

Національна академія медичних наук України  
ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова»  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**ТОЛСТУН ДЕНИС ОЛЕКСАНДРОВИЧ**

УДК 612.68-019:612.22

**ДИСЕРТАЦІЯ**

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

03.00.13 - фізіологія людини і тварин

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Підпис: \_\_\_\_\_

Науковий керівник: д.б.н., с.н.с. Мурадян Хачік Казарович

Київ-2021

## 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 метаболічних процесів (gross metabolic indices), які вважаються найбільш ефективними детермінантами активного довголіття і уповільнення розвитку вікової патології. Енергія і температура є основоположними термодинамічними характеристиками, які здатні модифікувати темпи і спрямованість практично всіх процесів, включаючи процеси старіння. Зниження температури тіла і енергетичних витрат сприяє уповільненню старіння й подовженню життя як пойкилотермних, так і гомойотермних тварин [72, 90, 130, 149, 239, 266].

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 [60, 155] та хвороб (саркопенія, діабет). Вчені припускають, що різниця в процесах старіння та довголіття миші та землекопа зумовлена особливостями способу їхнього життя і фізіології [98], оскільки ГЗ живуть в умовах сильної гіпоксії та гіперкапнії (до 10 %). 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?

Метою роботи стало з'ясування 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.

ГГС вивчали на молодих, дорослих і старих мишах ліній *CBA* і *C57Bl/6*, а також на дрозоділах лінії *Oregon-R*. У мишей ГГС створювали 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 змінювався за допомогою попереднього додавання інших газів — He, Ar,  $N_2$ ,  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $CO_2$ . У дрозоділах можливості підвищення стресостійкості і подовження життя за допомогою штучної атмосфери вивчали, застосовуючи 100 мл шприці. Ефекти ГГС аналізували за широким діапазоном фізіологічних, поведінкових та біохімічних змінних. Досліджували швидкість газообміну, температуру поверхні тіла, рухову активність, масу тіла та внутрішніх органів, споживання їжі та води, клітинний і біохімічний склад крові (ГТЗ і ГТ4 крові, рівень гемоглобіну, глюкози, тригліцеридів, загальну концентрацію холестерину), експресію генів білку роз'єднання окиснення і фосфорилування (*ucp-2*) у гіпоталамусі та білку теплового шоку (*hsp-90*) у серці. Можливість практичного застосування ГГС оцінювали на стрептозотоциновій моделі діабету та загоєнні шкірних ран.

В ході роботи розроблено модель і вперше вивчено вплив гострої і хронічної збалансованої ГГС (в якій  $\Delta P_{CO_2}$  приблизно дорівнює  $\Delta P_{O_2}$ ) на рівень метаболічних процесів, загоєння ран та розвиток діабету у мишей різного віку.

Було показано, що вплив ГГС (як гострий, так і хронічний) викликає дозо-залежне зниження швидкості газообміну ( $V_{O_2}$  та  $V_{CO_2}$ ) та температури поверхні тіла без вікових відмінностей. Були зроблені спроби зрозуміти, який компонент ГГС відповідає за пригнічення метаболізму — гіпоксія чи гіперкапнія? Для вирішення проблеми ефекти гіпоксії були посилені попереднім додаванням до повітря хімічно інертних газів —  $N_2$ ,  $H_2$ , He та Ar (25% за обсягом), а гіперкапнія — додаванням  $CO_2$ . Однак посилення гіпоксії не призводило до суттєвих змін газообміну, на відміну від гіперкапнії, після

якої  $V_{CO_2}$  та  $V_{O_2}$  різко зменшувались, вказуючи на домінуючу роль в ГГС. В середньому ГГС незалежно від віку і лінії мишей знижувало  $V_{CO_2}$  на 8-10% на кожен відсоток збільшення  $CO_2$  у повітрі.

Крім того ГГС зменшує споживання їжі і води, та масу тіла. Це робить його моделлю «добровільного» обмеження калорій та нормалізації надмірної маси тіла. Хоча маса тканин із слабо проліферуючими тканинами (серце, нирки, легені та підшлункова залоза) суттєво не змінювалася ( $p > 0,1$ ), маса тіла та печінки зменшилася приблизно на 20% ( $p < 0,01$ ). У перші дні хронічних експериментів рівень гормонів FT3 та FT4 у крові знижувався, однак, відновившись майже до контрольних значень через 10 днів впливу ГГС. Не виявлено помітних змін у експресії генів, які зазвичай активуються під впливом стресу (*hsp-90*) або при роз'єднанні окислення та фосфорилування (*ucp-2*). Концентрація глюкози в крові була значно знижена, що може бути причиною нормалізації рівня цукру в крові на стрептозотоциновій моделі діабету I типу. ГГС сприяла 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 ( $p < 0,02$ ).

Утримання дрозофіл в оптимальних умовах штучної атмосфери з додаванням  $H_2$ ,  $He$  та  $Ar$  призводило до уповільнення швидкості газообміну, підвищення активності ключових ферментів антиоксидантної системи (СОД та каталази), підвищення виживання в стресових умовах та подовження тривалості життя.

У дисертації наведено 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. Ретельно підібрані режими ГГС можуть бути ефективними при лікуванні різних захворювань, включаючи рак, інсульт, інфаркт, діабет, тощо.

Розроблена модель гострої і хронічної ГГС може мати широке застосування в різних областях біології і медицини — від лікування хвороб і забезпечення активного довголіття до застосування в космічних польотах і колонізації планет. Особливу перспективу розвитку ГГС може отримати в геронтології, ставши основою для розробки підходів уповільнення темпів старіння і попередження вікової патології.

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

## 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 the study of the effects of hypoxic-hypercapnic environment (HHE) on the physiological variables known as the main determinants of longevity (gross metabolic indices). Aging is a destructive process leading to declined productivity and elevated mortality. Millions of people yearly die suffering from the age-related disorders. Such considerations support actuality of the dissertation subject — search of new efficient physiological interventions for deceleration of aging rate and treatment of the associated diseases.

Energy and temperature are the two all-pervasive factors that can modify virtually all biological processes, aging included. Lower metabolic rate and body temperature could independently or in cooperation with each other contribute to longevity in both poikilotherms and homeotherms [72, 90, 130, 149, 239, 266]. Lately, the problem acquired additional impetus due to the emergence of a new gerontological model — the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*, NMR), a mouse-sized rodent species which maximum life span exceeds almost an order of magnitude the life span of closely related rodent species [60, 155]. Comparison of NMRs and mice revealed relatively small genomic rearrangements after their split from the common murid ancestor [133], indicating that striking longevity differences could be associated with their physiology and lifestyle [98]. In the habitat NMRs, CO<sub>2</sub> content increases and O<sub>2</sub> reciprocally decreases up to 10% resulting in several fold decrease of metabolic rate accompanied by significant decrease of the body temperature [236]. It was hypothesized that such HHE could be an efficient cause of decreased intensity of metabolic processes and extension of life span [7]. The aim of

this research was to clarify whether HHE commonly experienced by NMRs could induce similar metabolic and temperature changes in mice.

HHE in mice was created using the same principle as in NMR, that is, by placing animals in containers with limited ventilation, which led to a decrease in  $P_{O_2}$  and a proportional increase in  $P_{CO_2}$ . The performance of such model does not need in usage of complex technical equipments and sources of gases with inevitable side-effects especially unpredictable in chronic experiments. Therefore, the model used is simple, reliable and natural. The level of hypoxia and hypercapnia was additionally augmented or declined by preliminary addition of relevant gases (He, Ar,  $N_2$ ,  $H_2$ ,  $O_2$  and  $CO_2$ ). Furthermore, life-long effects of artificial atmospheres on viability and aging rates were tested on the favorite model organisms of genetics and gerontology – *Drosophila melanogaster*.

In acute and chronic experiments, HHE effects were analyzed using wide range of physiological, behavioral and biochemical variables, including (but not limited)  $V_{CO_2}$  and  $V_{O_2}$ , body core and surface temperatures, motor activity, body and inner organs' weight, food and water consumption, blood FT3 and FT4, hemoglobin, glucose, triglycerids and total cholesterol concentrations, expression of the genes of the uncoupling protein (*ucp-2*) in the hypothalamus and the heat shock protein (*hsp-90*) in the heart. The possibility of HHE practical application was assessed in the streptozotocin model of diabetes and skin wound healing.

It has been shown that exposure to HHE (both acute and chronic) causes a dose-dependent decrease in the rate of gas exchange ( $V_{O_2}$  and  $V_{CO_2}$ ) and body surface temperature without significant changes in motor activity. In acute experiments on mice of different strains and ages,  $O_2$  content gradually decreased, while  $CO_2$  content reciprocally increased causing gradual decrease of  $V_{O_2}$  and  $V_{CO_2}$  in both young and old mice. At the end of 3 hours exposure,  $V_{O_2}$  and  $V_{CO_2}$  were more than twice lower compared with initial values. In both age groups,  $V_{CO_2}$  negatively correlated with  $CO_2$  content in the air. Correlation of  $V_{O_2}$  with  $O_2$  content was lesser pronounced. The effects of age were insignificant. Body surface temperature also significantly decreased. Attempts were undertaken to understand which component of HHE was

responsible for the suppression of metabolism — hypoxia or hypercapnia? To solve the issue, hypoxia effects were augmented by preliminary addition to the air metabolically inert gases – N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, He and Ar (25% by the volume). In such experiments, HHE exposures were started and ended at lower Po<sub>2</sub> (around 16% and 7% correspondingly) compared with the experiments without preliminary application (Po<sub>2</sub> around 21% and 12%). Neither significant alterations were found when severity of hypoxia was in contrast reduced by preliminary application of 5% O<sub>2</sub>. Mild hyperoxia (26% O<sub>2</sub>) progressively subsided to mild hypoxia (18% O<sub>2</sub>). However, when hypercapnia effects were strengthened by preliminary application of only 3% CO<sub>2</sub> the V<sub>CO<sub>2</sub></sub> and V<sub>O<sub>2</sub></sub> drastically dropped, thus indicating that hypercapnia is the dominant factor of the inhibitory effects of HHE. The decrease in V<sub>CO<sub>2</sub></sub> occurred regardless of age and strain of mice, and corresponded to approximately 8-10% for each percent increase in CO<sub>2</sub> in the air.

Declined gaseous exchange rates at chronic exposure of mice to HHE were accompanied by proportional decrease in food and water intake, as well as in body weight, which can be considered as a model of “voluntary” dietary restriction. While the mass of tissues with a weakly proliferating cell type (heart, kidneys, lungs, and pancreas) did not significantly change ( $p > 0,1$ ), body and liver weights decreased by about 20% ( $p < 0,01$ ). In the first days of chronic experiments, the level of FT3 and FT4 hormones in the blood decreased, however, recovering almost to the control values after 10 days of HHE exposure. No noticeable changes were found for the expression of genes which are usually activated by stress (*hsp-90*) or at uncoupling of oxidation and phosphorylation (*ucp-2*). The concentration of glucose in the blood was significantly reduced which can be a cause of normalization of blood sugar in the streptozotocin model of type I diabetes. HHE exposure stimulated skin wound healing despite the declined metabolic rates. HHE accelerated the closure of young skin at the site of a round head wound (50% wound closure occurred on day  $19,7 \pm 3,3$  in experimental mice and on day  $25 \pm 2,4$  in control mice). Complete closure of the wound occurred on day  $24 \pm 3,8$  in experimental mice and on day  $29,2 \pm 1,6$  in control mice ( $p < 0,02$ ).

Life-long effects of artificial atmospheres on stress endurance and longevity were studied on drosophila models. Maintenance of fruit flies in an artificial atmosphere with the addition of optimal concentrations of H<sub>2</sub>, He, and Ar to the air led to a slowdown of gas exchange rate, increased activity of the key enzymes of the antioxidant system (SOD and catalase), elevated survival under various stress conditions, and prolongation of life span.

In conclusion, the most important finding of this research is the declined metabolic rate and associated lower resource expenditures in chronic HHE. Hypometabolism and hypothermia are powerful modifiers of practically all biological processes. The developed model of HHE can be used in various fields of biology and medicine — from the treatment of diseases to application in space flights. Although numerous obstacles remain to be bypassed, HHE ensures optimization/remodeling of metabolic processes with lesser food and O<sub>2</sub> expenditure. It could be a critical issue, e.g., in space flights and especially in long term colonization of planets. In combination with other more flexible regimes and gaseous compositions, the natural and ‘self-made’ HHE could be an optimal habitat for both on the earth and space explorations. Special prospects HHE can obtain in gerontology, because the declined metabolism and hypothermia are long recognized as the most promising means in slowing down aging rate and extension of life span. Thoroughly selected regimes of HHE could be efficient in treatment of various diseases, including cancer, stroke, heart-attack, diabetes, wound healing etc.

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

## Список публікацій здобувача

### *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. [1]
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. [2]
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. [3] *(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. [4]

### *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). [5] *(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. [6] *(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. [7] *(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. [8]
- 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. [9] *(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. [10]
- 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. [11]
- 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. [12]
- 13. Толстун ДА, Мурадян ХК, Тимченко АН.** Влияние гипоксии, моделированной гелием, на развитие и стрессоустойчивость дрозофил. Матеріали X конференції молодих вчених «Актуальні проблеми геронтології і геріатрії», присвяч. пам'яті акад. В. В. Фролькіса; 2011 Січ 26; Київ. К.: ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України». 2011:57 с. [13]

- 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. [14]
- 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. [15]
- 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. [16]
- 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. [17]
- 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. К.: 2013:61. [18]
- 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. [19]
- 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. [20]

- 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. [21]
- 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. [22]
- 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 10-12<sup>th</sup>; Rome, Italy. 2018:20-23. [23]
- 24.** Толстун ДА. Влияние гиперкапнии и гипоксии на скорость газообмена, температуру тела и двигательную активность мышечей. 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. [24]
- 25.** Толстун ДА, Мурадян ХК, Дубилей ТА, Тушинская ТВ, Безруков ВВ, Фрайфельд ВЭ, Князер АН. Метаболическое ремоделирование мышечей 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. [25]
- 26.** Толстун ДА, Мурадян ХК, Дубилей ТА, Тушинская ТВ. Гипометаболизм и снижение уровня глюкозы крови у мышечей с диабетом I типа в гипоксическо-гиперкапнической атмосфере. Матеріали III Науково-практичної internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція». 2020 Лист 19; Харків. Збірник доповідей. 2020:348-349. [26]

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	24
1.1. Еволюційні зміни газового складу атмосфери.....	24
1.2. Вплив гіперкапнії і гіпоксії на старіння.....	25
1.3. Гіперкапнічно-гіпоксичне середовище і екстремальне довголіття.....	27
1.4. Вплив на організм інертних газів.....	29
1.4.1. Протекторні властивості інертних газів.....	36
1.5. Кислотно-лужна рівновага і довголіття ссавців.....	39
1.6. Ультрафіолетове опромінення.....	40
1.7. Тепловий шок.....	44
1.9 Робота білків роз'єднання окислення і фосфорилування.....	48
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	49
2.1. Об'єкти дослідження.....	49
2.2. Штучна атмосфера.....	50
2.3. Швидкість газообміну.....	51
2.4. Спонтанна рухова активність.....	52
2.5. Споживання їжі та води.....	52
2.6. Температура ядра і поверхні тіла мишей.....	53
2.7. Модель діабету I типу.....	53
2.8. Аналіз експресії генів.....	53
2.9. Глюкозотолерантний тест.....	55
2.10. Аналіз плазми крові.....	55
2.11. Аналіз лактату мозку.....	55
2.12. Швидкість загоєння ран.....	56
2.13. Активність супероксиддисмутази.....	56
2.14. Активність каталази.....	57
2.15. Кислотно-лужна рівновага.....	57

	15
2.16. Стрес-тести .....	57
2.16.1. Тепловий шок.....	57
2.16.2. Ультрафіолетовий стрес .....	58
2.16.3. Аліментарна депривація.....	59
2.17. Методи статистичної обробки результатів .....	59
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	60
3.1. Інтенсивність окисних процесів і тривалість життя .....	60
3.1.1. Філогенетичні детермінанти довголіття.....	62
3.1.2. Кислотно-лужна рівновага і тривалість життя ссавців .....	63
3.2. Вплив гіпоксії і гіперкапнії на інтенсивність газообміну і температуру тіла у молодих і старих самців лінії СВА .....	65
3.2.1. Контроль.....	68
3.2.2. Азот .....	74
3.2.3. Водень.....	80
3.2.4. Гелій .....	84
3.2.5. Аргон.....	89
3.2.6. Кисень.....	93
3.2.7. Вуглекислий газ .....	97
3.3. Вплив ГГС на газообмін у самок мишей лінії C57Bl/6.....	102
3.3.1. Контроль.....	103
3.3.2. Азот .....	104
3.3.3. Гелій .....	104
3.3.4. Аргон.....	105
3.3.5. Водень.....	106
3.3.6. Кисень.....	106
3.3.7. Вуглекислий газ .....	107
3.4. Вплив хронічного ГГС на функціональний стан мишей.....	109
3.4.1. Газообмін $V_{O_2}$ і $V_{CO_2}$ .....	111
3.4.2. Температура поверхні тіла.....	111
3.4.3. Споживання їжі і води .....	112

	16
3.4.4. Маса внутрішніх органів .....	113
3.4.5. Показники крові .....	114
3.4.6. Вміст лактату у мозку .....	117
3.4.7. Пероральний тест толерантності до глюкози.....	118
3.4.8 Вплив ГГС на експресію генів <i>iscr-2</i> та <i>hsp-90</i> .....	119
3.5. Стрепозотоцинова модель діабету I типу.....	121
3.6. Загоєння ран в умовах ГГС.....	122
3.7. Вплив штучної атмосфери на детермінанти довголіття дрозофіл.....	124
3.7.1. Швидкість продукції $O_2$ .....	124
3.7.2. Спонтанна рухова активність.....	125
3.7.3. рН гомогенатів.....	126
3.7.4. Активність супероксиддисмутази.....	127
3.7.5. Активність каталази .....	127
3.8. Життєздатність дрозофіл, інкубованих у штучних атмосферах.....	128
3.8.1. Стійкість дрозофіл, що утримуються в штучних атмосферах, до опромінення ультрафіолетом.....	129
3.8.2. Виживаність дрозофіл, що утримуються в модифікованих атмосферах, до і після опромінення ультрафіолетом.....	132
3.8.3. Вплив штучних атмосфер на виживаність після теплового шоку....	136
3.8.4. Сполучення теплового шоку з опроміненням ультрафіолетом.....	137
3.8.5. Аліментарна депривація.....	138
3.9. Вплив ША на вікову динаміку смертності і тривалість життя дрозофіл	142
3.9.1. Концентрації <i>Ne</i> і <i>Ar</i> , що лінійно зростають або зменшуються.....	145
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	148
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	167
Додаток 1.....	193

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

АВВ – acid base balance (кисотно-лужна рівновага)

АТ – атмосферний тиск

АТФ – аденозинтрифосфат

ВШМ – відносна швидкість метаболізму

ГГС – гіперкапічно-гіпоксичне середовище

ДА – древні атмосфери

ЕТЛ – електронтранспортний ланцюг

ІГ – інертні гази

КІМ – коефіцієнт інгібування метаболізму

КОД – калорійно-обмежений раціон

НАДФ<sub>Н</sub> – нікотинаміддинуклеотидфосфат відновлений

СРА – спонтанна рухова активність

ТЖ – тривалість життя

ТШ – тепловий шок

УФ – ультрафіолетовий

ША – штучна атмосфера

FAD<sub>Н2</sub> – флавінаденіндинуклеотид

NAD<sub>Н</sub> – нікотинамідениндинуклеотид

P<sub>CO2</sub> – парціальний тиск CO<sub>2</sub>

P<sub>O2</sub> – парціальний тиск O<sub>2</sub>

V<sub>O2</sub> – швидкість споживання кисню

V<sub>CO2</sub> – швидкість виділення вуглекислого газу

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Пошук засобів цілеспрямованої модуляції окисних процесів був і залишається актуальним завданням біології і медицини [24, 55, 75, 249]. Адже процеси життєдіяльності організму енергозалежні, а, отже, управління перетворенням енергії відкриває реальні можливості для контролю над ними [23, 28, 220]. Основна складність тут, очевидно, полягає в мінімізації негативних наслідків втручання в окисні процеси. Багаторічний пошук засобів модифікації енергетичного обміну за допомогою різноманітних інгібіторів мітохондріальної і ядерної реплікації, транскрипції і трансляції показав, що хронічне застосування хімічних модуляторів малоефективне через відносно швидке вироблення механізмів протидії, яке, до того ж, підсилюється інтоксикацією організму продуктами розпаду ксенобіотиків, якими являється більшість інгібіторів метаболізму [13, 33, 95]. Тому для вирішення такої задачі краще використовувати еволюційно добре відпрацьовані фізіологічні впливи, одним з яких може бути газовий склад атмосфери. Адже добре відомо, що в ході еволюції газовий склад атмосфери зазнавав значних якісних і кількісних змін [51, 166, 247]. Достатньо підкреслити, що зародження життя і більша частина еволюції живого проходила в жорсткій гіперкапнічній і гіпоксичній атмосфері, де вміст  $\text{CO}_2$  перевищував вміст  $\text{O}_2$  на порядки, в той час, як у сучасній атмосфері вже вміст  $\text{O}_2$  перевищує вміст  $\text{CO}_2$  в 500 і більше разів [100]. Штучна атмосфера (ША) представляється оптимальним рішенням проблеми управління енергетичним обміном [16, 17, 91, 184]. Адже враховуючи консервативність основних систем життєзабезпечення, таке повернення до древніх атмосфер дозволяє «вимкнути» еволюційно молодші регуляторні і виконавчі системи, та перейти в більш економний режим функціонування [51, 138, 177, 247].

Серед різних модифікацій газового складу атмосфери найбільший інтерес представляють зміни вмісту  $\text{O}_2$  і  $\text{CO}_2$ , які можуть привести до розвитку гіпоксії і гіперкапнії. Гіпоксія часто розглядається як результат дисфункції або

патології, що грає особливо важливу негативну роль при старінні [15, 30]. Проте, також добре відомі позитивні наслідки гіпоксичних впливів, до числа яких можна віднести вазодилатацію, покращення ліпідного обміну, гіпертензію, інсулінову резистентність і ін. [53, 128, 137, 184, 200, 227]. Більше того, «м'яке» інгібування мітохондріального окислювання може сповільнити швидкість обмінних процесів і подовжити життя короткоживучих лабораторних тварин, зокрема, дріжджів, червів, дрозофіл і мишей [66, 73, 88, 91, 114, 118, 147, 151].

Таким чином, ША дозволяють модифікувати метаболічні процеси з мінімальною інвазією, діючи через еволюційно древні і добре «відшліфовані» канали прямих і зворотних зв'язків. Необхідна специфічність їхньої дії, як видно, може бути забезпечена відповідним підбором газового складу і режимів впливу [17, 18, 28].

Сказане робить ГГС і ША багатообіцяючими і універсальними засобами, як для управління нормальними фізіологічними процесами, так і для профілактики і лікування патологічних порушень.

**Зв'язок роботи з науковими темами, програмами, планами.** 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.

**Ціль і завдання дослідження.** Ціль роботи — з'ясувати можливості зниження інтенсивності метаболічних процесів і уповільнення розвитку залежних від віку патологічних станів 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 та стійкість до розвитку діабету I типу.

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

*Об'єкти дослідження* — молоді, дорослі і старі миші лінії *CBA* і *C57Bl/6*, а також дрозофіл 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 отриманих результатів.** Розроблено модель і вперше вивчено вплив гострої і хронічної збалансованої ГГС (в якій  $\Delta P_{CO_2}$  приблизно дорівнює  $\Delta P_{O_2}$ ) 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 експозиція (до 3 годин) ГГС викликає дозо-

залежне зниження швидкості газообміну ( $V_{O_2}$  і  $V_{CO_2}$ ) і ТПТ без суттєвих змін моторної активності. Метаболічні зміни супроводжувалися досить рідкісним у геронтології феноменом — практично повною відсутністю впливу вікового фактору. При хронічній експозиції істотне зниження метаболізму і ТПТ зберігаються до кінця досліджуваного терміну (30 діб), що робить ГГС унікальним за потужністю засобом хронічного гіпометаболізму й гіпотермії, аналоги якого нам не відомі. Зниження рівня метаболічних процесів супроводжуються пропорційним зниженням споживання їжі та води, а також маси тіла. Це дозволяє вважати ГГС перспективним засобом ослаблення негативних ефектів метаболічного синдрому, а також поліпшеним (добровільним) аналогом відомого геропротекторного впливу — калорійного обмеження раціону. ГГС майже не викликає зміни клітинного і біохімічного складу крові та гормонів FT3 і FT4, проте суттєво впливає на рівень глюкози. Експресія білку роз'єднання окислення і фосфорилування (*ucp-2*) в гіпоталамусі і білку-шаперону теплового шоку (*hsp-90*) в тканинах серця істотно не змінюються. Ослаблення окислювального фосфорилування при ГГС, очевидно, викликає компенсаторне посилення гліколізу та утилізації цукру крові, що може бути причиною більшої стійкості до розвитку діабету. Незважаючи на гіпометаболізм, ГГС має стимулюючий вплив на загоєння ран шкіри. Показана можливість підвищення життєздатності в стресових умовах і подовження життя при утриманні дрозофіл в гіпоксичних середовищах з додаванням  $H_2$ , He і Ar.

**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 щире 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 Негеві (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 «Здоровье 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 науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, 18 жовтня 2018); II науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, 21 листопада 2019); III науково-практичній інтернет-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 посилань. Робота викладена на 192 сторінках машинописного тексту, містить 7 таблиць, 70 рисунків.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Еволюційні зміни газового складу атмосфери

У ході еволюційного розвитку атмосфера піддавалася істотним якісним і кількісним змінам, які неминуче впливали на розвиток біологічних систем.

Вважається, що первинна атмосфера, яка існувала після «великого вибуху» і утворення Землі, складалася з  $H_2$  (95 %) і  $He$  (5 %) [165, 273]. Через кілька сотень мільйонів років після утворення твердої кори (мантії) атмосфера почала стрімко збагачуватися  $CO_2$ , парами  $H_2O$  і різними азот-, сірко- та фосфоровмісними газоподібними з'єднаннями в результаті вулканічної, гейзерної і метеоритної активності [51, 166, 225, 247, 259]. У цей абіогенний період атмосфера, імовірно, була найбільш динамічним компонентом навколишнього середовища і її зміни в значній мірі визначали зміни інших факторів середовища. Якісним стрибком в еволюційних взаєминах живих систем і атмосфери було виникнення мікроорганізмів з апаратом фотосинтезу, що відбулося приблизно 3,5 мільярди років тому. Використовуючи ультрафіолет і  $CO_2$ , ці мікроорганізми синтезували вуглеводи і інші необхідні їм продукти, виділяючи  $O_2$  як побічний продукт [48, 51, 165, 247]. З цього моменту почалася справжня ко-еволюція атмосфери і живих систем. Зміни складу атмосфери викликали адаптивні зміни, які часто супроводжувалися утворенням нових виконавчих і регуляторних систем, тим самим збільшуючи енергетичні і субстратні потреби клітини. Збільшені метаболічні витрати, у свою чергу, запускали новий «виток» змін газового складу атмосфери.

Масштаби еволюційних змін атмосфери наочно видні з порівняння газового складу первинної і сучасної атмосфери. Якщо первинна атмосфера складалася в основному з  $H_2$  і  $He$ , то в сучасній атмосфері вміст цих газів на 4-6 порядків нижче (табл. 1.1) [100, 282].

### Газовий склад сучасної атмосфери Землі

Назва	Формула	Вміст, %
Азот	N <sub>2</sub>	78,084
Кисень	O <sub>2</sub>	20,94
Аргон	Ar	0,934
Вуглекислий газ	CO <sub>2</sub>	0,039
Неон	Ne	0,018
Гелій	He	0,0005
Метан	CH <sub>4</sub>	0,0002
Криптон	Kr	0,0001
Водень	H <sub>2</sub>	0,00005
Ксенон	Xe	0,00001

Вміст же домінуючих у сучасній атмосфері N<sub>2</sub> і O<sub>2</sub> при цьому, навпроти, збільшився практично з нуля до 78 % і 21 %, тобто, на багато порядків. Все сказане дозволяє підсумувати, що *атмосфера була одночасно суб'єктом і об'єктом еволюції і ко-еволюціонувала разом з біологічними системами.*

## 1.2. Вплив гіперкапнії і гіпоксії на старіння

Серед різних модифікацій газового складу атмосфери найбільший інтерес представляють зміни вмісту O<sub>2</sub> і CO<sub>2</sub>, які можуть привести до розвитку гіпоксії і гіперкапнії. Гіпоксія часто розглядається як результат дисфункції або патології, що грає особливо важливу негативну роль при старінні [15, 30]. Проте, добре відомі також позитивні наслідки гіпоксичних впливів, до числа яких можна віднести вазодилатацію, покращення ліпідного обміну, гіпертензію, інсулінову резистентність і ін. [53, 128, 137, 184, 200, 222]. Більше того, «м'яке» інгібування мітохондріального окислювання може сповільнити швидкість

обмінних процесів і подовжити життя короткоживучих лабораторних тварин, зокрема, дріжджів, червів, дрозофіл і мишей [66, 73, 88, 91, 114, 118, 147, 151].

Крокодили відносяться до тих нечисленних видів, які пережили еволюційні пертурбації газового складу атмосфери без серйозних морфологічних і генетичних змін. Інкубація яєць американського алігатора в гіпоксії (12 % O<sub>2</sub>), нормоксії (21 % O<sub>2</sub>) і гіпероксії (30 % O<sub>2</sub>) показала, що особини, вирощені при гіпоксії, мали менші розміри тіла при вилупленні. У таких тваринні темпи постнатального росту і швидкість споживання O<sub>2</sub> занижені [192]. Цей феномен типовий і для багатьох інших видів і був неодноразово підтверджений у нашій лабораторії на дрозофілах (дані не представлені).

Заслуговує на увагу також той факт, що більшість типів стовбурових клітин розташовані в гіпоксичному мікрооточенні. Це підсилює експресію індукцйбельного фактору гіпоксії (hypoxia inducible factor, HIF 1 $\alpha$ ) і, імовірно, підтримує довжину теломер, проліферативну активність і самовідновлення у стовбурових клітинах [79].

Особливий інтерес представляють види з екстремальним довголіттям, які мають істотно більшу ТЖ, порівняно з представниками того ж таксону. Так, наприклад, горбатий кит, чемпіон у класі ссавців, доживає до 220 років, майже вдвічі перевершуючи найближчого в класі сусіда по довголіттю – людину. Великі черепахи, які доживають до 180 років, являються рекордсменами серед рептилій. Голий землекоп — чемпіон по довголіттю в межах найбільшого ряду ссавців — гризунів. Він живе більше 30 років.

Спільним для всіх цих неспоріднених видів є знижений pO<sub>2</sub> і підвищений pCO<sub>2</sub>, оскільки і кит, і черепаха, і землекоп постійно знаходяться в умовах сильної гіпоксії та гіперкапнії [68, 143]. З точки зору зниження інтенсивності метаболізму найбільш цікавим для дослідження є голий землекоп, у якого наслідками уповільнення метаболізму стали зниження температури тіла, феноменальна тривалість життя у таксоні, а також відсутність ознак старіння та онкологічних захворювань [68, 129, 248, 262]. Ми вважаємо, що саме жорсткі умови газового складу атмосфери (10 % гіпоксія і гіперкапнія) стали однією з

основних причин такого уповільнення обміну речовин, та, як результат такого уповільнення — подовження тривалості життя.

Варто зазначити, що гіпоксія і гіперкапнія добре відомі всім видам тварин із самого моменту запліднення. Адже ембріон практично беззахисний і повинен бути ізольованим від усіх негативних факторів навколишнього середовища шкарлупою у яйцекладних видів або утробою матері в плацентарних тварин. В обох випадках такий ізолюючий «щит» стає перешкодою для вільного обміну  $O_2$  і  $CO_2$ , тим самим створюючи гіпоксичне і гіперкапнічне середовище. Це дозволяє розширити добре відоме латинське прислів'я «*Omne vivum ex ovo*» до «*Omne vivum ex ovo in hypoxia et hypercapnia*» («Все живе народжується з яйця в гіпоксії і гіперкапнії»). Є підстави думати, що саме сполучення м'якої гіпоксії і гіперкапнії є найбільш ощадливим режимом генерації і наступного використання макроергів у метаболічних процесах [149, 176].

Вдалою моделлю для вивчення впливу модифікацій газового складу атмосфери є дрозофіла. До всіх відомих переваг дрозофіли, як модельного організму, у досліджах по вивченню впливу штучних атмосфер додається ще один важливий позитивний момент, що обумовлений добре структурованим трахейним апаратом доставки  $O_2$  прямо в клітину. Трахеї в дрозофіл розгалужуються в трахеоли діаметром до 1 мкм, що дозволяє їм пронизувати наскрізь клітину. Стінка такої трахеоли набагато тонша стінки капіляра, що істотно збільшує ефективність газообміну. Як видно, саме завдяки такій ефективній системі газообміну дрозофіли можуть не тільки виживати, але і жити довше в атмосферах з вмістом  $O_2$  близько 1 % [106, 237].

### 1.3. Гіперкапнічно-гіпоксичне середовище і екстремальне довголіття

Енергія і температура є основоположними термодинамічними характеристиками, які здатні модифікувати темпи і спрямованість практично всіх процесів в живих і неживих системах, включаючи процеси, що

детермінують швидкість і особливості старіння. Хоча деякі аспекти цієї проблеми залишаються дискусійними, проте, вважається встановленим те, що зниження температури тіла і енергетичних витрат сприяє уповільненню старіння і довголіття як пойкилотермних, так і гомойотермних організмів [72, 90, 130, 149, 239, 266]. На жаль, тут існують численні невирішені питання, основним з яких є висока складність хронічного зниження температури тіла і метаболізму у теплокровних, що призвело до поступового зниження інтересу до цього важливого напрямку досліджень.

В останні роки було запропоновано нову перспективну геронтологічну модель — гризуна голого землекопа (*Heterocephalus glaber*, ГЗ), вивчення якого може допомогти вирішенню проблеми хронічного зниження рівня обмінних процесів і температури тіла. Справа в тому, що тривалість життя ГЗ приблизно на порядок вище, тоді як швидкість метаболізму і температура тіла (33-34 °С) істотно нижче, ніж у мишей [98, 182]. ГЗ має приблизно такі ж розміри тіла, як і у миші, але його максимальна тривалість життя сягає 32 років, що робить цю тварину найбільш довгоживучим видом серед гризунів [60, 155]. Інші видатні характеристики ГЗ включають збереження високої фізичної та репродуктивної активності до глибокої старості і відсутність вікового зростання смертності [211]. Особливий інтерес представляє їх висока стійкість до залежних від віку захворювань — раку [156, 224], серцево-судинних порушень [74, 101], інсульту [183, 265], саркопенії [236], діабету [228] та ін.

Великі колонії ГЗ (до 100 особин) живуть в глибоких і погано вентильованих підземних норах [98]. В такому середовищі проживання вміст CO<sub>2</sub> істотно зростає (до 10%), а O<sub>2</sub> пропорційно зменшується [68]. Є підстави вважати, що таке гіпоксичне і гіперкапнічне середовище може бути причиною зниження інтенсивності метаболічних процесів і температури тіла не тільки ГЗ, а й інших екстремально довгоживучих видів, наприклад, китів, черепах, двостулкового молюска *Arctica islandica* і ін. [179].

#### 1.4. Вплив на організм інертних газів

Інертні гази (ІГ), як складові штучної атмосфери, викликають особливий інтерес, тому що їхні біологічні ефекти залишаються мало вивченими. Таке твердження особливо справедливе для вікового аспекту їхніх ефектів. У цілому, інертні в пробірці, ІГ продемонстрували дивовижно широкий спектр можливих мішеней і захисних властивостей на різноманітних медико-біологічних об'єктах. Хоча біологічна активність ІГ була відкрита більше, ніж 50 років тому [46, 49], тільки за останні десятиліття почалося активне їхнє вивчення в експерименті і з'ясування можливостей застосування в клініці. Зокрема, було показано, що He і Ar проявляють стимулюючу дію на тканинне дихання, що залежало від цілісності плазматичної мембрани і раціону [3, 10]. Особливе місце серед досліджень такого плану займають роботи про тканинопротекторні і органопротекторні властивості ІГ, добре документовані для міокарда, нейронів головного мозку, нирок, і ендотелію судин [47, 81, 98, 122, 163, 167, 168, 172, 193]. Це саме ті тканини, зміни яких критичні для зниження функціональних можливостей старіючого організму і вікового підвищення смертності.

З принципової точки зору важливо те, що ІГ можуть безпосередньо взаємодіяти з макромолекулами, зокрема, білками. Як показав кристалографічний аналіз, Ar, Kr і Xe здатні вибірково зв'язуватися зі специфічними сайтами у своєрідних молекулярних «печерах» (cavity), які є в макромолекулах, зокрема, ліозимах фага T4. З печерою ліозимів дикого типу зв'язувалися тільки по одній молекулі Ar, Kr або Xe, тоді як у мутантного типу були два незалежних сайти зв'язування, а в подвійного мутанта — три взаємодіючих сайти. Зв'язування Xe і в меншому ступені Kr і Ar викликало збільшення розмірів печер, хоча споконвічний розмір печер у багато разів більше, ніж розмір атомів БГ. Майже у всіх випадках ступінь зв'язування збільшувалася в міру росту атомарної маси, тобто в ряді  $Ar < Kr < Xe$  [161]. При помірних тисках Xe також здатний прямо зв'язуватися з ферментами і

утворити слабкі, але специфічні комплекси, які можуть бути виявлені і використані в рентгенокриталографічному аналізі. Наприклад, ферменти родини серин-протеїназа — еластаза, колагеназа і субтилізин мали ідентичний сайт зв'язування Хе, який, до того ж, перебував у каталітичному центрі. Зв'язування Хе було сполучено слабкою взаємодією з кількома амінокислотними послідовностями поза каталітичним центром, але без змін структури ферментів [222]. За допомогою флуоресцентної спектроскопії було також показано, що Хе має два сайти взаємодії із триптофановими залишками альбуміну сироватки крові, які можуть змінитися залежно від структури альбуміну [264].

З усіх ІГ найбільший інтерес представляють і найбільш вивчені медико-біологічні ефекти Не, Аг і Хе, насамперед, через унікальні захисні властивості, що виявляють при ішемії і депривації, тобто, одночасному і повному обмеженні субстратів окислювання і  $O_2$ .

### *1. Гелій*

Гелій є безбарвним і нетоксичним газом без запаху і анестезуючого ефекту. Гелій застосовувався у пацієнтів із захворюваннями дихальної системи ще в 30-х роках минулого сторіччя. Суміш із 79 % Не і 21 %  $O_2$ , відома як геліокс, має меншу щільність і ламінарний опір, що полегшує дихання у пацієнтів з легеневиими захворюваннями [37, 46, 109]. В останні роки геліокс застосовувався в різних клініках при гострих респіраторних захворюваннях у дітей і дорослих, а також при лікуванні декомпресії при глибоководних зануреннях [2, 67]. Однак найбільшу увагу привернула здатність гелію запобігати загибелі кардіоміоцитів, нейронів і епітеліальних клітин, які піддавалися ішемії/реперфузії [189]. При ішемії/реперфузії міокарда щурів і кроликів прекодиціонування гелієм помітно знижувало кількість загиблих клітин. Важливо те, що захисні властивості гелію проявляються не тільки при прекодиціонуванні, але і з практичної точки зору більш важливої моделі —

посткондиціонуванні. Було показано, що позитивний ефект посткондиціонування міокарду гелієм опосередкований зниженням числа клітин, що загинули через апоптоз. Це дає підставу допустити, що гелій має здатність регулювати транскрипцію факторів, які відповідальні за перемикання клітини від запрограмованої загибелі до виживання. Дійсно, диференціальна оцінка експресії генів, що беруть участь у клітинному апоптозі, некрозі і аутофагії, показала, що посткондиціонування міокарду після сеансу ішемії/реперфузії зменшує експресію сигнальних молекул клітинної загибелі, одночасно стимулюючи синтез молекул, що підтримують виживання клітин [188]. На моделі ішемії-реперфузії передпліччя здорових добровольців також було показано, що дихання геліоксом за 15 хв або 24 години до ішемії захищає клітини ендотелію від стресорних впливів, не порушуючи при цьому нормальний рівень цитокінів, адгезійних молекул і мікрочастинок плазми крові [230]. Зі всіх ІГ гелій становить найбільший інтерес для клінічного застосування, бо його унікальні органопротекторні властивості не ускладнені змінами гемодинаміки і анестезуючого ефекту, як, наприклад, у ксенону [261].

В останні роки намітилася ще одна область застосування ІГ у клініці. Мова йде про впровадження гелієвої і аргонної лазерної терапії, а також, так званого, «He-Ar ножа» для видалення пухлин за допомогою різкого місцевого охолодження (cryoablation). Найчастіше такі втручання застосовуються для видалення пухлин легень, печінки, простати, нирок і молочних залоз. Під спостереженням комп'ютерної томографії така операція проводиться за допомогою голки, тобто без розкриття і зрізів тканин, що підвищує ефективність антипухлинної терапії [260].

## *II. Аргон*

Аргон (Ar) є третім по поширеності газом атмосфери Землі після  $N_2$  і  $O_2$ . Його вміст (0,93 %) у тисячі разів більший інших ІГ, що робить його найдоступнішим з них. Слово «аргон» («αργός») у перекладі із грецького

означає інертний. Таке твердження, мабуть, справедливо, з огляду на поведінку цього елемента в хімічних реакціях, але ніяк не в біологічних системах. Заслуговує на особливу увагу те, що протекторні властивості Ar схожі аналогічним властивостям найбільш ефективного, але дорогого анестезуючого засобу майбутнього — Хе. У принципі, Ar може стати заміником Хе, наприклад, у дослідженнях на тваринах [217]. Відносно високий вміст Ar в атмосфері пояснюється тим, що він постійно утворюється в результаті  $\beta$ -розпаду ізотопу  $^{40}\text{K}$ , що є найпоширенішим радіоактивним елементом у всіх біологічних об'єктах, включаючи клітини людини [89]. Відомо, що, діючи за принципом зворотного зв'язку, кінцеві продукти біологічних реакцій нерідко стають сигнальною молекулою для запуску протидіючих процесів. Не виключено, що Ar, який утворюється в результаті розпаду  $^{40}\text{K}$ , служить сигнальною молекулою для активації репаративних процесів. Це може стати одним з пояснень широкого спектра захисних властивостей Ar і інших ІГ.

Фізіологічна активність Ar відкрита ще у 30-40 роки ХХ століття при пошуку газових сумішей для глибоководного занурення [49]. Однак посправжньому інтенсивне наукове вивчення Ar почалося лише недавно [69, 112, 187, 195, 217]. Відомо, що у людей азотний наркоз спостерігається при підвищенні тиску до 4 атм, а водневий наркоз настає, починаючи з 2,5-3 атм. У щурів азотний наркоз починається при підвищенні тиску до 10 атм і супроводжується вповільненням виділення дофаміну нейронами *substantia nigra*. Такі ж зміни відбуваються під впливом Ar, який має більше сильний наркотичний ефект, але не з гелієм, який відрізняється слабким наркотичним ефектом і не інгібує, а стимулює виділення дофаміну нейронами [215]. Інкубація яєць японського перепела (*Coturnix coturnix japonica dom.*) у гіпоксичній атмосфері (14-15 %  $\text{O}_2$  і 85-86 %  $\text{N}_2$ ) приводила до того, що тільки 16,7% ембріонів доживали до 4 діб, тоді як заміна 55 %  $\text{N}_2$  Ar збільшувала виживаність до 60 %, одночасно знижуючи частоту патологічних відхилень в особин, що вилупилися [11]. Газова суміш із добавкою Ar (24 % Ar, 16 %  $\text{O}_2$  і

60 % N<sub>2</sub>) забезпечувала нейро- і отопротекторний ефекти для клітин слухового апарата людини при шумі, гіпоксії і окисному стресі [19]. У молодих людей хронічна експозиція в атмосфері з високим вмістом Ar приводила до підвищення стійкості до гіпоксії, посилення газообміну і ліпідного обміну, збільшення працездатності у важких умовах, і ін. [195].

Дослідженнями останніх років показано, що амфетамін і його похідні активують  $\mu$ -опіоїдні рецептори *nucleus accumbens*, що викликає локомоторну сенситизацію до амфетаміну, тобто підвищену рухову активність після прийому препарату. Було виявлено, що Xe в субанестезуючих дозах запобігає сенситизації до амфетаміну у щурів [76]. Такий же ефект викликали антагоністи рецепторів  $\gamma$ -амінобутирової кислоти і бензопірена, через які, можливо, діє Ar [32]. У зв'язку із цим важливо було з'ясувати, чи здатний Ar знімати локомоторну сенситизацію до амфетаміну. Виявилось, що щури, які одержували амфетамін і утримувались протягом трьох днів в атмосфері з 75 % Ar і 25 % O<sub>2</sub> демонстрували істотно меншу активацію  $\mu$ -опіоїдних рецепторів і, як наслідок, зниження локомоторної активності у відповідь на введення амфетаміну, що, можливо, доводить дію Ar через опіоїдні рецептори [77].

Під впливом Ar і Ne нейтрофіли людини утворювали мікрочастинки і активували NO-синтазу 2 і NADPH-оксидазу, що викликало полімеризацію цитоплазматичного актину. Вивчення поперечних зшивок білків і імуноосадження показало, що полімеризація відбувалася через виділення фосфопротейну, адгезин-кінази, (H<sup>+</sup>)/(K<sup>+</sup>)АТФази, протеїн-дисульфід ізомерази і різних фліпаз (flippase). Антиоксиданти і інші впливи, що перешкоджають утворенню активних форм O<sub>2</sub>, знижували рівень полімеризації актину, що ще раз доводить різноманіття кінцевих мішеней і каналів дії Ar [250].

### III. Ксенон

Відомо, що в клітині існують недавно відкриті нуклеїнові кислоти — мікроРНК, які беруть участь у регуляції експресії різних генів. Не виключено,

що  $\text{I}_2$  здатні певним чином використати такі специфічні регулятори роботи геному. На моделі ниркової ішемії-реперфузії мишей було показано, що двогодинне прекодиціонування в атмосфері з 70 %  $\text{Xe}$  викликає морфологічний і функціональний захист тубулярних клітин від апоптозу і окисного стресу.  $\text{Xe}$  істотно підсилював експресію мікро-РНК *mir-21*, а також  $\text{HIF-1}\alpha$  і фактору росту васкулярного ендотелію (*vascular endothelial growth factor*) у нирках. Інактивація *mir-21* за допомогою анти-*mir-21* нуклеїнової кислоти погіршувала захисний вплив  $\text{Xe}$ , підсилюючи апоптоз підвищенням експресії про-апоптотичних білків і зменшення синтезу  $\text{HIF-1}\alpha$  [125, 126].

Ксенон багатьма вважається «ідеальним» анестезуючим засобом завдяки низькому коефіцієнту поділу фаз у крові (*blood-gas partition coefficient*), гемодинамічної стабільності і різними органопротекторними властивостями [140]. Вважається, що багато позитивних ефектів  $\text{Xe}$  обумовлені антагонізмом з  $\text{NMDA}$ -рецептором (*N-Methyl-D-Aspartate*) і пов'язані з такими функціями ЦНС, як пам'ять, біль і навчання. Установлено, що  $\text{NMDA}$ -рецептор є активатором групи іонних каналів [28, 180]. Більше того, дослідженнями останніх років встановлено, що  $\text{Xe}$  бере участь в активації не тільки  $\text{NMDA}$ -асоційованих, але і інших іонних каналів, зокрема тих, що підтримують клітинний гомеостат  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{K}^+$  [45, 199, 219]. Дрозофіла, як і людина, має складну мережу нейронів, з приблизно такою ж чутливістю до ксенонової анестезії [35, 254]. Завдяки наявності різних мутантних ліній вдалося показати, що ксенонова анестезія опосередкована не тільки антагонізмом з  $\text{NMDA}$ -рецептором, але і рецепторам інших іонних каналів [221].

