделированной гелием, на развитие и стрессоустойчивость *Drosophila melanogaster*. III міжнародна конференція «Дрозофіла в експериментальній генетиці і біології» 2012 Трав 11-16; Канів. Збірник тез. 2012:36-39.
- 15. Толстун ДА, Безруков ВВ, Тимченко АН, Мурадян ХК.** Искусственная атмосфера: влияние на развитие, старение и выживаемость при стрессах: Мат. VI конгр. патофізіологів України 2012 Жовт 3-5; АР Крим, Місхор; Таврич. медико-біологіч. вестник. 2012;15(3/2)(59): 383.
- 16. Tolstun DA.** Effects of artificial atmosphere modeled by Helium and Nitrogen on the rate of carbone dioxide production, motor activity and acid-base balance in young and old drosophila. II International Symposium “Molecular Mechanisms of Synaptic Transmission Regulation” In memory of Professor Vladimir Skok (1932–2003). 2012 Oct 6–9; Kiev. Abstract book. 2012:41.
- 17. Толстун ДА, Тимченко АН, Безруков ВВ, Мурадян ХК.** Гиперкапническая атмосфера как средство снижения скорости окислительных процессов, предотвращения избыточного метаболизма и продления жизни. Міжнар. наук.-практ. конф. «Прискорене старіння: механізми, діагностика, профілактика». 2012 Жовт 4-5; Київ. Тез. конф. Пробл. старения и долголетия. 2012;21 (приложение):43-44.
- 18. Толстун ДА.** Естественный и аномальный циркадный ритм у мышей разного возраста. Мат. XI наук. конф. молодих вчених з міжнар. участю «Актуальні питання геронтології та геріатрії», присвяч. пам'яті акад. В. В. Фролькіса 2013 Січ 25; Київ. 2013:61.
- 19. Толстун ДА, Безруков ВВ, Мурадян ХК.** Влияние ультрафиолетового облучения на уровень газообмена, устойчивость к стрессам и продолжительность жизни. Мат. XIX съезда физиологов Украины. Фізіологічний журнал. 2014;60(3)(додаток):189-190.
- 20. Толстун ДА.** Детерминанты долголетия дрозофил, инкубированных в искусственной атмосфере. Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии: V междунар. конф. 2016 Май 12-14; Киев. 2016:30-31.
- 21. Безруков ВВ, Толстун ДА, Тушинская ТВ, Дубилей ТА, Фрайфельд ВЭ, Мурадян ХК.** Может ли атмосфера сделать из мыши голого землекопа (*Heterocephalus glaber*)? VI Нац. конгр. геронтологів і геріатрів України. 2016 Жовт 19-21; Київ. Пробл. старения и долголетия. 2016;25:19-20.
- 22. Bezrukov VV, Tolstun DA, Tushynska TV, Dubiley TA, Muradian KK.** Metabolism ameliorating remodeling induced by atmosphere (MARIA). Expert's opinion on current approaches in anti-ageing medicine and gerontology. International symposium. 2017 May 27; Geneva, Switzerland. Book of abstracts. Geneva, 2017:20-23.

23. Fraifeld VE, **Tolstun DA**, Timchenko AN, Tushinskaya TV, Dubiley TA, Bezrukov VV, Knyazer A, Muradian KK. Metabolic remodeling of mice in hypoxic-hypercapnic environment. Aging and Rejuvenation Conference. 2018 Sept 10-12th; Rome, Italy. 2018:20-23.

24. Толстун ДА. Влияние гиперкапнии и гипоксии на скорость газообмена, температуру тела и двигательную активность мышцей. Матеріали I Науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція». 2018 Жовт 18; Харків. Збірник доповідей. 2018:236-238.

25. Толстун ДА, Мурадян ХК, Дубилей ТА, Тушинская ТВ, Безруков ВВ, Фрайфельд ВЭ, Князер АН. Метаболическое ремоделирование мышцей в гипоксическо-гиперкапнической атмосфере. Матеріали II Науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція». 2019 Лист 21; Харків. Збірник доповідей. 2019:348-349.

26. Толстун ДА, Мурадян ХК, Дубилей ТА, Тушинская ТВ. Гипометаболизм и снижение уровня глюкозы крови у мышцей с диабетом I типа в гипоксическо-гиперкапнической атмосфере. Матеріали III Науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція». 2020 Лист 19; Харків. Збірник доповідей. 2020:348-349.

АНОТАЦІЯ

Толстун Д. О. Вплив гіпоксично-гіперкапнічного середовища на фізіологічні показники і старіння лабораторних тварин. — На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13. — фізіологія людини і тварин. Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2021.

Дисертація присвячена дослідженню можливості зниження основних фізіологічних показників інтенсивності метаболізму (gross metabolic indices), які вважаються найбільш ефективними детермінантами активного довголіття і уповільнення розвитку вікової патології. ГГС створювали у тварин, утримуючи їх у контейнерах з обмеженою вентиляцією, що призводило до зниження P_{O_2} і пропорційного зростання P_{CO_2} у повітрі. У частині експериментів рівень гіпоксії і гіперкапнії додатково змінювали за допомогою попереднього додавання інших газів — He, Ar, N_2 , H_2 , O_2 , CO_2 . Показано, що ГГС зменшує швидкість газообміну (V_{O_2} та V_{CO_2}), споживання їжі і води та масу тіла. Це робить його моделлю «добровільного» обмеження калорій та нормалізації надмірної ваги. Не виявлені помітні зміни експресії генів, які зазвичай активуються при стресі (*hsp-90*) або роз'єднанні окислення і фосфорилування (*ucp-2*). При ГГС зменшувався розвиток діабету (стрептозотоцинова модель) та прискорювалось загоєння ран. Інкубація дрозофіл у штучній атмосфері із застосуванням оптимальних концентрацій H_2 , He та Ar у повітрі призводила до уповільнення

газообміну, збільшення активності ключових антиоксидантних ферментів (СОД та каталази), підвищувала стресостійкість і подовжувала тривалість життя.