Падіння кров'яного тиску під час хірургічних операцій пов'язане з підвищеним ризиком ускладнень і звичайно вимагає негайного внутрішньовенного введення вазоконстрикторів, зокрема, норадреналіну. Більшість анестезуючих речовин порушують симпатичний кардіоваскулярний контроль і знижують артеріальний тиск і серцевий викид. При *in vivo* анестезії  $\text{Xe}$  артеріальний тиск не тільки не знижується, але і трохи росте. Було показано, що в *in vitro* умовах  $\text{Xe}$  зменшує захоплення норадреналіну нейронами, що

приводить до підвищення вмісту цього медіатора в синаптичній щілині і плазмі крові [185]. Крім визнання як кращого анестезуючого і аналгетичного засобу, Хе відомий здатністю безпосередньої взаємодії з багатьма іншими агентами, які обумовлюють його позитивні фармакодинамічні і фармакокінетичні характеристики. Особливої уваги заслуговують органопротекторні властивості в мозку і міокарді, що знижують ризик інфаркту після застосування Хе. Унікальні мішені і канали дії дозволяють Хе не тільки залишатися поза конкурентною боротьбою з переважною більшістю інших регуляторних факторів, але і забезпечують високі шанси сумісності з ними. Так, терапевтична гіпотермія є одним з найбільш ефективних засобів і широко застосовується в клініці для зниження ушкоджень мозку при ішемії. Проте, наприклад, більше 50% немовлят вмирає або страждає від серйозних порушень після таких контрольованих процедур охолодження. Тим часом на різних видах лабораторних ссавців було показано, що Хе володіє нейропротекторним ефектом, який підсилюється при його сполученні з гіпотермією [218]. Більше того, Хе може отримати несподіване застосування в клініці через здатність зменшувати міграцію клітин аденокарциноми і знижувати рівень виділених ними про-ангіогенних факторів. При цьому NMDA-рецептор і гліцин виступали як антагоністи Хе [42].

Органопротекторна стратегія важлива не тільки в *in vivo* умовах, але і при зберіганні тканин для трансплантації. Дослідження з вивчення протекторного ефекту при гіпотермічному зберіганні нирок показали, що Хе індукує експресію основного стрес-білка (HSP-70) і гем-оксигенази-1, підвищуючи виживаність людських проксимальних тубулярних клітин після стресу, викликаного гіпоксією і гіпотермією. При трансплантації нирок від щурів лінії Norway до лінії Lewis введення Хе донорам і реципієнтам знижувало загибель тубулярних клітин і запобігало запальним процесам, тим самим збільшуючи строки існування пересаджених тканин. Хе прискорював активацію функціонування пересаджених тканин, зменшував частоту імунологічного відторгнення і підвищував строки їхнього життя [275]. При синергічній

трансплантації нирок щурів «Lewis-to-Lewis» Хе викликав зниження експресії каспази-3, запобігав активації NF-κB, прозапальних інтерлейкінів IL-1β і IL-6, а також TNF-α, тим самим підвищуючи виживаність ізографтів «Lewis-to-Lewis» або аллографтів «Fischer-to-Lewis» [274]. Вивчення протекторного ефекту Хе на нефротоксичну дію гентаміцину (gentamicin) у щурів, яких утримували в атмосфері з 70% Хе і 30% O<sub>2</sub>, показало, що Хе може проявляти захисні властивості, які виражаються у кращій морфологічній і функціональній роботі нирок у відповідь на введення гентоміцина. Хе запобігав тубулярним ушкодженням, апоптозу, розвитку окисного стресу і підвищував експресію HIF-2α і керованого ним фактора васкулярного ендотеліального росту (vascular endothelial growth factor). Хе також підсилював експресію мікроРНК miR-21, яка відома своїм антиапоптотичним ефектом [125].

Зазначені вище захисні властивості і переваги Хе, безумовно, повинні переважити його дорожнечу і відкрити широкі перспективи для використання в умовах клініки [201].

#### 1.4.1. Протекторні властивості інертних газів

За останні роки швидко зростає число експериментальних і клінічних робіт, у яких обговорюються цитопротекторні і органопротекторні властивості ІГ, зокрема, при ішемії-реперфузії. Незважаючи на хімічну інертність, ІГ здатні реагувати з активними центрами ферментів і рецепторів. На різних *in vitro*, *ex vivo* і *in vivo* моделях показано, що ІГ і, особливо, Ar і Хе, проявляють виражені кардіопротекторні, нейропротекторні і нефропротекторні ефекти.

*In vitro* відновлення зрізів гіпокампу мишей після механічної травми, яке оцінювалось за допомогою фокальної електрофізіології NMDA-рецепторів і TREK-1 каналів, показало, що Хе і Ar зменшували ушкодження, а He, Ne і Kr не мали істотного впливу. Гліцин, конкуруючи за NMDA-рецептори, знижує захисний ефект Хе, але не Ar. Ці дані ще раз свідчать про те, що Хе, на

відміну від Ar, діє через NMDA-рецептори і TREK-1 іонні канали, які вважаються основними мішенями нейропротекції [105].

Запрограмована загибель клітини або апоптоз є типовою клітинною відповіддю на різноманітні внутрішньоклітинні і позаклітинні фактори пошкодження та стреси. Вона звичайно опосередкована каскадом молекулярних подій, що приводять до збільшення проникності мітохондріальної мембрани, дисипації мітохондріального трансмембранного потенціалу, зупинки синтезу АТФ, виділення цитохрому-С і апоптоз-індукуючого фактору в цитоплазму. Після цього позаклітинна цитохром-оксидаза С ініціює зборку супермолекулярного комплексу, відомого як апоптосома, що каталізує активацію каспази-3. Виявилося, що Ar і Хе мають здатність запобігти апоптотичній загибелі клітин, індукованій різними агентами, які ушкоджують функціональну і морфологічну цілісність мітохондрій. Було показано, що при культивуванні клітин остеосаркоми людини в атмосфері, що складається з 20 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> і 75 % різних ІГ (He, Ne, Ar, Kr або Хе), заміна N<sub>2</sub> ІГ не викликала помітних змін життєздатності клітин. Однак Ar і Хе, але не Ne і Kr, істотно зменшували загибель клітин, викликану добре відомими інгібіторами кіназ апоптотичного каскаду — суропорином або мітоксантроном — агентом, що ушкоджує ДНК. Аналогічного типу захисні ефекти були виявлені при додаванні в культуральне середовище різних мітохондріальних токсинів. Цитопротекторний ефект супроводжувався посиленням цілісності мітохондрій, що контролювалося виходом цитохрому-С у цитоплазму, а також інгібуванням каспази-3. Ці результати підтверджують прийнятність використання ІГ у клінічній практиці [234].

Протягом 40 діб спостережень після помірної сили гіпоксичної ішемії у неонатальних щурят заміна N<sub>2</sub> на Хе, Ar і Не покращувала виживаність, зберігала від ушкоджень ЦНС і нейрологічні функції. При цьому Ar покращував виживаність клітин до рівня інтактних особин. При більш сильних ішемічних ушкодженнях Ar і Хе зменшували об'єм інфарктної зони. Всі три ІГ

підвищували експресію Vcl-2, He і Xe стимулювали експресію Vcl-x1, а Вах був підвищений в атмосфері з He і в контрольній групі [278].

Зрозуміло, не завжди і не всі застосовані ІГ приводили до позитивних результатів. Так, утримування культур нейронів, взятих у ембріонів мишей лінії BALB/c, у звичайній культуральній атмосфері (75 % N<sub>2</sub>, 20 % O<sub>2</sub> і 5 % CO<sub>2</sub>) або в атмосфері із заміною N<sub>2</sub> на He, Ne, Ar, Kr і Xe показало, що Kr погіршував, а Ar покращував виживаність культур. Відновлення після деприваційного стресу (повного обмеження O<sub>2</sub> і глюкози протягом 90 хв) показало, що захисні властивості ІГ знижувалися в ряді Xe>Ar>N<sub>2</sub>=Ne=Kr>He. Інакше кажучи, у порівнянні з N<sub>2</sub>, протекторний ефект був виявлений для Xe і Ar, Ne і Kr не створювали істотного впливу, а He погіршував відновлення нейронів ембріонів мишей [122]. У схожих за постановкою дослідах культура тубулярних клітин нирок людини (HK2) спочатку стимулювалася 3-годинним прекодиціонуванням в атмосфері із ІГ, а через 24 г піддавалася 3-годинному деприваційному стресу. За спаданням позитивного ефекту ряд ІГ мав вигляд: Xe>Kr>Ar>Ne>N<sub>2</sub>>He. При цьому тільки виживаність клітин, які піддавалися 3-годинному деприваційному стресу в атмосфері Xe, була вірогідно краща, а He — гірше, ніж при N<sub>2</sub>. На відміну від інших ІГ, Xe також викликав достовірне зростання експресії HIF-1 $\alpha$ , Vcl-2 і p-Akt [211].

Таким чином, наведений огляд літератури свідчить про те, що за останні десятиліття в тому, чи іншому ступені докладності були вивчені медико-біологічні властивості всіх ІГ, крім Rn. Судячи з того, що в більшості випадків ефективність ІГ росте в міру збільшення маси їхнього атома, то, саме Rn може виявитися найбільш ефективним з них. На жаль, Rn є одним з проміжних продуктів ланцюга радіоактивних розпадів, які призводять до утворення свинцю з торію і урану. Всі ізотопи Rn радіоактивні і мають досить короткий період розпаду, що практично виключає їхнє застосування в експериментальній і, тим більше, клінічній практиці. Що стосується інших ІГ, то, мабуть, найбільшою біологічною активністю володіють He, Ar і особливо Xe. По не дуже зрозумілим причинам Ne і Kr мають меншу активність і, зокрема, слабкий

органопротекторний ефект. Ці властивості проявляються у різний термін після прекондиціонування і посткондиціонування тканин і тварин шляхом вміщення їх на кілька годин в атмосферу з заміною  $N_2$  на  $I_2$ . Важливо те, що  $I_2$ , незважаючи на хімічну інертність, здатні прямо взаємодіяти з білками і різними біологічними структурами, зокрема, рецепторами, які беруть участь у регуляції іонних каналів і перемикальні програми загибелі клітини на виживання. Те, що ці процеси здійснюються при активній участі транскрипційних і мітохондріальних факторів, не виключає можливість існування мішеней  $I_2$ , які можуть перепрограмувати не тільки роботу геному, але і змінити хід окисних процесів і особливості старіння. На жаль, робіт такого напрямку в доступній нам літературі знайти не вдалося, що ще раз підкреслює піонерський характер проведених нами досліджень по вивченню впливу штучних атмосфер, у тому числі, з використанням  $H_2$ ,  $N_2$ ,  $He$  і  $Ar$  на рівень обмінних процесів, життєздатність у стресорних умовах і темпи старіння лабораторних тварин.

### **1.5. Кислотно-лужна рівновага і довголіття ссавців**

Кислотно-лужна рівновага (acid-base balance, АБВ) є фізико-хімічною основою процесів, які проходять у живих системах. Її порушення можуть, так чи інакше, відбитися на функціональному стані більшості, якщо не всіх, виконавчих і регуляторних систем. На відміну від локальних пошкоджуючих факторів, наприклад, мутацій, вільних радикалів і ін., дія АБВ більше нагадує зброю масового ураження. Навіть нетривалі і локальні порушення АБВ можуть викликати масовану і практично одночасну дисфункцію більшості захисних і репаративних систем організму. Нажаль, віковий аспект частоти і природи таких порушень залишається недостатньо вивченим. У цьому розділі зроблена спроба з'ясування залежності показників АБВ із МТЖ у ссавців різних видів.

Відомо, що переважна більшість видів ссавців здатна переносити лише невеликі зміни АБВ. У людини, наприклад, коливання на 0,02 одиниці вище

або нижче нормального діапазону рН крові (7,4) вважаються граничними для розвитку алкалозу або ацидозу. У випадку несвоєчасного усунення такі відхилення здатні викликати метаболічний колапс і раптову загибель організму, що підкреслює роль АВВ, як важливого детермінанта довголіття. Частота і вага порушень АВВ залежать від способу життя і природи продуктів харчування. Білки і зернові звичайно метаболізуються з утворенням з'єднань кислотної природи, наприклад, сірчаної кислоти, що утвориться в результаті окислювання сульфідних (SH-) груп метіоніну і серину. Метаболізм фруктів і овочів, навпроти, протікає з переважним утворенням продуктів лужної природи, наприклад, бікарбонату калію [157]. Метаболічний ацидоз є найбільш частим порушенням АВВ, що звичайно компенсується уповільненням екскреції цитратів і посиленням виділення амонію і кальцію, що приводить до втрати азоту, кальцію і фосфатів організму. Порушення АВВ є серйозним ризиком для розвитку різних хвороб, включаючи гіпертензію, діабет, інсулінову недостатність, ожиріння, утворення каменів і ін. [93, 212, 246]. Через те, що навіть невеликі відхилення можуть мати драматичні наслідки, концентрація іонів водню  $[H^+]$  підтримується в межах вузького діапазону за допомогою численних місцевих і центральних механізмів регуляції. Проте, старіння і супутня патологія часто зв'язані зі значними порушеннями такої регуляції, зокрема, через зниження буферної ємності [33, 223, 229].

## **1.6. Ультрафіолетове опромінення**

Ультрафіолетова (УФ) радіація широко використовується в експериментальній біології, як зручний інструмент для індукції дозо-залежних ушкоджень ДНК. Розрізняють три типи природного УФ — А, В і С, які відрізняються за довжиною хвиль, проникаючою здатністю і біологічними ефектами. Як електромагнітні хвилі, УФ радіація (10-400 нм) знаходиться поряд з іонізуючою радіацією (0,01-10 нм). Більше того, найбільш

короткохвильові УФ промені (10-100 нм) насправді мають іонізуючу здатність, що тільки підкреслює певну біологічну подібність між наслідками УФ і іонізуючого опромінення [127, 142, 164, 190].

Тривалий час саме УФ був стримуючим фактором для поширення життя на суші. Тільки після збільшення вмісту  $O_2$  в атмосфері і утворення озонового шару в іоносфері, який спричинив зменшення УФ радіації на поверхні планети, зробило освоєння суші біологічними об'єктами реальним завданням. Це підтримує ідею про ко-еволюцію атмосфери і чутливості до УФ-радіації біологічних об'єктів.

Як і при іонізуючому випромінюванні, УФ промені можуть пошкодити практично всі структури клітини. При високих дозах УФ здатний викликати масові пошкодження макромолекул, які нерідко призводять до апоптозу або некрозу клітини. Порушення геному, викликані УФ, зазвичай відновлюються за допомогою глобальної геномної репарації (global genome repair) або поєднаної із транскрипцією репарації (transcription coupled repair). На клітинному рівні частота викликаних УФ ушкоджень особливо висока в ядрі, мітохондріях і теломерах, через їхню меншу захищеність і здатність до репарації [44, 164, 197, 213]. Відповідно до існуючих рекомендацій, запобіжні заходи від передозувань УФ опромінення повинні бути прийняті з наймолодшого віку, тому що УФ-ушкодження мають здатність прогресивного нагромадження, що можуть призвести до драматичних наслідків через десятиліття, як це часто спостерігається при новоутвореннях шкіри людини. Фотостаріння і канцерогенний ефект УФ у людини в значній мірі залежать від підшкірної пігментації і, зокрема, меланіну, що синтезується меланоцитами шкіри. При цьому генетичні особливості можуть бути важливими предикторами чутливості до УФ. Показано, що ген пігментації і чутливість до меланому пов'язані з фенотипом світлого волосся. Частота раку шкіри, викликаного природною або штучної УФ-радіацією, істотно вища у людей зі світлим кольором шкіри і волосся [31, 99]. По чутливості до УФ люди можуть бути розділені на 6-7 груп: від тих, хто ніколи не засмагає (у них завжди утворюються опіки шкіри), до тих,

хто практично нечутливий до УФ (люди з темним цвітом шкіри). УФ-опромінення звичайно визначається кількістю годин, проведених на відкритому повітрі. Воно найбільш високе у працівників, зайнятих у сільському господарстві, будівництві і ін. Більшу частину УФ радіації організм людини звичайно одержує під час кількох годин опівдні і декількох тижнів літніх відпусток. Існує консенсус про те, що старіння і передозування УФ-опромінення мають причинно-наслідкові зв'язки із частотою доброякісних і злоякісних новоутворень шкіри. На жаль, незважаючи на успіхи медичної науки, фотостаріння і частота раку шкіри зростають у всьому світі з темпами, які викликають серйозну заклопотаність [50, 169].

Однією з найбільш привабливих областей застосування УФ у біологічних дослідженнях, стає використання опромінених об'єктів як тест-системи на репарацію ДНК. З огляду на те, що репарація ДНК є лімітуючим чинником для виживання багатьох опромінених УФ об'єктів, можна використати відносно доступні моделі виживання опромінених у специфічних умовах лабораторних тварин, щоб оцінити функціональний стан відповідних захисних систем [206].

Відомо, що точкові uszkodження або порушення невеликих ділянок спіралі ДНК відновлюються системою, відомої як репарація азотистих основ нуклеотидів (base excision repair, BER), тоді як великі за розмірами uszkodження подвійної спіралі відновлюються екцизійною репарацією (nucleotide excision repair, NER). При NER більше 20-30 поліпептидів кооперуються для розпізнавання місця і типу uszkodжень, їхнього видалення і заповнення ділянки ДНК, що звільнилася, новими нуклеотидами. Допущені при цьому помилки ДНК-полімерази усуваються за допомогою місматч репарації (mismatch repair, MMR), а зшивки, що утворилися, між двома спіралями розриваються між спіральною репарацією (interstrand crosslink repair). Найбільш складні для репарації uszkodження пов'язані з розривами подвійної спіралі, які відновлюються гомологічною рекомбінацією (homologous recombination), негомологічним зв'язуванням кінців розривів (nonhomologous end-joining) або іншими альтернативними репаративними системами [87, 132, 152, 186]. Крім

зазначених основних систем, існують численні більш специфічні системи репарації геному. У клітинах, що реплікуються, істотну роль у підтримці цілісності ДНК грають також захисні системи, пов'язані з білком p53 і численними контрольними точками реплікації (checkpoints) [57, 115]. Незважаючи на розмаїття систем репарацій, які відрізняються високим ступенем точності роботи і нерідко дублюють один одного, порушення ДНК і, зокрема, великі хромосомні перебудови з віком накопичуються практично у всіх клітинах і у всіх видів тварин і рослин [65, 226].

Важливими учасниками відновлення ДНК є репаративні системи, специфічно пов'язані з УФ-радіацією, зокрема, фоторепарація за участю фотолаз і глікозилаз (photorepair by the photolases and glycosylases). Існує певна специфічність відновлення УФ ушкоджень. Зокрема, NER вважається основним механізмом для видалення ушкоджень, викликаних УФ-С і УФ-В, тоді як BER в основному бере участь в усуненні порушень, що утворилися в ході вільно-радикальних модифікацій нуклеотидів після опромінення УФ-А [117, 127]. NER, BER, MMR і більшість альтернативних шляхів репарації ДНК, мабуть, були створені ще на ранніх етапах виникнення життя. Вони добре збережені в ході еволюції і мають високу гомологію від одноклітинних до людини. Хоча причини високого ступеня дубльованості альтернативних шляхів репарації ще остаточно не з'ясовані, проте, є підстави думати, що вони є залишками більш потужних репаративних систем, які існували на ранніх етапах еволюції живого, коли навколишнє середовище було набагато несприятливішим, зокрема, через високий рівень УФ радіації [271, 272, 277].

Показано, що у здорових людей репаративна здатність лінійно знижується з віком зі швидкістю приблизно 0,5-1 % у рік. Цей показник може бути істотно вищим у пацієнтів, схильних до генетичних порушень. Хоча здатність усувати ушкодження ДНК із віком знижується практично у всіх системах, проте, таке зниження відрізняється певною специфічністю і, наприклад, більш характерне для заключних етапів NER [244]. При старінні знижується як якість, так і швидкість відновних процесів. Так, більшість ушкоджень ДНК, викликані УФ в

епідермісі людини, усувалась протягом 4 діб у молодих людей і 7-14 діб у літніх пацієнтів [267].

Основаючись на цих даних одним з наших завдань було створення моделі впливу УФ на молодих і старих імаго дрозофіл. Вживаність після такого впливу визначається в основному здатністю усувати ушкодження геному і, насамперед, репарацією подвійних розривів ДНК [1, 22, 76]. Відомо, що проникаюча здатність УФ у біологічних об'єктах звичайно не перевищує декількох міліметрів [8]. Більшість наземних тварин досить добре захищені від сонячного УФ, завдяки природним покривам поверхні тіла (хутро, луска і ін.). У видів, у яких такий покрив відсутній, як наприклад, у людини, УФ опромінення, глибина проникнення може досягти базального епідермісу, становить серйозну небезпеку і є основною причиною новоутворень шкіри [263]. Клітини ж внутрішніх органів повністю захищені від прямої дії УФ [6, 63]. Тому, біологічні ефекти УФ опромінення в ссавців частіше вивчають на *in vitro* моделях. Види ж з невеликими розмірами тіла, як, наприклад, дрозофіла, практично «прозорі» для УФ. При УФ опроміненні в них всі клітини, у тому числі внутрішніх органів, пошкоджуються приблизно рівною мірою. Такі об'єкти поєднують переваги *in vitro* моделей і досліджень, проведених на цілісному організмі [25, 94]. Тому вивчення дрозофіл після УФ опромінення дозволяє одержати унікальні оцінки функціонального стану не тільки різних репаративних систем, але і їхньої взаємодії з іншими захисними і регуляторними механізмами, що визначають життєздатність на рівні цілісного організму, тобто того, що неможливо вивчити на інших моделях.

## 1.7. Тепловий шок

Концепція зниження адаптивних можливостей і здатності до виживання в несприятливих умовах при старінні не є новою [95]. Працями останніх десятиліть встановлено, що адаптація і виживання біологічних об'єктів у

стресових ситуаціях багато в чому визначається функціональними можливостями універсальної і еволюційно древньої програми — активації транскрипції і трансляції особливих стрес-білків, відомих також як шаперони. Стрес-білки вперше були виявлені в дрозофіл більше півстоліття назад [206]. З того часу дрозофіла є улюбленою моделлю для вивчення особливостей стресу, його зв'язку зі старінням і тривалістю життя, завдяки простоті утримування, легкості розмноження, добре вивченій генетиці і порівняно короткій ТЖ [252]. Види і особини з великою тривалістю життя часто демонструють підвищену здатність виживання в несприятливих умовах середовища. Тому вважається, що гени, відповідальні за розвиток стресорних реакцій, можуть мати безпосереднє відношення до довголіття. Аналіз цієї гіпотези показав, що це справедливо для більшості, але не для всіх стресорних і захисних систем, зокрема, для тих, підтримка яких пов'язана з більшими енергетичними і ресурсними витратами [256]. Основне завдання стрес-білків полягає в стабілізації структури і запобіганні денатурації білків і інших макромолекул. При стресах загальний транскрипційний апарат відключається, припиняється клітинний цикл і інші функції, що не мають прямого відношення до виживання, і починається інтенсивний синтез РНК і білків теплового шоку (HSP) [170]. Індукція генів HSP спостерігається також при старінні багатьох видів і, можливо, є відповідною реакцією на вікове нагромадження помилок у структурі білків при їхній зборці (misfolding) або через підвищену їхню денатурацію в ході функціонування. У дрозофіл на роль захисних стрес-білків з підвищеною експресією в старості і можливих предикторів довголіття претендують, як мінімум, кілька генів ТШ, зокрема, *hsp70* і *hsp22* [131, 269].

Фактор теплового шоку 1 (heat shock factor 1, HSF1) є основним регулятором інтегративної реакції на стрес. HSF1 бере участь у регуляторній відповіді на різноманітні стреси, включаючи інфекцію і запалення. Більше того, діапазон функцій HSF1 значно ширший і не обмежується стресом. Виявилось, що він контролює численні гени-мішені, які відіграють важливу роль при регуляції метаболізму, оогенезу, ембріонального розвитку, старінні і ін.

Механізм дії HSF1 ґрунтується на його здатності зв'язуватися зі спеціальними елементами ТШ, які є в промоторах багатьох генів. Перед зв'язуванням HSF1 піддається тримеризації і фосфорилюванню певних сайтів, зокрема тих, що входять у домен зв'язування із ДНК. Регуляція транскрипції за участю HSF1 є досить складним процесом, що містить у собі численні взаємодії із ДНК і білками і приводить до активації транскрипції шаперонов, убіквітину, різних ко-факторів, сигнальних молекул і ін. Деякі з HSP, зокрема, HSP90, HSP70 і HSP40 мають здатність регулювати зв'язування HSF1 з промоторними елементами генів. Така дія за принципом зворотного зв'язку забезпечує найбільш оперативне регулювання синтезу HSP [103, 257, 258].

У клітинах ссавців сімейство HSP90 є одним з найбільш широко представлених білків, які в нормальних умовах складають 1-2% загального клітинного білка і можуть збільшуватися до 4-6% в стресових умовах [200, 205]. Більш того, HSP90 взаємодіють з приблизно 2000 білками, що становить близько 10% протеома еукаріот [206].

Гени HSF1 і HSP відрізняються високим еволюційним консерватизмом і гомологією від дріжджів до людини. Різні види тварин звичайно відрізняються за числом і деяким іншим функціональними характеристиками HSF1 і HSP. У геномі дрозофіл, наприклад, є тільки один ген HSF1, що регулює синтез великих HSP83 і HSP70, а також малих HSP22, HSP23, HSP26 і HSP28 [103, 123, 158]. Важливо те, що активація HSF1 і HSP нерідко приводить до підвищення життєздатності і подовження життя лабораторних тварин [103, 257]. Аналіз експресії генів дрозофіл при старінні, тепловому шоку, гіпероксії, окисному стресі ( $H_2O_2$ ) і іонізуючому опроміненні показав, що транскрипція 18 генів була підвищена при всіх зазначених випадках. У список таких універсальних стрес-генів входили *hsp70* і *hsp83*, а також деякі білки ЕТЛ мітохондрій. Хоча старіння мало загальні активовані або інгібовані гени з усіма зазначеними стресами, найбільший збіг був виявлений при гіпероксії [141].

Крім HSF-1, експресія та посттранскрипційна модифікації HSP90 регулюються іншими механізмами, зокрема, ко-шаперонами. HSP90 приймає

активну участь в дозріванні ключових регуляторних білків, транскрипційних факторів, регуляторних кіназ, рецепторів гормонів та ін. [203, 245].

### 1.8 Пригнічення експресії HIF-1 $\alpha$ в умовах гіперкапнії

Індуцибельні фактори гіпоксії (HIF) є активаторами транскрипції, які вважаються головними регуляторами (master regulators) кисневого гомеостату у всіх видів багатоклітинних організмів [Semenza, 2012]. HIF-1 є найбільш відомим з численних представників сімейства HIF і складається з двох субодиниць — HIF-1 $\alpha$  і HIF-1 $\beta$ . В нормальних умовах HIF-1 $\beta$  присутній в надлишку, тому рівень HIF-1 $\alpha$  визначає функціональну активність HIF-1 в цілому. Обидві субодиниці містять домени типу helix-loop-helix, які дозволяють після гетеродимеризації приєднуватися до ДНК великої групи генів і змінювати інтенсивність їх транскрипції. [115, 147].

В умовах гіпоксії HIF-1 виконує роль основного перемикача метаболізму з окислювального фосфорилування на гліколіз шляхом інгібування перетворення пірувата в ацетил-коензим А і посилення перетворення пірувата в лактат за допомогою регуляції відповідно піруват-дегідрогенази і лактат-дегідрогенази. У відповідь на гіпоксію транскрипція багатьох сотень генів зростає за HIF-залежним механізмом. При цьому спостерігається одночасне зниження рівня транскрипції сотень інших генів також по HIF-залежного механізму, але без прямого приєднання HIF-1 до промоторів відповідних генів.

Показово, що гіперкапнія також викликає співмірні з гіпоксією глобальні зміни експресії генів [247]. Так, у модельних організмів *C.elegans* експозиція в атмосфері з 19% CO<sub>2</sub> протягом 3 днів викликала більш ніж дворазове посилення експресії 771 гена і більш ніж дворазове ослаблення експресії у 657 генів. При цьому утримання у такому середовищі протягом усього життя викликало подовження життя майже на 50% [151].

## 1.9 Робота білків роз'єднання окислення і фосфорилування

Мітохондрії є спеціалізованими субклітинними органелами, основна функція яких полягає в об'єднанні окислення біохімічних субстратів з синтезом АТФ. Цей процес здійснюється, зокрема, за допомогою перекачування протонів в міжмембранний простір мітохондрій. Протонний градієнт, що виникає в ході цього перекачування, потребує постійної регуляції, оскільки частина протонів повертається назад за рахунок спонтанного або фізіологічно керованого витоку.

Фізіологічна регуляція витоку протонів, яка в залежності від типу тканини коливається в межах 20-70%, здійснюється в основному за допомогою сімейства білків роз'єднання окислення і фосфорилування (UCP-1, UCP-2, UCP-3 і ін.) [232]. З них UCP-2 є найбільш поширеним і багатофункціональним. Так, якщо UCP-1 і UCP-3 діють в основному в клітинах бурого жиру і гладких м'язах, відповідно, то UCP-2 більш універсальний і експресується в багатьох органах, включаючи мозок, серце, печінку, нирки, скелетні м'язи і ін. [232, 279]. Широкий тканинний розподіл і важлива роль UCP-2 в генерації енергії підкреслює його значимість у різних фізіологічних і патофізіологічних процесах, включаючи інсулінорезистентність, цукровий діабет, нейродегенеративні та серцево-судинні захворювання, рак і ін. [214].

## РОЗДІЛ 2.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Об'єкти дослідження

Дослідження проведені на молодих і старих мишай ліній C57Bl/6 і CBA, а також на самках і самцях *Drosophila melanogaster* аутбредної лабораторної лінії *Oregon-R* дикого типу.

Всі експерименти на тваринах було виконано з дотриманням загальних принципів біоетики у відповідності до Хельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964), Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації по біоетиці та правах людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятою у 1997 році у м. Ов'єдо (Іспанія) та підписаною Верховною Радою України у 2002 році, Закону України № 3447 ІV «Про захист тварин від жорстокого поводження». Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

Молоді (3-4 місяця), дорослі (8-12 місяців) і старі (24-26 місяців) миші ліній C57Bl/6 або CBA утримувались в стандартних умовах віварію ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України» згідно зі «Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)» при фіксованому світловому режимі 12:12 год з вільним доступом до води та їжі *ad libitum*. Загалом у роботі використано 312 мишей.

Культура дрозофіл лінії *Oregon-R* підтримувалась в лабораторії фізіології ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України» протягом

багатьох років. У роботі використані дрозофіли різного віку, починаючи з ембріонального розвитку до старих імаго. Їх розведення і утримування здійснювали відповідно до стандартної методики. Дрозофіл розмножували і доводили до старості в 1-літрових банках у спеціальній кімнаті при температурі  $(25 \pm 0,3)$  °C і постійній вологості. Кімната інкубації обладнана пристроєм, що автоматично забезпечує 12-годинний режим освітлення (12 год світла — 12 год темряви). При таких умовах цикл розвитку дрозофіли від яйця до імаго триває приблизно 10 діб, з них на ембріональний розвиток яйця становить 20 годин, а розвиток личинки і лялечки — по 4 доби.

*Поживне середовище* для імаго складається з 50 г цукру, 120 г дріжджів, 17 г агар-агару, 10 мл 10 % ніпагіну і 5 мл пропіонової кислоти на 1 л кінцевого об'єму. На відміну від імаго, які майже повністю складаються з постреплікративних клітин, личинки дрозофіл інтенсивно набирають масу за рахунок синтезу білків і утворення нових клітин. Тому, з огляду на підвищені потреби в білку, у поживному середовищі, призначеному для розмноження, вміст дріжджів був збільшений до 200 г/л. Крім того, було зменшено вміст агар-агару до 14 г/л.

Для маніпуляцій дрозофіл наркотизували діетиловим ефіром. В експерименті дрозофіл розсаджували в скляні пробірки (70 мм x 13 мм) зі зйомною годівницею на 1 мл поживного середовища. Можливу геропротекторну дію випробуваних факторів оцінювали за допомогою порівняння вікової динаміки виживаності контрольних і піддослідних тварин. Визначали також показники середньої ТЖ (СТЖ) і максимальної ТЖ (МТЖ).

## **2.2. Штучна атмосфера**

*Штучну атмосферу* (ША) для дрозофіл створювали за допомогою шприців об'ємом 100 мл, у які ставили пробірку з дрозофілами й через отвір для голки вносили необхідну кількість газів —  $N_2$ , He, Ar. Підрахунок особин, що вижили, а також зміну поживного середовища і ША здійснювали через день.

*Гострі експозиції ГГС.* 70 молодих мишей лінії СВА, 70 молодих та 70 старих С57В1/6 (по 10 тварин в кожній віковій групі) 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  $\text{CO}_2$  до 7-9 % і пропорційного зменшення вмісту  $\text{O}_2$ . Проби повітря для вимірювання  $\text{CO}_2$  і  $\text{O}_2$  відбиралися через кожні 30 хв. В той же час реєстрували кількість рухомих та сплячих мишей. ТПТ вимірювали відразу після завершення 3-х годинної експозиції ГГС.

*Хронічний вплив ГГС.* Були проведені дві незалежні серії дослідів по хронічній експозиції в ГГС. У першій серії були вивчені тільки неінвазивні параметри у молодих, дорослих і старих мишей С57В1/6 (по 10 тварин в кожній віковій групі) 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, поміщених в прозорі пластикові кювети з кришками. Отвори для обміну повітря кювет регулювали, щоб  $\text{P}_{\text{O}_2}$  і  $\text{P}_{\text{CO}_2}$  підтримувалися на рівні  $10 \pm 2$  %. Вміст  $\text{O}_2$  і  $\text{CO}_2$  в повітрі регулярно контролювали за допомогою газоаналізатору (*Gerb. Minnhardt*, Нідерланди). Клітки чистили через день одночасно із заміною їжі і води (*ad libitum*), а також зважування мишей на електронних вагах. Контрольні тварини піддавалися таким же процедурам, але вони утримувались у відкритих кюветах.

### **2.3. Швидкість газообміну**

У піддослідних тварин визначали швидкість продукції  $\text{CO}_2$  ( $V_{\text{CO}_2}$ ,  $\text{мкл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{год}^{-1}$ ) і споживання  $\text{O}_2$  ( $V_{\text{O}_2}$ ,  $\text{мкл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{год}^{-1}$ ) за допомогою вимірювальних блоків газоаналізатора *Gerb. Minnhardt* (Нідерланди).

*Дрозофіли.* Вимірювання складу повітря відбувалось кожену добу в один і той же час шляхом відбору зразку газу зі 100 мл шприців, куди були вміщені пробірки з дрозофілами.

*Миші.* В гострих експериментах кожні 30 хвилин з банки відбирали 20 мл повітря. Ціна поділу шкали приладів становить: до 2 % — 0,1 % досліджуваного газу, більше 2 % — 0,2 %. Погрішність приладу — 0,2 і 0,4 % відповідно.

В хронічних експериментах різницю вмісту  $O_2$  чи  $CO_2$  до і після закривання кювет на 1 годину використовували для розрахунку  $V_{O_2}$  и  $V_{CO_2}$  (в  $мл \cdot г^{-1} \cdot год^{-1}$ ). Витоком газів з кювет нехтували, оскільки його показання були менші, ніж 0,01%/годину.

#### **2.4. Спонтанна рухова активність**

У *дрозофіл* спонтанну рухову активність оцінювали після серійного 10-кратного фотографування з витримкою 1,3 с. Імаго за такої витримки залишають на фотографії характерний змазаний 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.

У *мишей* СРА оцінювали 3-4 рази візуально, розділивши їх на три категорії — сплячі, не сплячі, і ті, що рухаються.

#### **2.5. Споживання їжі та води**

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.

## 2.6. Температура ядра і поверхні тіла мишей

Температуру ядра тіла вимірювали ректально за допомогою термометра з напівпровідниковим датчиком, що був вмонтований у гнучкий пластиковий шланг діаметром близько 2 мм. Однак, через травматичність цього методу в наступних дослідах використовували метод дистанційного вимірювання ТПТ за допомогою термометра 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.

## 2.7. Модель діабету I типу

Стрептозотоцинова модель діабету I типу була ініційована 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 вимірювали глюкометром (ACON, США) в крові, отриманій з кінчика хвоста один раз на тиждень. Контрольних мишей утримували в повітрі, а піддослідні миші знаходились у ГГС в період денного сну (з 8 до 16 годин). Вміст глюкози у кожної тварини до початку експериментів приймався за 100 %.

## 2.8. Аналіз експресії генів

Експресію генів аналізували згідно загальновідомої процедури кількісної полімеразної ланцюгової реакції (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR). Тотальну РНК екстрагували із зразків тканини з використанням набору для екстракції РНК Рібозол-А. РНК піддавали зворотній транскрипції в кДНК з використанням RT-набору Reverta-L-100 відповідно до інструкцій виробника

(AmpliSens, Росія). Кінцевий препарат тотальної РНК не містив ДНК і білків, мав відношення 260/280 нм і знаходився в межах 1,8-1,9. Праймери для ПЛР для всіх аналізованих генів були синтезовані Metabion International AG (Німеччина). Список нуклеотидних послідовностей для прямих (F) і зворотних (R) праймерів досліджених генів наведені нижче. У всіх qPCR експериментах гліцералальдегід 3-фосфат (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) використовувався в якості контрольного гена.

Нуклеотидна послідовність праймерів:

GAPDH F:	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'
GAPDH R:	5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'
UCP2 F:	5'-ATGGTTGGTTTCAAGGCCACA-3'
UCP2 R:	5'-CGGTATCCAGAGGGAAAGTGAT-3'
HSP90aa1 F:	5'-TGTTGCGGТАCTACACATCTGC-3'
HSP90aa1 R:	5'-GTCCTTGGTCTCACCTGTGATA-3'

Ампліфікацію ПЛР в реальному часі проводили з використанням системи Chromo4 (Bio-Rad, США). Реакційна суміш містила 5,5 мкл розведеної кДНК, по 10 пм кожного праймера, 10 мкл 2,5X SYBR Green мастер-сумішей із загальним об'ємом 25 мкл. ПЛР проводили при 95 °C протягом 5 хв, потім 40 циклів при 95 °C протягом 15 с, при 60 °C протягом 20 с і 72 °C протягом 20 с.

Специфічність продуктів RT-PCR була підтверджена шляхом перевірки кривих плавлення продукту. Було визначено граничний цикл (Ct) кожного продукту. Для розрахунку процентної зміни в порівнянні з контрольною GAPDH групою був використаний метод  $\Delta\Delta$  Ct.

Біохімічні та ПЛР аналізи проводилися за участю співробітників лабораторії ендокринології ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України» (зав. лабораторією к.б.н. Т. Дубілей і н.с. Т. Тушинської).

## **2.9. Глюкозотолерантний тест**

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

## **2.10. 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 (Filicit Diagnostics, Україна).

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

## **2.11. Аналіз лактату мозку**

Лактат 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 13000 ×g протягом 10 хвилин. Рівні лактату в надосадовій рідині визначали за допомогою набору (Corma, Польща), відповідно до рекомендацій виробника. Результати були скориговані на вміст білка (ПрАТ «Реагент», Україна).

## 2.12. Швидкість загоєння ран

Оцінку швидкості загоєння ран проводили відповідно до загальноприйнятої методики Yanai [268]. 12 молодих мишей лінії СВА наркотизували за допомогою внутрішньоочеревинного введення гексобарбіталу (70 мг/кг), після чого на поверхні поголеного черепа мишей в районі тім'яної кістки на повну товщину шкіри створювали рану з використанням 8-мм трепана (*Skin Punch Biopsy*). Процес загоєння ран після операції фіксували цифровим фотоапаратом (Cannon IXU, 4 M). Для фотографування мишу розміщували на білому фоні під безтіньовою лампою. Були зроблені два типи знімків: знімки крупним планом для ретельної візуальної оцінки рани/рубця; фотографії, зроблені з відстані 25 см, коли лінійка розташована поруч із раною (для вимірювання площі рани). Морфометричний аналіз закриття рани проводився як подвійне сліпе дослідження. Кількісну оцінку області рани проводили за допомогою програмного забезпечення NIH Image v1.43. з відкритим кодом. Масштаб встановлювали окремо для кожного зображення, відповідно до лінійки, за допомогою інструменту ImageJ straight.

## 2.13. Активність супероксиддисмутази

Активність супероксиддисмутази (СОД, ЄС 1.15. 1.1) у гомогенатах дрозофіл визначали за методом McCord & Fridovich [173]. Інкубаційна суміш містила 50 мкл ксантину, цитохром С і 100 мкл 1 % гомогенату дрозофіл. Реакцію запускали додаванням 20 мкл ксантин оксидази. Оптичну щільність вимірювали на довжині хвилі 550 нм на спектрофотометрі  $\mu$ -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 (ум.од. $\cdot$ хв<sup>-1</sup> $\cdot$ мг<sup>-1</sup>). За умовну одиницю СОД приймали активність, що інгібувала відновлення цитохрому С на 50 %.

## 2.14. Активність каталази

Активність каталази (ЄС 1.11. 1.6) визначали за методом Аєбі [34]. Інкубаційна суміш містила 0,1 мл 0,03% перекису водню і 10 мкл 1 % гомогенату дрозофіл. Активність каталази оцінювали за швидкістю утилізації перекису водню, експонентне зниження концентрації якої спостерігали на довжині хвилі 240 нм на спектрофотометрі  $\mu$ -Quant MQX-200 (Biotech, США). Активність каталази виражали в мкмоль утилізованого  $H_2O_2$  на 1 мг маси тіла і 1 хв (мкмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup>).

## 2.15. 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).

## 2.16. Стрес-тести

Про функціональний стан дрозофіл судили за результатами батареї стрес-тестів, що включала наступні випробування: тепловий шок, ультрафіолетовий стрес, аліментарну депривацію.

### 2.16.1. Тепловий шок

Під час проведення цього тесту дрозофіли перебували в конвекційному повітряному термостаті за температури  $38 \pm 0,2$  °С. Температуру контролювали

за допомогою електричного термометру з напівпровідниковим датчиком (Nihon Kohden, Японія). Оскільки стійкість до теплового шоку (ТШ) відрізняється у різних субпопуляціях, а вибір оптимальної експозиції є критичним параметром при такому тесті, то перед основною серією дослідів проводили випробування для встановлення оптимальної тривалості ТШ, яка зазвичай становила 25-30 хвилин. Вживаність оцінювали через 24 години після стресу.

### *2.16.2. Ультрафіолетовий стрес*

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

Для визначення вживаності опромінених УФ молодих і старих імаго дрозофіл, які утримувалися у пре- і пострадіаційні періоди в модифікованих атмосферах використовували молодих (5-15 діб) і старих (50-60 діб) імаго дрозофіл. Протягом тижня до опромінення і відразу після 50-хвилинного УФ опромінення (256 нм, 50 W) їх утримували в гіпероксичній, гіпоксичній, або гіперкапнічній атмосферах різної сили. Для приготування таких атмосфер змішували з повітрям 20 % і 50 % по об'єму He, Ar, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> або 10 % CO<sub>2</sub>.

В експериментах по з'ясуванню стійкості дрозофіл, що утримуються в штучних атмосферах, до УФ-опромінення, вивчалася динаміка виживання молодих імаго дрозофіл після 40-хвилинного опромінення УФ (256 нм, 50 W). Відразу після УФ опромінення у кварцових кюветах, комах поміщали в скляні пробірки з поживним середовищем і переносили в 100 мл шприці, у яких створювали гіпоксичну, гіпероксичну або гіперкапнічну атмосфери. Гіпоксію моделювали додаванням до повітря рівного об'єму N<sub>2</sub>, He, Ar або H<sub>2</sub>. У дослідах з гіпероксією пробірки з опроміненими імаго вміщували у шприці, заповнені рівним об'ємом повітря і O<sub>2</sub>, що відповідало приблизно 60 % O<sub>2</sub> в атмосфері. Для гіперкапнії створювали атмосферу додаванням 10% CO<sub>2</sub>.

### 2.16.3. Аліментарна депривація

Голодовий стрес створювали повним обмеженням їжі і частковим обмеженням  $O_2$  на 50 % і 80 %. Молодих (10-15 діб) імаго дрозофіл утримували протягом 7 діб у шприцах з різними концентраціями шести газів —  $N_2$ , He, Ar,  $H_2$ ,  $O_2$  і  $CO_2$ . Всі гази, крім  $CO_2$ , додавалися у двох концентраціях — 50 % і 80 % від загального об'єму. У випадку  $N_2$ , He, Ar,  $H_2$  така процедура приводила до зниження вмісту  $pO_2$  приблизно до 10 % і 5 %  $CO_2$ . При додаванні аналогічних кількостей  $O_2$  до повітря гіпероксія відповідала 60 % і 85 %  $pO_2$ . Для створення гіперкапнічної атмосфери додавали  $CO_2$  з розрахунку 5 % і 15 %.

Контрольні особини піддавалися аналогічним маніпуляціям, але утримувалися в шприцах з повітрям. Після 7 діб адаптації у піддослідних мух видаляли годівниці з поживним середовищем і продовжували утримувати в зазначених атмосферах, але без їжі. Всі випробування проводилися паралельно на імаго, узятих з однієї маткової популяції, які утримувалися в тому самому термостаті. Кількість особин у дослідах становила приблизно 60 на одну групу.

## 2.17. Методи статистичної обробки результатів

Статистичну обробку даних, побудова 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 и непараметричного рангового коефіцієнта Спірмана. Ступінь залежності між змінними оцінювали за допомогою параметричних і непараметричних методів кореляційного і регресійного аналізу [9]. Крім парної лінійної кореляції і регресії були використані методи багатомірної і нелінійної статистики.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 3.1. Інтенсивність окисних процесів і тривалість життя

Зворотна залежність між рівнем метаболізму і ТЖ, вперше показана проф. Берлінського університету Максом Рубнером в 1907 році, дотепер залишається популярною геронтологічною парадигмою. Більше того, ця концепція сумісна і може бути розглянута як більше загальний варіант багатьох відомих гіпотез старіння, зокрема, гіпотези зношування, нагромадження клітинного сміття, мутацій, генерації вільних радикалів і інших. Універсальність і пластичність закону Рубнера була неодноразово доведена на різноманітних філогенетичних і онтогенетичних моделях. Ще в 1917 році Леб і Нортроп показали, що уповільнення обмінних процесів за допомогою зниження температура інкубації є потужним чинником довголіття у дрозофіл [161]. З тих пір це відкриття було неодноразово підтверджене в багатьох лабораторіях світу на різних пойкилотермних та гомойотермних об'єктах.

В наших дослідах ТЖ дрозофіл, інкубованих у діапазоні температур, характерних для природних умов їхнього перебування (15 – 30 °С), змінювалася приблизно в чотири рази (рис. 3.1).

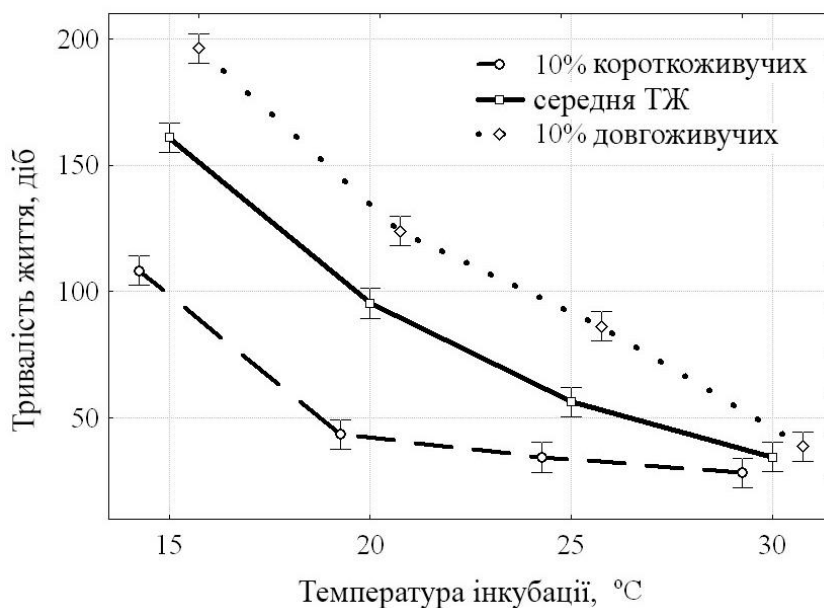


Рис. 3.1. Тривалість життя імаго дрозофіл, інкубованих при різних температурах.

Зміни ТЖ супроводжувалися такими ж по величині, але протилежно спрямованими змінами швидкості споживання  $O_2$  або продукції  $CO_2$  (рис. 3.2).

Старі імаго мали нижчий рівень обміну при всіх температурах, у порівнянні з молодими особинами, і вплив фактору віку відрізнявся високою вірогідністю як для  $Vo_2$  ( $P < 0,003$ ), так і  $Vco_2$  ( $P < 0,002$ ). Однак вірогідність внеску фактору температури набагато перевищувала ці величини ( $P < 10^{-30}$ ) (рис. 3.2).

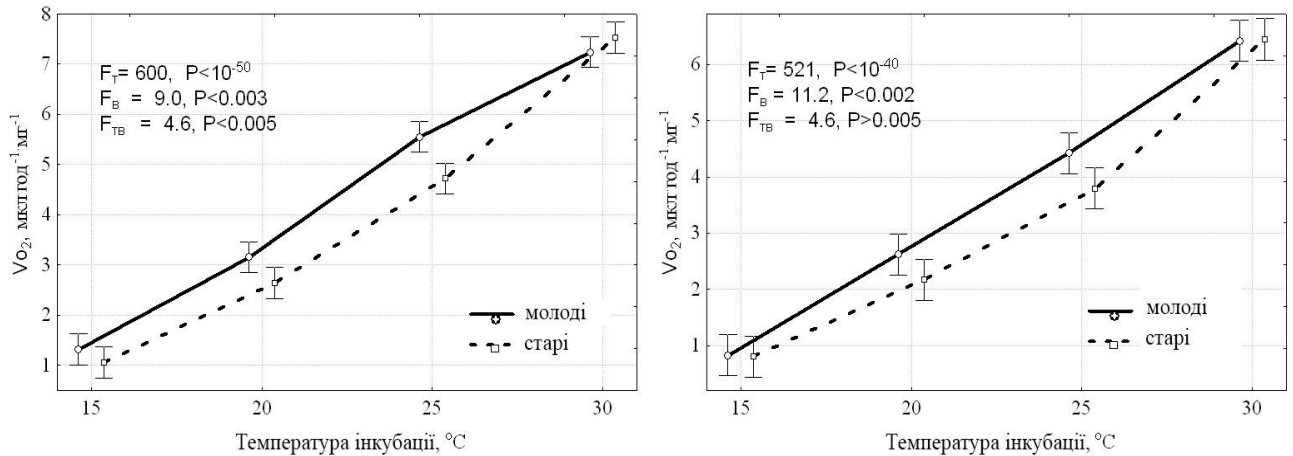


Рис. 3.2. Швидкість споживання  $O_2$  ( $Vo_2$ ) і продукції  $CO_2$  ( $Vco_2$ ) у молодих і старих дрозофіл, інкубованих при різних температурах. Вірогідність впливу факторів температури ( $F_T$ ), віку ( $F_B$ ) і їхньої спільної дії ( $F_{TB}$ ) оцінювали за допомогою двофакторного ANOVA.

Представлені на рис. 3.2 дані про вплив температури на метаболізм частково могли бути обумовлені дуже достовірним ростом CPA (рис. 3.3).

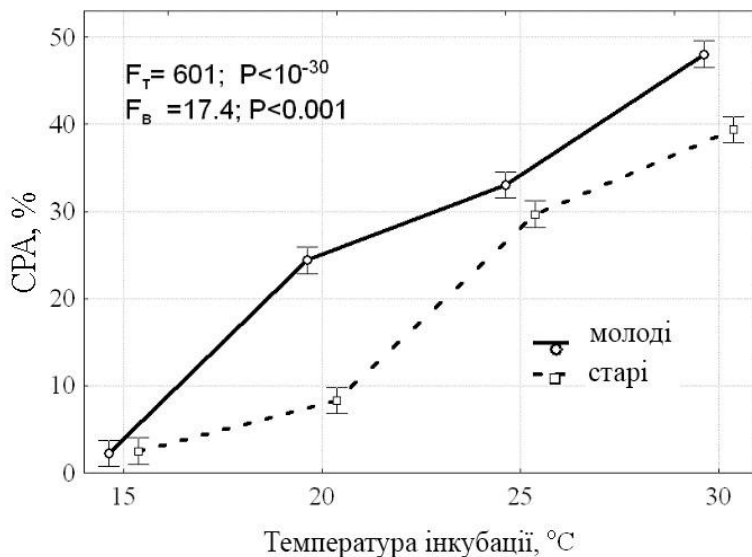


Рис. 3.3. Спонтанна рухова активність (CPA) у молодих і старих дрозофіл, інкубованих при різних температурах.

Як показано на рисунку 3.3 в діапазоні температур від 15 до 30 °С рухова активність дрозофіл змінювалась приблизно у 20 разів і відрізнялася високо достовірними F-критеріями віку ( $P < 0,001$ ) і температури ( $P < 10^{-30}$ ).

Отримані дані свідчать про те, що на онтогенетичних моделях, які дозволяють у досить широкому діапазоні варіювати рівнем обмінних процесів, як це має місце при інкубації холонокровних при різних температурах, чітко проявляється негативна корелятивна залежність між рівнем метаболізму і ТЖ.

### 3.1.1. Філогенетичні детермінанти довголіття

Порівняльно-фізіологічний аналіз залежності довголіття від інтенсивності обмінних процесів являє собою привабливу модель для вивчення факторів, що детермінують ТЖ. Адже масштабність змін довголіття, які відбулися в ході еволюційного розвитку, немислима в лабораторних умовах. З існування екстраординарно високої вірогідності коефіцієнту кореляції між МТЖ і рівнем метаболізму видно, що тренди метаболізму і довголіття, мабуть, були певним чином скоординованими (рис. 3.4).

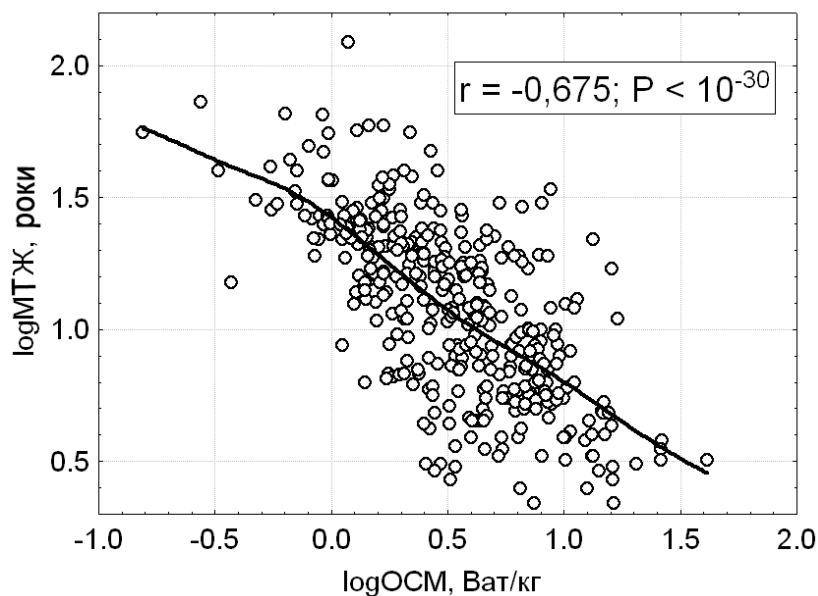


Рис. 3.4. Відносна швидкість метаболізму (ВШМ) і максимальна тривалість життя (МТЖ) у ссавців. Вірогідність кореляції оцінювали за допомогою непараметричного рангового коефіцієнта Спірмана.

### 3.1.2. Кислотно-лужна рівновага і тривалість життя ссавців

При аналізі наявних даних про якісні і кількісні характеристики корелятивного зв'язку між показниками кислотно-лужної рівноваги і МТЖ у ссавців встановлено, що взаємозв'язок між МТЖ,  $[H^+]$  і  $[HCO_3^-]$  може бути далеким від простої лінійності. Дані для різних видів були зібрані в ході аналізу тисячі публікацій, наведених у базі PubMed.

З представленого на рис. 3.5 тривимірного графіку слідує, що види з найбільшою тривалістю життя відрізняються одночасно високим рівнем  $[H^+]$  і  $[HCO_3^-]$  у крові. Поверхня відгуку МТЖ досягає найбільшої висоти в далекому куті, де обидва показники АВВ  $[H^+]$  і  $[HCO_3^-]$  максимальні. При цьому МТЖ мінімальна у видів, у яких високі значення  $[H^+]$  поєднуються з низькими величинами  $[HCO_3^-]$  (рис. 3.5).

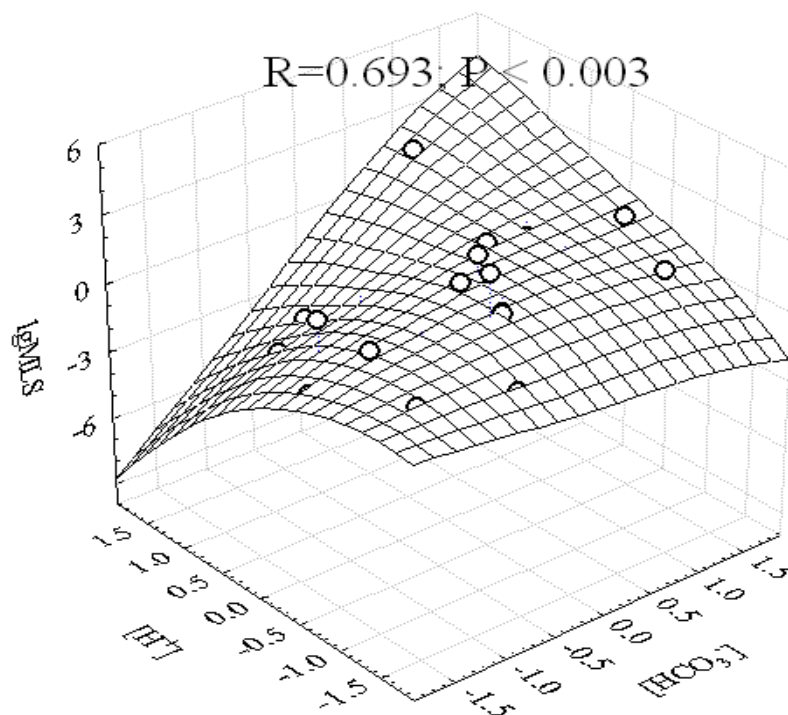


Рис. 3.5. Тривимірна залежність між максимальною тривалістю життя (МТЖ) і концентраціями  $[HCO_3^-]$  і  $[H^+]$  у крові ссавців.

З коефіцієнта множинної кореляції ( $R=0,692$ ;  $P < 0,003$ ) слідує, що  $[H^+]$  і  $[HCO_3^-]$  разом детермінують приблизно  $\frac{1}{2}$  варіації МТЖ ссавців.

Щоб уникнути негативних наслідків порушення АВВ важливо забезпечити надійність підтримки АВВ у вузьких межах коливань, тобто мати більшу буферну ємність. На жаль, даних про буферну ємність у ссавців різних видів знайти не вдалося, тому в цій роботі стабільність роботи АВВ оцінювали за допомогою коефіцієнта варіації рН (CVpH) крові, вважаючи, що, чим стабільніша підтримка АВВ, тим менше CVpH. Виявлена високо достовірна негативна кореляція між CVpH і МТЖ ссавців ( $r = -0,670$ ;  $P < 0,00007$ ) (Рис. 3.6).

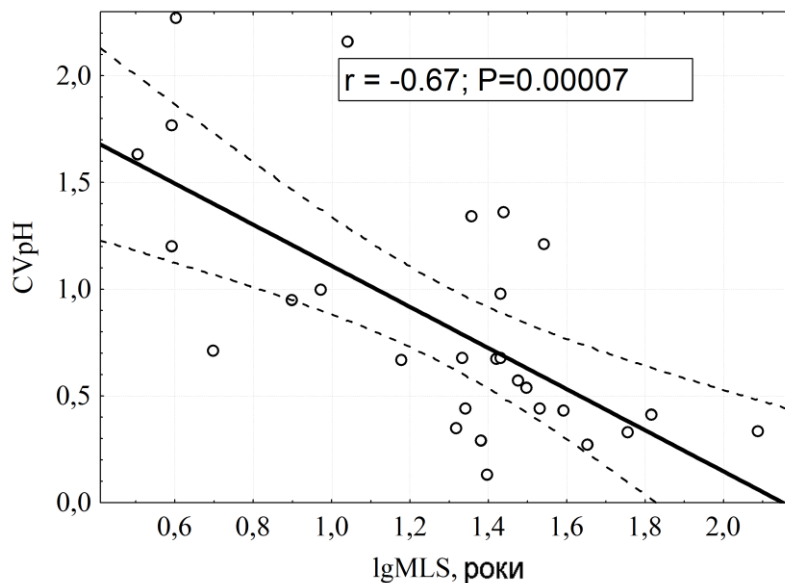


Рис. 3.6. Кореляція між коефіцієнтом варіації рН крові (CVpH) і максимальною тривалістю життя (МТЖ) у ссавців.

Ідея про те, що види з великою тривалістю життя повинні мати більш стабільні гомеостатичні системи, не нова і обговорювалася багатьма. Однак такі обговорення, як правило, носили концептуальний характер і не були підтримані відповідним кількісним матеріалом. Як нам відомо, кореляція CVpH із МТЖ у ссавців є одними з перших кількісних доказів існування зв'язку між довголіттям і гомеостатичною стабільністю. Привертає увагу і те, що CVpH може бути своєрідною сполучною ланкою між МТЖ, інтенсивністю метаболізму і масою тіла. Важливо те, що CVpH демонструє високо достовірні кореляції одночасно із МТЖ ( $r = -0,670$ ;  $P < 0,00007$ ), рівнем метаболізму ( $r = 0,692$ ;  $P < 0,001$ ) і масою тіла ( $r = -0,689$ ;  $P < 0,00004$ ). При цьому кореляція із МТЖ і масою тіла негативна, а з метаболізмом позитивна. Негативну кореляцію з масою тіла, імовірно, можна пояснити тим, що, чим більша маса тіла, тим легше перерозподіляються електроліти по різних органах у випадку

виникнення змін АВВ. Що стосується позитивної кореляції між CVp і інтенсивністю метаболізму, те це може бути пов'язане із труднощами підтримки стабільності рН при високих швидкостях метаболічних перетворень.

Результати порівняльно-фізіологічних досліджень, свідчать про те, що особливості старіння і довголіття в значній мірі визначені основними морфофізіологічними параметрами організму (gross morpho-physiological indices), зокрема, інтенсивністю метаболізму, температурою тіла і надійністю функціонування кислотно-лужного гомеостату [75, 145]. Інтенсивність метаболізму займає особливе положення в цьому списку, оскільки її зниження приводить до істотного подовження життя не тільки на філогенетичних, але і онтогенетичних моделях [40, 176]. У зв'язку з цим пошук неінвазивних шляхів зниження енергетичних витрат набуває особливої значимості.

У наступному підрозділі закономірності, виявлені на філогенетичних моделях, будуть перевірені на онтогенетичних моделях, зокрема, в експериментах на мишах ліній C57Bl і CBA, а також дрозофілах лінії Oregon-R. Крім того, будуть розглянуті перспективні підходи для зниження рівня метаболізму в експерименті.

Основні наукові результати даного розділу опубліковані в працях [10].

### **3.2. Вплив гіпоксії і гіперкапнії на інтенсивність газообміну і температуру тіла у молодих і старих самців лінії CBA**

Інтенсивність метаболізму займає особливе положення в списку основних детермінант довголіття, оскільки її зниження приводить до істотного подовження життя не тільки на філогенетичних, але і онтогенетичних моделях [40, 175]. Прикладом цього можуть служити дані про екстремальне довголіття таких видів, як *Arctica islandica*, горбатий кит, гігантська морська черепаха, голий землекоп і ін. Всі перераховані види тварин об'єднані підвищеним  $P_{CO_2}$  і зниженим  $P_{O_2}$  у їхньому природному середовищі існування, що може бути

ефективним засобом уповільнення інтенсивності метаболічних процесів, подовження життя і зниження частоти вікової патології [43, 138].

У зв'язку з цим пошук неінвазивних шляхів зниження енергетичних витрат отримує особливу значимість, оскільки всі процеси життєдіяльності організму енергозалежні, а, отже, управління генерацією енергії може стати ключем для цілеспрямованих змін практично всіх біологічних процесів [104, 107, 173]. Слід зазначити, що існують різні способи створення штучної атмосфери, однак нами перевага була віддана гіперкапічно-гіпоксичному середовищу (ГГС), аналогічному середовищу існування голого землекопа *Heterocephalus glaber* [119, 155, 182]. Суть такої моделі ГГС полягає в тому, що досліджувані біологічні об'єкти поміщають у ємність з обмеженою вентиляцією. В результаті газообміну організму із середовищем вміст  $O_2$  у повітрі поступово знижується, а вміст  $CO_2$  росте до настання рівноваги, тобто до моменту, коли кількість газів, які дифундували у навколишнє середовище, стає рівною кількості газів, виділених тваринами. Величину гіперкапнії і гіпоксії в камері можна підтримувати в заданих межах простою зміною розміру вентиляційного отвору. Таким чином атмосфера стабілізується на необхідному рівні гіперкапнії і гіпоксії. Важливою перевагою моделі є те, що гіперкапнію і гіпоксію створюють самі експериментальні тварини без використання складних технічних пристосувань. Гіперкапнія і гіпоксія при цьому розвиваються пропорційно і поступово, без небезпечних для біологічних об'єктів різких техногенних втручань і змін. Модель дозволяє легко замінити пропорційні зміни  $O_2$  і  $CO_2$  на непропорційні шляхом додавання  $O_2$  і  $CO_2$  або інших газів на початку або на будь-якому іншому етапі експерименту. Така модель ГГС проста, надійна та природня. Метою цього підрозділу стало вивчення метаболічних змін у мишей різного віку, статі і лінії при їхньому утримуванні в ГГС. Були використані молоді (3-4 міс) і старі (23-24 міс) самці лінії СВА.

Перш ніж перейти до вивчення впливу ГГС на інтенсивність обмінних процесів і життєздатність, вважали за необхідне мінімізувати можливий внесок чинників «шуму», зокрема вікових відмінностей добових коливань

інтенсивності метаболічних процесів [62, 82, 116, 243]. Для цього з'ясували вікові відмінності циркадних ритмів  $V_{O_2}$  і  $V_{CO_2}$  і підбрали період постановки експериментів, коли добові зміни обмінних процесів були мінімальними (рис. 3.7).

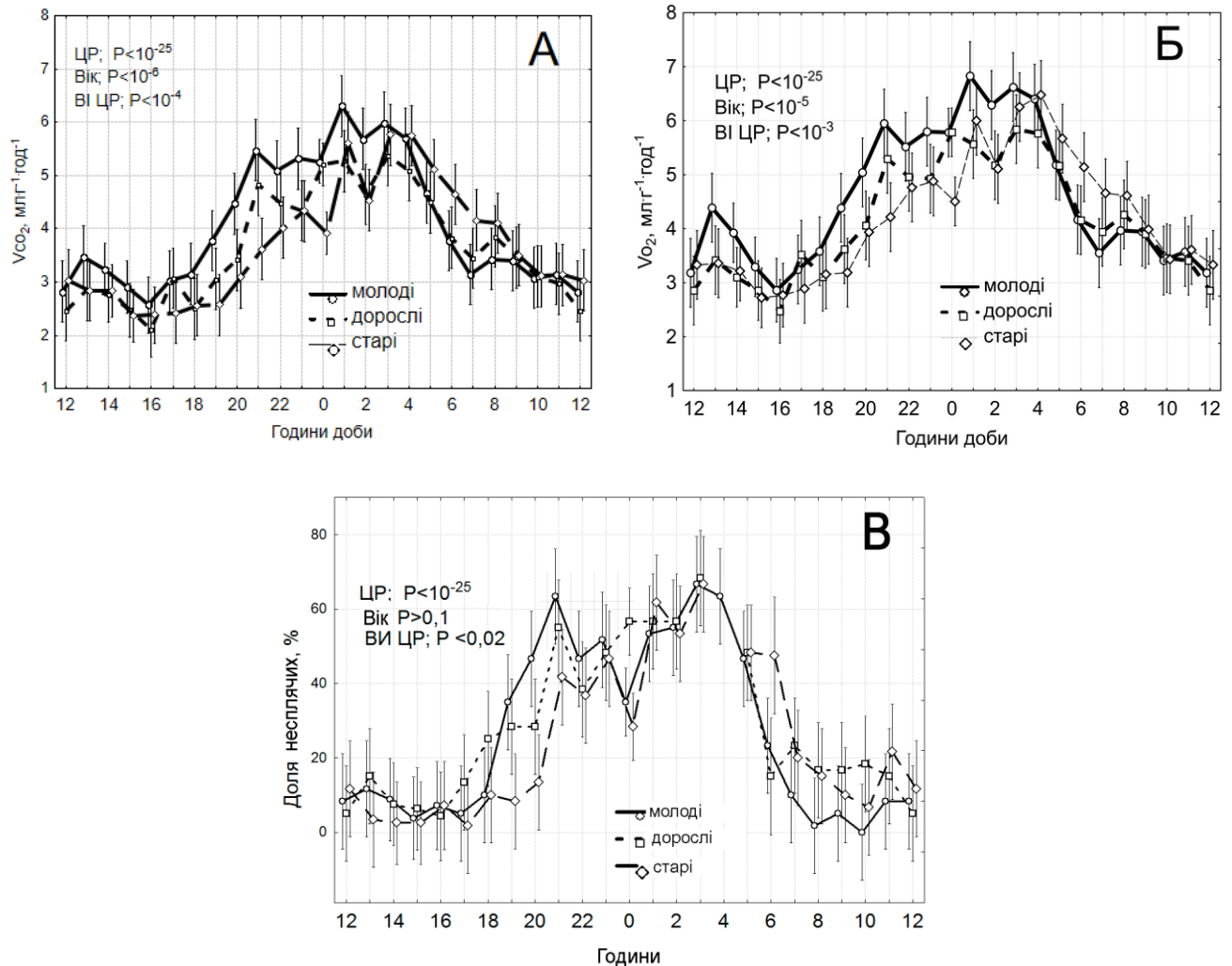


Рис. 3.7. Відмінності  $V_{CO_2}$  (А),  $V_{O_2}$  (Б), та активності (В) у різні години доби у молодих, дорослих і старих самців мишей лінії СВА.

Як видно з наведених даних, мінімальні добові коливання і вікові відмінності  $V_{O_2}$  і  $V_{CO_2}$  відповідали періоду між 12-17 годинами (рис. 3.7 а і б). Примітно, що цей період також відповідає мінімальному числу активних особин всіх трьох вікових груп (рис. 3.7 в). Тому, всі наступні експерименти з вивченням впливу ША були проведені тільки в цьому проміжку часу.

Основні наукові результати даного розділу опубліковані в працях [1, 3, 5, 18].

### 3.2.1. Контроль

Контрольними в цій серії дослідів вважалися миші, яких поміщали в банки з повітрям без додавання інших газів.

*Газообмін.* Дані про залежність середніх величин, коефіцієнтів варіації, скошеності продукції CO<sub>2</sub> (V<sub>CO<sub>2</sub></sub>) і споживання O<sub>2</sub> (V<sub>O<sub>2</sub></sub>) від тривалості експозиції мишей в умовах ГГС представлені в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

#### Вплив тривалості експозиції (хв) на V<sub>CO<sub>2</sub></sub> (мл·г<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>) і V<sub>O<sub>2</sub></sub> (мл·г<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>) у молодих і старих контрольних самців мишей лінії СВА

Показник	Вік	Час, хв	N	$\bar{x} \pm SE$	KB $\pm SE$	СК $\pm SE$
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	молоді	0-30	10	4,72 $\pm$ 0,35	23,38 $\pm$ 5,51	0,30 $\pm$ 0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	молоді	0-30	10	5,47 $\pm$ 0,40	23,11 $\pm$ 5,44	0,13 $\pm$ 0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	молоді	30-60	10	2,98 $\pm$ 0,28	29,14 $\pm$ 7,05	0,15 $\pm$ 0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	молоді	30-60	10	4,25 $\pm$ 0,39	28,82 $\pm$ 6,96	-0,14 $\pm$ 0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	молоді	60-90	10	2,79 $\pm$ 0,27	31,13 $\pm$ 7,61	0,37 $\pm$ 0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	молоді	60-90	10	3,55 $\pm$ 0,58	51,78 $\pm$ 14,35	0,02 $\pm$ 0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	молоді	90-120	10	2,61 $\pm$ 0,18	22,05 $\pm$ 5,16	-0,46 $\pm$ 0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	молоді	90-120	10	3,72 $\pm$ 0,40	33,73 $\pm$ 8,36	0,02 $\pm$ 0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	молоді	120-150	10	2,24 $\pm$ 0,15	21,28 $\pm$ 4,97	-0,61 $\pm$ 0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	молоді	120-150	10	2,35 $\pm$ 0,27	36,88 $\pm$ 9,30	-1,37 $\pm$ 0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	молоді	150-180	10	1,79 $\pm$ 0,10	18,22 $\pm$ 4,21	0,07 $\pm$ 0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	молоді	150-180	10	2,54 $\pm$ 0,25	30,58 $\pm$ 7,45	-0,41 $\pm$ 0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	старі	0-30	10	5,19 $\pm$ 0,37	22,75 $\pm$ 5,34	0,92 $\pm$ 0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	старі	0-30	10	5,87 $\pm$ 0,39	21,16 $\pm$ 4,94	0,86 $\pm$ 0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	старі	30-60	10	3,27 $\pm$ 0,27	26,46 $\pm$ 6,32	0,49 $\pm$ 0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	старі	30-60	10	4,67 $\pm$ 0,50	34,14 $\pm$ 8,48	0,38 $\pm$ 0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	старі	60-90	10	3,54 $\pm$ 0,26	23,20 $\pm$ 5,46	0,35 $\pm$ 0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	старі	60-90	10	4,48 $\pm$ 0,47	33,10 $\pm$ 8,17	1,06 $\pm$ 0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	старі	90-120	10	2,77 $\pm$ 0,21	23,68 $\pm$ 5,58	1,38 $\pm$ 0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	старі	90-120	10	3,49 $\pm$ 0,45	40,95 $\pm$ 10,58	-0,28 $\pm$ 0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	старі	120-150	10	2,14 $\pm$ 0,17	25,51 $\pm$ 6,06	0,53 $\pm$ 0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	старі	120-150	10	1,93 $\pm$ 0,28	45,31 $\pm$ 12,03	0,18 $\pm$ 0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	старі	150-180	10	1,71 $\pm$ 0,13	24,70 $\pm$ 5,85	0,40 $\pm$ 0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	старі	150-180	10	2,21 $\pm$ 0,20	28,81 $\pm$ 6,96	0,11 $\pm$ 0,69

Прим.:  $\bar{x} \pm SE$  - середня величина ( $\bar{x}$ ) і стандартна помилка (SE) середньої; KB $\pm SE$  - коефіцієнт варіації; СК $\pm SE$  - скошеність.

Результати вказують на те, що при збільшенні експозиції і посиленні ГГС прогресивно знижується  $V_{CO_2}$  і  $V_{O_2}$ . Коефіцієнт варіації (КВ) і скошеність (СК) розподілів  $V_{CO_2}$  і  $V_{O_2}$  вірогідно не змінюються, тому можна застосовувати параметричні методи аналізу. Дані двофакторного ANOVA свідчать про дуже високий ступінь вірогідності впливу тривалості експозиції на  $V_{CO_2}$  ( $F_e = 41,6$ ;  $P < 10^{-30}$ ), тоді як вікові відмінності статистично не достовірні ( $F_v = 1,9$ ;  $P < 0,07$ ). Аналогічні F-критерії і вірогідності для  $V_{O_2}$  становили:  $F_e = 22,2$ ;  $P < 10^{-15}$  і  $F_v = 0,3$ ;  $P > 0,6$ . Тобто зниження вмісту  $O_2$  і особливо ріст  $CO_2$  атмосфери створюють високо достовірне зниження інтенсивності метаболізму. Чутливість до пригнічуючої дії ГГС при старінні практично не змінюється.

Особливий інтерес представляло вивчення корелятивної залежності між швидкістю газообміну і рівнем гіпоксії або гіперкапнії в атмосфері. На рис. 3.8 наведені графіки залежності  $V_{CO_2}$  від вмісту  $CO_2$  у молодих і старих мишей.

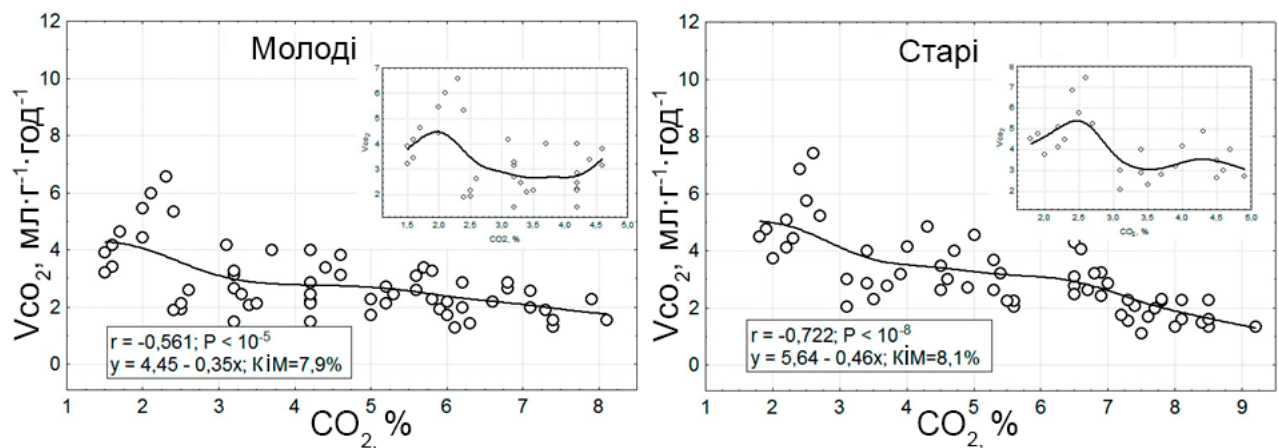


Рис. 3.8. Залежність  $V_{CO_2}$  від вмісту  $CO_2$  в атмосфері у молодих і старих самців мишей лінії СВА. Наведено коефіцієнти кореляції, лінійної регресії між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$  і КІМ. Графіки у вкладишах указують динаміку  $V_{CO_2}$  на першій і другій фазах експерименту ( $CO_2 < 5\%$ ).

При оцінці досліджуваної залежності у всьому діапазоні змін  $CO_2$  (від 1 % до 9 %) спостерігається статистично високо достовірне зниження  $V_{CO_2}$  як у молодих ( $P < 10^{-5}$ ), так і у старих мишей ( $P < 10^{-8}$ ) (рис. 3.8). Судячи з рівнянь регресії, пригнічуючий вплив  $CO_2$  на  $V_{CO_2}$  мало змінюється при старінні, становлячи 7,8 % у молодих і 8,1 % у старих мишей, тобто  $V_{CO_2}$  знижується приблизно на 8 % у відповідь на кожен відсоток підвищення вмісту  $CO_2$ . Ця

величина є кількісною мірою пригнічуючого ефекту  $\text{CO}_2$  і названа нами коефіцієнтом інгібування метаболізму (KIM).

Однак при більш детальному аналізі стає очевидним, що залежність  $V_{\text{CO}_2}$  від  $\text{CO}_2$  далека від простого лінійного зниження. У першому наближенні весь діапазон досліджуваної залежності може бути розділений на три фази. В обох вікових групах перша фаза відповідає порогу гіперкапнії ( $\text{CO}_2$  до 2-3 %) і характеризується не зниженням, а парадоксальним підвищенням  $V_{\text{CO}_2}$ . За нею слідує друга фаза відносної стабільності, коли  $V_{\text{CO}_2}$  мало змінюється у відповідь на поступове збільшення  $\text{CO}_2$  (див. графіки вкладишів). Найбільш сильне і близьке до лінійності інгібування  $V_{\text{CO}_2}$  відбувається при високих концентраціях третьої фази ( $\text{CO}_2 > 5\%$ ).

Ріст  $V_{\text{CO}_2}$  протягом першої фази, скоріше за все, пояснюється добре відомими ефектами  $\text{CO}_2$  на серцево-судинну і дихальну системи — розширенням капілярів у сполученні з посиленням кровообігу і дихання [173]. Це, напевно, призводить до посилення припливу субстратів окислювання і кисню з одночасним прискоренням відтоку  $\text{CO}_2$  через гіпервентиляцію. На жаль, у нас не було можливості прямого виміру  $P_{\text{CO}_2}$  у таких умовах, але не виключено, що внаслідок посиленого відтоку  $\text{CO}_2$  на цій фазі  $P_{\text{CO}_2}$  у крові і метаболічно активних тканинах насправді знижується, не дивлячись на зростання вмісту  $\text{CO}_2$  у вдихуваному повітрі. Принаймні, гіпервентиляційний алкалоз, що настає внаслідок посиленого виведення з організму  $\text{CO}_2$ , є добре документованим феноменом [43, 138]. У міру наступного підвищення  $\text{CO}_2$ , імовірно, настає приблизна рівність між ефектами різних стимулюючих і пригнічуючих факторів, що приводить до відносної стабілізації  $V_{\text{CO}_2}$  (друга фаза). І тільки при більших концентраціях третьої фази ( $\text{CO}_2 > 5\%$ ) настає очевидне превалювання пригнічуючого ефекту. Ми думаємо, що критична границя близько 5%  $\text{CO}_2$  не випадкова. Вона обумовлена тим, що в нормі  $P_{\text{CO}_2}$  крові мишей і більшості інших ссавців (36-40 мм рт. ст.) відповідає приблизно 5 % від атмосферних 760 мм рт. ст. Очевидно, що при вмісті  $\text{CO}_2$  в атмосфері до 5 % організм може підтримати відносно стабільний внутрішній рівень  $P_{\text{CO}_2}$

шляхом посилення вентиляції. Однак при підвищенні вмісту  $\text{CO}_2$  у вдихуваному повітрі більше 5% гіпервентиляція не тільки не допомагає видаленню з організму надлишкового  $\text{CO}_2$ , а навпаки підсилює приплив екзогенного  $\text{CO}_2$ , у результаті чого концентрація  $\text{CO}_2$  в організмі неминуче почне перевищувати норму. Саме такі значення  $\text{CO}_2$ , очевидно, здатні викликати зниження інтенсивності окисних процесів і, насамперед, сповільнити три послідовні етапи декарбоксилування пірувату в циклі лимонної кислоти, які проходять у мітохондріальному матриксі [157, 206].

Практично аналогічні залежності були виявлені нами при оцінці впливу  $\text{O}_2$  атмосфери на  $\text{V}_{\text{O}_2}$ . Між вмістом  $\text{O}_2$  і  $\text{V}_{\text{O}_2}$  знайдені високо достовірні негативні залежності в обох вікових групах контрольних мишей (рис. 3.9).

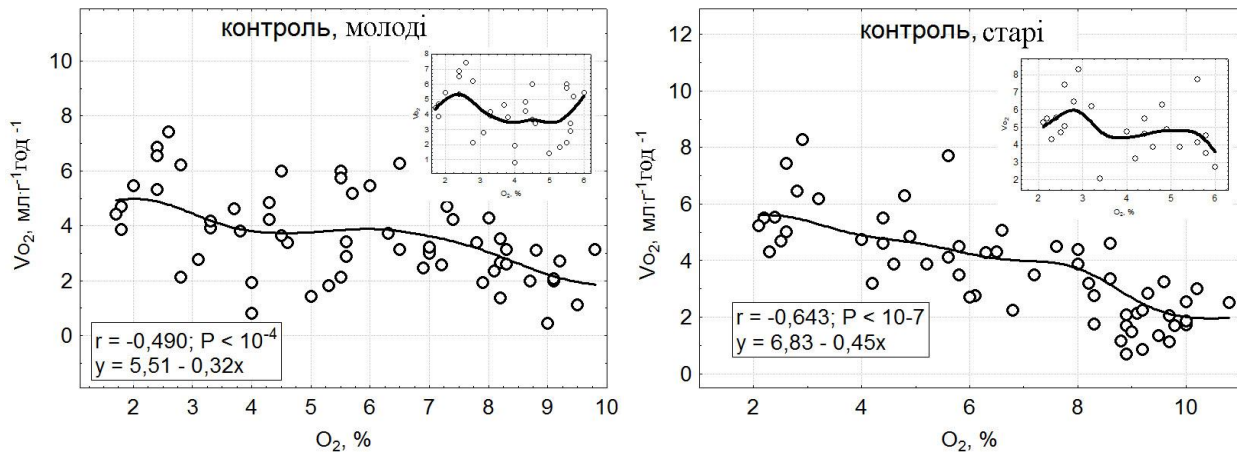


Рис. 3.9. Залежність  $\text{V}_{\text{O}_2}$  від зниження  $\text{O}_2$  в атмосфері молодих і старих самців лінії СВА. Наведено коефіцієнти кореляції і лінійної регресії між  $\text{V}_{\text{O}_2}$  і  $\text{O}_2$ . Графік вкладиша вказує динаміку змін  $\text{V}_{\text{O}_2}$  на I і II фазі ГГС ( $\text{CO}_2 < 5\%$ ).

Як і у випадку  $\text{CO}_2$ , при оцінці всього досліджуваного діапазону (1-10 %) були виявлені високо достовірні негативні лінійні кореляції у молодих ( $P < 10^{-4}$ ), та у старих мишей ( $P < 10^{-7}$ ). При цьому привертає на себе увагу те, що статистична значимість коефіцієнтів кореляції між  $\text{V}_{\text{O}_2}$  і  $\text{O}_2$  приблизно на порядок нижча, ніж аналогічні величини для  $\text{V}_{\text{CO}_2}$  і  $\text{CO}_2$  (див. рис. 3.8 і 3.9). Як видно із графіків, наведених у вкладишах, у діапазоні до  $\text{CO}_2 < 5\%$  аналізовані залежності були нелінійними.

*Температура поверхні тіла.* Відомо, що хоча температурний гомеостаз

являє собою самостійну функціональну одиницю зі специфічними регуляторними центрами, його стан у значній мірі визначено рівнем загального метаболізму. Як змінюється температура тіла, і чи корелює вона з рівнем газообміну при ГГС? Чи змінюються ці взаємини при старінні? Оскільки вимірювання температури ядра тіла є досить травматичною процедурою, то в наших дослідженнях перевага була віддана дистанційному виміру температури поверхні тіла (ТПТ) у мишей за допомогою термометра, що фіксує інтенсивність інфрачервоного випромінювання.

Попередні випробування показали, що між ректальною температурою і ТПТ існує високо достовірна позитивна залежність, і ТПТ може в достатньому ступені точності характеризувати можливі зміни температури ядра тіла. На жаль, у нашій постановці дослідів не було можливості стежити за динамікою температури, тому ТПТ вимірювали тільки до початку і відразу після завершення сеансу ГГС.

Проведені дослідження показали, що ТПТ вірогідно знижується до кінця ГГС у мишей обох вікових груп (рис. 3.10). Як видно з результатів ANOVA, така експозиція приводить до достовірного зниження ТПТ ( $P < 10^{-9}$ ) при повній відсутності впливу фактору віку ( $P > 0,9$ ).

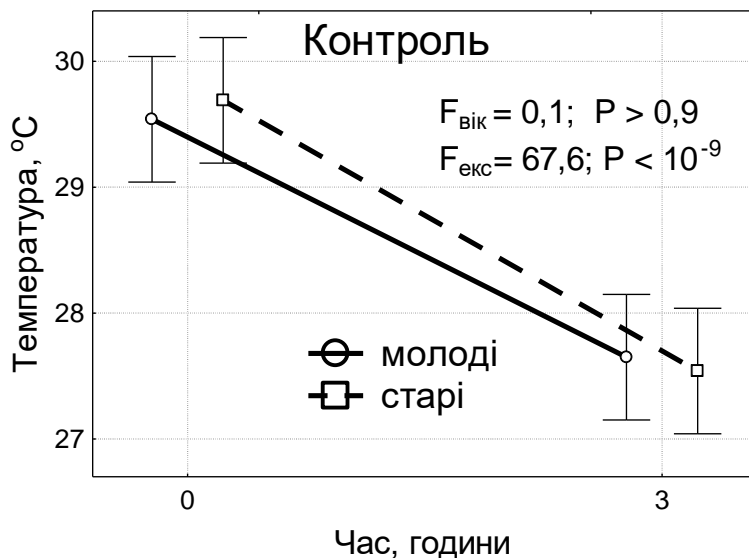


Рис. 3.10. Температура поверхні тіла молодих і старих самців мишей лінії СВА до початку і після 3-годинної експозиції в симетричному ГГС.

Завдяки тому, що піддослідні миші були промарковані, з'явилася можливість оцінити ступінь корелятивної залежності між ТПТ і газообміном (рис. 3.11). Виявлені високо достовірні коефіцієнти кореляції між ТПТ і рівнем

газообміну, які свідчать про те, що зниження ТПТ може бути викликане інгібуванням окисних процесів, що має місце при ГГС.

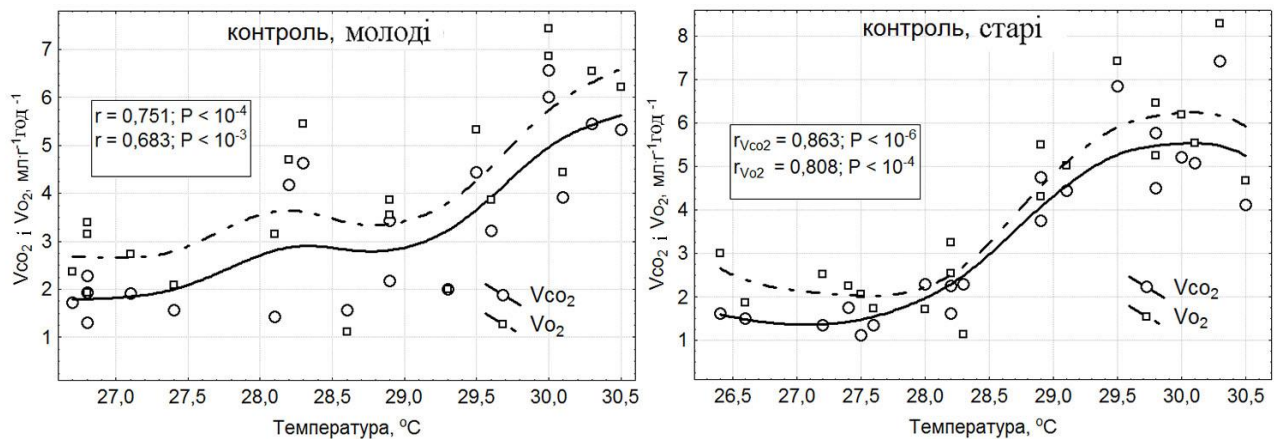


Рис. 3.11. Залежність температури поверхні тіла від  $V_{CO_2}$  і  $V_{O_2}$  у молодих і старих самців мишей лінії СВА при 3-годинному ГГС.

*Спонтанна рухова активність* оцінювалась візуально, піддослідних мишей розділили на три категорії: сплячих, не сплячих, і тих, що рухаються. Крім самостійного значення, СРА є простим і об'єктивним поведінковим показником, який характеризує ступінь занепокоєння або дискомфорту тварин, при якому СРА звичайно росте. Дані про зміни частки (%) сплячих, і мишей, що рухаються, у міру збільшення вмісту  $CO_2$  в атмосфері наведені на рис. 3.12.

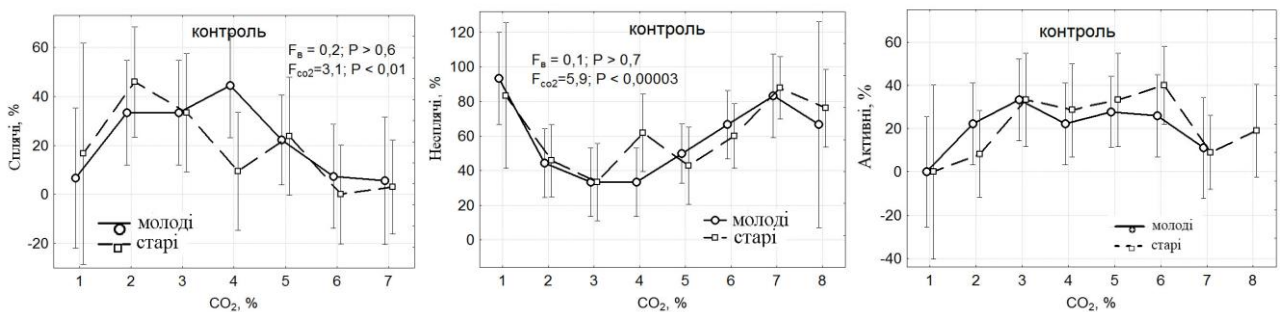


Рис. 3.12. Динаміка частки (%) сплячих, не сплячих і рухливих молодих і старих контрольних самців мишей лінії СВА при підвищенні вмісту  $CO_2$  (%) в ГГС. Вірогідність вікових відмінностей ( $F_{\alpha}$ ) і впливу  $CO_2$  ( $F_{CO_2}$ ) оцінювали за допомогою факторного ANOVA

Близько 70-80 % молодих і старих тварин при малих концентраціях  $CO_2$  не сплять, але і не переміщуються. У міру збільшення  $CO_2$  до 5 % більша частина

переходить у категорію сплячих або починають рухатися. При більш високих концентраціях  $\text{CO}_2$  миші, очевидно, проявляють занепокоєні, і більшість сплячих просинаються. Судячи із кривих за результатами ANOVA, вплив  $\text{CO}_2$  на СРА високо вірогідний. Вікові відмінності при цьому не достовірні.

Таким чином, проведені дослідження дозволяють заключити, що поступове підвищення вмісту  $\text{CO}_2$  і пропорційне зниження вмісту  $\text{O}_2$  у повітрі, приводить до істотного зниження рівня окисних процесів і ТПТ. Таке зниження не лінійне і в першому наближенні може бути розділене на три фази — фазу росту, стабільності і інгібування. Судячи з показників СРА, такий режим ГГС є мало інвазійним, тому що значна частина тварин, не проявляючи ознак явного дискомфорту, спить і пробуджується тільки при перевищенні  $\text{CO}_2$  рівня 5-6 %.

У наступних серіях дослідів був вивчений вплив асиметричного ГГС, модельованого додаванням до повітря  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{He}$ ,  $\text{Ar}$ ,  $\text{O}_2$  і  $\text{CO}_2$ .