Ключові слова: старіння, довголіття, штучна атмосфера, миша, дрозофіла, гіпометаболізм, гіпотермія, тироксин, глюкоза, діабет, стрес.

АННОТАЦІЯ

Толстун Д. А. Влияние гипоксически-гиперкапнической среды на физиологические показатели и старение лабораторных животных. — На правах рукописи.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13. — физиология человека и животных. Киевский национальный государственный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2021.

Диссертация посвящена исследованию возможности снижения основных физиологических показателей интенсивности метаболических процессов (*gross metabolic indices*), которые считаются наиболее эффективными детерминантами активного долголетия и замедления развития возрастной патологии. ГГС создавали у животных, удерживая их в контейнерах с ограниченной вентиляцией. Это приводило к снижению P_{O_2} и пропорциональному росту P_{CO_2} во вдыхаемом воздухе. Уровень гипоксии и гиперкапнии дополнительно меняли предварительным добавлением других газов — He, Ar, N_2 , H_2 , O_2 , CO_2 . Показано, что экспозиция в ГГС (как острая, так и хроническая) вызывает дозозависимое снижение скорости газообмена (V_{O_2} и V_{CO_2}) и температуры поверхности тела без изменений моторной активности. Снижение V_{CO_2} происходило независимо от возраста и линии мышей, и соответствовало примерно 8-10 % на каждый процент увеличения CO_2 в воздухе. Хроническая экспозиция мышей в ГГС сопровождается снижением потребления пищи и воды, а также массы тела, что может быть рассмотрено как модель «добровольного» ограничения рациона. В то время как масса тканей со слабо пролиферирующим типом клеток (сердца, почек, легких и поджелудочной железы) достоверно не изменялась ($p > 0,1$), масса тела и печени уменьшалась примерно на 20% ($p < 0,01$). В первые дни хронических экспериментов снижается уровень гормонов FT3 и FT4 в крови, который после 10 суток восстанавливается. Не изменяется экспрессия генов, активирующихся при стрессе (*hsp-90*) или разобщении окисления и фосфорилирования (*ucp-2*). Уровень глюкозы в крови у мышей с индуцированным стрептозотоцином диабетом I типа был существенно ниже (110-160 %) у животных-диабетиков, находившихся в ГГС, чем у диабетиков, дышавших воздухом (до 250-300 %) в течение 12 недель наблюдений ($p < 0,02$). Кроме того, гипометаболическое состояние, индуцированное ГГС, может влиять и на скорость заживления ран. Показано, что ГГС значительно ускоряет закрытие молодой кожей круглой раны головы. 50 % закрытие ран произошло на $19,7 \pm 3,3$ день у подопытных мышей и на $25 \pm 2,4$ день у контрольных мышей ($p = 0,03$). Полное закрытие раны произошло на $24 \pm 3,8$ день у подопытных и на $29,2 \pm 1,6$ день у контрольных

мышей ($p=0,02$). Содержание дрозофил в искусственной атмосфере с добавлением к воздуху оптимальных концентраций H_2 , He и Ar приводило к замедлению газообмена, повышению активности ключевых ферментов антиоксидантной системы (СОД и каталазы), выживаемости при стрессах и продлению жизни.

Разработанная модель острой и хронической ГГС может иметь широкое применение в различных областях биологии и медицины — от лечения болезней и обеспечения активного долголетия до применения в космических полётах и колонизации планет. Особую перспективу развития ГГС может получить в геронтологии, став основой для разработки подходов замедления темпов старения и предупреждения возрастной патологии.

Ключевые слова: старение, долголетие, искусственная атмосфера, мышь, дрозофила, гипоксически-гиперкапническая среда, гипометаболизм, гипотермия, экспрессия генов, тироксин, глюкоза, диабет, стресс.

SUMMARY

Tolstun D. A. Effects of hypoxic hypercapnic environment on physiological indices and ageing of laboratory animals. — Manuscript.

Dissertation for the degree of Candidate of Biological Sciences, speciality 03.00.13 “Physiology of man and animals”. — Taras Shevchenko National University of Ukraine Ministry of Education and Science, Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to research of possibility decrease the basic physiological indicators of intensity of a metabolism which are considered as the most effective determinants of active longevity and slowing down of development of age pathology. HHE for mice was created by placing animals in containers with limited ventilation which led to decreased Po_2 and a proportional increase in Pco_2 . The level of hypoxia and hypercapnia was additionally varied by preliminary addition of other gases - He, Ar, N_2 , H_2 , O_2 , CO_2 . HHE decreases the rate of gaseous exchange (Vo_2 and Vco_2), food and water consumption and body weight making it a model of “voluntary” caloric restriction and normalization of the overweight. No significant changes in the expression of genes that are usually activated at stress (*hsp-90*) or uncoupling of oxidation and phosphorylation (*ucp-2*) were observed. Hypometabolism and hypothermia in HHE are the most important findings of this research and could have wide application in biology and medicine. In particular, HHE prevented development of diabetes in the streptozotocin model and accelerated wound healing. Incubation of fruit flies in an artificial atmosphere with adding of optimal concentrations of H_2 , He and Ar to the air led to a slowdown in the gaseous exchange rate, increase of activity of the key antioxidant enzymes (SOD and catalase), thus ensuring elevated stress endurance and extension of life span.

Key words: aging, longevity, artificial atmosphere, mouse, *Drosophila*, hypoxic-hypercapnic environment, hypometabolism, gene expression, hypothermia, triiodothyronine, thyroxin, glucose, diabetes, stress.