### 3.2.2. Азот

У цій серії експериментів вивчено вплив асиметричного ГГС, яке створювали додаванням 25 %  $\text{N}_2$  до повітря на початку дослідів. У результаті такого втручання сеанс ГГС починалось не з нульових значень гіпоксії і гіперкапнії, як у контрольній групі, а з приблизно 5 % гіпоксії і нульової гіперкапнії.

*Газообмін.* Середні величини, КВ і СК  $V_{\text{CO}_2}$  і  $V_{\text{O}_2}$  при ГГС наведені в таблиці 3.2.

**Вплив тривалості експозиції (хв) на  $V_{CO_2}$  (мл·г<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>) і  $V_{O_2}$  (мл·г<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>) у молодих і старих самців мишей лінії СВА в ГГС, модельованому додаванням до повітря 25 %  $N_2$**

Параметр	Вік	Час, хв	N	$\bar{x} \pm SE$	$KB \pm SE$	$CK \pm SE$
$V_{CO_2}$	молоді	0-30	10	4,26±0,24	18,08±4,17	0,37±0,69
$V_{O_2}$	молоді	0-30	10	3,35±0,25	23,28±5,48	-0,14±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	30-60	10	2,77±0,24	27,24±6,53	1,05±0,69
$V_{O_2}$	молоді	30-60	10	2,90±0,49	52,99±14,81	1,58±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	60-90	10	2,13±0,10	15,47±3,54	0,23±0,69
$V_{O_2}$	молоді	60-90	10	2,98±0,34	35,99±9,03	2,14±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	90-120	10	2,55±0,20	24,34±5,76	0,75±0,69
$V_{O_2}$	молоді	90-120	10	3,23±0,25	24,98±5,92	0,46±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	120-150	10	2,10±0,14	21,15±4,94	-0,81±0,69
$V_{O_2}$	молоді	120-150	10	2,76±0,37	42,35±11,04	-1,05±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	150-180	10	1,48±0,15	31,33±7,66	-0,11±0,69
$V_{O_2}$	молоді	150-180	10	3,42±0,21	19,55±4,54	0,78±0,69
$V_{CO_2}$	старі	0-30	10	3,90±0,24	19,66±4,56	0,60±0,69
$V_{O_2}$	старі	0-30	10	3,30±0,13	12,84±2,92	0,40±0,69
$V_{CO_2}$	старі	30-60	10	3,16±0,18	17,83±4,11	-0,35±0,69
$V_{O_2}$	старі	30-60	10	4,01±0,29	22,95±5,39	-0,10±0,69
$V_{CO_2}$	старі	60-90	10	2,27±0,13	17,77±4,10	0,20±0,69
$V_{O_2}$	старі	60-90	10	2,84±0,19	21,57±5,04	-0,42±0,69
$V_{CO_2}$	старі	90-120	10	2,41±0,17	22,85±5,37	-0,08±0,69
$V_{O_2}$	старі	90-120	10	2,97±0,22	23,44±5,52	-0,64±0,69
$V_{CO_2}$	старі	120-150	10	1,80±0,17	30,50±7,43	-0,40±0,69
$V_{O_2}$	старі	120-150	10	2,84±0,28	31,52±7,72	-0,66±0,69
$V_{CO_2}$	старі	150-180	10	1,13±0,12	33,03±8,15	0,18±0,69
$V_{O_2}$	старі	150-180	10	2,69±0,32	37,81±9,59	-0,13±0,69

Прим.:  $\bar{x} \pm SE$  - середня величина ( $\bar{x}$ ) і стандартна помилка (SE) середньої;  $KB \pm SE$  - коефіцієнт варіації;  $CK \pm SE$  – скошеність.

Як і в контрольній групі, при ГГС, модельованому додаванням 25 %  $N_2$ , двофакторна ANOVA вказує на високо достовірний вплив  $CO_2$  в атмосфері на  $V_{CO_2}$  ( $F_e = 55,9$ ;  $P < 10^{-30}$ ) при невірогідності вікових відмінностей ( $F_b = 1,0$ ;  $P > 0,2$ ). Інші закономірності були знайдені для  $O_2$  і  $V_{O_2}$ . На відміну від аналогічних величин для контрольних мишей при асиметричному ГГС впливи експозиції і віку були недостовірними ( $F_e = 1,2$ ;  $P > 0,2$  і  $F_b = 0,01$ ;  $P > 0,9$ ).

Збереження високо достовірної залежності між  $\text{CO}_2$  і  $V_{\text{CO}_2}$  на тлі відсутності корелятивних зв'язків між  $\text{O}_2$  і  $V_{\text{O}_2}$  при асиметричному ГГС із очевидністю слідує за результатами корелятивного аналізу. Між  $\text{CO}_2$  і  $V_{\text{CO}_2}$  спостерігається високо достовірна негативна кореляція в обох вікових групах. При цьому кореляція на 1-2 порядку вище, ніж у контроля (рис. 3.13).

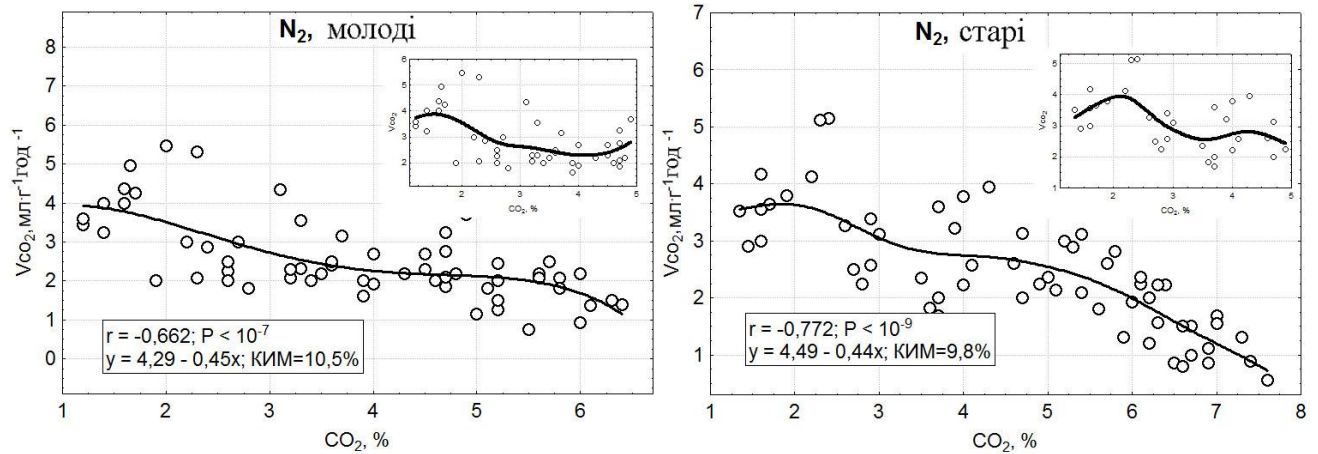


Рис. 3.13. Залежність  $V_{\text{CO}_2}$  від вмісту  $\text{CO}_2$  при інкубації молодих і старих самців лінії СВА в ГГС із посиленням компонентом гіпоксії, модельованому додаванням до повітря 25%  $\text{N}_2$  на початку дослідження. Графіки у вкладишах вказують динаміку  $V_{\text{CO}_2}$  на першій і другій фазі експерименту ( $\text{CO}_2 < 5\%$ ).

Наведені коефіцієнти кореляції і лінійної регресії між  $V_{\text{CO}_2}$  і  $\text{CO}_2$  вказують на посилення зв'язку між ними в асиметричному ГГС, а також на підвищення КИМ (близько 8 % при симетричному ГГС і 10 % при додаванні  $\text{N}_2$ ). Із практично ідентичних рівнянь регресії між  $V_{\text{CO}_2}$  і  $\text{CO}_2$  у молодих і старих мишей слідує, що КИМ мало змінюється в старості (зниження  $V_{\text{CO}_2}$  на 10,5 % і 9,8 % з розрахунку на кожен відсоток збільшення  $\text{CO}_2$  у повітрі). Основна відмінність залежності між  $V_{\text{CO}_2}$  і  $\text{CO}_2$  при вивченому варіанті асиметричного ГГС від контрольної групи полягає в тому, що вільні члени регресії при посиленні гіпоксичного компонента знижуються, що може свідчити про деяке уповільнення швидкості окисних процесів у таких умовах. Із графіків, наведених у вкладишах видно, що при цьому зберігається трифазна структура залежності з переходом фази росту у фазу стабільності ( $\text{CO}_2 < 5\%$ ). Реальне

інгібування метаболічних процесів відбувається тільки при перевищенні критичного порогу  $\text{CO}_2$  (рис. 3.13).

Інші закономірності були виявлені при аналізі залежності між  $\text{V}_{\text{O}_2}$  і  $\text{O}_2$  при асиметричному ГГС, модельованому додаванням  $\text{N}_2$  (рис. 3.14).

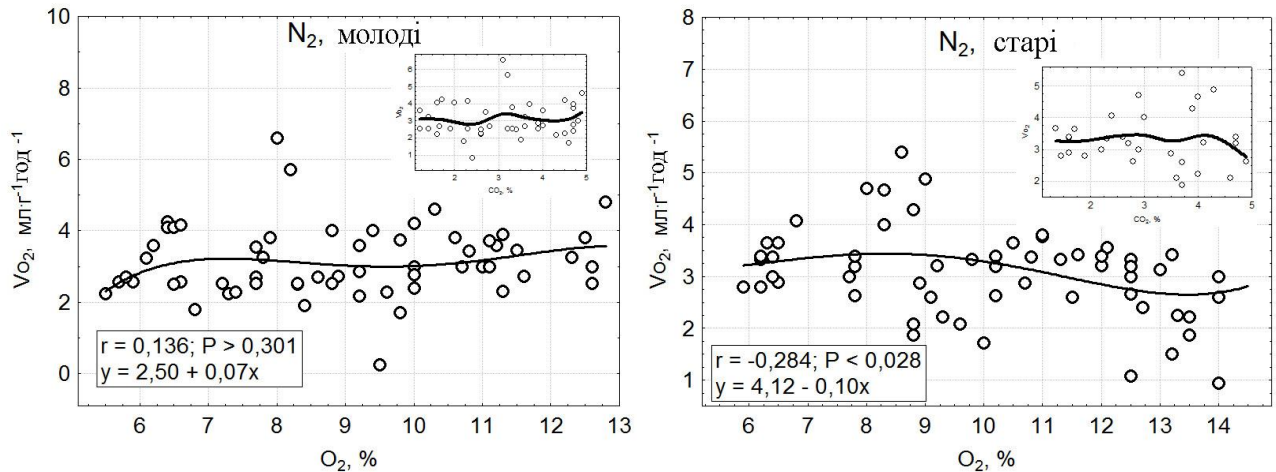


Рис. 3.14. Залежність  $\text{V}_{\text{O}_2}$  від вмісту  $\text{O}_2$  при інкубації молодих і старих самців мишей лінії СВА в ГГС із посиленням компонентом гіпоксії, модельованому додаванням до повітря 25%  $\text{N}_2$  на початку досліджу. Наведено коефіцієнти кореляції і лінійної регресії між  $\text{V}_{\text{O}_2}$  і  $\text{O}_2$ . Графік у вкладиші вказує динаміку  $\text{V}_{\text{O}_2}$  на першій і другій фазі експерименту ( $\text{CO}_2 < 5\%$ ).

З наведених графіків і рівнянь видно, що зниження вмісту  $\text{O}_2$  не чинить істотного впливу на  $\text{V}_{\text{O}_2}$  у молодих мишей, і кореляція між  $\text{V}_{\text{CO}_2}$  і  $\text{CO}_2$  недостовірна ( $P > 0,3$ ). Доречно відзначити, в аналогічних умовах залежність між  $\text{V}_{\text{CO}_2}$  і  $\text{CO}_2$  насправді підсилюється. У групі старих мишей кореляція між  $\text{V}_{\text{O}_2}$  і  $\text{O}_2$  значима ( $P < 0,03$ ), але істотно нижча, ніж для пари  $\text{V}_{\text{CO}_2}$  і  $\text{CO}_2$  у цих же умовах.

Таким чином, при утримуванні мишей в умовах ГГС, модельованого додаванням 25 %  $\text{N}_2$ , на тлі деякого збільшення вірогідності кореляції між  $\text{V}_{\text{CO}_2}$  і  $\text{CO}_2$  і відповідних коефіцієнтів КІМ спостерігається практично повна відсутність (у молодих) або ослаблення корелятивної залежності між  $\text{V}_{\text{O}_2}$  і  $\text{O}_2$  (у старих). Отримані дані можуть свідчити про те, що при вмісті  $\text{CO}_2$  вище критичних значень ( $>5\%$ ) гіперкапічна атмосфера має у своєму

розпорядженні канали впливу, які більш тісно «зчеплені» з першопричинами інгібування метаболізму, ніж гіпоксичні фактори.

*Температура поверхні тіла.* ТПТ мишей вірогідно знижувалася до кінця сеансу ГГС, модельованого додаванням до повітря 25 %  $N_2$  на початку експозиції. Судячи з результатів ANOVA, високо достовірний вплив ГГС на ТПТ ( $P < 10^{-11}$ ) сполучався із практично повною відсутністю впливу фактору віку ( $P > 0,5$ ). Так, у середньому, ТПТ молодих мишей після тригодинного сеансу асиметричного ГГС знизилася з  $30,1 \pm 0,6$  °C до  $26,9 \pm 0,7$  °C, у старих мишей – з  $29,8 \pm 0,6$  °C до  $26,7 \pm 0,6$  °C. У цілому, графік зниження температури практично ідентичний графіку ТПТ у контролю (рис. 3.10).

Оцінка ступеня кореляції терморегуляції з показниками газообміну показала, що ТПТ позитивно корелювала з  $V_{CO_2}$  ( $P < 10^{-4}$ ) при повній відсутності аналогічної кореляції з  $V_{O_2}$  (рис. 3.15).

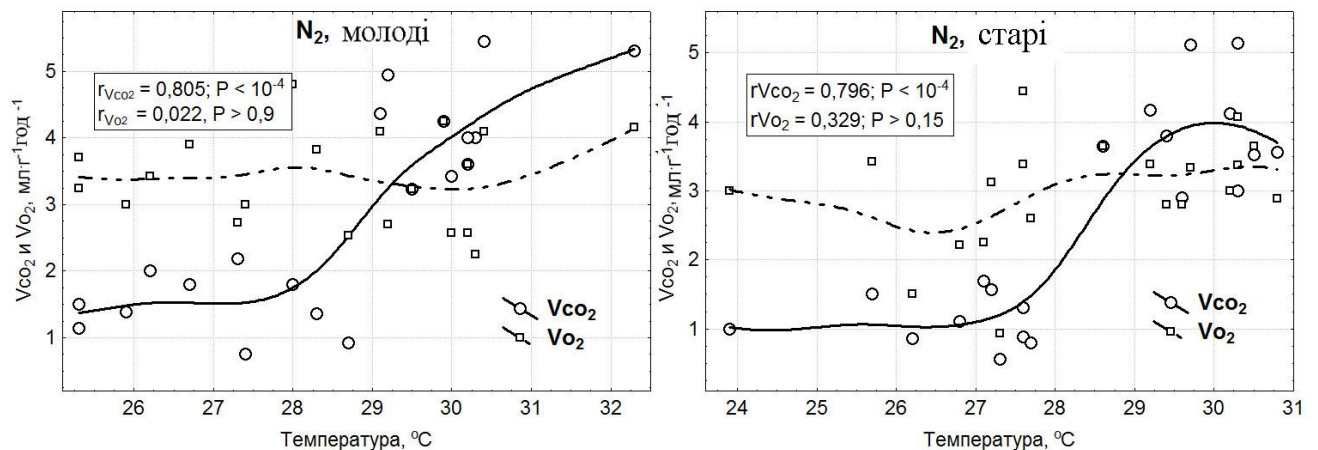


Рис. 3.15. Залежність температури поверхні тіла від  $V_{CO_2}$  і  $V_{O_2}$  у молодих і старих самців мишей лінії СВА при 3-годинній експозиції в ГГС, модельованого додаванням 25%  $N_2$  до повітря на початку експозиції.

Отримані дані ще раз свідчать на користь припущення про те, що гіперкапнія відіграє провідну роль у виявлених закономірностях.

*Спонтанна рухова активність.* Динаміка вивчених показників СРА при асиметричному ГГС, модельованому додаванням 25 %  $N_2$  до повітря відрізнялася від такої, яка спостерігалась у контрольних групах (рис. 3.16).

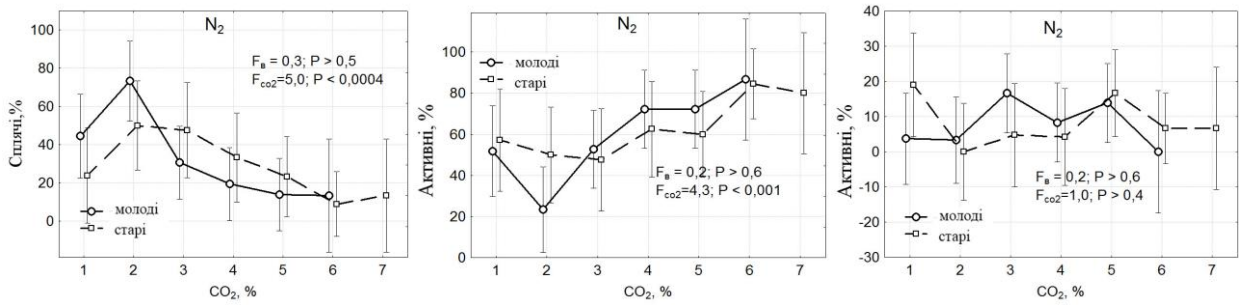


Рис. 3.16. Динаміка частки сплячих, не сплячих і рухливих молодих і старих самців мишей лінії СВА при підвищенні вмісту CO<sub>2</sub> (%) при ГГС, модельованому додаванням 25% N<sub>2</sub> до повітря. Вірогідність вікових відмінностей ( $F_B$ ) і впливу CO<sub>2</sub> ( $F_{CO_2}$ ) оцінювали факторного ANOVA.

З отриманих результатів привертає на себе увагу те, що частка особин, які рухаються (< 20 %) залишається на рівні нижче контрольного. Частка сплячих трохи більше, але помітно знижується до кінця експозиції. При цьому число активних тварин у міру посилення гіперкапнії поступово росте. Отримані дані свідчать про те, що тварини при посиленні асиметричного ГГС, імовірно, не відчують сильного дискомфорту, але трохи насторожені і стурбовані.

Таким чином, інкубація молодих і старих самців мишей лінії СВА в умовах 3-годинної асиметричного ГГС із посиленим гіпоксичним компонентом, модельованим додаванням 25 % N<sub>2</sub> до повітря, характеризується високо достовірною залежністю між  $V_{CO_2}$  і вмістом CO<sub>2</sub> в атмосфері у мишей обох вікових груп. КІМ росте до приблизно 10%, що на 25 % більше, ніж при симетричному ГГС. При цьому зберігається типова послідовність фаз – росту, стабільності і зниження  $V_{CO_2}$  у міру підвищення вмісту CO<sub>2</sub> в атмосфері. Аналогічна залежність між  $V_{O_2}$  і O<sub>2</sub>, яка чітко проявляється при симетричному ГГС, була відсутня (у молодих) або ослаблена (у старих) при посиленні гіпоксичного компоненту. До цього моменту в обох вікових групах спостерігається приблизно однакове зниження ТПТ, яке корелює з  $V_{CO_2}$ , але не з  $V_{O_2}$ . У цілому, отримані в цьому підрозділі дані не виключають того, що зрушення CO<sub>2</sub> атмосфери можуть бути ближчі до причинних факторів регуляції метаболізму, ніж O<sub>2</sub>.

### 3.2.3. Водень

Водень займає унікальне положення в природі і має біологічну активність, діючи як антиоксидант і відновник [100, 108, 120, 135, 191, 276]. Тому можна було очікувати, що ефекти додавання  $N_2$  до повітря для посилення гіпоксичного компоненту ГГС можуть трохи відрізнятись від  $N_2$ .

*Газообмін.* Середні величини КВ і СК  $V_{CO_2}$  і  $V_{O_2}$  молодих і старих мишей, що утримуються в умовах асиметричного ГГС, модельованого додаванням 25%  $N_2$  на початку експерименту, представлені в табл. 3.3.

Таблиця 3.3

**Вплив тривалості експозиції (хв) на  $V_{CO_2}$  (мл·г<sup>-1</sup>·в<sup>-1</sup>) і  $V_{O_2}$  (мл·г<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>) у молодих і старих самців мишей лінії СВА в асиметричному ГГС, модельованому додаванням до повітря 25 %  $N_2$**

Параметр	Вік	Час, хв	N	$\bar{x} \pm SE$	КВ $\pm SE$	СК $\pm SE$
$V_{CO_2}$	молоді	0-30	10	4,58 $\pm$ 0,27	18,48 $\pm$ 4,27	1,02 $\pm$ 0,69
$V_{O_2}$	молоді	0-30	10	4,23 $\pm$ 0,39	29,52 $\pm$ 7,15	0,49 $\pm$ 0,69
$V_{CO_2}$	молоді	30-60	10	2,51 $\pm$ 0,12	14,74 $\pm$ 3,37	0,42 $\pm$ 0,69
$V_{O_2}$	молоді	30-60	10	3,16 $\pm$ 0,34	34,20 $\pm$ 8,49	-0,84 $\pm$ 0,69
$V_{CO_2}$	молоді	60-90	10	2,59 $\pm$ 0,15	18,61 $\pm$ 4,30	-0,67 $\pm$ 0,69
$V_{O_2}$	молоді	60-90	10	4,12 $\pm$ 0,32	24,25 $\pm$ 5,73	1,48 $\pm$ 0,69
$V_{CO_2}$	молоді	90-120	10	2,28 $\pm$ 0,17	23,50 $\pm$ 5,54	0,37 $\pm$ 0,69
$V_{O_2}$	молоді	90-120	10	3,66 $\pm$ 0,25	21,31 $\pm$ 4,98	-0,21 $\pm$ 0,69
$V_{CO_2}$	молоді	120-150	10	1,76 $\pm$ 0,34	60,72 $\pm$ 17,90	2,04 $\pm$ 0,69
$V_{O_2}$	молоді	120-150	10	2,56 $\pm$ 0,20	24,85 $\pm$ 5,89	1,14 $\pm$ 0,69
$V_{CO_2}$	молоді	150-180	10	1,31 $\pm$ 0,08	18,61 $\pm$ 4,30	-0,39 $\pm$ 0,69
$V_{O_2}$	молоді	150-180	10	2,74 $\pm$ 0,26	29,47 $\pm$ 7,14	0,08 $\pm$ 0,69
$V_{CO_2}$	старі	0-30	10	4,50 $\pm$ 0,13	8,99 $\pm$ 2,03	0,17 $\pm$ 0,69
$V_{O_2}$	старі	0-30	10	5,04 $\pm$ 0,32	20,07 $\pm$ 4,66	0,14 $\pm$ 0,69
$V_{CO_2}$	старі	30-60	10	2,66 $\pm$ 0,15	18,26 $\pm$ 4,22	0,34 $\pm$ 0,69
$V_{O_2}$	старі	30-60	10	3,56 $\pm$ 0,22	19,66 $\pm$ 4,56	0,02 $\pm$ 0,69
$V_{CO_2}$	старі	60-90	10	2,40 $\pm$ 0,16	21,15 $\pm$ 4,94	-0,68 $\pm$ 0,69
$V_{O_2}$	старі	60-90	10	3,44 $\pm$ 0,41	37,79 $\pm$ 9,58	-0,94 $\pm$ 0,69
$V_{CO_2}$	старі	90-120	10	2,17 $\pm$ 0,24	35,42 $\pm$ 8,86	0,05 $\pm$ 0,69
$V_{O_2}$	старі	90-120	10	4,37 $\pm$ 0,40	28,74 $\pm$ 6,94	0,56 $\pm$ 0,69
$V_{CO_2}$	старі	120-150	10	1,33 $\pm$ 0,13	29,93 $\pm$ 7,27	-0,70 $\pm$ 0,69
$V_{O_2}$	старі	120-150	10	2,43 $\pm$ 0,37	47,55 $\pm$ 12,81	-0,81 $\pm$ 0,69
$V_{CO_2}$	старі	150-180	10	0,86 $\pm$ 0,09	32,44 $\pm$ 7,98	0,11 $\pm$ 0,69
$V_{O_2}$	старі	150-180	10	2,21 $\pm$ 0,24	34,76 $\pm$ 8,66	1,01 $\pm$ 0,69

Прим.:  $\bar{x} \pm SE$  – середня величина ( $\bar{x}$ ) і стандартна помилка (SE) середньої; КВ $\pm SE$  – коефіцієнт варіації; СК $\pm SE$  – скошеність.

Аналіз отриманих даних за допомогою двофакторного ANOVA свідчить про те, що вплив тривалості експозиції в атмосфері з добавками  $\text{H}_2$  на  $V_{\text{CO}_2}$  відрізняється високим F-критерієм і вірогідністю ( $F_e = 84,2$ ;  $P < 10^{-30}$ ). Вікові відмінності залишались невірогідними ( $F_v = 3,2$ ;  $P < 0,08$ ). Аналогічні величини для  $V_{\text{O}_2}$  були нижчі, ніж для  $V_{\text{CO}_2}$  ( $F_e = 14,7$ ;  $P < 10^{-13}$  і  $F_v = 0,3$ ;  $P > 0,6$ ).

При кореляційному аналізі впливу водню на газообмін привертають на себе увагу більш високі коефіцієнти кореляції між  $V_{\text{CO}_2}$  і вмістом  $\text{CO}_2$  в атмосфері, вірогідність яких на кілька порядків вище, ніж в аналогічних дослідках, проведених на контрольних мишах і при ГГС, модельованому додаванням  $\text{N}_2$ . Як і в попередніх серіях дослідів, вірогідність кореляцій залишається на кілька порядків вищою у старих мишей, ніж у молодих, що може свідчити про посилення пригнічуючого впливу ГГС у старості (рис. 3.17).

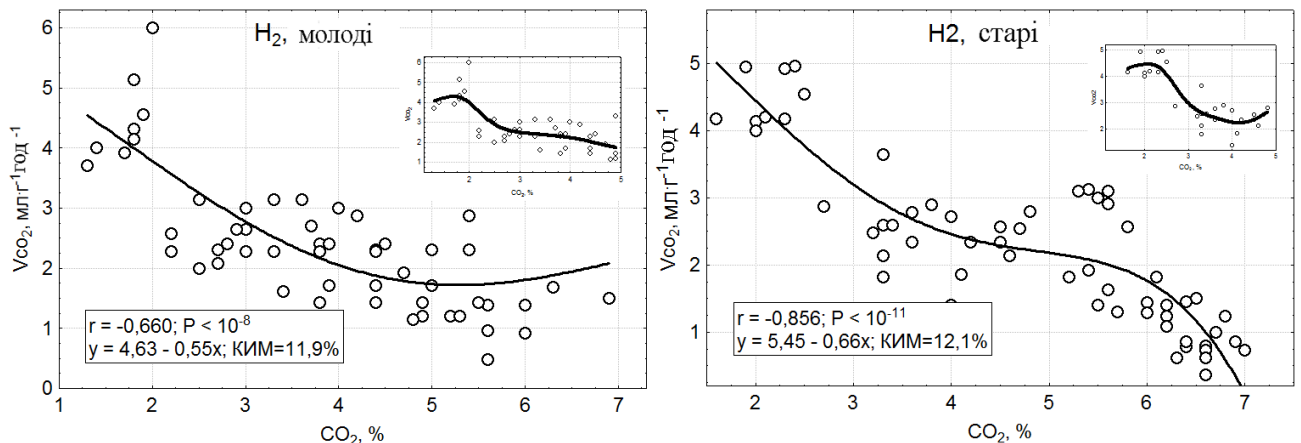


Рис. 3.17 Залежність  $V_{\text{CO}_2}$  від вмісту  $\text{CO}_2$  при інкубації молодих і старих самців мишей лінії СВА в ГГС із посиленим компонентом гіпоксії, модельованим додаванням до повітря 25 %  $\text{H}_2$  на початку досліду. Наведено коефіцієнти кореляції і лінійної регресії між  $V_{\text{CO}_2}$  і  $\text{CO}_2$ . Графік у вкладиші вказує динаміку  $V_{\text{CO}_2}$  на першій і другій фазі експерименту ( $\text{CO}_2 < 5\%$ ).

З коефіцієнтів лінійної регресії між  $V_{\text{CO}_2}$  і  $\text{CO}_2$  слідує, що КИМ  $\text{H}_2$  у молодих (11,9 %) і старих мишей (12,1 %) перевищує контрольний рівень на майже 50% (див. рис. 3.8 і 3.17). Додавання  $\text{H}_2$ , певно, підсилює пригнічуючий ефект ГГС особливо при високих концентраціях  $\text{CO}_2$  в атмосфері у старих мишей. Із представлених на рис. 3.17 графіків видно, що до кінця сеансу  $V_{\text{CO}_2}$

знижується приблизно в 3 рази у молодих і 5 разів у старих мишей. При цьому зберігається послідовність проходження фаз росту, стабільності і інгібування в міру підвищення вмісту  $\text{CO}_2$ .

Іншими були виявлені закономірності при аналізі залежності між  $V_{\text{O}_2}$  і  $\text{O}_2$  при посиленні гіпоксичного компоненту ГГС за допомогою додавання 25 %  $\text{N}_2$  до повітря (рис. 3.18).

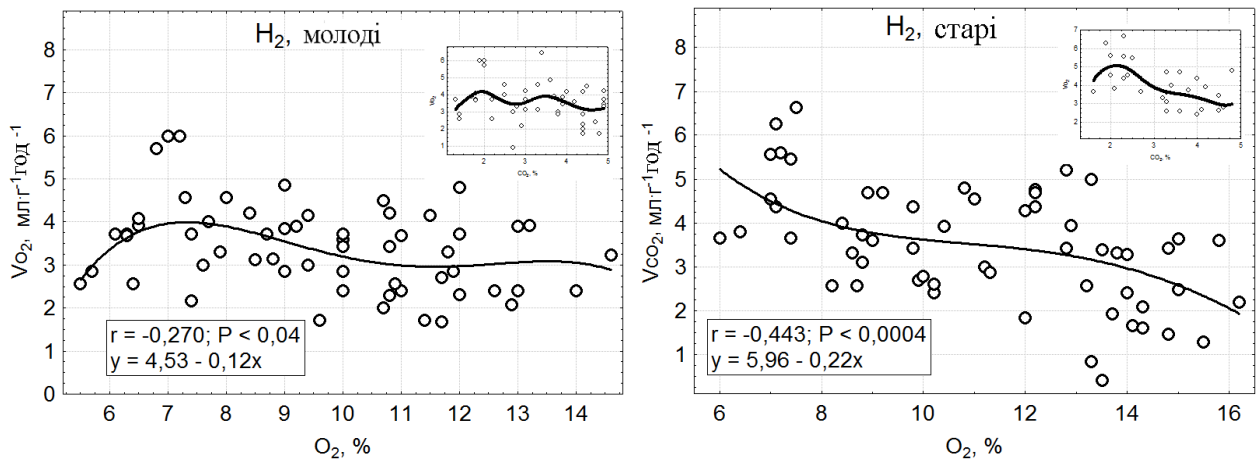


Рис. 3.18 Залежність  $V_{\text{O}_2}$  від вмісту  $\text{O}_2$  при інкубації молодих і старих самців мишей лінії СВА в ГГС із посиленим компонентом гіпоксії, модельованим додаванням до повітря 25 %  $\text{N}_2$  на початку досліду. Наведено коефіцієнти кореляції і лінійної регресії між  $V_{\text{O}_2}$  і  $\text{O}_2$ . Графік у вкладиші вказує динаміку  $V_{\text{O}_2}$  на першій і другій фазі експерименту ( $\text{CO}_2 < 5\%$ ).

Хоча негативна корелятивна залежність при цьому зберігається, відповідні коефіцієнти кореляції і КІМ (2,6 % у молодих і 3,3 % у старих мишей) помітно менші, ніж для аналогічної залежності між  $V_{\text{CO}_2}$  і  $\text{CO}_2$  (див. рис. 3.17 і 3.18). Обчислення часткових (рос. "частных") коефіцієнтів кореляції, як і у серії дослідів з  $\text{N}_2$ , свідчать про те, що при виключенні впливу факторів, пов'язаних із  $\text{CO}_2$ , кореляція між  $V_{\text{O}_2}$  і  $\text{O}_2$  була б не негативна, а позитивна ( $r=0,279$ ;  $P < 0,03$  у молодих і  $r=0,281$ ;  $P < 0,03$  у старих мишей). Отримані дані повторюють відзначену раніше більш важливу роль гіперкапнії в інгібуванні окисних процесів, ніж гіпоксії.

*Температура поверхні тіла.* Як і в попередніх експериментах, утримування мишей в ГГС із посиленням гіпоксичним компонентом, який моделювався додаванням 25%  $N_2$ , за 3 години експозиції приводило до статистично достовірного зниження ТПТ із  $29,9 \pm 0,6$  °С до  $27,8 \pm 0,6$  °С у молодих, і з  $30,3 \pm 0,7$  °С до  $28,2 \pm 0,7$  °С у старих мишей. До кінця сеансу зниження температури мало високу вірогідність ( $P < 10^{-5}$ ) на тлі несуттєвих вікових відмінностей між молодими і старими групами. Графік зниження температури практично ідентичний графіку ТПТ у контрольних тварин (рис.3.10).

Вивчення корелятивної залежності між ТПТ і рівнем газообміну показало, що при посиленні гіпоксичного компоненту ГГС шляхом додавання  $N_2$  до повітря, на відміну від аналогічної серії дослідів з  $N_2$ , значима кореляція ТПТ зберігається з  $V_{CO_2}$  і  $V_{O_2}$  (рис. 3.19).

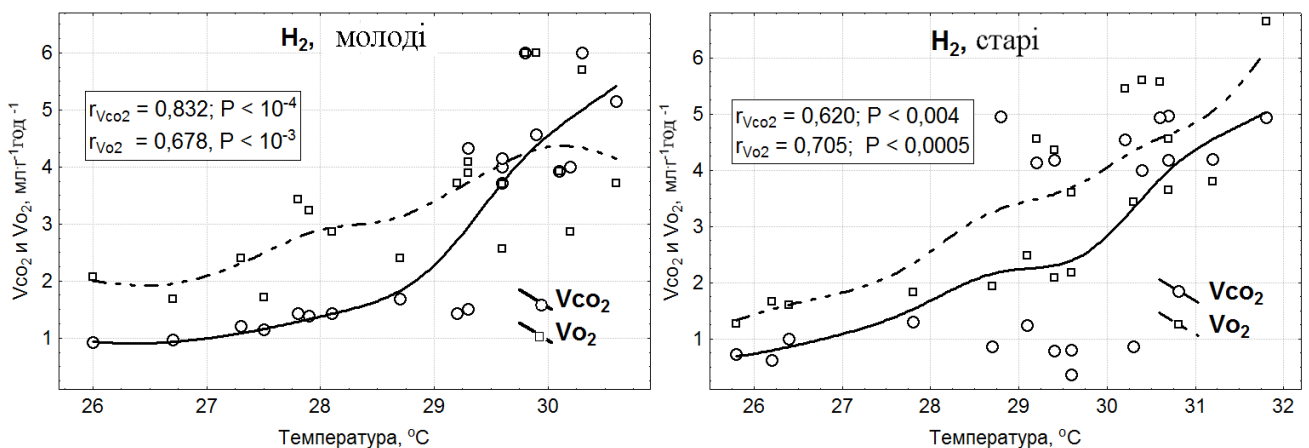


Рис. 3.19 Залежність температури поверхні тіла від  $V_{CO_2}$  і  $V_{O_2}$  у молодих і старих самців мишей лінії СВА при 3-годинній експозиції в ГГС, модельованому додаванням 25 %  $N_2$  до повітря на початку експозиції.

*Спонтанна рухова активність.* Динаміка змін частки сплячих, не сплячих і рухливих молодих і старих самців мишей при 3-годинній експозиції в асиметричному ГГС, модельованій додаванням 25 %  $N_2$ , багато в чому нагадувала аналогічні зміни, виявленні при додаванні  $N_2$  (рис. 3.20).

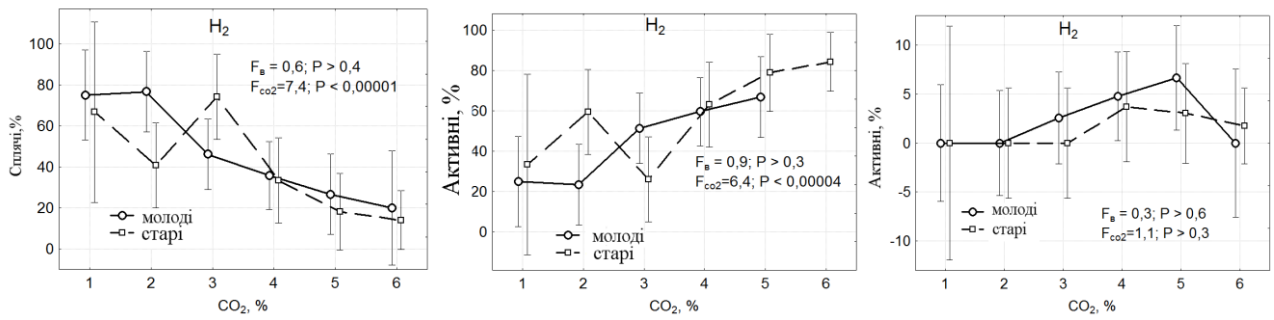


Рис. 3.20 Динаміка частки сплячих, не сплячих і активних молодих і старих самців мишей лінії СВА при підвищенні вмісту  $CO_2$  (%) в ГГС, модельованому додаванням 25 %  $H_2$  до повітря. Вірогідність вікових відмінностей ( $F_B$ ) і впливу  $CO_2$  ( $F_{CO_2}$ ) оцінювали за факторним ANOVA.

На перших етапах експерименту приблизно 70-80 % молодих і старих самців мишей сплять. У міру накопичення  $CO_2$  в атмосфері до кінця сеансу пробуджується до 70-80 % особин (рис. 3.20).

Таким чином, 3-годинна експозиція молодих і старих самців мишей в умовах ГГС із посиленням гіпоксичним компонентом з додавання 25 %  $H_2$  до повітря з початку сеансу, має багато подібного, але не ідентична з аналогічними дослідженнями з додаванням  $N_2$ . В обох випадках спостерігається високо достовірна кореляція між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$ . У міру накопичення  $CO_2$  в атмосфері більша частина мишей поступово переходить із категорії сплячих у не сплячі при мінімальній частці особин, що рухаються (<5 %). До кінця експозиції у піддослідних мишей спостерігається достовірне зниження ТПТ, яке позитивно корелює з  $V_{CO_2}$  і  $VO_2$  в обох вікових групах. Важливою специфічною рисою впливу такого ГГС може бути те, що  $H_2$  підсилює корелятивний зв'язок між  $VO_2$  і  $O_2$ , а також  $VO_2$  і ТПТ, які були відсутні в аналогічних дослідженнях з додаванням  $N_2$ .

#### 3.2.4. Гелій

За атомною масою і поширеністю у Всесвіті Не посідає друге місце після  $H_2$  [100]. Він належить до групи інертних газів, у яких хімічна інертність дивним чином сполучається з різноманіттям біологічних ефектів (див. розділ 1).

*Газообмін.* Утримування експериментальних мишей в атмосфері ГГС із додаванням 25 % гелію відрізнялося високою вірогідністю ефектів на  $V_{CO_2}$  ( $F_e = 61,1$ ;  $P < 10^{-30}$ ). При цьому також достовірними були вікові відмінності ( $F_b = 6,7$ ;  $P < 0,01$ ). Дані для  $V_{O_2}$  свідчать про помітно слабший вплив гелію на споживання  $O_2$  ( $F_e = 9,1$ ;  $P < 10^{-7}$  і  $F_b = 0,1$ ;  $P > 0,7$ ) (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

**Вплив тривалості експозиції (хв) на  $V_{CO_2}$  (мл·г<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>) і  $V_{O_2}$  (мл·г<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>) у молодих і старих самців мишей лінії СВА в асиметричному ГГС, модельованому додаванням до повітря 25 % He**

Параметр	Вік	Час, хв	N	$\bar{x} \pm SE$	$KB \pm SE$	$CK \pm SE$
$V_{CO_2}$	молоді	0-30	10	5,08±0,64	12,60±2,86	-0,87±0,69
$V_{O_2}$	молоді	0-30	10	4,12±1,30	31,59±7,74	1,73±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	30-60	10	3,54±0,72	20,37±4,74	-0,44±0,69
$V_{O_2}$	молоді	30-60	10	4,03±0,79	19,70±4,57	0,04±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	60-90	10	3,19±0,75	23,42±5,52	-1,0±0,69
$V_{O_2}$	молоді	60-90	10	3,45±1,19	34,43±8,56	-1,6±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	90-120	10	2,68±0,55	20,52±4,78	-0,37±0,69
$V_{O_2}$	молоді	90-120	10	2,67±0,98	36,68±9,24	-0,22±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	120-150	10	2,59±0,75	28,76±6,94	0,48±0,69
$V_{O_2}$	молоді	120-150	10	2,77±0,73	26,23±6,26	0,00±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	150-180	10	1,70±0,46	26,79±6,41	0,50±0,69
$V_{O_2}$	молоді	150-180	10	2,02±0,75	37,07±9,36	0,99±0,69
$V_{CO_2}$	старі	0-30	10	4,29±0,48	11,17±2,53	0,00±0,69
$V_{O_2}$	старі	0-30	10	3,28±0,56	17,19±3,96	1,10±0,69
$V_{CO_2}$	старі	30-60	10	3,33±0,78	23,31±5,49	0,80±0,69
$V_{O_2}$	старі	30-60	10	3,92±0,78	19,93±4,63	-0,77±0,69
$V_{CO_2}$	старі	60-90	10	3,06±0,45	14,72±3,36	0,13±0,69
$V_{O_2}$	старі	60-90	10	3,54±0,58	16,23±3,72	0,21±0,69
$V_{CO_2}$	старі	90-120	10	2,78±0,55	19,88±4,62	-0,17±0,69
$V_{O_2}$	старі	90-120	10	3,38±0,73	21,64±5,06	0,20±0,69
$V_{CO_2}$	старі	120-150	10	2,21±0,45	20,37±4,74	0,8±0,69
$V_{O_2}$	старі	120-150	10	2,26±1,68	74,06±23,98	-2,7±0,69
$V_{CO_2}$	старі	150-180	10	1,40±0,52	37,20±9,40	-1,5±0,69
$V_{O_2}$	старі	150-180	10	2,27±1,39	61,21±18,10	1,2±0,69

Прим.:  $\bar{x} \pm SE$  – середня величина ( $\bar{x}$ ) і стандартна помилка (SE) середньої;  $KB \pm SE$  – коефіцієнт варіації;  $CK \pm SE$  – скошеність.

Широкий спектр біологічної активності гелію чітко проявляється і за результатами корелятивного аналізу. При цьому, судячи з КІМ і динаміки залежності  $V_{CO_2}$  від  $CO_2$ , його ефекти впливу на швидкість окисних процесів ближчі до контрольної групи, а по залежності між  $V_{O_2}$  від  $O_2$  він більше нагадує ефекти  $N_2$ . З представлених на рис. 3.21 графіків слідує, що в експерименті з He для залежності  $V_{CO_2}$  від  $CO_2$  КІМ для молодих (9,0 %) і старих мишей (8,1 %) мало відрізняється від аналогічних величин, виявлених у контрольній групі.

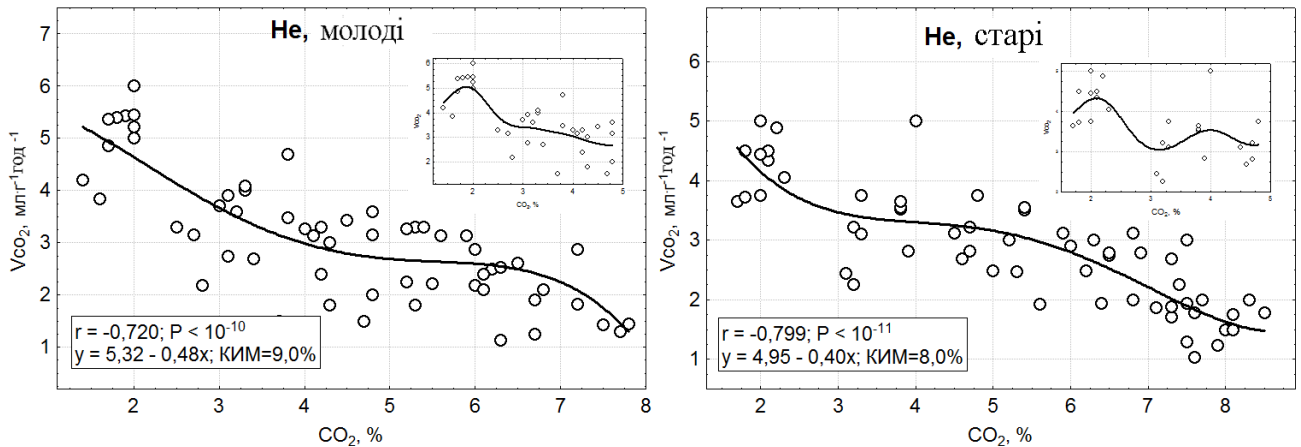


Рис. 3.21. Залежність  $V_{CO_2}$  від вмісту  $CO_2$  в атмосфері при інкубації молодих і старих самців мишей лінії СВА в ГГС із посиленням компонентом гіпоксії, модельованим додаванням до повітря 25 % He на початку досліду. Наведено коефіцієнти кореляції, лінійної регресії і КІМ між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$ . Графік у вкладиші вказує динаміку  $V_{CO_2}$  на I і II фазах експерименту ( $CO_2 < 5\%$ ).

Аналіз залежності між  $V_{O_2}$  і  $O_2$  в атмосфері з додаванням He, як і аналогічна залежність між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$ , указує на проміжне положення ефектів He, у порівнянні з ефектами, характерними для контрольної групи і мишей, що утримуються в атмосфері з додаванням  $N_2$  (рис. 3.22).

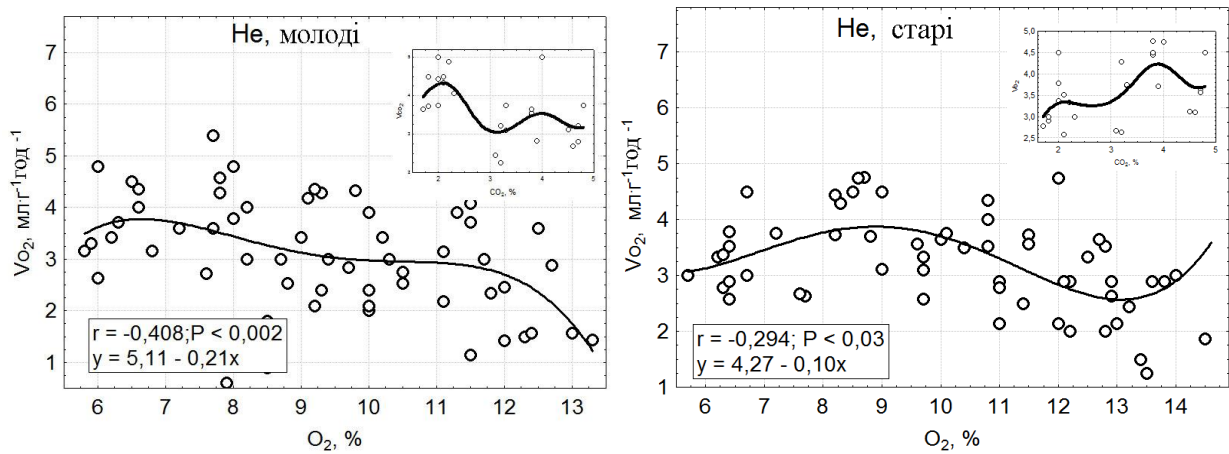


Рис. 3.22 Залежність  $V_{O_2}$  від вмісту  $O_2$  у повітрі при інкубації молодих і старих самців мишей лінії СВА в ГГС із посиленням компонентом гіпоксії, модельованим додаванням до повітря 25 % He на початку дослідження. Наведено коефіцієнти кореляції і лінійної регресії між  $V_{O_2}$  і  $O_2$ . Графік у вкладиші вказує динаміку  $V_{O_2}$  на першій і другій фазі експерименту ( $CO_2 < 5\%$ ).

Із представлених даних слідує, що хоча у випадку He між  $V_{O_2}$  і  $O_2$  існує значима негативна залежність в обох вікових групах, КІМ, коефіцієнти кореляції і їхньої вірогідності (КІМ = 4,1;  $r = -0,408$ ;  $P < 0,002$  у молодих і КІМ = 2,3;  $r = -0,204$ ;  $P < 0,03$  у старих) істотно нижчі, ніж аналогічні величини в контрольній групі (КІМ = 5,8;  $r = -0,490$ ;  $P < 0,0001$  у молодих, КІМ = 6,6;  $r = -0,643$ ;  $P < 10^{-7}$  у старих), але вищі, ніж у групі з додаванням  $N_2$  (КІМ = -2,8;  $r = 0,136$ ;  $P > 0,3$  у молодих і КІМ = 2,4;  $r = -0,284$ ;  $P < 0,03$  у старих) (див. рис. 3.9, 3.13 і 3.22).

*Температура поверхні тіла.* ТПТ у самців обох вікових груп вірогідно знижувалася до кінця експозиції в атмосфері з добавками гелію. Як і в інших дослідках з ГГС, у цій серії дослідів високо достовірний вплив підвищеного рівня  $CO_2$  і зниженої кількості  $O_2$ , разом з He ( $P < 10^{-15}$ ) сполучається зі слабким впливом віку ( $P > 0,8$ ). Так, після 3 годин впливу температура тіла молодих мишей знизилася з  $29,4 \pm 0,4$  °C до  $26,8 \pm 0,4$  °C, а температура старих мишей упала з  $29,8 \pm 0,4$  °C на початку експерименту до  $26,7 \pm 0,4$  °C у кінці. У цілому, графік зниження температури практично ідентичний графіку ТПТ у контрольних тварин (рис. 3.10).

Між ТПТ і рівнем газообміну була виявлена високо достовірна позитивна корелятивна залежність (3.23).

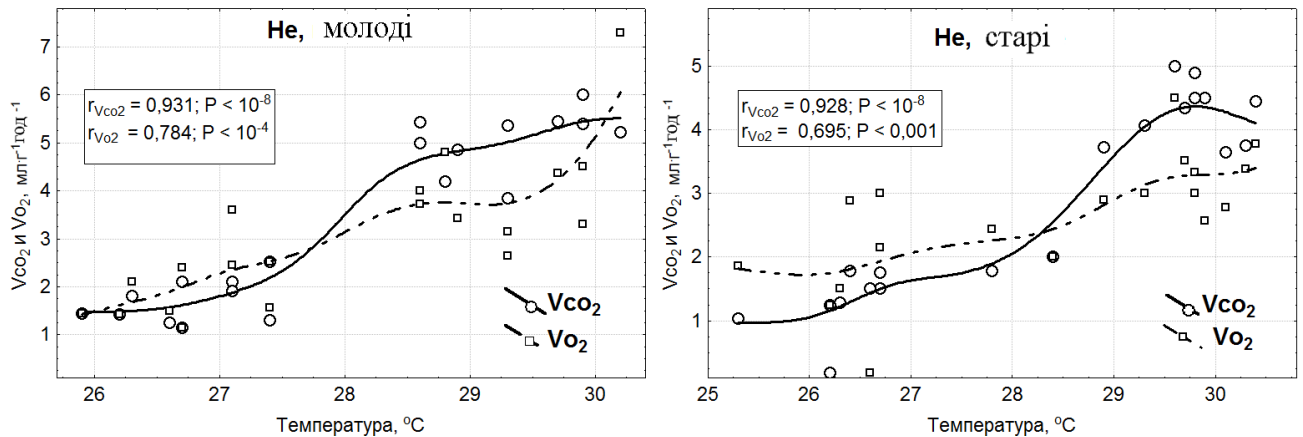


Рис.3.23 Залежність між температурою поверхні тіла і рівнем газообміну ( $V_{CO_2}$  і  $VO_2$ ) у молодих і старих самців мишей лінії СВА при 3-годинній експозиції в асиметричному ГГС, модельованому додаванням 25 % He до повітря на початку експозиції.

*Спонтанна рухова активність.* У міру посилення гіпоксії і гіперкапнії в атмосфері з додаванням гелію, як і в інших аналогічних серіях дослідів, частина сплячих переходить у категорію не сплячих, і тих, що рухаються, що може вказувати на прояв ознак занепокоєння (рис. 3.24).

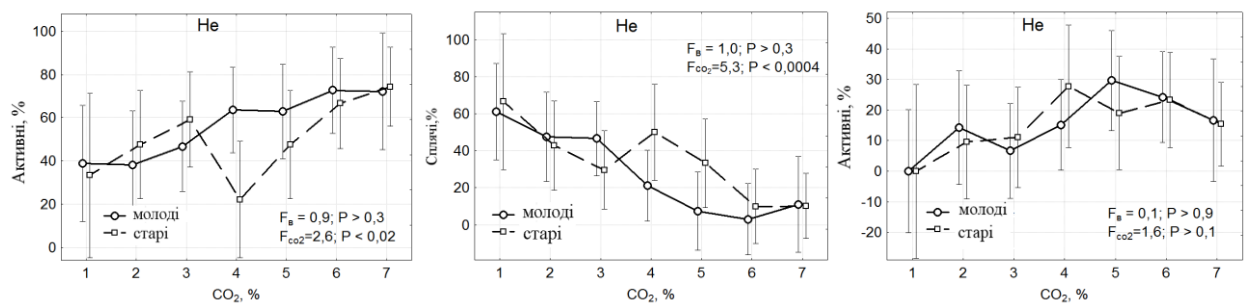


Рис. 3.24 Динаміка частки сплячих, не сплячих, і тих, що рухаються молодих і старих самців мишей лінії СВА по мірі підвищення вмісту  $CO_2$  (%) при ГГС, модельованим додаванням 25 % He до повітря. Вірогідність вікових відмінностей ( $F_B$ ) і впливу  $CO_2$  ( $F_{CO_2}$ ) оцінювали факторним ANOVA.

У цілому, результати ANOVA свідчать про те, що вірогідність впливу  $CO_2$  в атмосфері на моторну активність нижча, ніж у випадках з газообміном і

терморегуляцією. При цьому відмінності впливу факторів, пов'язаних з віком, мінімальні і залишаються істотно нижчими границі вірогідності.

Таким чином, посилення гіпоксичного компоненту ГГС шляхом додавання 25 %  $\text{Ne}$  до повітря приводить до істотних змін інтенсивності окисних процесів, терморегуляції і рухової активності. При цьому зберігається перехід від фаз активації газообміну до фази стабільності при вмісті  $\text{CO}_2$  до 5 %. Тільки при більш високих концентраціях спостерігається явне превалювання пригнічуючого впливу  $\text{CO}_2$  на рівень обмінних процесів. Судячи з КІМ і коефіцієнтів кореляції, і на цій моделі асиметричного ГГС зберігається домінуючий вплив гіперкапнії, у порівнянні з гіпоксією.

### 3.2.5. Аргон

Аргон, вміст якого в атмосфері землі наближається до 1 %, є найбільш поширеним і доступним інертним газом [29].

*Газообмін.* У порівнянні із попередніми атмосферами, ГГС модельоване додаванням 25 %  $\text{Ar}$ , показало порівняно слабкі ефекти як на  $V_{\text{CO}_2}$  ( $F_e = 9,7$ ;  $P < 10^{-7}$  і  $F_v = 0,1$ ;  $P > 0,3$ ), так і на  $V_{\text{O}_2}$  ( $F_e = 12,2$ ;  $P < 10^{-8}$  і  $F_v = 0,01$ ;  $P > 0,9$ ) (табл. 3.5).

**Вплив тривалості експозиції (хв) на  $V_{CO_2}$  (мл·г<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>) і  $V_{O_2}$  (мл·г<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>) у молодих і старих самців мишей лінії СВА в асиметричному ГГС, модельованим додаванням до повітря 25 % Ar**

Параметр	Вік	Час, хв	N	$\bar{x} \pm SE$	$KB \pm SE$	$CK \pm SE$
$V_{CO_2}$	молоді	0-30	10	4,57±0,20	13,75±3,13	0,16±0,69
$V_{O_2}$	молоді	0-30	10	3,58±0,38	33,56±8,31	0,15±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	30-60	10	3,06±0,28	29,02±7,01	0,42±0,69
$V_{O_2}$	молоді	30-60	10	3,84±0,32	26,25±6,26	1,04±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	60-90	10	2,88±0,29	31,57±7,73	0,31±0,69
$V_{O_2}$	молоді	60-90	10	3,82±0,22	17,97±4,15	0,52±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	90-120	10	2,69±0,24	28,20±6,79	-0,02±0,69
$V_{O_2}$	молоді	90-120	10	2,85±0,32	35,76±8,96	-0,01±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	120-150	10	1,81±0,23	39,68±10,18	0,61±0,69
$V_{O_2}$	молоді	120-150	10	2,62±0,37	45,29±12,03	1,84±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	150-180	10	1,64±0,13	25,77±6,13	-0,18±0,69
$V_{O_2}$	молоді	150-180	10	2,16±0,22	31,54±7,72	-1,32±0,69
$V_{CO_2}$	старі	0-30	10	4,19±0,39	29,40±7,12	1,28±0,69
$V_{O_2}$	старі	0-30	10	3,46±0,24	21,95±5,14	-0,30±0,69
$V_{CO_2}$	старі	30-60	10	4,20±1,16	87,54±31,15	2,92±0,69
$V_{O_2}$	старі	30-60	10	4,41±0,26	18,31±4,23	1,80±0,69
$V_{CO_2}$	старі	60-90	10	2,68±0,28	32,89±8,11	0,12±0,69
$V_{O_2}$	старі	60-90	10	3,67±0,17	15,00±3,43	0,20±0,69
$V_{CO_2}$	старі	90-120	10	2,86±0,13	14,79±3,38	0,10±0,69
$V_{O_2}$	старі	90-120	10	3,71±0,22	18,59±4,30	0,27±0,69
$V_{CO_2}$	старі	120-150	10	1,81±0,12	20,45±4,76	-0,24±0,69
$V_{O_2}$	старі	120-150	10	2,54±0,33	40,46±10,42	-0,33±0,69
$V_{CO_2}$	старі	150-180	10	1,39±0,12	26,10±6,22	0,50±0,69
$V_{O_2}$	старі	150-180	10	1,00±0,89	27,64±7,06	-1,72±0,69

Прим.:  $\bar{x} \pm SE$  – середня величина ( $\bar{x}$ ) і стандартна помилка (SE) середньої;  $KB \pm SE$  – коефіцієнт варіації;  $CK \pm SE$  – скошеність.

При цьому корелятивна залежність між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$  істотно не відрізнялася від такої, виявленої у контрольній групі (рис. 3.25).

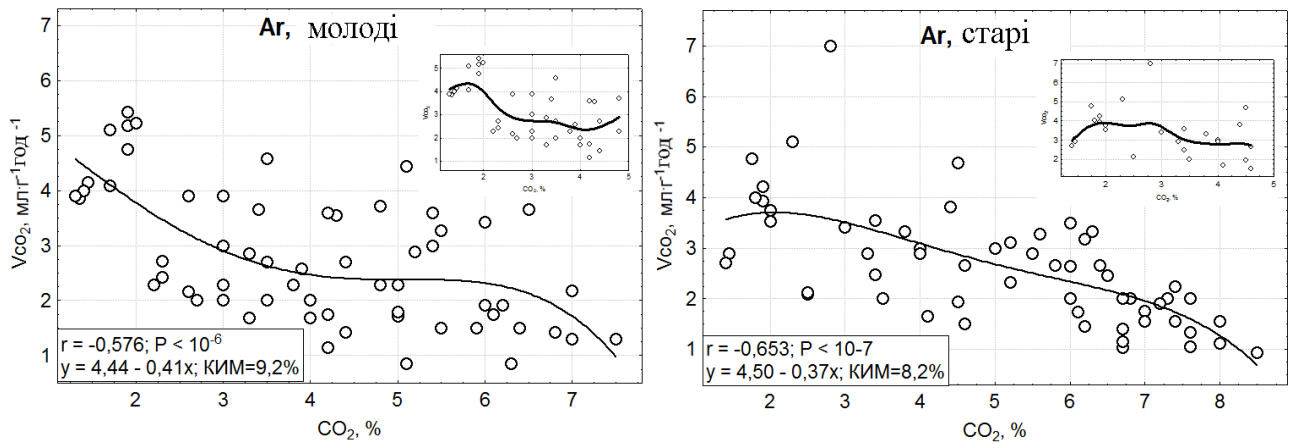


Рис. 3.25 Залежність  $V_{CO_2}$  від вмісту  $CO_2$  при інкубації молодих і старих самців мишей лінії СВА в ГГС із посиленням компонентом гіпоксії, модельованим додаванням до повітря 25 %  $Ar$  на початку дослідження. Наведено коефіцієнти кореляції і лінійної регресії між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$ . Графік у вкладиші вказує динаміку  $V_{CO_2}$  на першій і другій фазі експерименту ( $CO_2 < 5\%$ ).

У молодих і старих самців мишей КІМ (відповідно 9,2 % і 8,2 %), коефіцієнти кореляції і динаміка зниження  $V_{CO_2}$  були приблизно такими ж, як і в контрольній групі (див. рис. 3.8 і 3.25).

Що стосується залежності між  $V_{O_2}$  і вмістом  $O_2$  у повітрі, то тут спостерігалось помітне ослаблення в порівнянні з контролем (рис. 3.26).

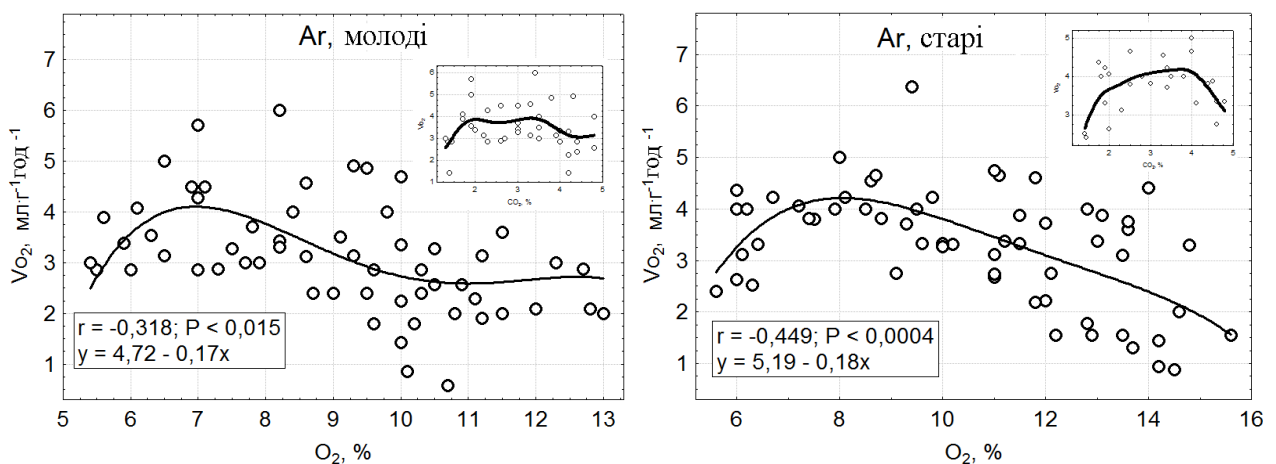


Рис. 3.26 Залежність  $V_{O_2}$  від вмісту  $O_2$  при інкубації молодих і старих самців мишей лінії СВА в ГГС із посиленням компонентом гіпоксії, модельованим додаванням до повітря 25 %  $Ar$  на початку дослідження. Наведено коефіцієнти кореляції і лінійної регресії між  $V_{O_2}$  і  $O_2$ . Графік у вкладиші вказує динаміку  $V_{O_2}$  на першій і другій фазі експерименту ( $CO_2 < 5\%$ ).

КІМ у молодих (3,7 %) і старих (3,5 %) мишей були майже вдвічі нижче, ніж у контрольній групі. Істотні відмінності виявлені і для коефіцієнтів кореляції і регресії, а також у структурі переходу фаз.

*Температура поверхні тіла.* Температура поверхні тіла молодих і старих самців мишей лінії СВА вірогідно знижувалася в ході 3-годинного сеансу асиметричного ГГС, модельованого додаванням 25 % Ar до повітря. Так ТПТ у молодих тварин знизилася з  $30 \pm 0,7$  °C до  $28,1 \pm 0,7$  °C, а у старих мишей зниження відбулося з температури  $30,7 \pm 0,7$  °C до  $27,9 \pm 0,7$  °C. Достовірних вікових відмінностей, як і в інших групах, не було. Що свідчить про вплив ГГС на температуру незалежно від віку піддослідних тварин. У цілому, графік зниження температури практично ідентичний графіку ТПТ у контрольних тварин (рис. 3.10).

Зміни ТПТ корелювали з  $V_{CO_2}$  і  $Vo_2$  в обох вікових групах, причому кореляції з  $V_{CO_2}$  істотно вищі, ніж з  $Vo_2$  (рис. 3.27).

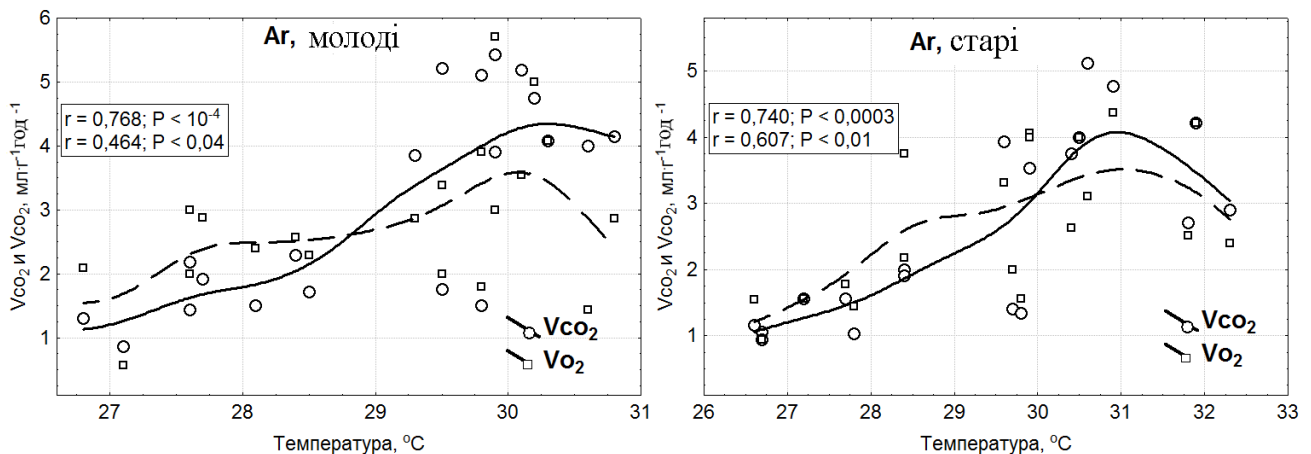


Рис. 3.27 Залежність температури поверхні тіла від  $V_{CO_2}$  і  $Vo_2$  у молодих і старих самців мишей лінії СВА при 3-годинній експозиції в ГГС, модельованим додаванням 25 % Ar до повітря на початку експозиції.

*Спонтанна рухова активність.* Як і інших аналогічних серіях дослідів, додавання Ar до ГГС приводило до поступового зниження частки сплячих і збільшенню частки не сплячих особин (рис. 3.28).

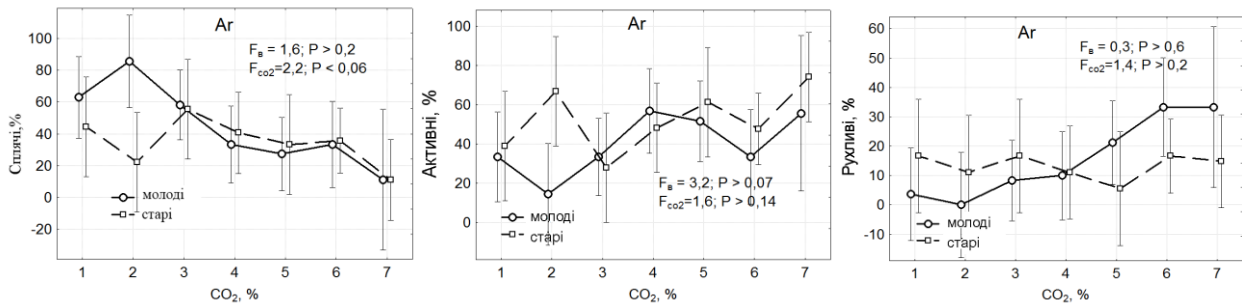


Рис. 3.28 Динаміка частки сплячих, не сплячих і рухливих молодих і старих самців мишей лінії СВА в міру підвищення вмісту  $\text{CO}_2$  (%) при ГГС, модельованому додаванням 25 % Ar до повітря. Вірогідність вікових відмінностей ( $F_b$ ) і впливу  $\text{CO}_2$  ( $F_{\text{CO}_2}$ ) оцінювали факторним ANOVA.

Зміни частки рухливих молодих і старих мишей були статистично незначущими.

### 3.2.6. Кисень

На відміну від дослідів з посиленням гіпоксичного компонента ГГС, модельованого додаванням до повітря  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{Ne}$  або Ar, метою цієї серії дослідів було, навпроти, ослаблення гіпоксії, що забезпечувалося шляхом додавання близько 8 %  $\text{O}_2$  в атмосферу перед початком ГГС. Природно, що при цьому піддослідні миші починали сеанс із гіпероксії, потім після короткого проміжку нормоксії, переходили у відносно слабку гіпоксію до кінця експерименту, на тлі більш істотного посилення гіперкапнії.

*Газообмін.* Судячи з результатів ANOVA, додаванням  $\text{O}_2$  з початку сеансу ГГС практично не впливає на  $V_{\text{CO}_2}$  ( $F_b = 27,3$ ;  $P < 10^{-30}$ ), але істотно змінює динаміку  $V_{\text{O}_2}$  ( $F_b = 5,3$ ;  $P < 10^{-3}$ ). При цьому привертає увагу істотне збільшення і вірогідність F-критеріїв віку як для  $V_{\text{CO}_2}$  ( $F_b = 5,4$ ;  $P < 0,02$ ), так і особливо для  $V_{\text{CO}_2}$  ( $F_b = 17,5$ ;  $P < 0,0006$ ) (табл. 3.6).

**Вплив тривалості експозиції (хв) на  $V_{CO_2}$  ( $мл \cdot г^{-1} \cdot хв^{-1}$ ) і  $V_{O_2}$  ( $мл \cdot г^{-1} \cdot хв^{-1}$ ) у молодих і старих самців мишей лінії СВА в асиметричному ГГС, модельованому додаванням до повітря 8 %  $O_2$**

Параметр	Вік	Час, хв	N	$\bar{x} \pm SE$	$KB \pm SE$	$CK \pm SE$
$V_{CO_2}$	молоді	0-30	10	4,96±0,32	20,42±4,75	0,65±0,69
$V_{O_2}$	молоді	0-30	10	4,79±0,21	14,07±3,21	0,95±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	30-60	10	2,93±0,23	24,51±5,8	-0,08±0,69
$V_{O_2}$	молоді	30-60	10	4,71±0,16	11,03±2,5	0,06±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	60-90	10	2,55±0,32	40,16±10,33	0,47±0,69
$V_{O_2}$	молоді	60-90	10	4,07±0,43	33,31±8,23	0,03±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	90-120	10	3,06±0,27	28,33±6,82	-0,46±0,69
$V_{O_2}$	молоді	90-120	10	4,81±0,31	20,12±4,68	0,00±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	120-150	10	2,49±0,19	24,75±5,86	-0,02±0,69
$V_{O_2}$	молоді	120-150	10	4,50±0,29	20,45±4,76	0,66±0,69
$V_{CO_2}$	молоді	150-180	10	1,97±0,08	12,48±2,83	-0,19±0,69
$V_{O_2}$	молоді	150-180	10	3,80±0,23	19,24±4,46	-1,27±0,69
$V_{CO_2}$	старі	0-30	10	4,04±0,31	24,26±5,74	0,66±0,69
$V_{O_2}$	старі	0-30	10	4,41±0,20	14,55±3,32	-0,04±0,69
$V_{CO_2}$	старі	30-60	10	2,65±0,26	31,16±7,61	0,01±0,69
$V_{O_2}$	старі	30-60	10	3,89±0,22	18,00±4,15	0,24±0,69
$V_{CO_2}$	старі	60-90	10	2,66±0,21	25,41±6,04	0,18±0,69
$V_{O_2}$	старі	60-90	10	3,72±0,20	16,75±3,85	-0,46±0,69
$V_{CO_2}$	старі	90-120	10	2,78±0,24	27,55±6,61	-0,20±0,69
$V_{O_2}$	старі	90-120	10	3,95±0,38	30,30±7,37	-1,94±0,69
$V_{CO_2}$	старі	120-150	10	2,21±0,23	33,18±8,20	-1,08±0,69
$V_{O_2}$	старі	120-150	10	3,72±0,35	29,68±7,20	1,17±0,69
$V_{CO_2}$	старі	150-180	10	1,64±0,16	30,85±7,53	-0,82±0,69
$V_{O_2}$	старі	150-180	10	2,54±0,50	62,24±18,54	-1,89±0,69

Прим.:  $\bar{x} \pm SE$  – середня величина ( $\bar{x}$ ) і стандартна помилка (SE) середньої;  $KB \pm SE$  – коефіцієнт варіації;  $CK \pm SE$  – скошеність.

Як показують дані корелятивного аналізу, залежність між  $V_{CO_2}$  і вмістом  $CO_2$  при ГГС із додаванням  $O_2$ , також зберігає високо достовірну негативну кореляцію і трифазність переходу від активації до інгібування (рис. 3.29).

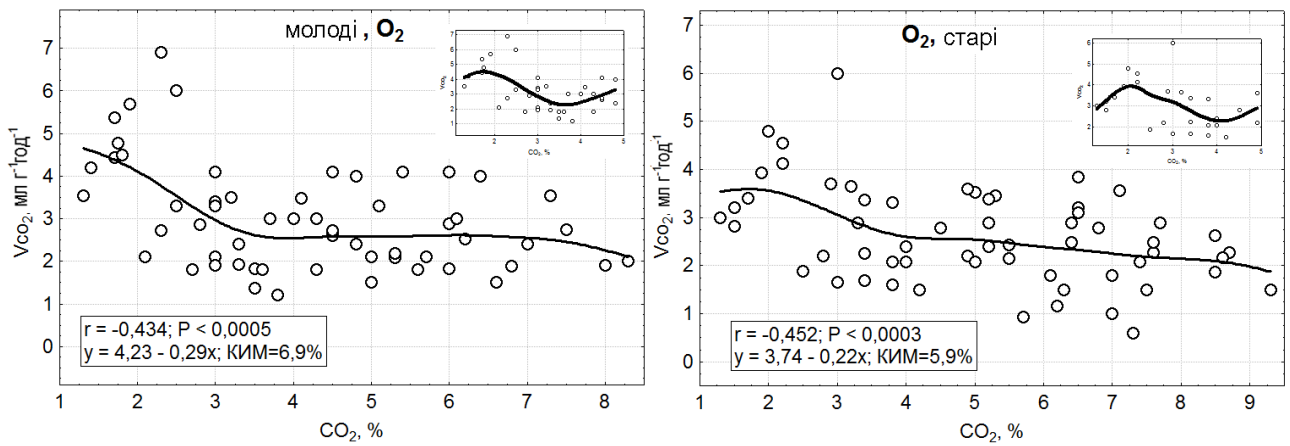


Рис. 3.29 Залежність  $V_{CO_2}$  від вмісту  $CO_2$  при інкубації молодих і старих самців мишей лінії СВА в ГГС із послабленням гіпоксії при додаванні до повітря близько 8 %  $O_2$  на початку дослідження. Наведено коефіцієнти кореляції і лінійної регресії між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$ . Графік у вкладкиші вказує динаміку  $V_{CO_2}$  на I і II фазах експерименту ( $CO_2 < 5\%$ ).

Привертає на себе увага те, що КИМ і коефіцієнти кореляції при цьому менші, ніж в аналогічних дослідженнях з посиленням гіпоксії. У цих дослідженнях не так чітко виражений перехід від фази стабільності до інгібування (рис. 3.29).

Інші закономірності були виявлені при аналізі залежності між  $V_{O_2}$  і  $O_2$  на цій моделі ГГС. Щоб уникнути труднощів, пов'язаних з ідентифікацією переходу від гіпероксії до гіпоксії, у даній серії по осі абсцис зазначений не рівень гіпоксії, а абсолютні значення вмісту  $O_2$  в атмосфері (рис. 3.30).

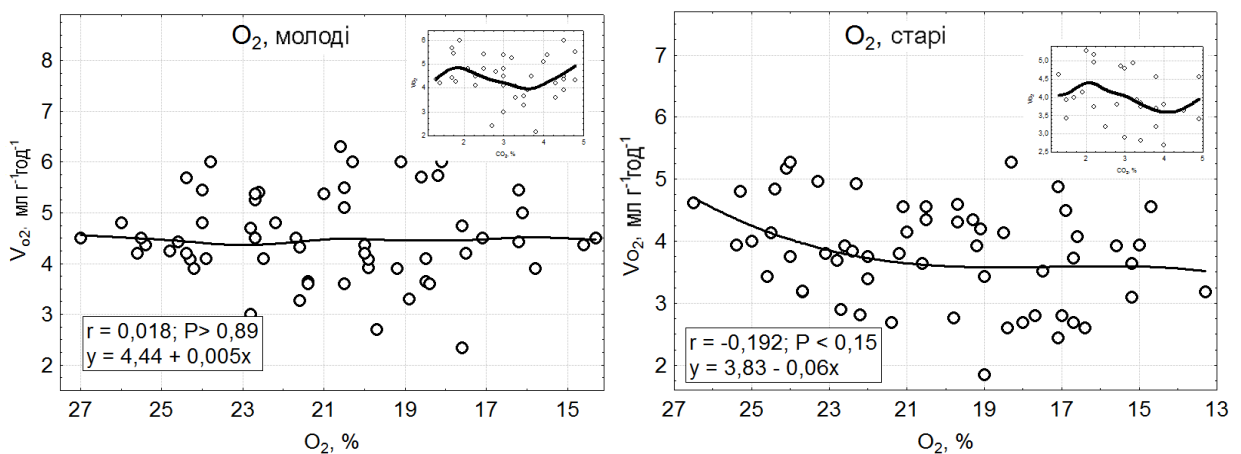


Рис. 3.30. Залежність  $V_{O_2}$  від вмісту  $O_2$  при інкубації молодих і старих самців мишей лінії СВА в ГГС із послаблення гіпоксії при додаванні до повітря 8 %  $O_2$  на початку дослідження. Наведено коефіцієнти кореляції і лінійної регресії

між  $V_{O_2}$  і  $O_2$ . Графік у вкладиші вказує динаміку  $V_{O_2}$  на першій і другій фазах експерименту ( $CO_2 < 5\%$ ).

Із представлених даних видно, що при гіпероксії відсутня значима кореляція між  $V_{O_2}$  і  $O_2$ . Відповідні величини КІМ і коефіцієнтів кореляції близькі до нульових значень.

*Температура поверхні тіла.* Через менше інгібування окисних процесів, зниження ТПТ у цій серії було найменшим з випробуваних атмосфер, і склало близько  $1\text{ }^\circ\text{C}$ . Початкова ТПТ у молодих мишей становила  $30,2 \pm 0,4\text{ }^\circ\text{C}$ , до кінця ж експерименту вона впала до  $29,2 \pm 0,4\text{ }^\circ\text{C}$ . Тут, як і в експериментах з іншими атмосферами цієї серії, вплив експозиції відрізнявся високою вірогідністю ( $P < 10^{-5}$ ), незалежно від віку тварин ( $P > 0,8$ ).

*Залежність ТПТ від  $V_{CO_2}$  і  $V_{O_2}$*  при цьому також відрізняється від інших серій (рис. 3.31).

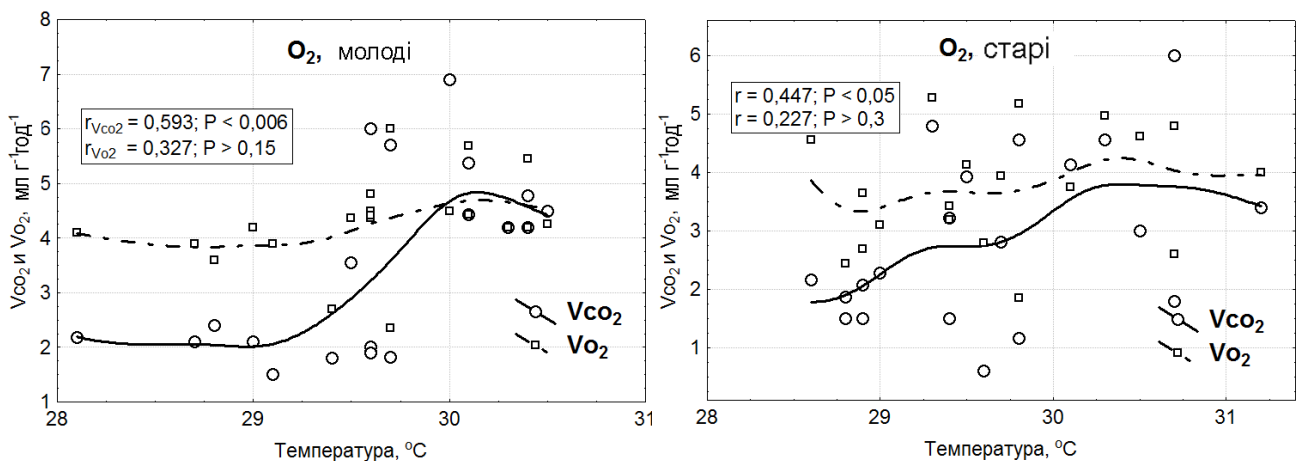


Рис. 3.31. Залежність температури поверхні тіла від  $V_{CO_2}$  і  $V_{O_2}$  у молодих і старих самців мишей лінії СВА при 3-годинній експозиції в ГГС, модельованому додаванню  $8\% O_2$  до повітря на початку експозиції.

Знову звертає на себе увагу те, що значима кореляція виявлена тільки між ТПТ і  $V_{CO_2}$ , тоді як аналогічна залежність із  $V_{O_2}$  незначима.

*Спонтанна рухова активність.* Ослаблення гіпоксичного компоненте ГГС шляхом додавання  $O_2$  в атмосферу приводило до істотних змін частки сплячих, не сплячих і рухливих молодих і старих самців мишей (рис. 3.32).

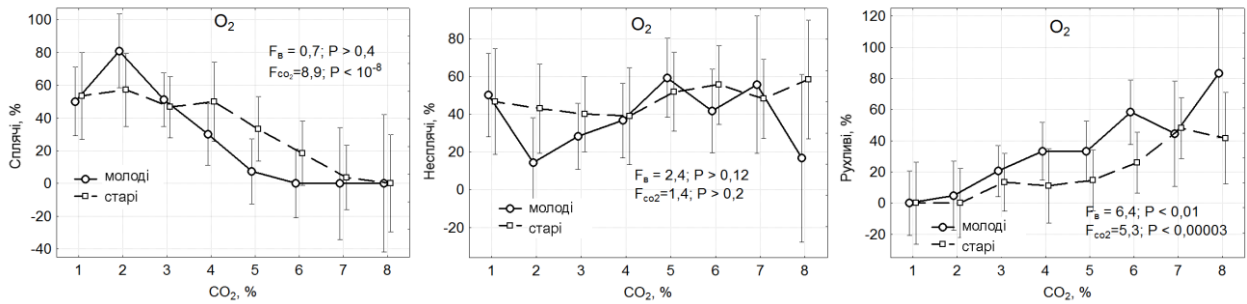


Рис. 3.32. Динаміка частки сплячих, не сплячих і рухливих молодих і старих самців мишей лінії СВА при підвищенні вмісту  $\text{CO}_2$  (%) в ГГС, модельованому додаванням 8 %  $\text{O}_2$  до повітря. Вірогідність вікових відмінностей ( $F_{\text{в}}$ ) і впливу  $\text{CO}_2$  ( $F_{\text{со}_2}$ ) оцінювали факторним ANOVA.

При цьому в міру підвищення в атмосфері вмісту  $\text{CO}_2$  прогресивно знижуються частки сплячих і не сплячих мишей і відповідно росте частка особин, що рухаються, що досягає до 50-60 % до кінця експозиції (рис. 3.32).

Таким чином, ослаблення гіпоксичного компоненту ГГС додаванням  $\text{O}_2$  в атмосферу призводить до помітних змін динаміки досліджуваних змінних, серед яких виділяються відсутність кореляції між  $V_{\text{O}_2}$  і  $\text{O}_2$ , менше зниження ТПТ і збільшення частки особин, що рухаються, до кінця сеансу. Отримані дані свідчать про те, що негативна залежність між  $V_{\text{CO}_2}$  і  $\text{CO}_2$  залишається незмінною і на цій моделі. Разом з тим зміни газового складу атмосфери можуть забезпечити певну специфічність зрушень інших досліджених змінних.

### 3.2.7. Вуглекислий газ

У наступній серії дослідів вивчили вплив посилення гіперкапічного компоненту ГГС при додаванні близько 4 %  $\text{CO}_2$  до повітря з початку сеансу. Вже на початку сеансу концентрації  $\text{CO}_2$  були приблизно рівними величинам, які утворилися до початку третьої фази у контрольних мишей (див. рис. 3.8).

*Газообмін.* Виявилося, що додавання 4 %  $\text{CO}_2$  до повітря було досить, щоб майже вдвічі знизити  $V_{\text{CO}_2}$  із самого початку експозиції. Скошеність ( $\text{СК} \pm \text{SE}$ ) вірогідно не відрізнялася від нуля, що не суперечило можливості застосування

параметричних методів аналізу, зокрема, двофакторного ANOVA. У міру збільшення тривалості експозиції в такому ГГС вміст CO<sub>2</sub> у повітрі продовжував повільно рости, а величина V<sub>CO<sub>2</sub></sub> знижуватися. Вікові відмінності динаміки V<sub>O<sub>2</sub></sub>, невірогідні у контрольних мишей або мишей в асиметричному ГГС, стають достовірними при зміні вмісту O<sub>2</sub> або CO<sub>2</sub> з початку експозиції (див. табл. 3.6 і 3.7).

Таблиця 3.7

**Вплив тривалості експозиції (хв) на V<sub>CO<sub>2</sub></sub> (мл·г<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>) і V<sub>O<sub>2</sub></sub> (мл·г<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>) у молодих і старих самців мишей лінії СВА в ГГС, модельованому додаванням до повітря 3-4 % CO<sub>2</sub>**

Параметр	Вік	Час, хв	N	$\bar{x} \pm SE$	$KB \pm SE$	$CK \pm SE$
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	молоді	0-30	10	2,43±0,25	32,41±7,97	0,51±0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	молоді	0-30	10	5,94±0,33	17,38±4,00	-0,42±0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	молоді	30-60	10	1,75±0,28	49,80±13,62	-0,02±0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	молоді	30-60	10	2,55±0,21	26,13±6,23	-0,39±0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	молоді	60-90	10	1,66±0,23	44,29±11,69	0,13±0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	молоді	60-90	10	4,28±0,62	45,53±12,11	0,33±0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	молоді	90-120	10	1,81±0,43	74,29±24,10	-0,20±0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	молоді	90-120	10	3,66±0,61	52,95±14,79	-1,39±0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	молоді	120-150	10	1,80±0,48	83,94±29,13	1,22±0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	молоді	120-150	10	3,71±0,62	52,56±14,64	-0,19±0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	молоді	150-180	10	1,82±0,46	80,28±27,16	1,20±0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	молоді	150-180	10	3,62±0,77	67,00±20,64	-0,49±0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	старі	0-30	10	2,14±0,23	34,23±8,50	0,85±0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	старі	0-30	10	4,21±0,45	34,01±8,44	-0,75±0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	старі	30-60	10	1,84±0,27	45,50±12,10	1,49±0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	старі	30-60	10	2,85±0,25	27,76±6,67	0,57±0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	старі	60-90	10	1,92±0,34	55,26±15,68	1,57±0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	старі	60-90	10	3,30±0,25	23,96±5,66	-0,01±0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	старі	90-120	10	1,46±0,23	49,86±13,64	0,07±0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	старі	90-120	10	3,24±0,25	24,84±5,89	0,57±0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	старі	120-150	10	1,50±0,24	51,07±14,09	0,48±0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	старі	120-150	10	2,68±0,42	49,29±13,43	0,24±0,69
V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	старі	150-180	10	1,34±0,42	99,29±38,27	0,18±0,69
V <sub>O<sub>2</sub></sub>	старі	150-180	10	3,35±0,48	45,76±12,19	-0,72±0,69

Прим.:  $\bar{x} \pm SE$  – середня величина ( $\bar{x}$ ) і стандартна помилка (SE) середньої;  
**KB±SE** – коефіцієнт варіації; **CK±SE** – скошеність.

На тлі зростаючого розкиду (КВ нерідко перевищував 80-90 %) зміни були недостатні для достовірних F-критеріїв експозиції ( $F_e = 1,2$ ;  $P > 0,3$ ) або віку ( $F_v = 1,0$ ;  $P > 0,3$ ). Відповідні критерії для  $V_{CO_2}$ , навпроти, були достовірними ( $F_e = 5,3$ ;  $P < 10^{-4}$  і  $F_v = 17,5$ ;  $P < 10^{-3}$ ).

Судячи з коефіцієнтів регресії і кореляції, у такій атмосфері рівень  $V_{CO_2}$  знижується нижче контрольного рівня із самого початку експозиції і зберігається на низькому рівні протягом досліджуваного строку (рис. 3.33).

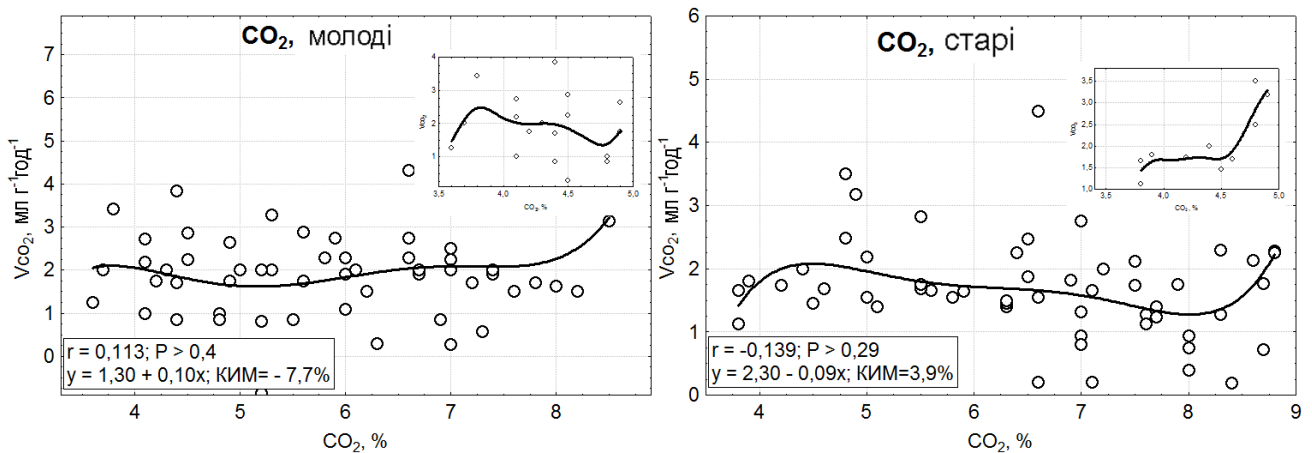


Рис. 3.33. Залежність  $V_{CO_2}$  від вмісту  $CO_2$  при інкубації молодих і старих самців мишей лінії СВА в ГГС із посиленням гіперкапнії, модельованим додаванням до повітря 3-4 %  $CO_2$  на початку досліджу. Наведено коефіцієнти кореляції і лінійної регресії між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$ . Графік вкладиші вказує динаміку  $V_{CO_2}$  першої і другої фаз експерименту ( $CO_2 < 5\%$ ).

З представлених графіків видно, що  $V_{CO_2}$  в обох вікових групах відразу знижується і зберігається на рівні, близькому до  $2 \text{ мл}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{год}^{-1}$  при наступному збільшенні вмісту  $CO_2$  в атмосфері.

При цьому мало змінюється також залежність між  $V_{O_2}$  і  $O_2$ , в результаті чого коефіцієнти кореляції в обох вікових групах недостовірні (рис. 3.34).  $V_{O_2}$  обох вікових груп, як і  $V_{CO_2}$ , знижується майже вдвічі, у порівнянні з контролем і зберігається на такому рівні протягом усього сеансу, незважаючи на прогресивне посилення гіпоксії і гіперкапнії.

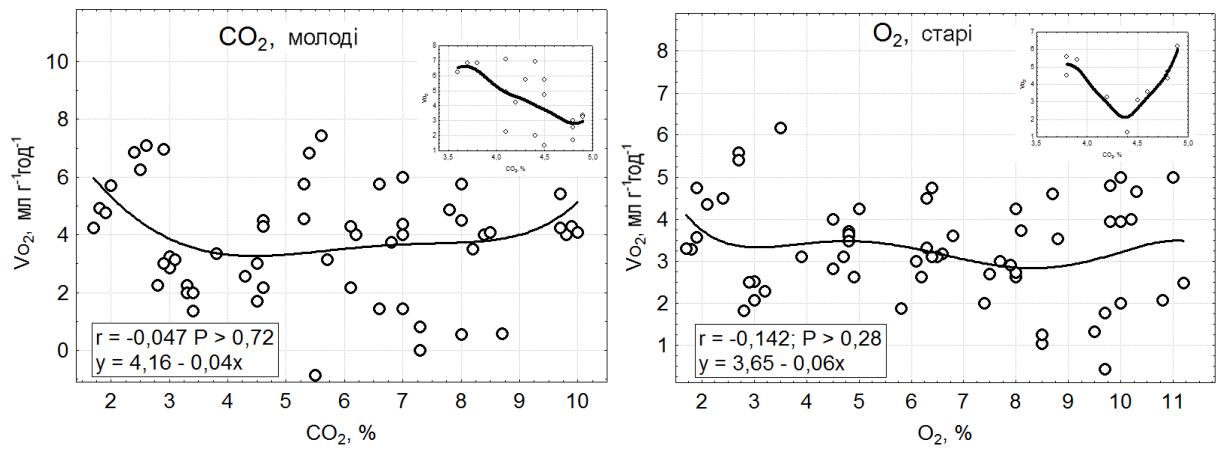


Рис. 3.34. Залежність  $Vo_2$  від вмісту  $O_2$  при інкубації молодих і старих самців мишей лінії СВА в ГГС із посиленням гіперкапнії, модельованим додаванням до повітря 3–4 %  $CO_2$  на початку досліду. Наведено коефіцієнти кореляції і лінійної регресії між  $Vo_2$  і  $O_2$ . Графік у вкладиші вказує динаміку  $Vo_2$  на першій і другій фазах експерименту ( $CO_2 < 5\%$ ).

На відміну від дослідів із симетричним ГГС, а також дослідів з посиленням гіпоксичного компонента за допомогою додавання до повітря 25 %  $N_2$ ,  $H_2$ ,  $He$  і  $Ar$ , початкове посилення гіперкапнії всього на кілька відсотків, виявляється достатнім для того, щоб знизити рівень споживання кисню майже вдвічі. Цей рівень зберігається майже стабільним протягом всієї експозиції, що відбивається на статистичній невірності коефіцієнтів кореляції між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$  і  $Vo_2$  і  $O_2$ .

*Температура поверхні тіла.* Посилення гіперкапнії при додаванні  $CO_2$  з початку експозиції, приводило до достовірного зниження ТПТ з  $30,1 \pm 0,6$  °C до  $27,2 \pm 0,7$  °C у молодих тварин і з  $30,3 \pm 0,7$  °C до  $26,6 \pm 0,6$  °C у старих тварин. Вплив атмосфери відрізнявся високою вірогідністю ( $P < 10^{-9}$ ), достовірних вікових відмінностей не спостерігалось ( $P > 0,5$ ).

При цьому зниження ТПТ (на 3-4 °C) було трохи більшим, ніж при інших випробуваних моделях ГГС, як видно, тому, що інгібування окисних процесів настає практично із самого початку експозиції.

Більше того, змінюється залежність між ТПТ і газообміном (рис. 3.35).

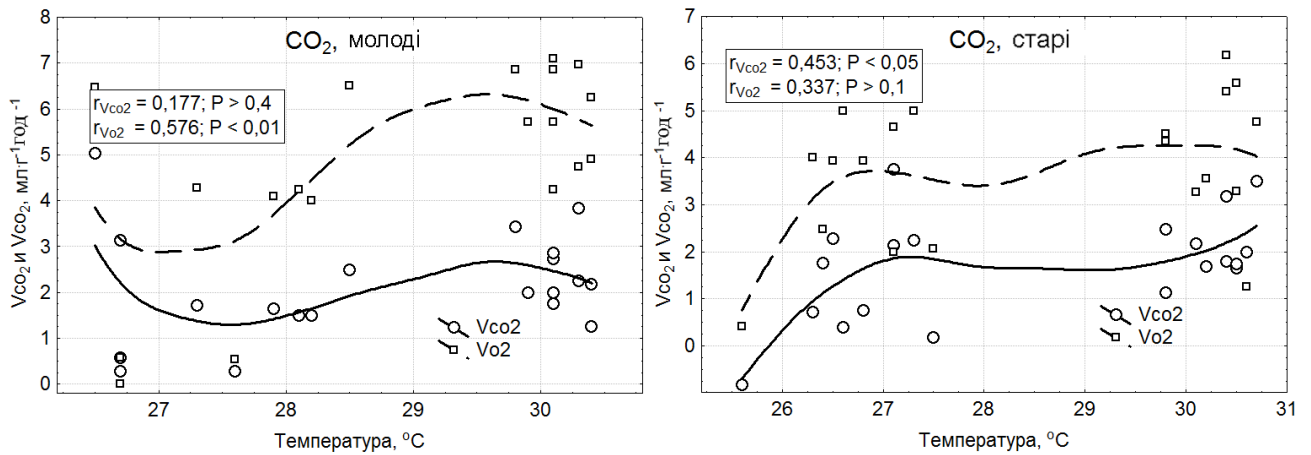


Рис. 3.35. Залежність температури поверхні тіла від  $V_{CO_2}$  і  $V_{O_2}$  у молодих і старих самців мишей лінії СВА при 3-годинній експозиції в ГГС, модельованому додаванням 3-4 %  $CO_2$  до повітря на початку експозиції.

Коефіцієнти кореляції між ТПТ і  $V_{CO_2}$  або  $V_{O_2}$ , високо достовірні при всіх дотепер випробуваних моделях ГГС, при посиленні гіперкапнії стають недостовірними або помітно меншими.

*Спонтанна рухова активність.* Відмінною рисою моторної активності молодих і старих мишей в умовах посиленої гіперкапнії є відносно висока частка сплячих і низька частка не сплячих особин протягом всієї експозиції. Протягом сеансу частка сплячих не знижується нижче 50-60 %, а частка не сплячих не росте вище 40% при мінімумі особин, що рухаються (рис. 3.36).

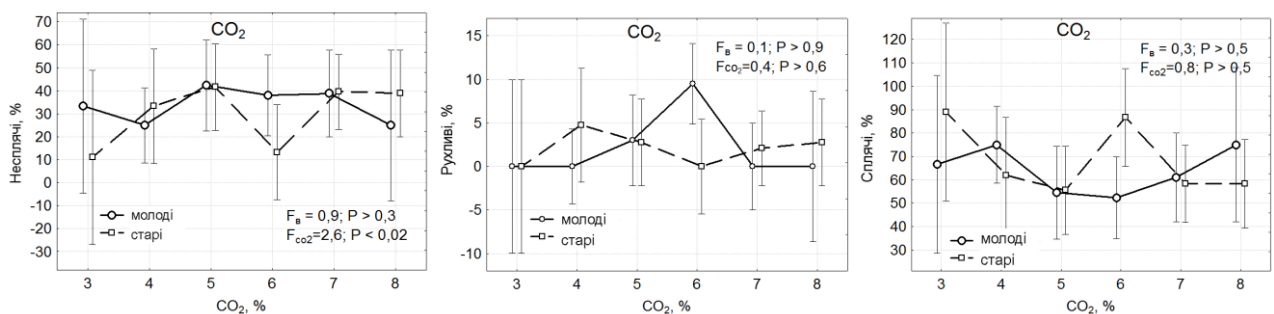


Рис. 3.36. Динаміка частки сплячих, не сплячих і рухливих молодих і старих самців мишей лінії СВА в міру підвищення вмісту  $CO_2$  (%) при ГГС, модельованому додаванням 3-4 %  $CO_2$  до повітря. Вірогідність вікових відмінностей ( $F_B$ ) і впливу  $CO_2$  ( $F_{CO_2}$ ) оцінювали за допомогою факторного ANOVA.

Судячи з ANOVA, вплив  $\text{CO}_2$  вірогідний тільки для частки не сплячих мишей. У всіх фракціях вплив факторів, пов'язаних з віком, залишається далеким від статистичної значимості (рис. 3.36).

Таким чином, посилення гіперкапнічного компонента додаванням до повітря  $\text{CO}_2$  з початку сеансу призводило не до прогресивного зниження газообміну, як при інших випробуваних ГГС, а до падіння  $V_{\text{CO}_2}$  і  $V_{\text{O}_2}$  майже вдвічі із самого початку сеансу. Природно, що при цьому були відсутні типові для інших випробуваних середовищ кореляції між  $V_{\text{CO}_2}$  і  $\text{CO}_2$ , а зниження ТПТ було найбільшим із всіх випробуваних варіантів ГГС.

Основні наукові результати даного розділу опубліковані в працях [17, 24].

### **3.3. Вплив ГГС на газообмін у самок мишей лінії C57Bl/6**

Метою даного підрозділу роботи було з'ясувати, чи зберігаються закономірності, виявлені для молодих і старих самців лінії СВА, у популяціях мишей іншої лінії і іншої статі. Для з'ясування цього питання були проведені близькі по постановці досліди на молодих і старих самках мишей лінії C57Bl/6. Слід зазначити, що обидві випробувані лінії відносяться до категорії мишей з відносно великою тривалістю життя і особливо популярні в геронтологічних дослідженнях. Кількісні характеристики пригнічуючого метаболізму ефекту  $\text{CO}_2$  у мишей лінії C57Bl/6 вивчали при практично тих же умовах симетричного і асиметричного ГГС, з тією лише істотною відмінністю, що тривалість експозиції становила 2 години, протягом яких ріст вмісту  $\text{CO}_2$  в атмосфері звичайно не перевищував 5-6 %. Це вказує на те, що в цих дослідах повною мірою могли реалізуватися фізіологічні події, характерні для фази активації і стабільності, а фаза інгібування була представлена лише невеликою ділянкою. Інакше кажучи, описані в цьому підрозділі дані більше відповідають графікам, представленим у вкладишах відповідних малюнків для мишей СВА, у яких були наведені дані для атмосфер зі вмістом  $\text{CO}_2 < 5\%$ . У цій серії дослідів ми

зосереджували увагу на з'ясуванні головної закономірності – пригнічуючого метаболізму впливу  $\text{CO}_2$ . Тут відсутні дані про ТПТ і рухову активність, а також залежність між  $V_{\text{O}_2}$  і вмістом  $\text{O}_2$  у навколишньому середовищі.

### 3.3.1. Контроль

У групах молодих і старих контрольних самок мишей лінії C57Bl/6 були виявлені приблизно однотипні кількісні характеристики залежності між  $V_{\text{CO}_2}$  і вмістом  $\text{CO}_2$  в атмосфері (рис. 3.37).

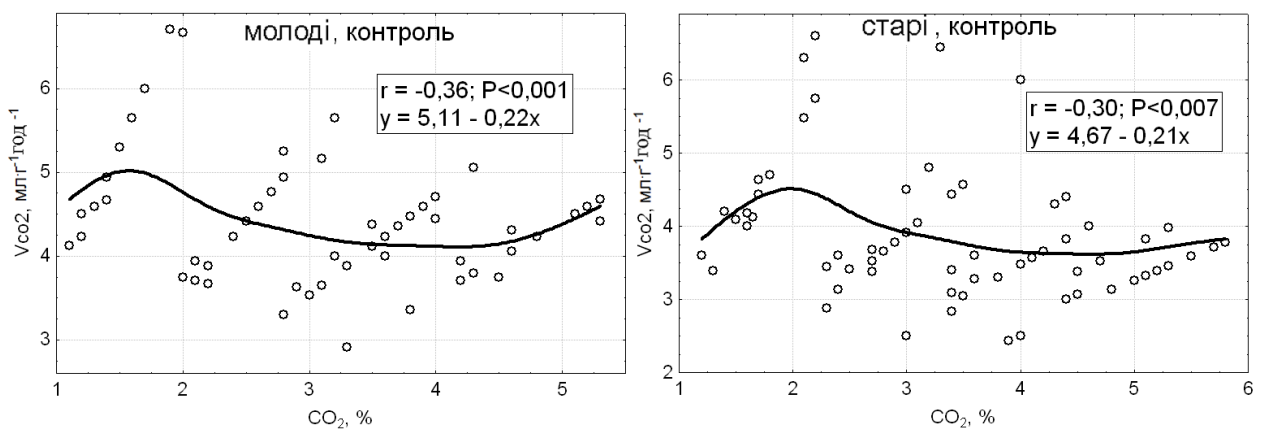


Рис. 3.37. Кореляційні поля, коефіцієнти кореляції і регресії для залежності між  $V_{\text{CO}_2}$  і вмістом  $\text{CO}_2$  в атмосфері у молодих і старих контрольних самок мишей лінії C57Bl/6.

У молодих і старих самок лінії C57Bl/6 зберігається приблизно така ж негативна залежність між  $V_{\text{CO}_2}$  і вмістом  $\text{CO}_2$  в атмосфері, як у самців СВА за умови  $\text{CO}_2 < 5\%$  (див. графік вкладки рис. 3.8). На кожен відсоток підвищення вмісту  $\text{CO}_2$  в атмосфері  $V_{\text{CO}_2}$  знижується на  $0,22 \text{ млг}^{-1} \cdot \text{год}^{-1}$ , що відповідає КІМ близько  $4,3\%$ . У групі старих тваринні коефіцієнти кореляції і КІМ ( $4,7\%$ ) близькими з молодими. При цьому досить чітко видні фази активації (до  $\text{CO}_2 < 2-2,5\%$ ) і стабільності. Отримані дані вказують на певну подібність пригнічуючого метаболізму ефекту  $\text{CO}_2$  у самок C57Bl/6 і самців мишей СВА. Привертає на себе увагу те, що незалежно від статі і лінії, вплив  $\text{CO}_2$  на  $V_{\text{CO}_2}$  практично однаковий у групах молодих і старих мишей. Не виключено, що це

свідчить про важливість такої закономірності, що зберігається стабільної незалежно від віку і статевих відмінностей.

### 3.3.2. Азот

При утримуванні молодих C57Bl/6 мишей в умовах ГГС, модельованого додаванням 25 % N<sub>2</sub> на початку сеансу, коефіцієнти кореляції і регресії в групі молодих мишей мало відрізнялися від аналогічних показників, виявлених у молодих контрольних мишей (рис. 3.38).

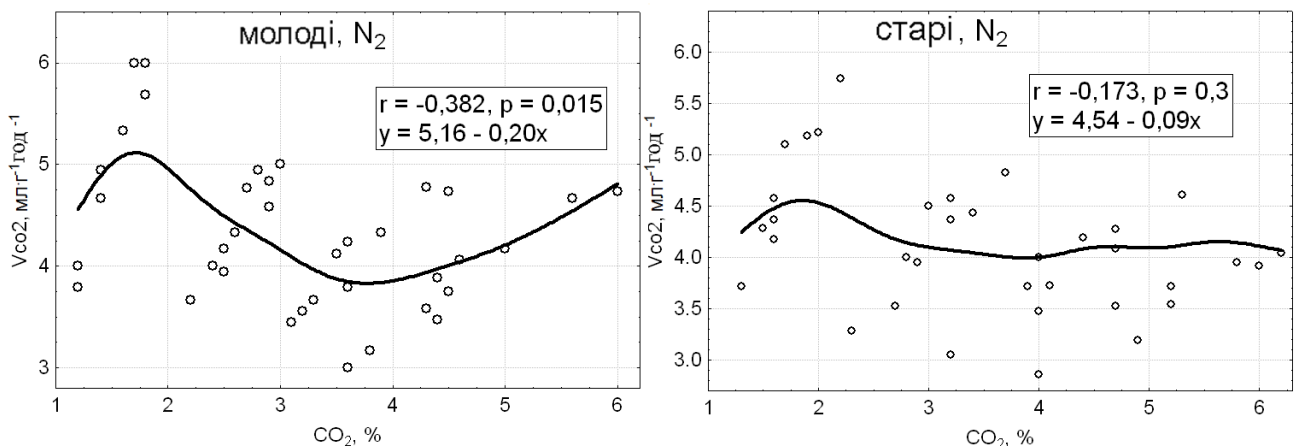


Рис. 3.38 Кореляційні поля, коефіцієнти кореляції і регресії для залежності між V<sub>CO<sub>2</sub></sub> і CO<sub>2</sub> у молодих і старих самок мишей лінії C57Bl/6, інкубованих у гіпоксичній атмосфері з додаванням 25 % N<sub>2</sub> до повітря.

У групі старих мишей, інкубованих в атмосфері з N<sub>2</sub>, був виявлений майже такий же вільний член регресії (4,54), як у старих контрольних мишей (4,67). Однак коефіцієнт регресії був майже вдвічі нижчим, що робить коефіцієнт інгібування метаболізму пропорційно нижчим — 1,9 % проти 4,7 % (рис. 3.38).

### 3.3.3. Гелій

Коефіцієнти кореляції і регресії у мишей, які утримувались в ГГС, модельованому додаванням 25% He, багато в чому нагадували величини, які ми спостерігали у старих мишей в гіпоксичній атмосфері з N<sub>2</sub> (рис. 3.39).

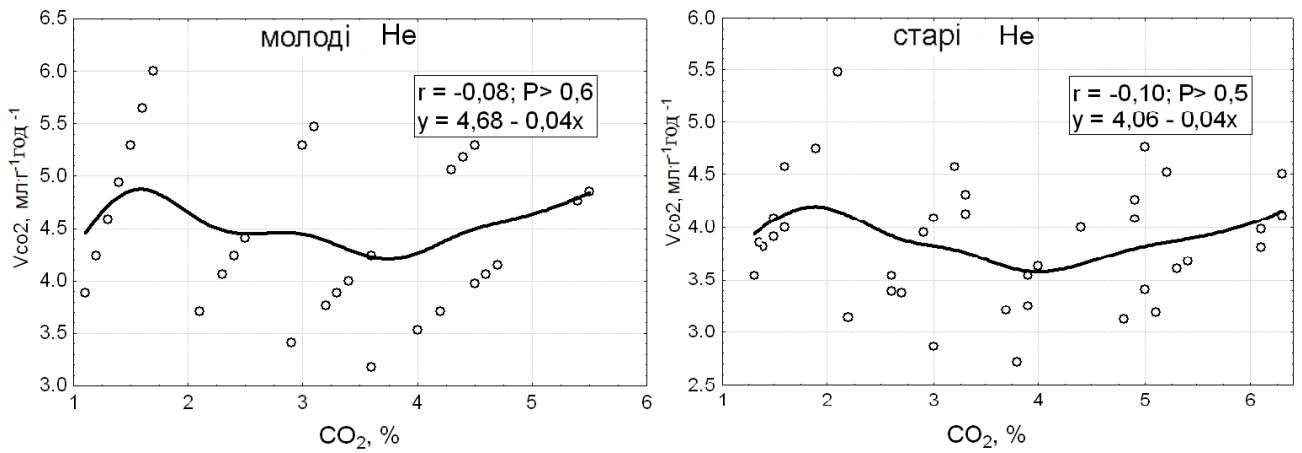


Рис. 3.39. Кореляційні поля, коефіцієнти кореляції і регресії для залежності між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$  у молодих і старих самок мишей лінії C57Bl/6, інкубованих у гіпоксичній атмосфері з додаванням 25 % He.

В обох вікових групах спостерігається зниження коефіцієнтів кореляції і КІМ, можливо тому, що повністю не спрацьовує фаза інгібування при значеннях  $CO_2$ , вище критичних 5 % (рис. 3.39)

### 3.3.4. Аргон

Дані, отримані для мишей, що утримувались в атмосфері з 25 % Ar, у цілому були аналогічні результатам, отриманим в дослідях з He (рис. 3.40).

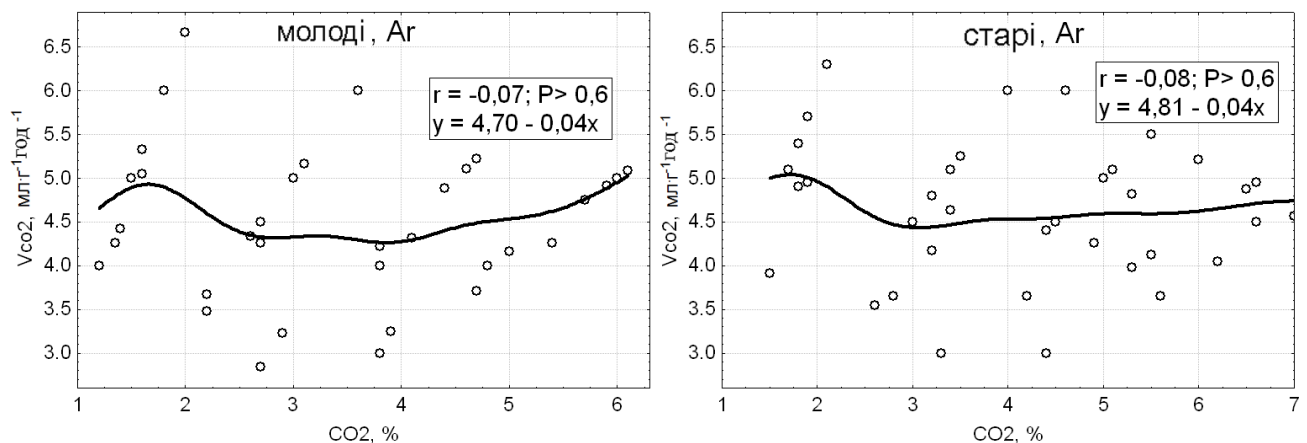


Рис. 3.40. Кореляційні поля, коефіцієнти кореляції і регресії для залежності між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$  у молодих і старих самок мишей лінії C57Bl/6, інкубованих у гіпоксичній атмосфері з 25 % Ar.

Єдина принципова відмінність полягала в тому, що вільний член регресії у старих мишей не знижувався, що може свідчити про стимулюючу дію Ar на метаболізм старих мишей.

### 3.3.5. Водень

Дані, отримані в атмосфері з 25 %  $H_2$ , більше нагадують аналогічні результати у контрольних тварин (рис. 3.41).

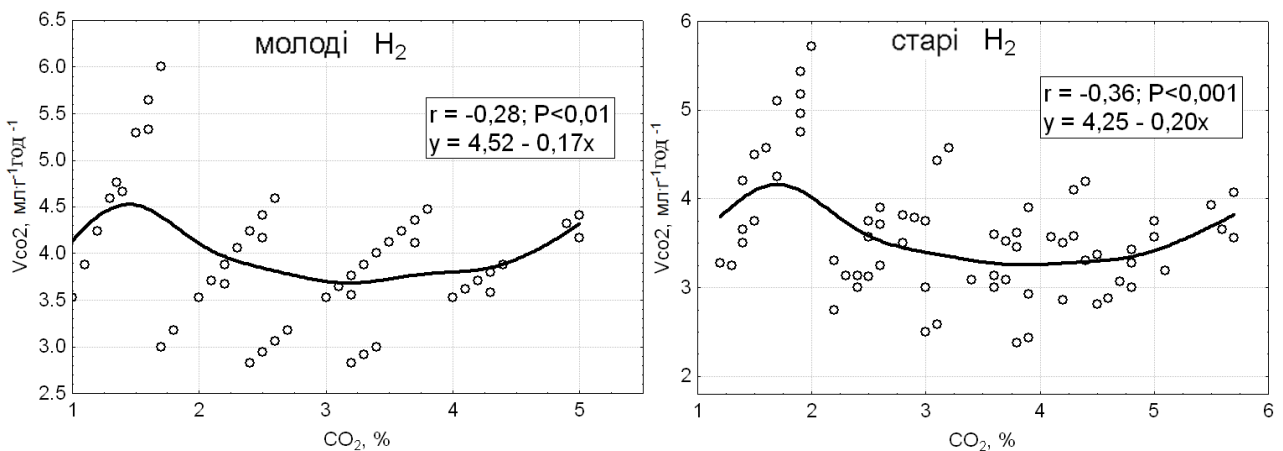


Рис. 3.41. Кореляційні поля, коефіцієнти кореляції і регресії для залежності між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$  у молодих і старих мишей, інкубованих у гіпоксичній атмосфері з 25 %  $H_2$ .

У цій серії дослідів знижуються вільні члени регресії в обох вікових групах, що може свідчити про ослаблення інтенсивності обмінних процесів у мишей цієї лінії в присутності  $H_2$  в атмосфері (рис. 3.41).

### 3.3.6. Кисень

Трохи інша картина спостерігається при утримуванні мишей у гіпероксичній атмосфері, створеній додаванням 25 %  $O_2$  до повітря (рис. 3.42).

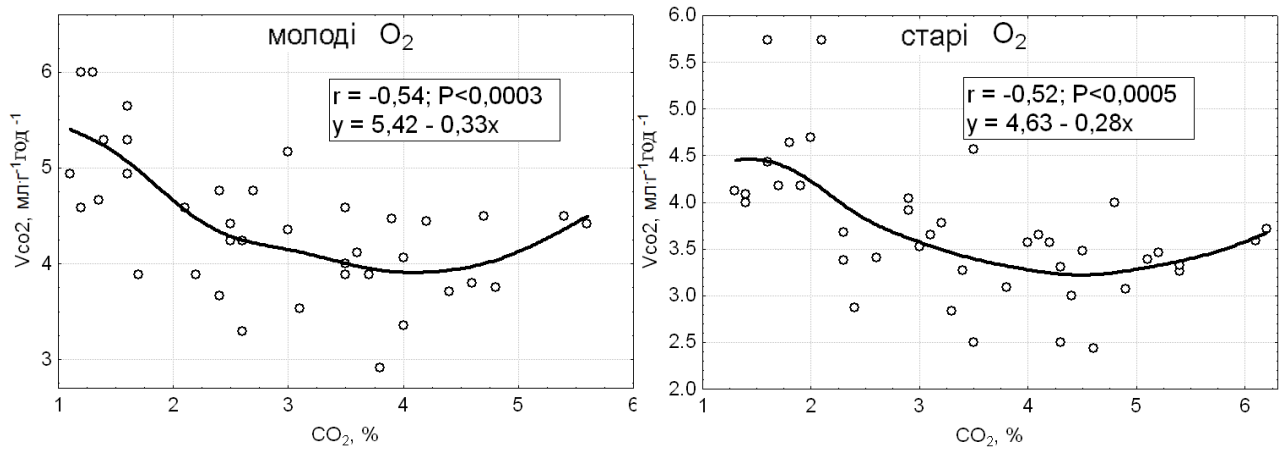


Рис. 3.42 Кореляційні поля, коефіцієнти кореляції і регресії для залежності між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$  у молодих і старих мишей, інкубованих у гіпероксичній атмосфері з додаванням 25 %  $O_2$  до повітря.

Коефіцієнти регресії в обох вікових групах ростуть, що може свідчити про посилення КІМ в умовах гіпероксії.

### 3.3.7. Вуглекислий газ

У цій серії дослідів ГГС починали з посиленням гіперкапнічного компоненту шляхом додавання до повітря близько 10 %  $CO_2$ . Така постановка дослідів дозволила з'ясувати, як змінюється  $V_{CO_2}$  при концентраціях  $CO_2$ , близьких до приграничних величин. Як і в попередніх підрозділах, у яких обговорювався вплив гіперкапнії на рівень обмінних процесів, у цій серії у мишей обох вікових груп були виявлені позитивні коефіцієнти кореляції і регресії між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$ . Це свідчить про те, що при збільшенні вмісту  $CO_2$  в атмосфері вище 10 %  $V_{CO_2}$  не знижується, а росте в міру наступного посилення гіперкапнічного ефекту (рис. 3.43).

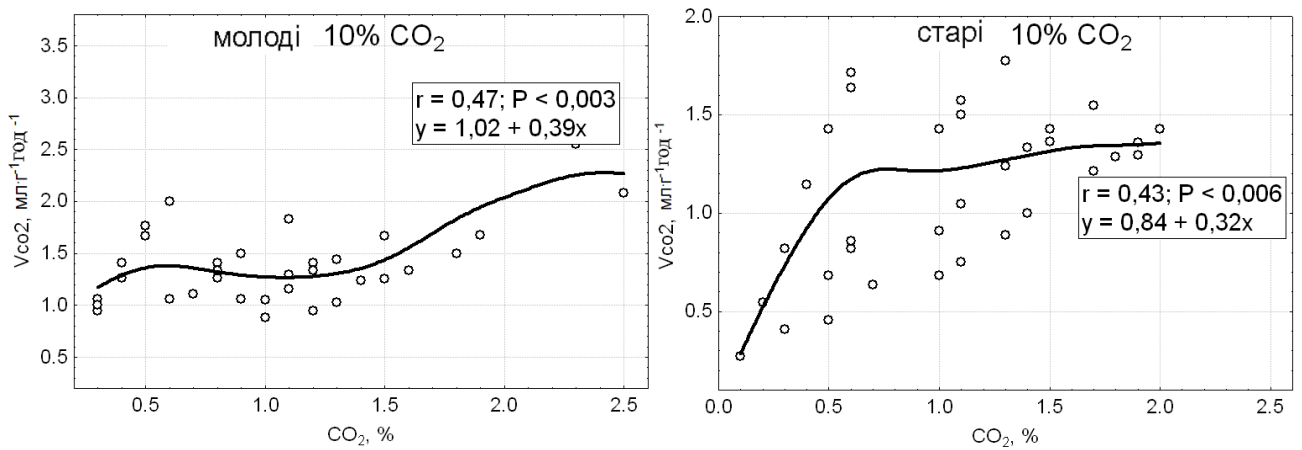


Рис. 3.43 Кореляційні поля, коефіцієнти кореляції і регресії для залежності між  $V_{CO_2}$  і виробленим мишами  $CO_2$  у молодих і старих особин, інкубованих у гіперкапнічній атмосфері з додаванням 10 %  $CO_2$  на початку сеансу.

Слід зазначити, що на цьому рисунку по осі абсцис зазначений не абсолютний вміст  $CO_2$  в атмосфері, а та кількість газу, яка була вироблена самими мишами. У цих умовах виробляється в 2-3 рази менше  $CO_2$ , що відбивається на аналогічному падінні розрахункових величин  $V_{CO_2}$ . При концентраціях  $CO_2$  вище 10 % наступний ріст  $CO_2$  атмосфери може збільшити розбалансування метаболічних процесів, у тому числі ацидотичного характеру, у результаті чого ефективність (ККД) окисних процесів знижується, а загальні метаболічні витрати ростуть. Тому оптимальний діапазон інгібування швидкості окисних процесів  $CO_2$  атмосфери перебуває в межах 5-10 %.

Таким чином, узагальнюючи вищевикладені результати, можна укласти, що утримування мишей в умовах симетричного і асиметричного ГГС, може вплинути на інтенсивність обмінних процесів. Негативна залежність між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$  помітно стабільніша, ніж між  $V_{O_2}$  і  $O_2$ . Як було показано в розділі 3.1  $P_{CO_2}$  у крові є інформативним детермінантом довголіття, обумовлюючи негативну кореляцію з рівнем метаболізму і позитивну із МТЖ. Аналогічні кореляції для  $P_{O_2}$  були статистично незначущими [149]. Привертає на себе увагу те, що утримання лабораторних мишей в умовах ГГС призводить до зменшення рівня газообміну, температури тіла, кількісно наближаючи ці параметри до таких у голого землекопа.

Проведені дослідження дозволяють підсумувати, що:

i) В міру збільшення вмісту CO<sub>2</sub> атмосфери відбувається зниження рівня метаболізму, що найбільш виражено в діапазоні близько 5-10 % CO<sub>2</sub>. При виході за межі цього діапазону залежності між V<sub>CO<sub>2</sub></sub> і CO<sub>2</sub> можуть бути іншими. У молодих і старих контрольних мишей КІМ CO<sub>2</sub> близький до 8 %.

ii) Цей показник мало змінюється при старінні, але може змінюватися залежно від тривалості ГГС, статі і лінії піддослідних мишей, а також природи газу, за допомогою якого моделюється асиметричне ГГС. Остання якість представляється особливо важливою, тому що вказує на можливість створення ГГС зі специфічними характеристиками.

iii) Ослаблення інтенсивності окисних процесів супроводжується зниженням температури тіла, мінімальним при гіпероксичній (додавання O<sub>2</sub>) і максимальним при гіперкапнічному ГГС (додавання CO<sub>2</sub>). Судячи з поведіння піддослідних мишей, тварини обох вікових груп відносно спокійно переносять навантаження типу ГГС.

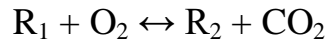
Основні наукові результати даного розділу опубліковані в працях [17, 24].

### **3.4. Вплив хронічного ГГС на функціональний стан мишей**

Наступні дві серії дослідів носили довгостроковий характер для вивчення ефектів хронічного впливу ГГС на метаболічні, морфологічні та молекулярні показники мишей лінії C57Bl/6. У першій серії були вивчені тільки неінвазивні параметри у молодих, дорослих і старих мишей C57Bl/6 протягом 90 днів. У другій серії дослідів мишей утримували в ГГС і забивали для біохімічних і ПЛР-аналізів на 0, 1, 10, 20 і 30 добу експозиції. Мишей постійно утримували в кюветах з парціальним тиском O<sub>2</sub> і CO<sub>2</sub> на рівні 10 ± 2%.

Теоретичним обґрунтуванням такої хронічної моделі стало припущення, що рівень метаболізму може знижуватися в залежності від кількості кисню та вуглекислого газу у вдихуваному повітрі.

Як відомо,  $O_2$  і  $CO_2$  є безпосередньо субстратом і продуктом реакції окислення біологічних сполук в організмі. Хоча в реальності картина дещо складніша, у першому наближенні генерацію енергії в клітині можна зобразити формулою:



де  $R_1$  і  $R_2$  — продукти до і після окислення. Така реакція оборотна, тому інтенсивність утворення енергії визначається різницею швидкостей прямої і зворотної реакцій. Які в свою чергу залежать від концентрацій  $O_2$  і  $CO_2$  відповідно. Оскільки при ГГС концентрація  $O_2$  знижується, а  $CO_2$  пропорційно зростає, то це повинно призвести до уповільнення швидкості прямої реакції і приблизно до такого ж зростання швидкості зворотної реакції. Саме таке "подвійне" уповільнення швидкості генерації енергії робить ГГС унікальною за простотою моделювання, але потужною за ефектом інтервенцією інгібування інтенсивності метаболічних процесів. Відомо, що при нестачі тепла в організмі вмикаються різні механізми як стимуляції термогенезу (роз'єднання окислення і фосфорилування, тремтіння тощо), так і мінімізації тепловтрат (звуження підшкірних капілярів, *cuddling* та ін.). У більшості випадків такі спільні зусилля, спрямовані на підтримку стабільності температурного гомеостазу, завершуються успішно, що, мабуть, і визначає крайню складність моделювання хронічної гіпотермії у теплокровних. Інша картина при ГГС. Тут одночасна інгібіторна дія гіпоксії і гіперкапнії є настільки сильною, що системи терморегуляції не можуть впоратися з «навантаженням», і переходять до стабілізації температури тіла на сходинку нижче, тобто при 33-34 °C.

У нашій лабораторії, як і в багатьох інших лабораторіях світу, довгі роки проводився пошук засобів уповільнення метаболічних процесів, які могли призвести до зниження темпів старіння і подовження життя. Були випробувані десятки фізіологічних впливів і препаратів з класів інгібіторів і роз'єднувачів окислення і фосфорилування, інгібіторів мітохондріальної та ядерної реплікації, транскрипції, трансляції та ін. На жаль, всі вони забезпечували лише маргінальні позитивні результати, які часто були перекреслені токсичними

ефектами хронічного застосування "чужорідних" хімічних продуктів [95]. У цьому плані ГГС вигідно відрізняється простотою моделювання і високою ефективністю гіпометаболічного і гіпотермічного ефектів.

### 3.4.1. Газообмін $V_{O_2}$ і $V_{CO_2}$

$V_{O_2}$  і  $V_{CO_2}$  мишей при хронічному утриманні в умовах ГГС демонстрували стійке зниження (рис. 3.44).

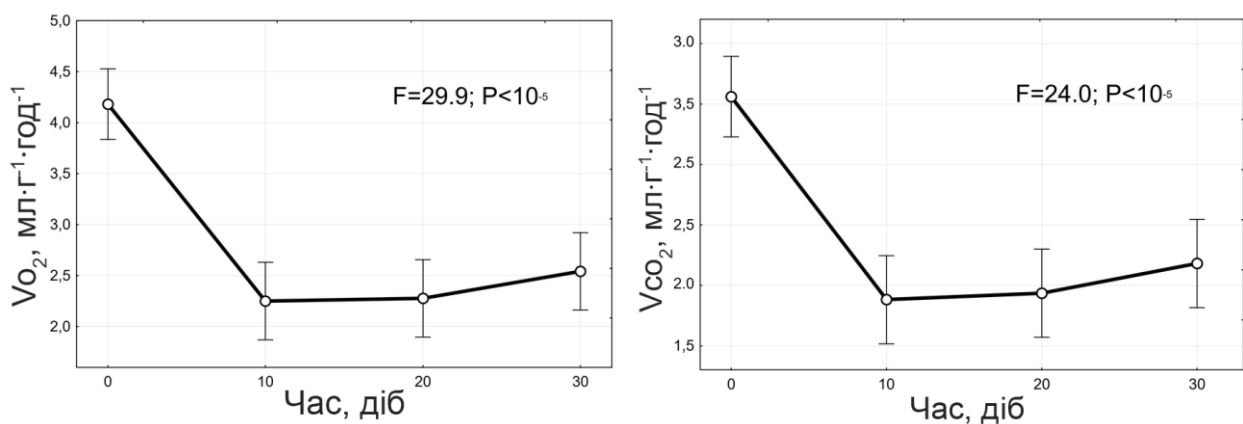


Рис. 3.44.  $V_{O_2}$  і  $V_{CO_2}$  (середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення) молодих мишей C57Bl/6 при утриманні в умовах хронічного ГГС.

$V_{O_2}$  і  $V_{CO_2}$  мишей при хронічному ГГС, як і споживання їжі і води, стабілізувалися на рівні приблизно на 30-50% нижче, ніж у контрольній групі. За даними однофакторного ANOVA, ефект ГГС при цьому був статистично високо достовірним ( $P < 10^{-5}$ ) (рис. 3.44).

### 3.4.2. Температура поверхні тіла

Температура тіла при хронічній ГГС знизилася приблизно на 2,5-3,5 °C (рис. 3.45). Вплив ГГС на температуру тіла також було статистично високо значущим ( $P < 10^{-9}$ ).

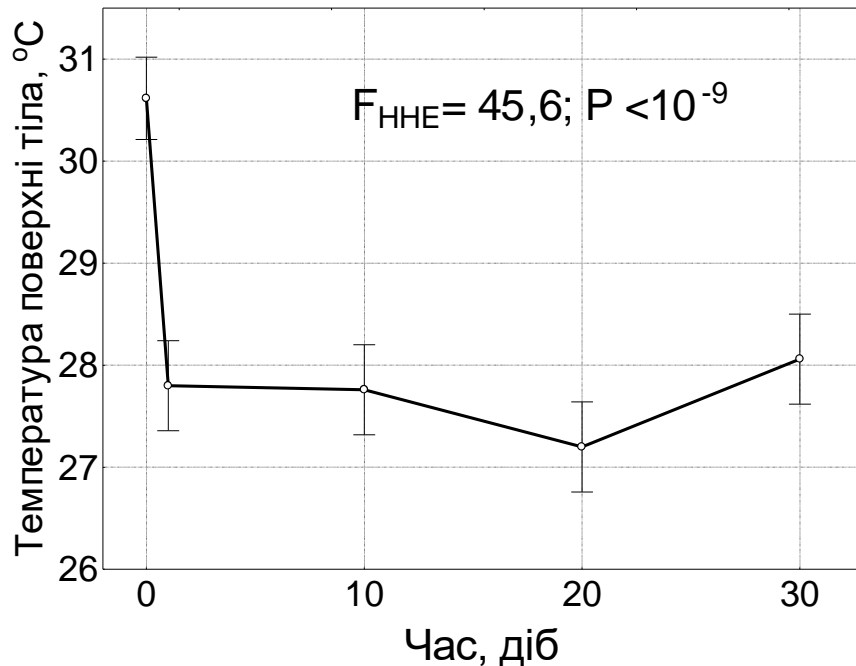


Рис. 3.45. Температура поверхні тіла (середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення) молодих мишей C57Bl/6 при утриманні в хронічному ГГС.

Гіпотермічний ефект ГГС можна пояснити змінами мітохондріального метаболізму та судинних реакцій. Гіпоксія обмежує рух електронів по електрон-транспортному ланцюгу (ЕТЛ) мітохондрій, де вони мають бути утилізовані молекулою  $O_2$ . А його нестача, викликана гіпоксією, уповільнює процес утилізації відпрацьованих електронів. Крім того, гіпоксія і гіперкапнія індукують сильні судинорозширювальні реакції, сприяючи втратам тепла [160, 266].

### 3.4.3. Споживання їжі і води

Споживання їжі і води помітно знижувалось у всіх вікових групах протягом усього вивченого періоду хронічного ГГС (рис. 3.46).

Споживання їжі і води швидко зменшувалось протягом перших 2 тижнів ГГС. Згодом ці показники стабілізувалися на рівні приблизно на 30-50% нижче контрольного рівня. Звертає на себе увагу те, що зниження споживання їжі і води практично не залежить від віку (рис. 3.46).

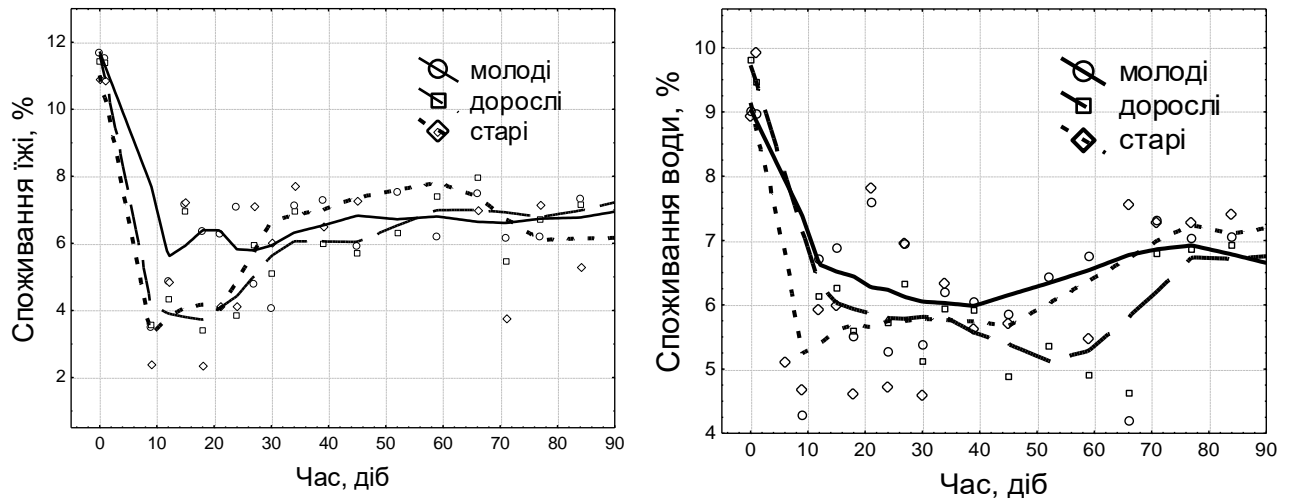


Рис. 3.46. Споживання їжі і води у відсотках від маси тіла) у молодих, дорослих і старих мишей лінії C57Bl/6 при утриманні в хронічному ГГС.

З огляду на це ГГС можна розглядати як модель «добровільного» калорійно-обмеженого раціону, оскільки експериментальні тварини за власним бажанням скорочували споживання їжі в режимі годування *ad libitum*. Показово, що ГГС стабілізує споживання їжі на тому ж рівні, як і в найбільш ефективних звичайних моделях КОР. Однак у звичайних (примусових) калорійно-обмежених дієтах тварини зазвичай переїдають у відносно короткі періоди наявності їжі, після чого голодують до наступного годування.

#### 3.4.4. Маса внутрішніх органів

Маса тіла — відносно легко оцінюваний показник. Незважаючи на те, що його важливість часто ігнорується, вага тіла є високоінформативним та надійним показником, що підкреслює інтегральні ефекти всіх анаболічних та катаболічних процесів. Індуковані ГГС зміни маси тіла добре збігаються із споживанням їжі та швидкістю метаболізму ( $V_{O_2}$  та  $V_{CO_2}$ ).

Маса тіла і внутрішніх органів при хронічній ГГС змінювалася залежно від типу тканини (рис. 3.47).

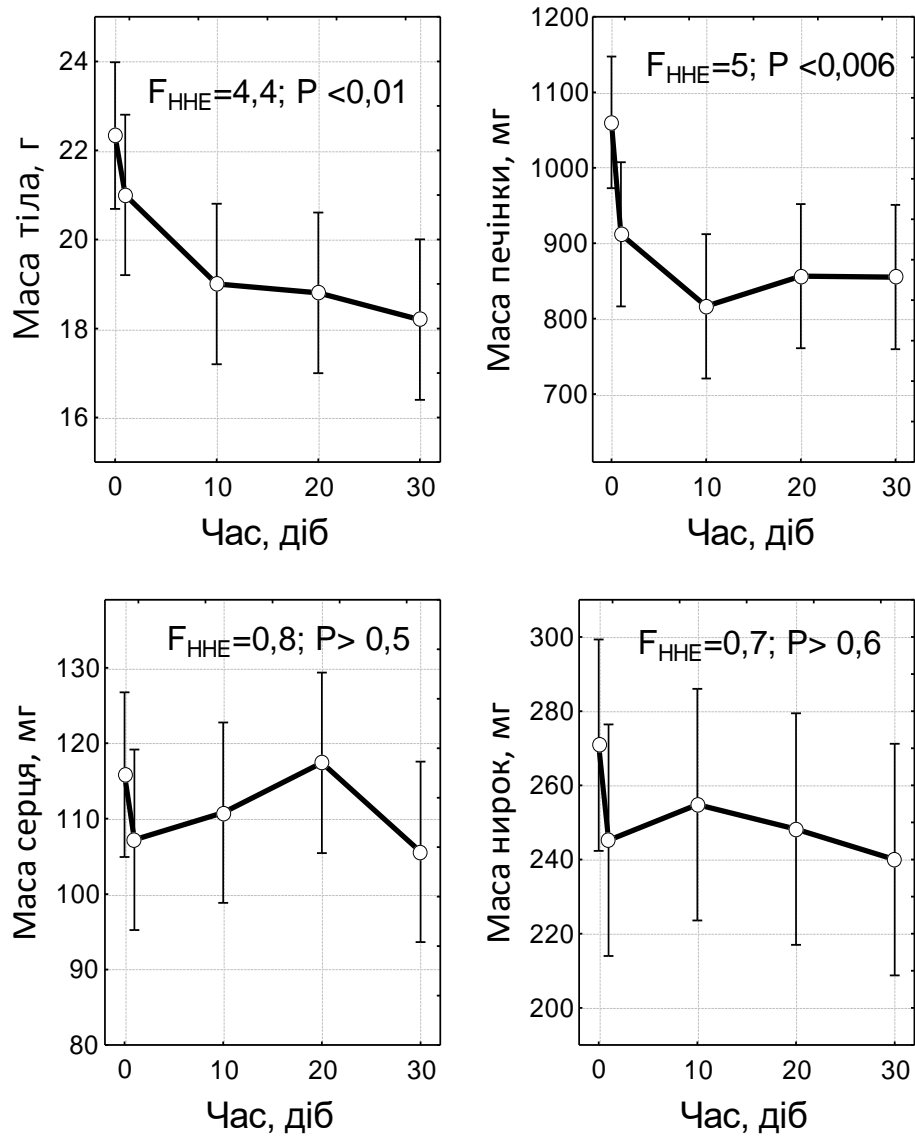


Рис. 3.47. Маса тіла, печінки, серця і нирок (середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення) молодих мишей C57Bl/6 при утриманні в хронічному ГГС.

Зменшення маси тіла повинно бути результатом використання ліпідних відкладень. У той час як маси тіла, печінки і тимуса зменшилися приблизно на 20%, маса тканин зі слабо проліферуючим типом клітин (серця, нирок, легенів, підшлункової залози) достовірно не змінилася ( $p > 0,1$ ) (рис. 3.47).

### 3.4.5. Показники крові

Кров, як рідка сполучна тканина організму, не тільки забезпечує взаємозв'язок всіх органів і систем, будучи індикатором стану організму, але і сама безпосередньо реагує на дефіцит кисню та надлишок  $CO_2$  в організмі.

Глюкоза плазми крові, загальний холестерин, тригліцериди і вміст гемоглобіну показали відносно невеликі зміни протягом всього періоду хронічної експозиції ГГС (рис. 3.48).

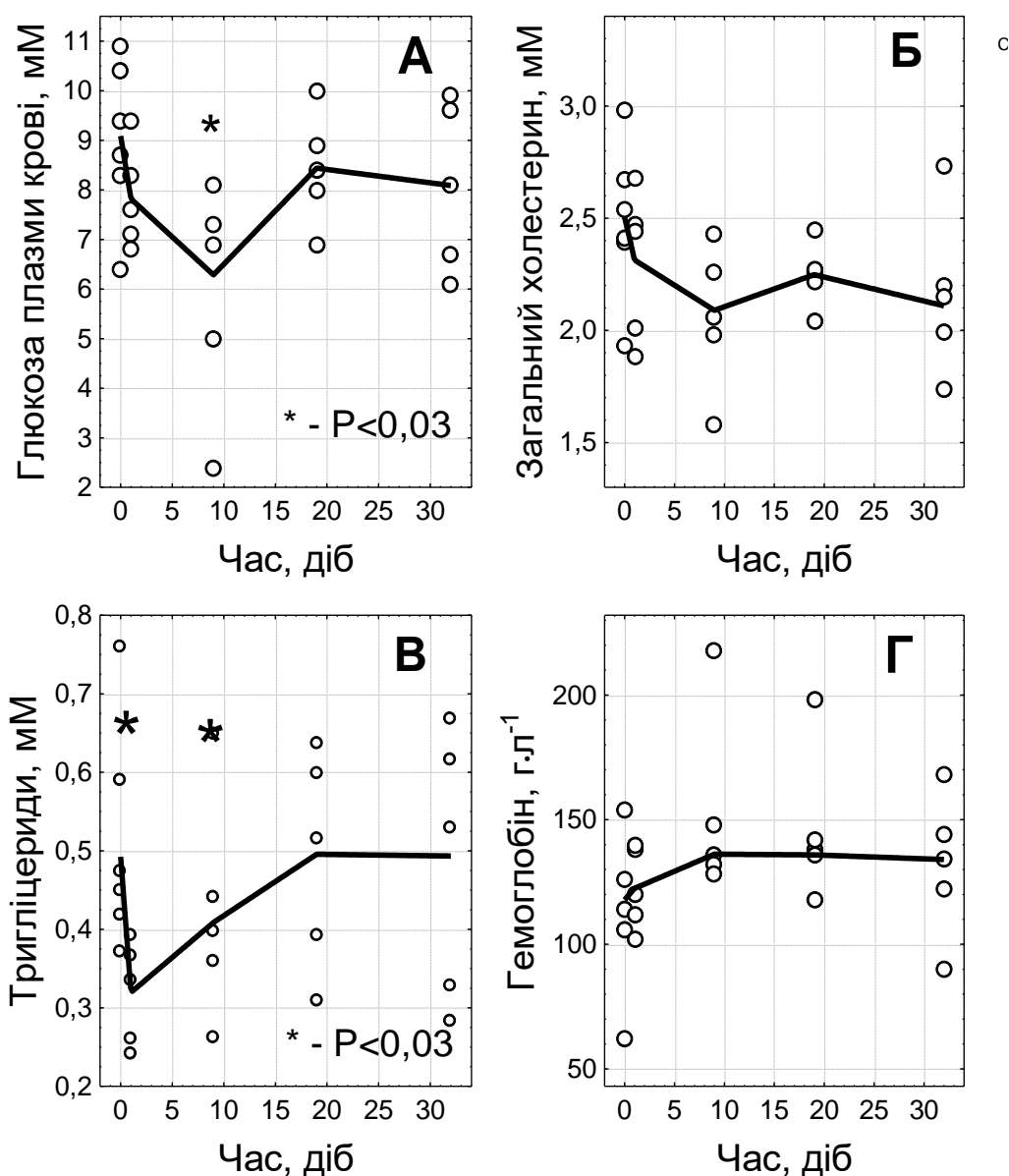


Рис. 3.48. Вміст глюкози (А), загального холестерину (Б), тригліцеридів (В) і гемоглобіну (Г) в плазмі крові мишей лінії C57Bl/6 при утриманні в хронічному ГГС.

Вміст загального холестерину, тригліцеридів і гемоглобіну істотно не змінився, тоді як рівень глюкози достовірно знизився на 10-ту добу ( $p < 0,03$ ), але згодом відновився (рис. 3.48 А).

Вміст глюкози як основного субстрату окисного фосфорилування у крові ссавців підтримується на відносно стабільному рівні. Порушення утилізації спожитої глюкози і підвищення її рівня в крові зазвичай призводить до тяжких патологічних наслідків і розвитку діабету. Хронічне перебування в умовах ГГС, ймовірно є одним із впливів, які призводять до посилення утилізації глюкози і зниження її вмісту в крові. Принаймні частково це може відбуватися в результаті компенсаторної активації гліколізу у відповідь на ослаблення окисного фосфорилування. У наших експериментах вміст глюкози в крові мишей достовірно знижувався на 34% на 10 добу ( $p < 0,03$ ), але повертався до вихідного рівня на пізніх термінах утримування в ГГС (рис. 3.48 А).

Холестерин складає близько 1/3 мембран клітин і одночасно служить попередником фізіологічно активних сполук, в тому числі, стероїдних гормонів кори надниркових залоз, статевих гормонів, вітаміну D і похідних. Рівень загального холестерину в крові визначається, перш за все, його кількістю, що надходять зі спожитої їжі, і власним синтезом, який здійснюється в основному клітинами печінки [52, 75]. Проведені нами дослідження показали, що утримування мишей в умовах ГГС протягом 30 діб не призводить до достовірних змін кількості холестерину у крові мишей (рис. 3.48 Б).

Високий рівень тригліцеридів в крові може індукувати розвиток атеросклерозу і захворювань серцево-судинної системи. Зниження маси тіла і дієта вважаються ефективними засобами запобігання гіпертри-гліцеридемії і пов'язаних патологічних станів [33, 40, 61]. Рівень тригліцеридів крові мишей в умовах хронічної ГГС достовірно знижувався протягом перших 10 днів, після чого повертався до попередніх значень (рис. 3.48 В). Це можна пояснити перебудовою енергетичного обміну, що опосередковано підтверджується і достовірним зменшенням рівня глюкози крові. Синхронне зниження глюкози та тригліцеридів є сигналом нестачі енергії, переходом до пострезорбції і  $\beta$ -окислення жирів до ацетил-КоА гепатоцитами.

Зазвичай зниження парціального тиску кисню в атмосфері, як наприклад, при тривалому перебуванні в умовах високогір'я, викликає стимуляцію

утворення еритроцитів і гемоглобіну в них [5, 14, 17]. Але у наших експериментах зростання кількості гемоглобіну було недостовірним (рис. 3.48 Г). Це можна пояснити ефектом гіпометаболізму в ГГС, що закономірно супроводжується зниженням споживання  $O_2$  і виділення  $CO_2$ .

Для оцінки функціонального стану щитовидної залози дослідили вміст вільного тироксину (FT4) і вільного трийодтироніну (FT3) у плазмі крові. Ці гормони діють практично на всі тканини організму, приєднуючись до ядерних рецепторів і змінюючи експресію багатьох генних продуктів. Вони приймають участь в регуляції білкового, вуглеводного і жиrowого обміну.

Вільний трийодтиронін (FT3) і тироксин (FT4) плазми крові достовірно знижувалися лише у перші дні експерименту (рис. 3.49).

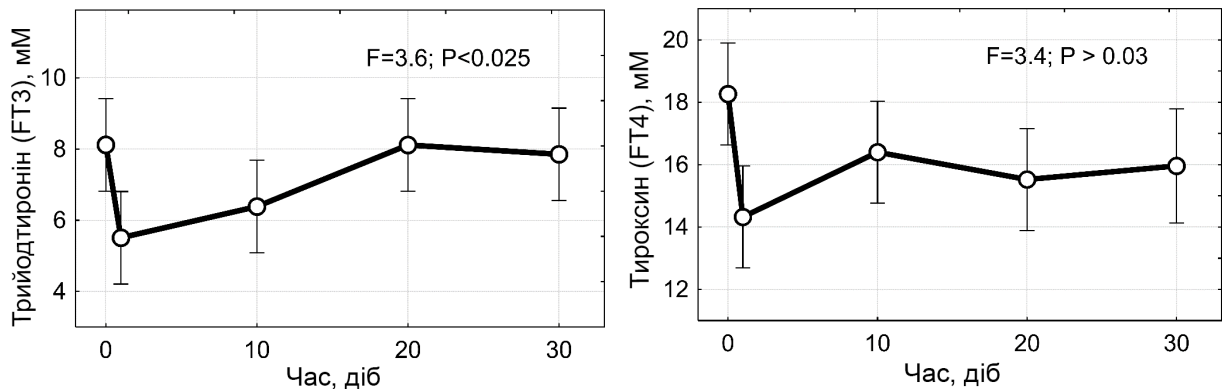


Рис. 3.49. FT3 і FT4 плазми крові (середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення) у молодих мишей лінії C57Bl/6 при утриманні в хронічному ГГС.

Хоча роль гормонів щитовидної залози в регуляції метаболізму та температури тіла добре встановлена [85], схоже, що вони мають лише помірний вплив на гіпометаболічні/гіпотермічні ефекти ГГС (рис. 3.49).

#### 3.4.6. Вміст лактату у мозку

Лактат мозку є важливим параметром метаболізму глюкози та маркером гіпоксії, оскільки він синтезується при недостатчі кисню та переході організму до гліколізу. У хронічних експериментах концентрація лактату достовірно ( $p < 0,003$ ) зростала до кінця періоду ГГС (рис. 3.50).

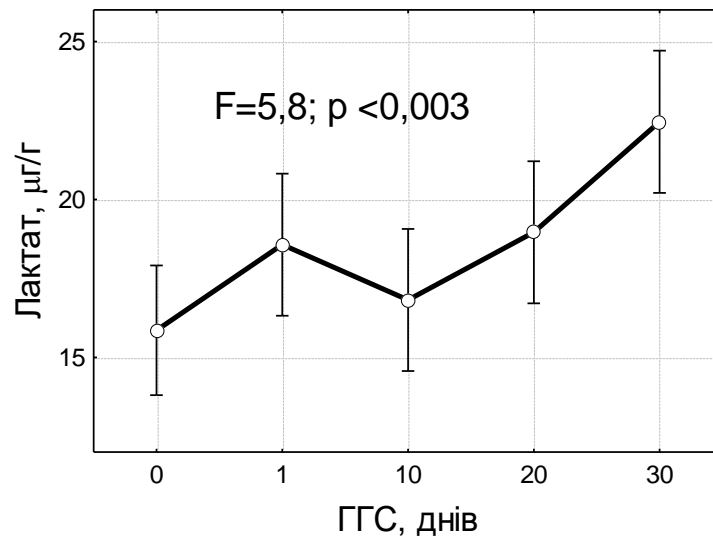


Рис. 3.50. Концентрація лактату (середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення) в мозку мишей лінії C57Bl/6 упродовж 30 діб утримування в ГГС.

У першу добу після початку експерименту відбувався сильний стрибок концентрації лактату, очевидно, як компенсаторна відповідь організму на гіпоксичне навантаження. Але після адаптації до умов ГГС концентрація лактату знижувалась.

Тим не менше, рівень лактату поступово зростав до 30 доби, що свідчить зростання долі гліколізу в енергетичному метаболізмі організму (рис. 3.50).

#### 3.4.7. Пероральний тест толерантності до глюкози

Пероральний тест толерантності до глюкози (ПТТГ) вивчали шляхом вимірювання вмісту глюкози в крові, взятої з кінчика хвоста, у двох груп мишей: контрольних і тих, що 8 діб утримування в ГГС. В обох групах в експеримент брали мишей після 10-годинного нічного голодування (рис. 3.51).

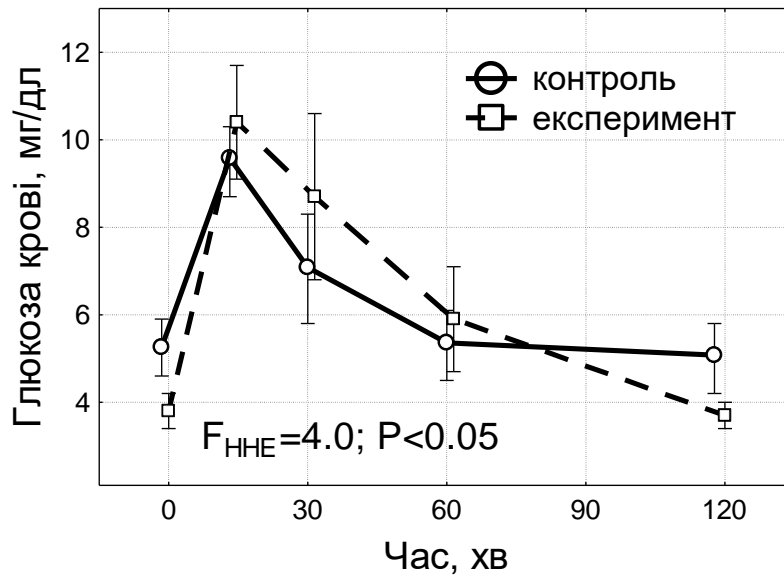


Рис. 3.51. Рівень глюкози в крові (середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення) при ПТТГ контрольних і утримуваних 8 діб в ГГС молодих мишей лінії C57Bl/6.

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. 3.51). Хоча площі поверхні під кривими утилізації глюкози істотно не розрізнялися ( $P > 0,5$ ), відновлення вихідного рівня глюкози у мишей в ГГС відбувалося повільніше в порівнянні з контролем (відповідно через 120 і 60 хвилин).

Таке зниження цукру крові, можливо, є результатом ослаблення окисного фосфорилування, компенсаторного посилення гліколізу і утилізації глюкози, яке настає під впливом гіпоксії.

#### 3.4.8 Вплив ГГС на експресію генів *ucp-2* та *hsp-90*

Принципово важливою особливістю використаної нами моделі є одночасна дія і збалансованість гіпоксії і гіперкапнії. Справа в тому, що зміни  $P_{CO_2}$  і особливо  $P_{O_2}$  можуть викликати порушення нормального потоку електронів по електрон-транспортному ланцюгу (ЕТЛ) мітохондрій, оскільки електрони, що в

кінці ЕТЛ втратили надлишок енергії, повинні бути утилізовані молекулою  $O_2$  з утворенням води ( $4e^- + 4H^+ + O_2 = 2H_2O$ ). Недостача  $O_2$ , викликана гіпоксією, може уповільнити процес утилізації таких відпрацьованих електронів і викликати своєрідний «затор» в ЕТЛ, що, в свою чергу, може підсилити зрив електронів з ЕТЛ. Такі процеси можуть посилити утворення вільних радикалів і роз'єднання окислення і фосфорилування. Тому можна було очікувати, що ГГС призведе до зміни експресії генів, що кодують білки роз'єднання і фосфорилування, зокрема, *usc-2* [251]. Однак аналізи ПЛР свідчать про стабільність експресії *usc-2* протягом всього періоду спостережень (рис. 3.52)

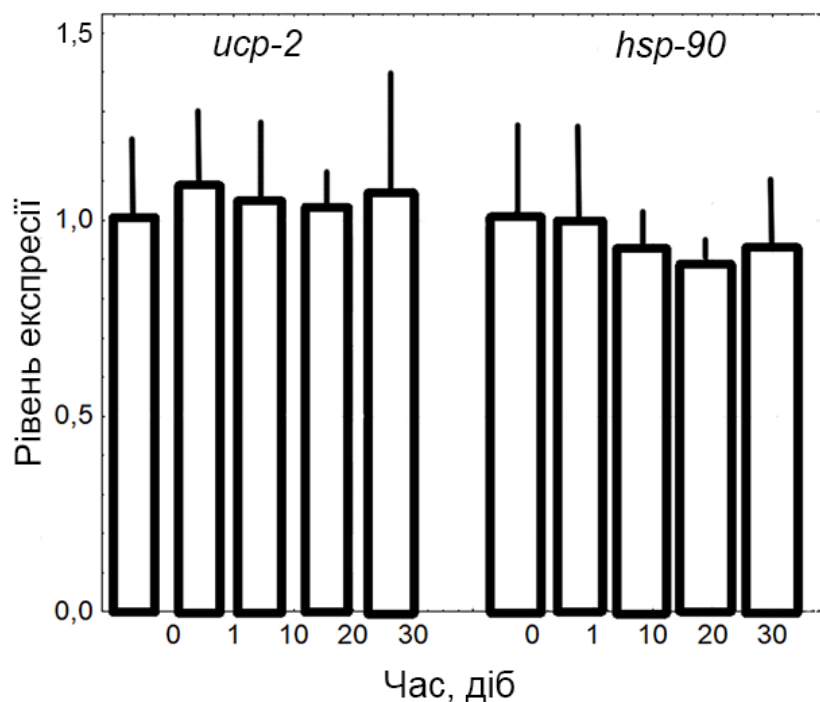


Рис. 3.52. Експресія *usc-2* у вентромедіальному ядрі гіпоталамуса і *hsp-90* в серці мишей лінії C57Bl/6 протягом 30 діб експозиції в ГГС. За 1 прийнято рівень експресії гліцеральдегід 3-фосфату у відповідних тканинах.

Оскільки витік протонів з міжмембранного простору супроводжується виділенням тепла, ми припускали, що зниження температури тіла мишей при ГГС може стимулювати синтез *usc-2* для підтримання температурного гомеостазу. Однак в наших досліджах рівень експресії *usc-2* в гіпоталамусі

тримався на стабільному рівні, а зміни були недостовірні ( $p > 0,5$ ) протягом всього періоду хронічної ГГС (рис. 3.52).

Гіпоксія і гіперкапнія є сильними факторами стресу, які могли активувати відповідні молекулярні механізми, зокрема, посилити експресію гену одного з найбільш важливих стрес білків — HSP90 [70]. Експресію цього гена 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 ( $p > 0,5$ ).

Принаймні частково це можна пояснити тим, що генерація тепла, ймовірно, більш властива для UCP-1, локалізованого в бурому жирі, а UCP-2 міокарда залучений в інші процеси [214, 279, 232].

Основні наукові результати даного розділу опубліковані в працях [7, 21, 22, 23, 25, 26].

### **3.5. Стрептозотоцинова модель діабету I типу**

Знижений вміст глюкози в крові мишей в умовах ГГС (рис. 3.48 і 3.51) дозволяє припустити, що хронічне ГГС і пов'язана з ним посилена утилізація глюкози завдяки компенсаторній активації гліколізу може бути ефективним немедикаментозним засобом нормалізації рівня глюкози і лікування діабету.

В досліді у молодих (2-3 місяці) мишей C57Bl/6 індукували хімічне руйнування  $\beta$ -клітин підшлункової залози за допомогою стрептозотоцину. Піддослідних мишей утримували 8 годин в ГГС, контрольні знаходились на повітрі. Вміст глюкози міряли в крові з кінчика хвоста один раз в тиждень. Результати представлено на рис. 3.53.

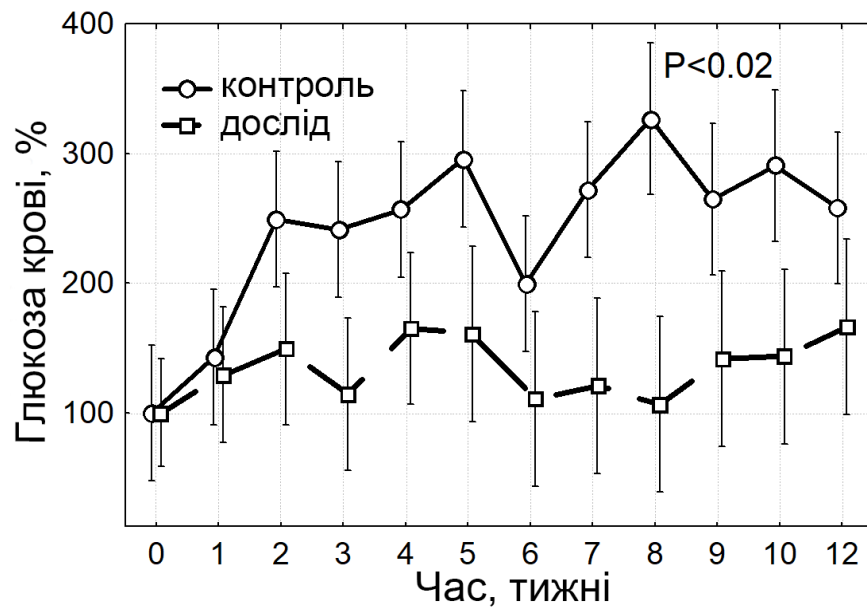


Рис. 3.53. Рівень глюкози в крові (сер. знач.  $\pm$  станд. відхилення) мишей лінії C57Bl/6 з індукованим діабетом I типу при диханні повітрям і у «м'яких» умовах ГГС (8 годин на добу). За 100 % прийнято рівень глюкози до початку дослідів.

Зростання вмісту глюкози в крові мишей з діабетом I типу, що дихали повітрям, було істотно вище (до 250-300%), ніж у мишей з діабетом I типу, які перебували в ГГС (110-160%). Такі відмінності зберігалися протягом всіх 12 тижнів спостережень ( $P < 0,02$ ). Оскільки руйнування  $\beta$ -клітин підшлункової залози стрептозотоцином є сильним стресом, в цій серії дослідів використали не цілодобовий, а більш «м'який» режим ГГС (8-годин на добу) (рис. 3.53).

Основні наукові результати розділу опубліковані в працях [7, 22, 23, 26].

### 3.6. Загоєння ран в умовах ГГС

Гіпометаболічний стан, індукований ГГС, може впливати на основні біологічні процеси, такі як загоєння ран у тканинах. Тому ми оцінили вплив хронічного ГГС на швидкість загоєння шкіри у молодих мишей C57Bl/6. Відповідно до загальноприйнятої методики Yanai [268] 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 рани за допомогою цифрового фотоапарату. Результати наведено на рис. 3.54.

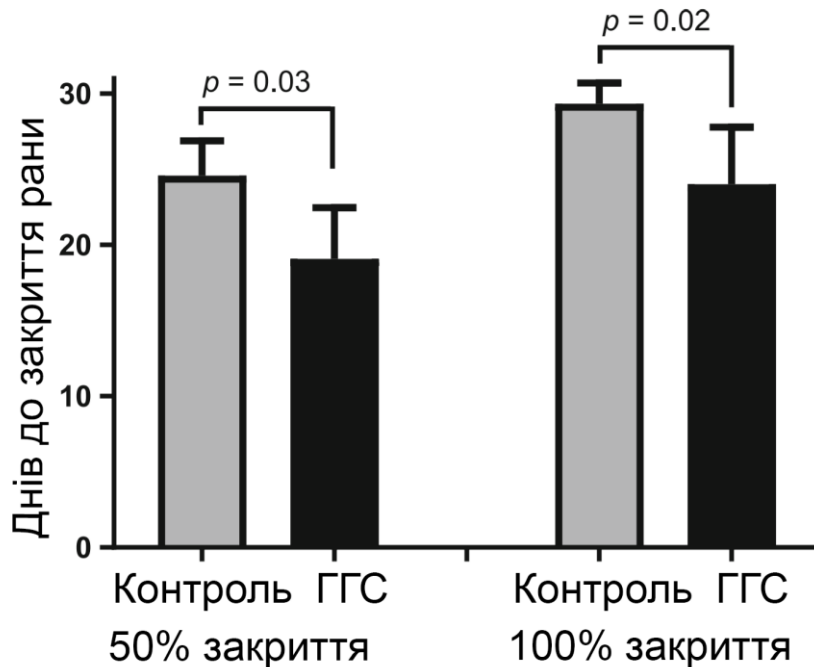


Рис. 3.54. Швидкість загоєння ран шкіри у молодих самців мишей *C57Bl/6* (n=6 у кожній групі) під час хронічного ГГС. Представлені середнє і стандартне відхилення часу 50 % і повного загоєння ран.

Незважаючи на зниження швидкості метаболізму, ГГС значно прискорив закриття молодою шкірою на місці 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 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 гліколізу і мобілізацією мезенхімальних стовбурових клітин у відповідь на ГГС [79, 147]. Аналогічно, ГГС може прискорити загоєння ран, стимулюючи проліферацію клітин [253].

Основні наукові результати даного розділу опубліковані в працях [7].

### 3.7. Вплив штучної атмосфери на детермінанти довголіття дрозоді

Відомо, що рівень метаболізму, а також пов'язані з ним біологічні змінні, які, наприклад, характеризують репаративні і антиоксидантні системи захисту, фізичну і розумову працездатність, і ін., можуть бути інформативними детермінантами довголіття. Тому перед вивченням впливу ША на темпи старіння і ТЖ у прямих дослідках, ми оцінили їхній вплив на показники життєздатності організму.

Мета цього підрозділу — з'ясувати, якою мірою гіпоксичні атмосфери, модульовані інертними газами, впливають на ТЖ і кореляцію між детермінантами довголіття у дрозоді.

Для вирішення поставлених завдань був обраний комплекс із п'яти показників, які відрізнялися стабільністю зв'язку із ТЖ: швидкість продукції  $\text{CO}_2$  ( $V_{\text{CO}_2}$ ), спонтанна рухова активність (CPA), рН цільних гомогенатів, активність СОД і каталази.

#### 3.7.1. Швидкість продукції $\text{O}_2$

Динаміка  $V_{\text{CO}_2}$  у молодих і старих дрозоді в атмосфері, що складається з рівних об'ємів повітря і  $\text{N}_2$ ,  $\text{He}$  або  $\text{Ar}$  показана на рис. 3.55. Заміну атмосфери і поживного субстрату здійснювали через день. На малюнках 3.55 – 3.59 вірогідність впливу тривалості експозиції ( $F_e$ ), віку ( $F_v$ ) і вікових змін тривалості експозиції ( $F_{ev}$ ) оцінювалися за допомогою двофакторного ANOVA.

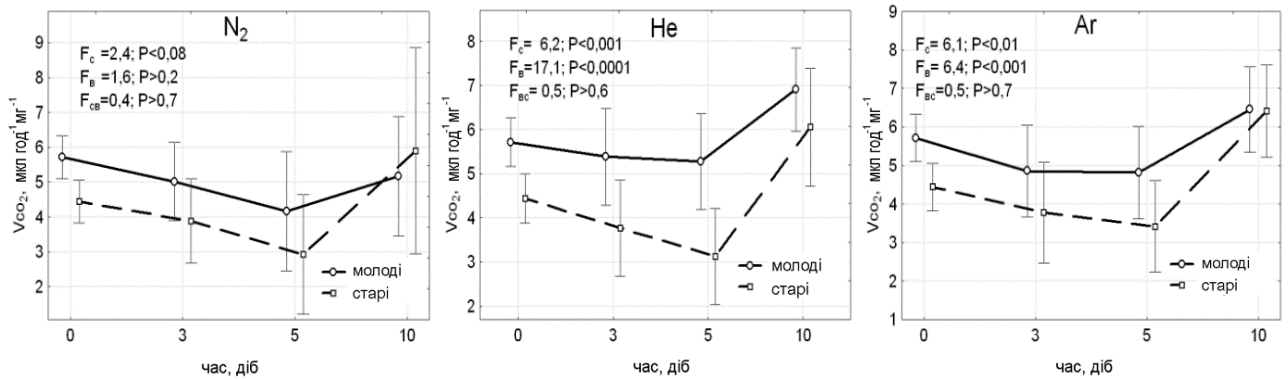


Рис. 3.55. Динаміка  $V_{CO_2}$  при утримуванні молодих і старих імаго дрозофіл в атмосфері з додаванням до повітря 50 %  $N_2$ , He або Ar.

З наведених графіків слідує, що утримування у ША з  $N_2$  приводить до деякого зниження  $V_{CO_2}$  до 5 діб. Однак до 10 доби цей показник майже повертається до рівня контрольних імаго. Згідно ANOVA, у цілому тривалість експозиції і вік не мали статистично значимого впливу на інтенсивність обмінних процесів у дрозофіл, що утримуються в такій гіпоксичній атмосфері. На відміну від  $N_2$ , в аналогічній серії дослідів з добавками He ( $F_c = 6,2; P < 0,001$  і  $F_b = 17,1; P < 0,0001$ ) або Ar були виявлені істотні зміни динаміки  $V_{CO_2}$  (рис. 3.55). Виявлені відмінності між  $N_2$  і He або Ar не виключають того, що крім гіпоксії, ПГ можуть мати специфічні ефекти на швидкість метаболізму.

### 3.7.2. Спонтанна рухова активність

Відомо, що при пересадці дрозофіл, як, імовірно, і більшості інших видів тварин, у нову обстановку (у наших умовах — шприці) рухова активність зростає через природне прагнення вивчити особливості нового середовища перебування. СРА у молодих і старих дрозофіл в атмосфері, що складається із суміші рівних об'ємів повітря з  $N_2$ , He і Ar представлена на рис. 3.56.

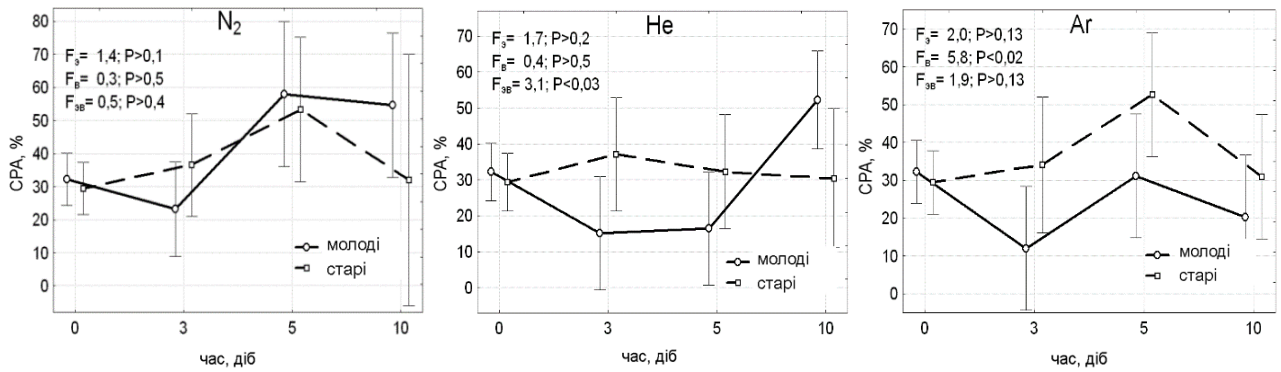


Рис. 3.56. Динаміка спонтанної рухової активності (CPA) при утримуванні молодих і старих імаго дрозофіл в атмосфері, що складається з рівних об'ємів повітря і N<sub>2</sub>, He або Ar.

В обох вікових групах стандартне відхилення CPA помітно збільшувалося до 5 і 10 діб утримування, що відбилося на невірогідності критерію експозиції або віку у всіх трьох ША.

### 3.7.3. рН гомогенатів

При утримуванні дрозофіл в атмосфері, що складається із суміші рівних об'ємів повітря з N<sub>2</sub>, He або Ar був виявлений достовірний вплив експозиції, але не вікових факторів, на рН гомогенатів (рис. 3.57).

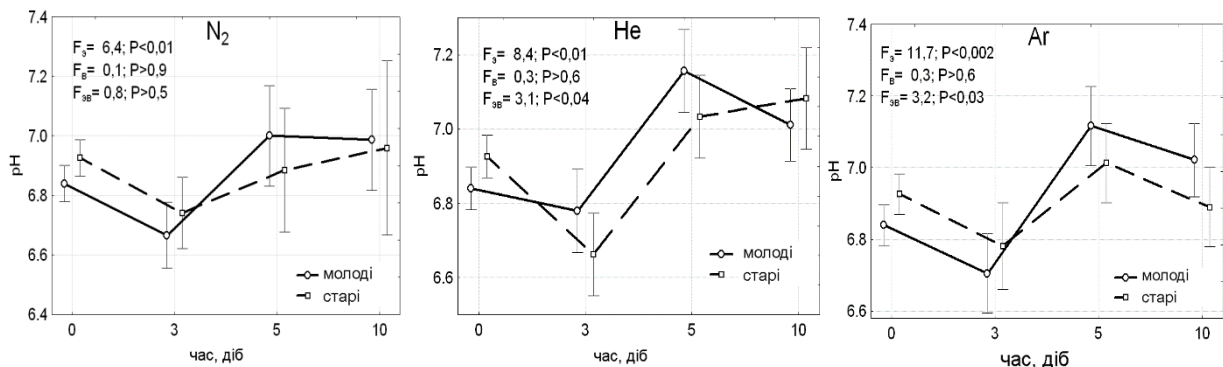


Рис. 3.57. Динаміка рН гомогенатів при утримуванні молодих і старих імаго дрозофіл в атмосфері, що складається з рівних об'ємів повітря і N<sub>2</sub>, He або Ar.

Таким чином, проведені дослідження показали, що при утримуванні в гіпоксичній атмосфері, що складається з рівних об'ємів повітря з N<sub>2</sub>, He або Ar,

відбуваються істотні зміни рН гомогенатів. Через кілька діб після початку інкубації спостерігаються ацидотичні зміни, за якими слідує, очевидно, компенсаторний ріст рН і з наступною нормалізацією до 10 діб.

### 3.7.4. Активність супероксиддисмутази

Хронічна експозиція в гіпоксичних атмосферах, може індукувати розвиток окисного стресу з наступним компенсаторним ростом ключових ферментів антиоксидантного захисту. У молодих і старих імаго дрозофіл активність СОД знижувалася до 3 діб, але вірогідно збільшувалася до 5 – 10 діб (рис. 3.58).

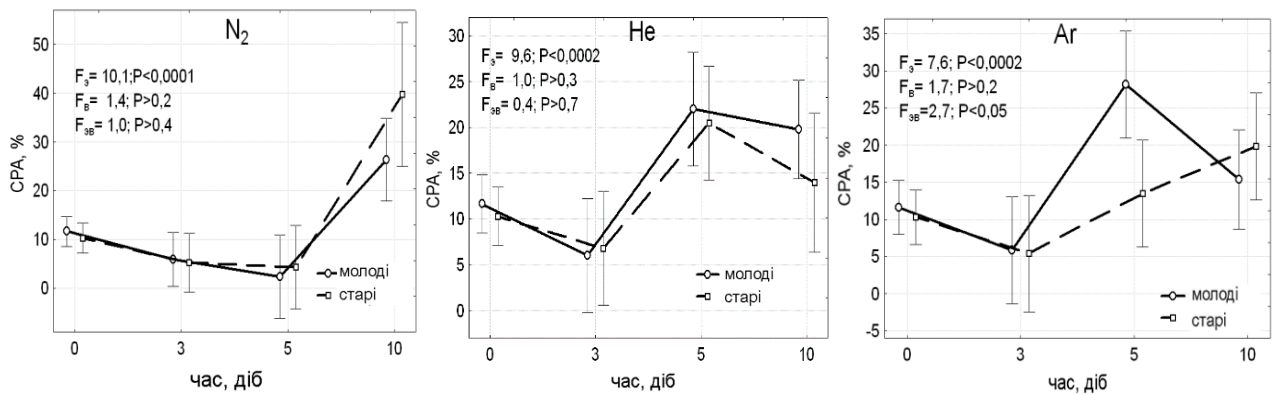


Рис. 3.58. Динаміка активності супероксиддисмутази (СОД, ум.од.·мг<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>) при утримуванні молодих і старих імаго дрозофіл в атмосфері, що складається з рівних об'ємів повітря і N<sub>2</sub>, He або Ar.

Результати двофакторного дисперсійного аналізу свідчать про практично повну відсутність вікових відмінностей. Критерії F<sub>в</sub> були далекі від статистичної вірогідності, і тільки критерій F<sub>е</sub> демонстрував високу статистичну вірогідність (P < 0,0002) (рис. 3.58).

### 3.7.5. Активність каталази

В атмосфері з добавками N<sub>2</sub> активність каталази почала зростати вже до 5 діб (рис. 3.59).

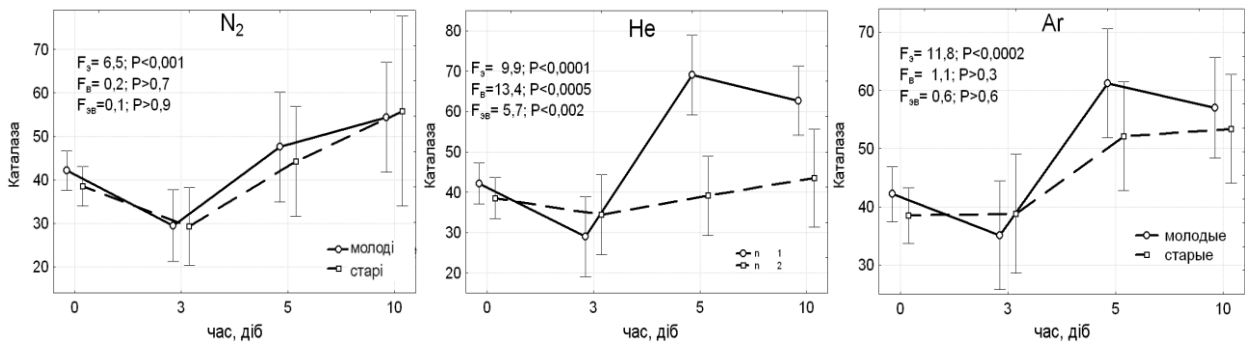


Рис. 3.59. Динаміка активності каталази ( $\mu\text{M}\cdot\text{Mg}^{-1}\cdot\text{hV}^{-1}$ ) при утриманні молодих і старих імаго дрозофіл в атмосфері, що складається з рівних об'ємів повітря і N<sub>2</sub>, He або Ar.

Однак результати ANOVA були практично такими ж, як при СОД – високо достовірний Fe ( $p < 0,001$ ) у сполученні із вкрай низькими значеннями вікових критеріїв F<sub>в</sub> (крім He) (рис. 3.59).

Узагальнюючи результати цього підрозділу, відзначимо, що досліджені фізіологічні, поведінкові і біохімічні показники демонструють певну подібність і відмінності залежно від газового складу атмосфери, що складається із суміші рівних об'ємів повітря з N<sub>2</sub>, He і Ar. Така подібність у значній мірі може бути обумовлена тим, що всі випробувані атмосфери моделювали рівний ступінь гіпоксії (приблизно 10 % O<sub>2</sub>). Разом з тим подібності між He і Ar помітно більше, ніж між ними і N<sub>2</sub>, що може бути проявом специфічного ефекту ІГ.

Основні наукові результати розділу опубліковані в працях [4, 10, 16, 17].

### 3.8. Життєздатність дрозофіл, інкубованих у штучних атмосферах

Вивчення життєздатності організмів у стресових умовах становить особливий інтерес, тому що це дозволяє не тільки зрозуміти можливі механізми дії стресорних факторів, але може бути основою для розробки відповідних захисних засобів. У роботі були вивчені особливості впливу УФ-опромінення, ТШ і деприваційного стресу на виживаність молодих і старих дрозофіл.

### 3.8.1. Стійкість дрозофіл, що утримуються в штучних атмосферах, до опромінення ультрафіолетом

Опромінення дрозофіл УФ багато в чому аналогічне дії іонізуючої радіації. В обох випадках критичним для виживання клітини є функціональний стан приблизно одних і тих же репаративних систем, відповідальних за відновлення ДНК. В обох випадках є дозо-залежний прихований період дії, протягом якого навіть смертельно опромінені тварини зовні практично не відрізняються від інтактних особин. Тільки після завершення такого прихованого періоду спостерігається різке зростання смертності.

Перш, ніж приступити до широкомасштабних дослідів, важливо було з'ясувати ефект дозо-залежності. Результати досліджень, у яких дозу УФ опромінення змінювали від 20 хв до 80 хв, представлені на рис. 3.60.

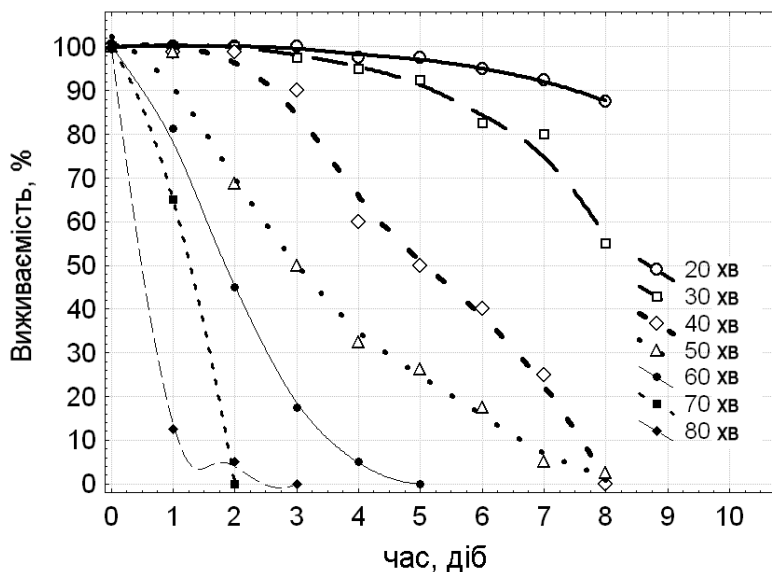


Рис. 3.60. Вплив тривалості експозиції на динаміку виживання дрозофіл після опромінення УФ-С.

Як видно із представлених графіків, після експозицій, рівних 70 хв і 80 хв опромінені тварини гинуть протягом кількох днів, тоді як при експозиції 20 хв і 30 хв ця величина вимірюється тижнями. У міру зниження тривалості експозиції пропорційно ростуть як прихований період, так і середня, і максимальна ТЖ опромінених тварин (рис. 3.60).

Відмінності виживаності імаго дрозофіл, у яких пост-радіаційний період після УФ опромінення проходив в повітрі (контрольна група) або в суміші рівних об'ємів повітря і досліджуваних газів, представлені на рис. 3.61.

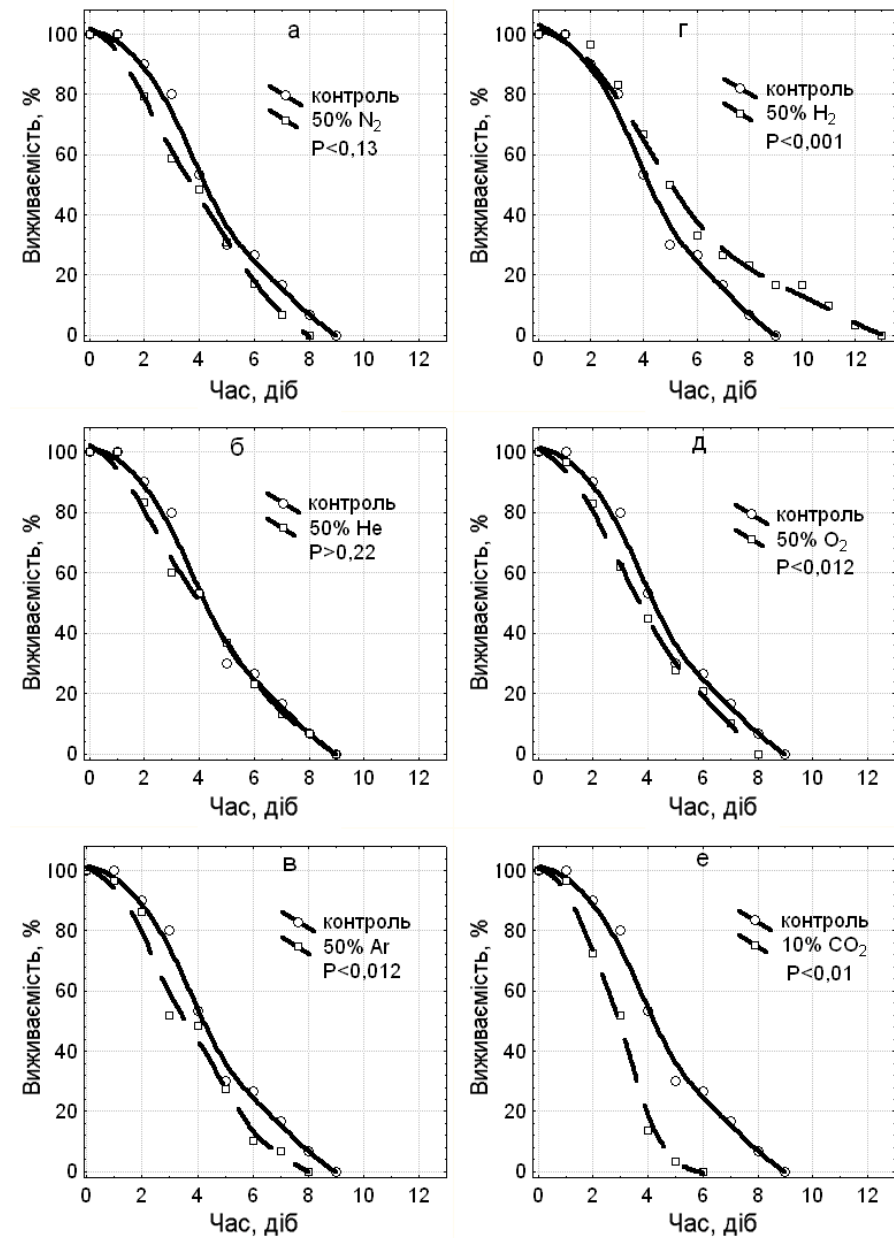


Рис. 3.61. Динаміка виживаності імаго дрозофіл, яких після 40-хвилинного УФ опромінення (256 нм, 50 Ват) тримали в повітрі (контрольна група) або в модифікованих атмосферах, що склалися з рівних об'ємів повітря з N<sub>2</sub>, He, Ar, H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> або 10 % CO<sub>2</sub>. Відмінності виживаності контрольних і піддослідних груп оцінювали за допомогою непараметричного критерію Вілкоксона.

*Гіпоксія.* З представлених графіків слідує, що зниження вмісту O<sub>2</sub> в атмосфері до приблизно 10 % шляхом додавання до повітря рівного об'єму N<sub>2</sub> не призводило до істотних змін виживаності молодих імаго дрозофіл (P < 0,13).

*Гелій.* В аналогічній серії дослідів з додаванням до повітря рівного об'єму He відмінності між контрольними і піддослідними групами були ще менш

вираженими (рис. 3.61 б). Отримані дані дозволяють зробити висновок, що збільшення вмісту He в атмосфері до 50 %, як видно, не викликає істотних змін репаративних і інших захисних механізмів, які визначають динаміку виживаності опромінених тварин.

*Аргон.* На відміну від He, додавання до повітря рівного об'єму іншого з випробуваних ІГ — Ar приводило до статистично значимого ( $P < 0,012$ ) прискоренню вимирання (рис. 3.61 в).

Хоча безпосередні мішені і механізми дії Ar дотепер залишаються нез'ясованими, проте, у ряді робіт було показано, що додавання Ar до вдихуваного повітря може призвести до посилення метаболічних процесів [21]. Такі результати були отримані також нами при утримуванні дрозофіл і мишей в атмосфері з Ar. Не виключено, що додаткове метаболічне навантаження на вже ушкоджений опроміненням організм приводить до ще більшого його розбалансування, що прискорює загибель опромінених імаго (рис. 3.61 в).

*Водень* виявився єдиним газом, додавання якого до повітря приводило до істотного поліпшення виживаності молодих імаго, опромінених УФ. Водень відомий своїми антиоксидантними і відновними властивостями [108, 120, 135, 191, 276]. Можливо, саме ці якості в сполученні з гіпоксією виявилися вирішальними, для позитивного впливу  $H_2$  на виживаність опромінених імаго дрозофіл (рис. 3.61 г).

*Кисень.* Гіпероксична атмосфера, модельована змішуванням рівних об'ємів повітря і  $O_2$ , як видно, приводить до погіршення динаміки їхньої виживаності після УФ опромінення (рис. 3.61 д).

Відомо, що підвищення вмісту молекулярного кисню в організмі може привести до посилення важко контрольованих окисних процесів, у тому числі тих, які проходять по вільно–радикальному механізму. Це, в свою чергу, може індукувати розвиток окисного стресу. Наслідки таких порушень можуть бути особливо негативними саме у опромінених тварин. Імовірно, цим можна пояснити несприятливий вплив підвищеного вмісту  $O_2$  на виживаність опромінених імаго (рис. 3.61 д).

*Вуглекислий газ.* Утримування у гіперкапнічній атмосфері, модельованій додаванням 10% CO<sub>2</sub> до повітря, приводило до найбільш помітного погіршення виживаності опромінених дрозофіл (рис. 3.61 е).

В роботах, проведених нами і іншими дослідниками [238] було показано, що утримування лабораторних тварин у гіперкапнічній атмосфері помірної сили (5-10 %) може привести до зниження інтенсивності метаболізму і подовження життя. Однак для опромінених тварин додавання 10 % CO<sub>2</sub> стає поза межним впливом, і негативно впливає на виживаність у стресорних умовах (рис. 3.61 е).

Таким чином, узагальнюючи результати описаних вище дослідів, можна зробити висновок, що утримання дрозофіл у штучних атмосферах, створених змішуванням рівних об'ємів повітря з N<sub>2</sub> і He істотно не впливає на динаміку виживаності молодих імаго, опромінених УФ-С протягом 40 хв. В аналогічних умовах додавання Ar і O<sub>2</sub>, а також 10 % CO<sub>2</sub> погіршують виживаність. У більшості випадків модифіковані атмосфери викликали посилення негативного ефекту УФ опромінення. Тільки атмосфера з H<sub>2</sub> позитивно впливала на виживаність молодих імаго дрозофіл після УФ опромінення. З огляду на можливу подібність ультрафіолетового і радіаційного опромінення у дрозофіл, варто звернути особливу увагу на позитивний вплив H<sub>2</sub>, і при можливості випробувати його гіпотетичну радіопротекторну дію в прямих дослідах з іонізуючим опроміненням.

### *3.8.2. Виживаність дрозофіл, що утримуються в модифікованих атмосферах, до і після опромінення ультрафіолетом*

У попередньому розділі були обговорені результати дослідів, в яких інтактних дрозофіл вміщували в умови штучної атмосфери відразу після УФ опромінення. Але певний інтерес представляло питання про те, чи могла попередня адаптація в штучних атмосферах стимулювати репаративні і захисні можливості, та сприяти покращенню виживаності організму після УФ

опромінення. На малюнках 3.62 – 3.67 наведені результати опромінення протягом 50 хв, УФ 256 нм, лампою потужністю 45 W. Після опромінення дрозофіл пересажували штучні атмосфери. Дрозофіли утримувались в таких умовах до повного вимирання. Контрольною групою в експерименті служили тварини, які також пройшли УФ опромінення, але утримувались у повітрі.

*Азот.* Дані про виживаність молодих і старих імаго дрозофіл, що утримуються в атмосфері з додаванням 20 % і 50 %  $N_2$  до і після УФ опромінення, представлені на рис. 3.62.

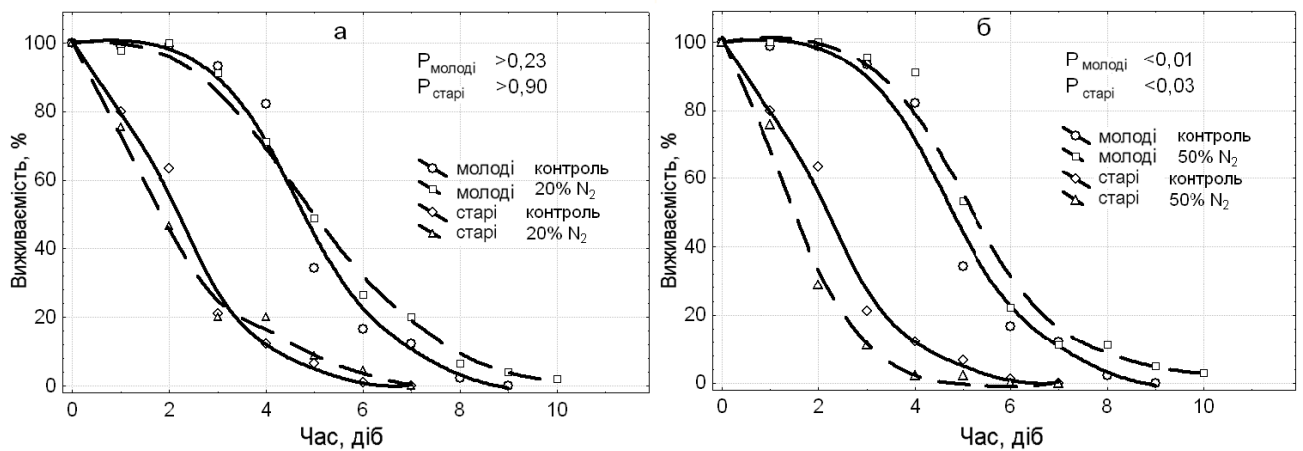


Рис. 3.62. Динаміка виживаності молодих (5-15 діб) і старих (50-60 діб) імаго дрозофіл, які після 7 діб адаптації в гіпоксичній атмосфері з додаванням 20 % (а) і 50 %  $N_2$  (б) до повітря піддавалися опроміненню УФ.

Із представлених графіків, насамперед, привертають на себе увагу істотні вікові відмінності виживаності після УФ опромінення. За цим показником молоді імаго контрольних і піддослідних груп набагато перевершували старих тварин ( $P < 10^{-7}$ ). Важливо те, що виражені вікові відмінності зберігалися у всіх інших досліджених штучних атмосферах. Помірна гіпоксія (20 %  $N_2$ ) достовірно не впливала на виживаність в обох вікових групах (рис. 3.62 а). Однак при більшій гіпоксії (50 %  $N_2$ ) достовірно покращувалась виживаність у молодих ( $P < 0,01$ ), але погіршувалась у старих імаго ( $P < 0,03$ ) (рис. 3.62 б).

*Гелій.* У цілому, графік динаміки виживаності дрозофіл, що перебували 7 діб в атмосфері гелію, після опромінення УФ, практично ідентичний графіку виживаності тварин, які знаходились в атмосфері азоту (рис. 3.62). В атмосфері

з додаванням 20 %  $\text{Ne}$  також привертають на себе увагу істотні вікові відмінності виживання після УФ опромінення.

Молоді тварини явно перевершують по цьому показнику старих імаго ( $P < 10^{-7}$ ). При додаванні 20 %  $\text{Ne}$  відсутність достовірного впливу на виживаність молодих дрозофіл зберіглася, як і в дослідях з додаванням аналогічного об'єму  $\text{N}_2$  ( $P > 0,73$ ). Однак у старих тварин навіть помірні концентрації  $\text{Ne}$  приводили до прискорення вимирання опромінених імаго ( $P < 0,05$ ).

Як і при дослідях з 20 %  $\text{Ne}$ , достовірні відмінності між контрольними і опроміненими молодими дрозофілами були відсутні при підвищенні вмісту  $\text{Ne}$  до 50% ( $P > 0,39$ ), у той час як для старих імаго було характерно погіршення виживаності ( $P > 0,12$ ).

*Аргон.* Приблизно такі ж результати були отримані в дослідях з додаванням  $\text{Ar}$ . Як і у випадку  $\text{Ne}$ , малі концентрації  $\text{Ar}$  не впливали на виживаність молодих дрозофіл ( $P > 0,59$ ), але впливали на групу старих імаго ( $P > 0,03$ ). При підвищенні концентрації  $\text{Ar}$  до 50 % достовірні відмінності між контрольними молодими ( $P > 0,95$ ) і старими ( $P > 0,12$ ) дрозофілами були відсутні.

*Водень.* Додавання 20 і 50 % об'єму  $\text{H}_2$  до атмосфери молодих імаго було єдиним випадком покращення виживаності в штучній атмосфері (рис. 3.63 а).

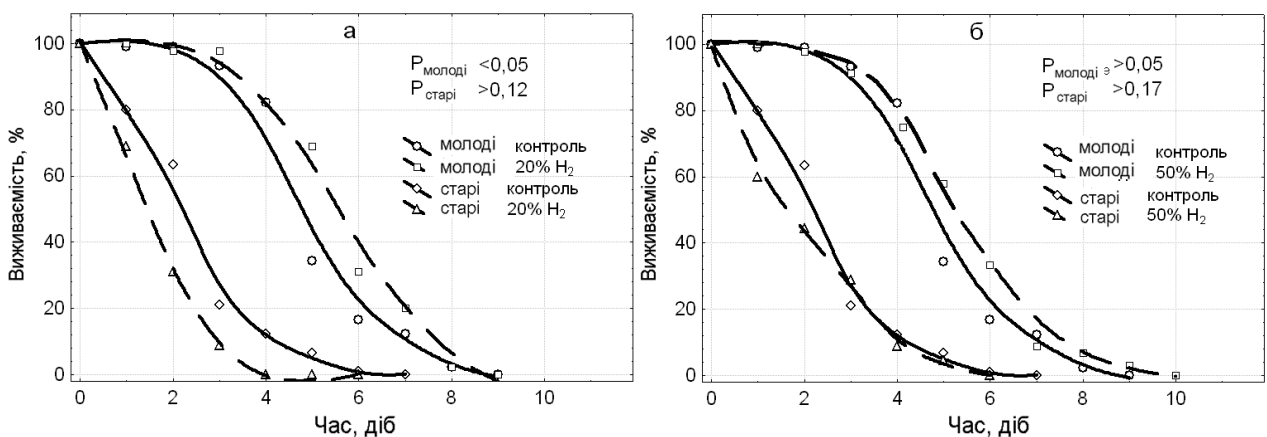


Рис. 3.63. Динаміка виживаності молодих (5-15 діб) і старих (50-60 діб) імаго дрозофіл, які після 7 діб адаптації в гіпоксичній атмосфері з додаванням 20 % (а) і 50 %  $\text{H}_2$  (б) піддавалися опроміненню УФ.

Ці результати збігаються з даними, представленими на рис. 3.61 г, де обговорювалася виживаність у штучній атмосфері після 40 хв УФ опромінення без адаптації.

*Кисень.* Гіпероксична атмосфера, модульована додаванням 20 мл  $O_2$  до 80 мл повітря, у результаті чого вміст  $O_2$  в атмосфері збільшувався до приблизно 37 %, призводила до помітного погіршення виживаності молодих ( $P > 0,23$ ) і старих ( $P > 0,03$ ) імаго дрозofil, які піддавались УФ опроміненню.

При підвищенні вмісту  $O_2$  в атмосфері до приблизно 60 % шляхом змішування рівних об'ємів повітря і  $O_2$  негативний вплив гіпероксії на виживаність опромінених тварин обох вікових груп залишався приблизно таким же, що і при 37 %  $O_2$  ( $P > 0,05$  для молодих, і ( $P > 0,12$  для старих тварин). Імовірно, 35 – 40 %  $O_2$  в атмосфері є досить сильним токсичним агентом, і наступне його підвищення до 60 % істотно не змінює динаміку виживаності.

*Вуглекислий газ.* До приблизно таких же висновків приводить аналіз впливу 10 % і 20 %  $CO_2$  на виживаність опромінених імаго.

Обидві випробувані гіперкапнічні атмосфери, імовірно, були позамежними по токсичному ефекту і приводили до приблизно однотипного погіршення виживаності, що особливо помітно в групах старих імаго, у яких час 50 % смертності скорочувався у кілька разів.

Таким чином, отримані дані дозволяють зробити висновок, що утримування молодих і старих дрозofil у штучних атмосферах до і після опромінення найчастіше приводило до погіршення виживання. Особливо яскраво це виражено у старих тварин. Привертає на себе увагу те, що гіпоксичні атмосфери, модельовані додаванням 20 % або 50 %  $N_2$ , He і Ar, проявляли порівняно невеликий вплив на виживаність опромінених тварин. Найбільш сильний негативний вплив був виявлений при додаванні  $O_2$  і  $CO_2$  в обох концентраціях і в обох вікових групах. І тільки утримування опромінених молодих дрозofil в атмосфері з  $H_2$  приводило до уповільнення їхньої загибелі, що вказує на перспективність подальшого вивчення його протекторних властивостей не тільки після УФ, але і іонізуючого опромінення.

### 3.8.3. Вплив штучних атмосфер на виживаність після теплового шоку

У доступній нам літературі не вдалося знайти роботи, у яких би вивчався вплив газового складу атмосфери на виживаність тварин різного віку після теплового шоку. У наших дослідах, дрозофіли різного віку піддавалися ТШ після адаптації в штучних атмосферах, створених додаванням до повітря різних концентрацій  $N_2$ ,  $Ar$  і  $He$ . В якості контролю служили комахи, яких утримували в чистому повітрі. Відомо, що фактори із критичним ефектом на виживаність після ТШ діють за принципом «все або нічого», тобто після ТШ особини або гинуть практично відразу після впливу, або виходять зі стресового стану без істотних ушкоджень. Виживаність оцінювали через 24 год після ТШ.

Проведені дослідження показали, що молоді і старі імаго дрозофіл істотно відрізнялися виживаністю після ТШ незалежно від атмосфери (рис. 3.64).

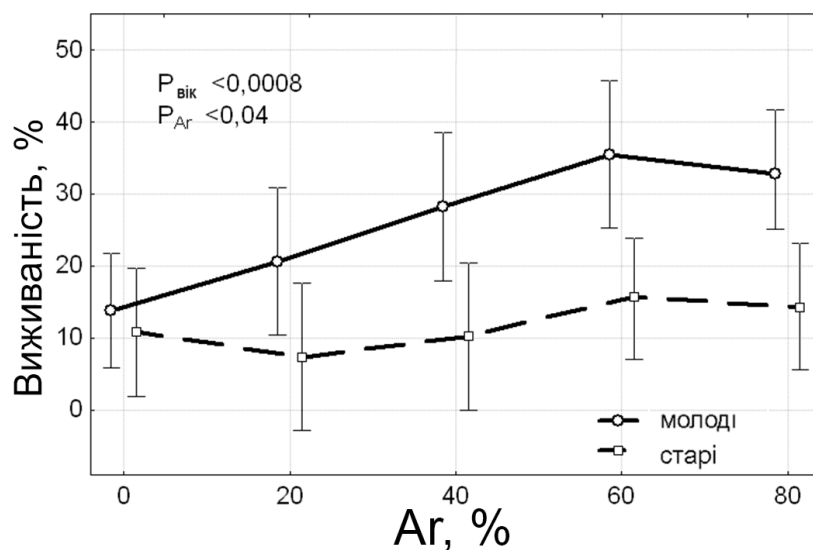


Рис. 3.64. Вплив тижневої адаптації в атмосфері з додаванням до повітря різних об'ємів  $N_2$  на виживаність молодих (15 діб) і старих (50-55 діб) імаго дрозофіл після ТШ (25 хв при  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Вірогідність впливу  $Ar$  і вікових відмінностей оцінювали двофакторним дисперсійним аналізом (factorial ANOVA).

Особин, які вижили після ТШ, можна повторно піддати такому ж стресу із приблизно однаковими результатами виживання, як і у першій сеанс впливу.

Найбільш достовірні статистичні відмінності були виявлені після інкубації в атмосфері з Ar (рис. 3.64). Вплив доданого газу ( $P > 0,0008$ ) і віку ( $P > 0,04$ ) були достовірними.

Додавання  $N_2$  до атмосфери могло бути причиною деякої тенденції до росту виживаності у молодих дрозофіл ( $P < 0,12$ ). В дослідях з додаванням He також були виявлені істотні вікові відмінності виживаності після ТШ ( $P > 0,002$ ). Ефект адаптації в атмосфері з He був недостовірний ( $P < 0,11$ ).

Отримані нами дані дозволяють зробити висновок, що молоді і старі імаго дрозофіли істотно відрізняються за здатністю виживати після сублетальних експозицій ТШ. У цьому сенсі вікові відмінності впливу ТШ подібні з аналогічними даними УФ опромінення і є наслідком зниження загальної адаптаційної здатності старих особин. У молодих самців спостерігається деяка тенденція до росту виживаності і при додаванні  $N_2$  і He, але достовірні відмінності були виявлені тільки для Ar. У самок вікові відмінності також були достовірними. Однак попередня адаптація до  $N_2$ , He і Ar не мала істотного впливу на життєздатність при ТШ.

#### *3.8.4. Сполучення теплового шоку з опроміненням ультрафіолетом*

ТШ і УФ опромінення представляються двома найбільш інформативними типами стресів. Вони мають тотальний характер дії і впливають на практично всі аспекти діяльності клітини. Водночас у них різні мішені і системи, які є лімітуючими для виживання, – репарація ДНК при УФ і стабільність макромолекул при ТШ. Для нас особливою цікавістю викликало питання: які відбуватимуться зміни виживаності при послідовній дії цих двох стресів. Тривалість ТШ скорочували до 20 хв, виживаність, як і в попередніх серіях, визначали через 24 години після ТШ. Для УФ цей момент ще відповідав прихованому періоду, і прямий вплив УФ на виживаність повинен бути мінімальним. Крім того, ми варіювали проміжком між двома впливами, піддаючи дрозофіл стресу одразу після завершення одного впливу або через 6

годин. За цей час між певна частина ушкоджень першого стресу, напевно, могла бути відновлена. Результати таких дослідів представлені на рис. 3.65.

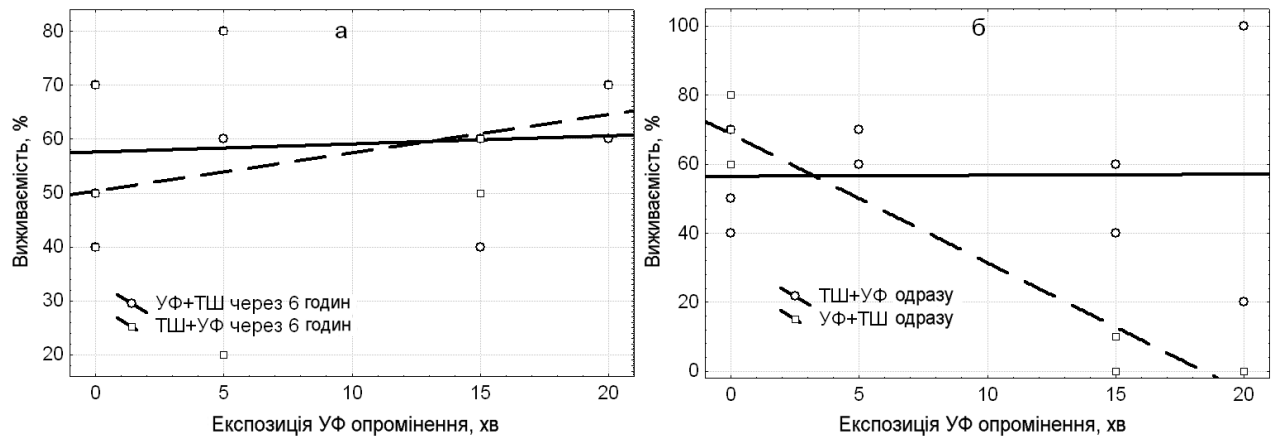


Рис. 3.65. Сполучення ТШ (38°C, 20 хв) з УФ-С опроміненням різної тривалості (від 5 до 20 хв) із проміжком 6 годин (а) або одразу після обох стресів.

Як видно із представлених ліній регресії, сполучення цих двох стресів із проміжком 6 годин не має істотного впливу на виживаність наступного дня після впливів. Приблизно такі ж результати отримані при УФ опроміненні одразу після ТШ. Як видно, піддослідні дрозофіли відносно швидко виходять із критичного стану, викликаного ТШ. Протягом 6 годин проміжку між двома стресами вони, імовірно, встигають відновити значну частину ушкоджень, які наступають після УФ опромінення. Наприклад, відомо, що одиночні розриви ДНК практично повністю, а нерідко і «надлишково» репаруються протягом перших 15-30 хвилин після УФ. Однак якщо ТШ починається відразу після УФ, коли такі ушкодження ще не відновлені, те це, очевидно, приводить до підсумовування пошкоджуючих ефектів ТШ і УФ, і виживаність падає майже до нуля (рис. 3.65 б).

### 3.8.5. Аліментарна депривація

Вживаність при деприваційному (голодовому) стресі є відносно простим у виконанні, але інформативним тестом для оцінки життєздатності організму. Строки виживання при цьому залежать, насамперед, від двох змінних –

швидкості витрачання енергетичних і субстратних ресурсів і загальної життєздатності організму.

*Азот.* Додавання  $N_2$  до повітря є простою і розповсюдженою моделлю створення гіпоксичної атмосфери. Як слідує з представлених даних, зниження вмісту  $O_2$  до 10% (додавання 50 мл  $N_2$  до 50 мл повітря) достовірно покращує динаміку виживання при голодовому стресі. Однак при наступному зниженні вмісту  $O_2$  до 5 % (додавання 80 мл  $N_2$  до 20 мл повітря) динаміка виживання контролю і досліду стає практично ідентичною (рис. 3.66).

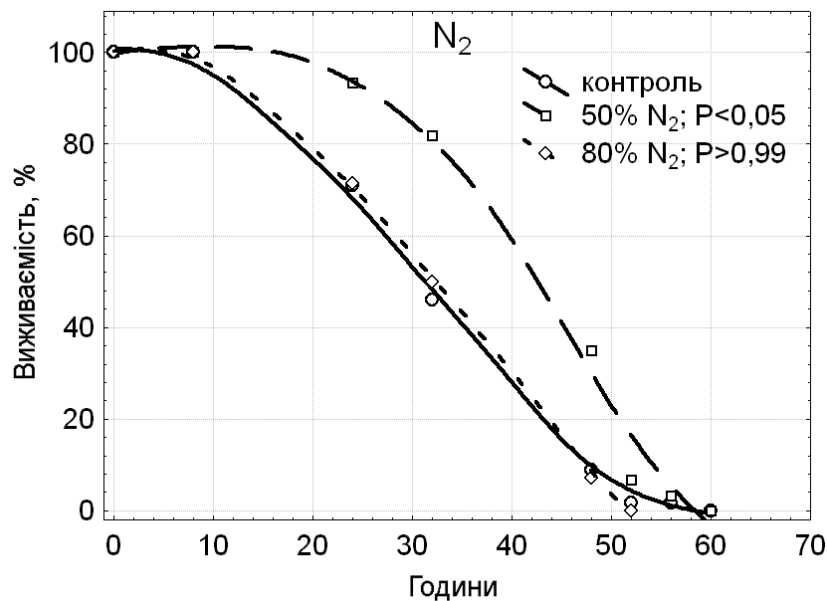


Рис. 3.66. Вплив 7 діб адаптації в атмосфері з додаванням 50 % і 80 % (по об'єму)  $N_2$  до повітря на виживаність дрозофіл при повному голодуванні. Вірогідність відмінностей між контрольними і дослідними групами оцінювали непараметричним критерієм Вілкоксона (Wilcoxon matched pairs test).

Як слідує з раніше отриманих даних [26, 95], швидкість метаболічних процесів при гіпоксії трохи знижується, що може сприяти більш ощадливому витрачання енергетичних ресурсів і покращенню виживання. Цим, очевидно, можна пояснити достовірні відмінності імаго, що утримуються у відносно помірній для дрозофіл гіпоксії (10 %  $O_2$ ). Однак при наступному посиленні гіпоксії, позитивний ефект гіпоксії, імовірно, повністю компенсуються витратами на гіпервентиляцію, що приводить до практично повного збігу динаміки виживаності в контрольних і піддослідних групах.

*Гелій* додавався до повітря в таких же пропорціях, що і  $N_2$  (50 мл і 80 мл до загального об'єму). Це дозволяє використати дані по  $N_2$  у якості своєрідного додаткового контролю на специфічність ефектів He. У цілому, графік впливу прекоondiціонування протягом 7 діб в атмосфері гелію на виживаність дрозофіл при повному голодуванні дуже схожий із графіком такого ж прекоondiціонування в атмосфері з  $N_2$  (див. рис. 3.66). Достовірні відмінності в порівнянні з контрольними імаго спостерігаються тільки для групи у 80 % He ( $P < 0,05$ ). При зменшенні вмісту гелію в атмосфері до 50 % спостерігається лише тенденція до покращення виживаності ( $P < 0,08$ ). Гелій, імовірно, має ширший діапазон позитивного впливу на виживаність при голодуванні.

*Аргон*. Виживаність в атмосфері з добавками Ar помітно перевершувала аналогічні показники дослідів з використанням інших модифікованих атмосфер. Обидві випробувані концентрації Ar приводили до достовірного уповільнення темпів загибелі імаго дрозофіл ( $P < 0,03$ ). Більше того, ці групи були єдиними, у яких збільшувалися максимальні строки виживання з 60 до 70 годин. У цілому, порівняння із групою з добавками  $N_2$  свідчить про досить виражений специфічний ефект ІГ. Хоча внесок гіпоксії при цьому не виключається, додавання ІГ створює більше сприятливі умови для виживання, що приводить до розширення діапазону концентрацій із захисним ефектом.

*Водень*. Відомо, що молекулярний  $H_2$  володіє рядом унікальних властивостей, які роблять його багатообіцяючим і специфічним геропроєктором. Завдяки мінімальним розмірам молекули, водень майже не має перешкод в організмі і клітині. Він може легко проникнути практично всюди і проявляє захисні та, зокрема, антиоксидантні і відновні властивості там, куди не можуть проникнути більші молекули з аналогічними ефектами. Проте, низька швидкість хімічних реакцій за участю  $H_2$ , порівняно з аналогічними ферментативними процесами, дає проявитися позитивному впливу  $H_2$  тільки при тривалих експозиціях [120, 276]. Можливо, цим пояснюється порівняно невеликий позитивний вплив  $H_2$  на виживаність при голодовому стресі.

Достовірний ( $P < 0,05$ ) позитивний вплив на виживаність при голодуванні було виявлено тільки при 50 %  $N_2$ . У цілому, дані, отримані з  $N_2$  подібні до даних для  $N_2$ . Тому не можна виключити, що основним діючим початком в обох випадках є гіпоксія.

*Вуглекислий газ.* Проведеними раніше дослідженнями було показано, що підвищений вміст  $CO_2$  в атмосфері може привести до уповільнення інтенсивності метаболічних процесів [26, 95], що, здавалося, повинно сприяти виживанню при голодовому стресі. Однак при утримуванні в гіперкапнічній атмосфері зростає ймовірність порушення кислотно-лужної рівноваги і розвитку ацидотичних ушкоджень. Можливо, цим можна пояснити те, що підвищення вмісту  $CO_2$  в атмосфері до 5 % і 15 % не було виявлено позитивного ефекту.

При утримуванні імаго в атмосфері з 5 %  $CO_2$  динаміка виживання істотно не відрізнялася від контрольних величин. Однак при 15 %  $CO_2$  спостерігалася тенденція ( $P < 0,07$ ) до погіршення здатності вижити при голодовому стресі, скорочуючи тривалість життя з 60 до 50 годин.

*Кисень.* Гіпероксію створювали додаванням до повітря  $O_2$  з розрахунку 50 мл і 80 мл  $O_2$  до 100 мл об'єму. Гіпероксичні атмосфери приводили до помітного погіршення динаміки виживаності дрозозфіл при голодовому стресі до 48 годин у порівнянні з 60 годинами у контрольних тварин. Проте, непараметричний критерій Вілкоксона не виявив достовірні розходження між контрольними і піддослідними групами ( $P < 0,11$ ). Деякою мірою це пояснюється тим, що короткострокове утримування молодих імаго в гіпероксичній атмосфері звичайно не приводить до негайного підвищення темпів метаболізму. Як свідчать результати наших досліджень, важко контрольований ріст обмінних процесів звичайно настає тільки при хронічній дії гіпероксії у старих тварин.

Отримані дані дозволяють зробити висновок, що тільки порівняно помірні для дрозозфіл гіпоксичні атмосфери з додаванням 50 %  $N_2$  і  $N_2$  приводили до покращення виживаності при голодовому стресі. При аналогічній постановці

дослідів II забезпечували більше виражену позитивну дію. І нарешті, гіпероксичні і гіперкапнічні атмосфери, скоріше, приводили до погіршення виживаності молодих імаго дрозофіл при голодовому стресі.

Основні наукові результати даного розділу опубліковані в працях [2, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19].

### **3.9. Вплив ША на вікову динаміку смертності і тривалість життя дрозофіл**

У дослідах, в яких вивчаються можливості подовження життя, важливо мати популяцією тварин з високою тривалістю життя. Інакше, високі відсотки подовження життя можуть бути інтерпретовані як наслідок нейтралізації негативних факторів, які викликали невелику ТЖ контрольних тварин. На жаль, в експериментальному пролонгуванні життя така ситуація є розповсюдженим явищем. У наших дослідах по вивченню впливу гіпоксичних атмосфер середня ТЖ контрольних дрозофіл перевищувала 60 діб, що відповідає кращим стандартам цього параметра. Оскільки дослідження ША проводилися вперше, тому для виявлення можливих статевих відмінностей були використані самки і самці, узяті з однієї і тієї ж популяції розмноження. Основним критерієм впливу штучних атмосфер слугувало порівняння вікової динаміки виживаності за допомогою непараметричного методу (критерій Вілкоксона) і оцінка моменту 50 % смертності.

Результати дослідів по вивченню динаміки виживаності в умовах гіпоксії, створеної додаванням  $N_2$  до повітря, представлені на рис. 3.67.

Гіпоксія, створена 10 %  $N_2$ , практично не впливає, а 20 % гіпоксія трохи покращує динаміку виживаності дрозофіл. Момент 50 % смертності, що у більшості випадків добре збігається із середньою ТЖ, збільшується в межах 10 %. Такого типу результати, були отримані нами і в інших аналогічних серіях дослідів [27, 110].

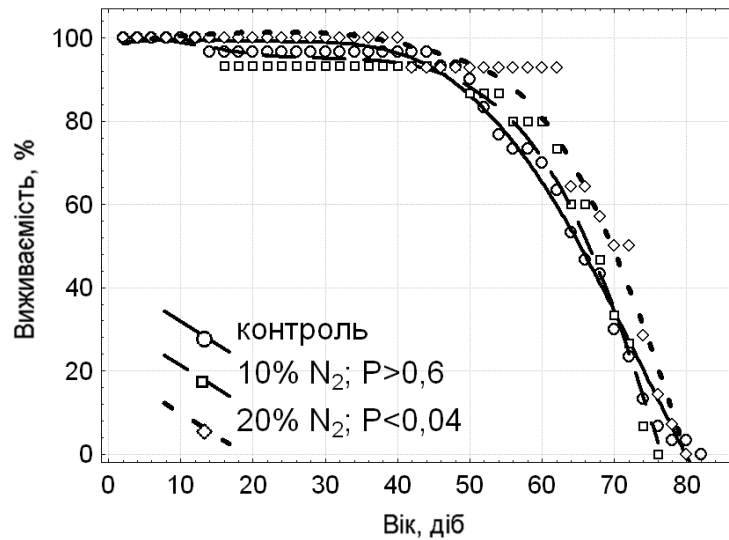


Рис. 3.67. Вплив гіпоксичної атмосфери, створеної додаванням до повітря 10 % і 20 %  $N_2$ , He або Ar, на вікову динаміку виживаності самців дрозофіл. Статистичну значимість розходжень між контрольними і експериментальними групами оцінювали за допомогою непараметричного критерія Вілкоксона.

Дослідження з додаванням He до повітря показали, що вже невеликі концентрації цього газу достатні для достовірного покращення динаміки виживаності і подовження життя (рис. 3.68).

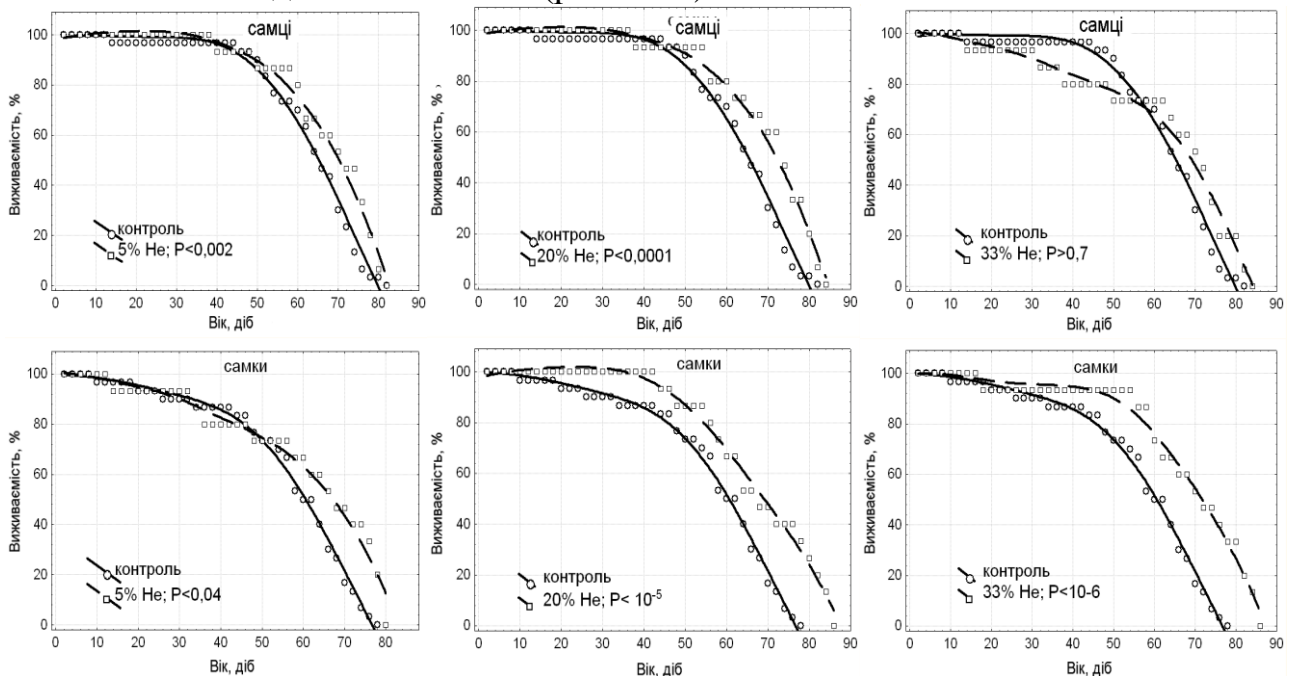


Рис. 3.68. Вплив гіпоксичної атмосфери, створеної додаванням до повітря 5 %, 20 % і 33 % He, на вікову динаміку виживаності самців і самок дрозофіл. Статистичну значимість розходжень між контрольними і експериментальними групами оцінювали за допомогою непараметричного критерія Вілкоксона.

Такий ефект не є типовим для настільки слабкої гіпоксії, що викликає додавання 5 %  $\text{Ne}$  до атмосферного повітря, і скоріше, свідчить про специфічний ефект  $\text{Ne}$ , ніж гіпоксії. Доза 20 %  $\text{Ne}$  також показала позитивний вплив на виживаність дрозofil обох статей. При наступному підвищенні вмісту  $\text{Ne}$  до 33 % виявився негативний ефект на ранніх етапах у групі самців, але був відсутній у самок, де ріст середньої ТЖ наближається до 20 % (рис. 3.68).

Таким чином, результати дослідів з додаванням помірних концентрацій  $\text{Ne}$  до повітря (до 1/3) дозволяють зробити висновок, що такі штучні атмосфери часто впливають у другій половині досліджуваного строку, тобто після періоду адаптації. На ранніх етапах дії 33 %  $\text{Ne}$  спостерігається підвищення смертності в самців, які відсутні при 5 % і 20 %.

У дослідях з  $\text{Ar}$  можливі негативні дії на самців на ранніх етапах проявляються вже при дозі 5 % (рис. 3.69).

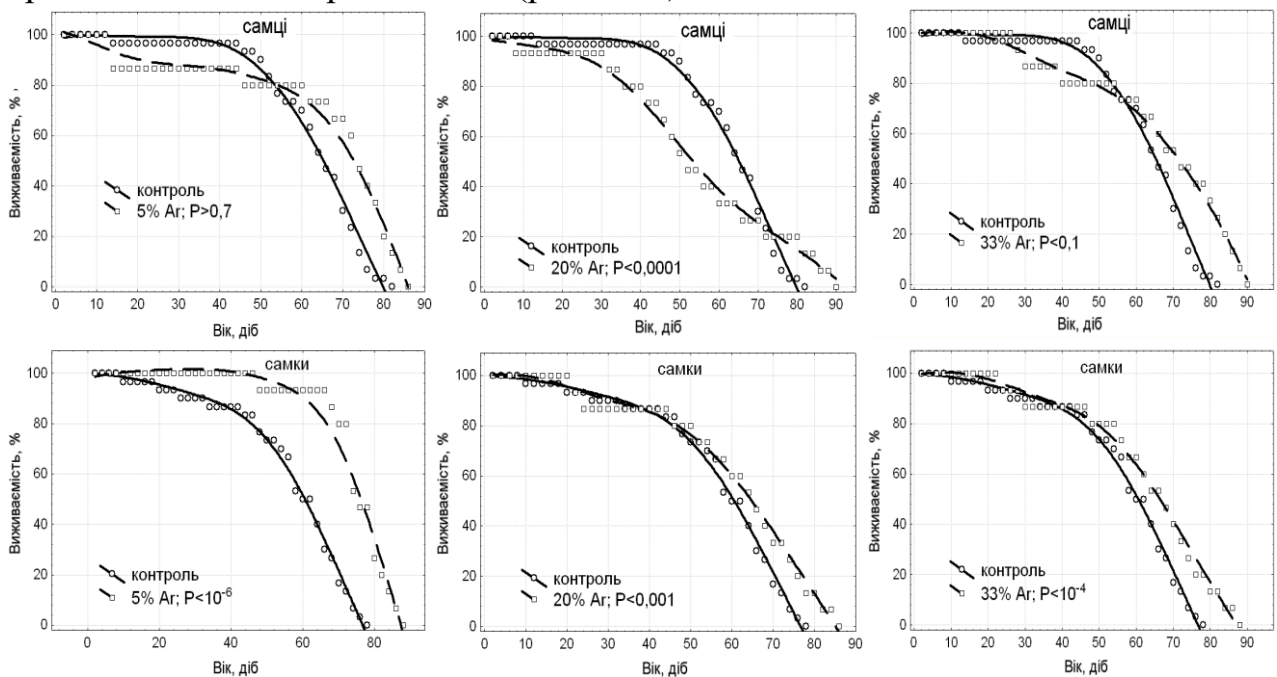


Рис. 3.69. Вплив гіпоксичної атмосфери, створеної додаванням до повітря 5 %, 10 %, 20 % і 33 %  $\text{Ar}$ , на вікову динаміку виживаності самців і самок дрозofil. Статистичну значимість розходжень між контрольними і експериментальними групами оцінювали з допомогою непараметричного критерія Вілкоксона.

Такий ефект був відсутній у самок, де привертає на себе увагу істотне збільшення середньої і максимальної ТЖ. При концентрації  $\text{Ar}$  20 % вікова

динаміка виживаності показує явні ознаки погіршення. Результати дослідів з 33 % Ar в атмосфері були схожі на дані, отримані при 20 % (рис. 3.69).

Таким чином, додавання до повітря різних концентрацій He і Ar приводить до зміни вікової динаміки виживаності. При цьому нерідкі випадки, коли на ранніх етапах дії таких атмосфер смертність росте, що особливо характерно для самців. Найбільш виражене покращення вікової динаміки смертності і збільшення ТЖ спостерігалось при порівняно високих концентраціях He (>20 %), але малих концентрація Ar (<20 %).

### *3.9.1. Концентрації He і Ar, що лінійно зростають або зменшуються*

В описаних дослідах рівень гіпоксії підтримувався практично незмінним протягом усього випробуваного строку. Чи є такий режим дії ША найбільш оптимальним? Існує висока ймовірність того, що впливи оптимальної сили повинні мати більш складну динаміку. На жаль, повне вивчення цього питання вимагає великого обсягу експериментальних розробок і збільшення ресурсів для досліджень. Тому ми обмежилися лише випробуванням одного з найбільш простих варіантів змінних концентрацій — лінійного збільшення або зменшення концентрацій He або Ar від 0 до 80 % зі швидкістю 1 % за добу. Вікова динаміка виживаності самців і самок дрозофіл, що утримувались в лінійно зростаючих і зменшуваних концентраціях, He, представлені на рис. 3.70.

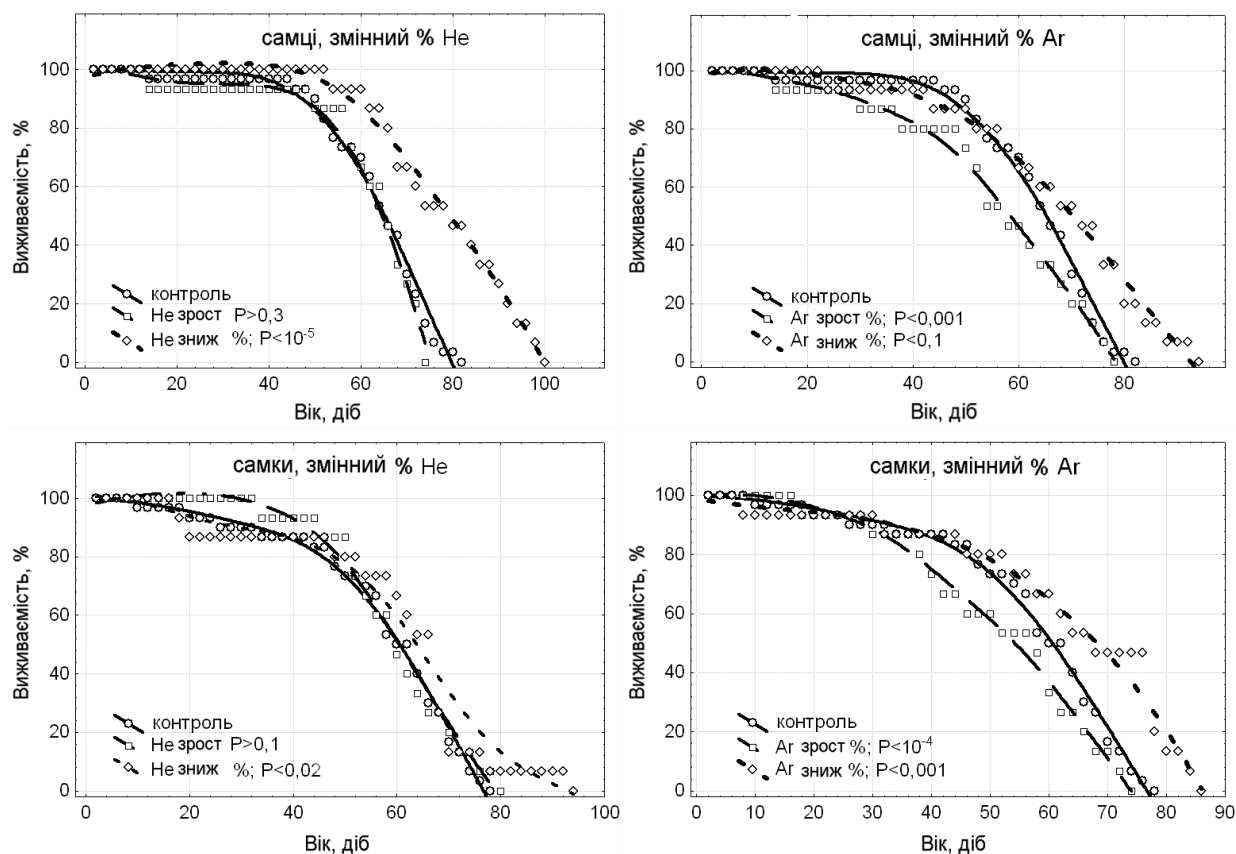


Рис. 3.70. Вплив гіпоксичної атмосфери, створеної додаванням до повітря зростаючих і зменшуваних концентрацій (1 % /добу) Ne і Ar на вікову динаміку виживаності самців і самок дрозофіл. Статистичну значимість розходжень між контрольними і експериментальними групами оцінювали за допомогою непараметричного критерія Вілкоксона.

З наведених графіків видно, що у самців поступово зростаючі концентрації Ne дозволяли уникнути підвищення смертності на ранніх етапах дії. Однак при цьому був відсутній і ефект уповільнення смертності в другій половині онтогенезу, у результаті чого динаміка виживаності таких особин скільки-небудь помітно не відрізнялася від контрольної групи. Разом з тим зменшувані концентрації вірогідно покращували динаміку виживаності і сполучені з нею показники середньої і максимальної ТЖ.

У самок зростаючі концентрації також не мали істотного ефекту на динаміку виживаності, а спадаючі концентрації покращували цей показник у меншому ступені, ніж у самців. В аналогічній серії дослідів з використанням Ar

зростаючі концентрації приводили до підвищення смертності, а спадаючі сповільнювали динаміку вимирання у представників обох статей (рис. 3.70).

Узагальнюючи отримані результати можна сказати, що гіпоксичні атмосфери, модельовані додаванням до повітря помірних постійних концентрацій  $N_2$ , He і Ar (до 33 %), у більшості випадків приводили до деякого покращення динаміки виживаності. На відміну від  $N_2$ , ІГ проявляли позитивну дію, починаючи з 5 %. Нажаль, сприятливий вплив на пізніх етапах життя нерідко перекреслювався підвищенням смертності на ранніх етапах їхнього застосування, що особливо типово для Ar. Результати дослідів зі змінними концентраціями дозволяють зробити висновок, що гелій не має істотного впливу на виживаність при режимі лінійного росту зі швидкістю 1 %/добу від 0 до 80 %, але помітно покращує динаміку вимирання при спадаючих концентраціях з такою ж швидкістю. В аналогічних умовах Ar також сприятливо впливав на динаміку виживаності самок, але прискорював динаміку смертності самців. Виживаність імаго, вирощених в атмосфері з 50 % He, які потім почали утримуватись на повітрі, покращувалась. Тоді як в аналогічних умовах Ar скорочував строки існування через прискорення смертності протягом першої половини імагіального життя. Не виключено, що для адаптації до атмосфер із ІГ потрібний певний період часу. Тому, для успішного проходження цього важкого періоду, очевидно, потрібні додаткові заходи обережності, включаючи особливим чином підібрані режими змінних концентрацій ІГ.

Основні наукові результати розділу опубліковані в працях [9, 11, 15].

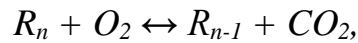
## РОЗДІЛ 4.

### ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Старіння є підсумковим результатом постійного протистояння великої кількості руйнівних і відновлювальних зовнішніх та внутрішніх факторів. У багатоклітинних організмів, на жаль, руйнація йде швидше, ніж відновлення, що призводить до накопичення порушень на всіх рівнях біологічної організації, зниження життєздатності і смерті організму. Вікові зміни відбуваються у всьому організмі, і для того, щоб успішно протистояти тотальності вікових порушень, потрібно мати адекватні, універсальні контрвпливи. Енергія і температура є одним з небагатьох факторів, які відповідають всім вимогам такої універсальності. Тому, цілеспрямована модуляція генерації енергії і терморегуляції є найбільш багатообіцяючими підходами уповільнення старіння та подовження тривалості життя.

Результати проведених нами порівняльно-фізіологічних досліджень свідчать про те, що особливості старіння і довголіття в значній мірі визначені основними морфофізіологічними параметрами організму (gross morphophysiological indices), зокрема, інтенсивністю метаболізму, температурою тіла і надійністю функціонування кислотно-лужного гомеостату [75, 145]. Інтенсивність метаболізму займає особливе положення в цьому списку, оскільки її зниження приводить до істотного подовження життя не тільки на філогенетичних, але і на онтогенетичних моделях [40, 154]. У цьому зв'язку пошук неінвазивних шляхів зниження енергетичних витрат отримує особливу значимість, оскільки всі процеси життєдіяльності організму енергозалежні, а, отже, управління генерацією енергії може стати ключем для цілеспрямованих змін практично всіх біологічних процесів. Основною складністю може стати вибір оптимальних режимів такого управління, мінімізація його негативних наслідків, а також вироблення способів і стратегії його використання для розв'язання конкретних біологічних і медичних проблем.

У самому загальному виді генерацію енергії можна описати рівнянням:



де  $R_n$  і  $R_{n-1}$  – органічна сполука до і після окислювання із числом атомів вуглецю, відповідно рівних  $n$  і  $n-1$ . Як відомо із законів кінетики хімічних реакцій, швидкість прямої реакції описується рівнянням  $V_{пр} = k_{пр} \cdot [R_n] \cdot [O_2]$ , а швидкість зворотної реакції  $V_{зв} = k_{зв} \cdot [R_{n-1}] \cdot [CO_2]$ , де  $k_{пр}$  і  $k_{зв}$  – константи прямої і зворотної реакцій [12]. Оскільки концентрації  $[R_n]$  і  $[R_{n-1}]$  звичайно рівні або близькі, то підсумковий результат генерації енергії насамперед повинен визначатися парціальним тиском  $O_2$  і  $CO_2$  у клітинах. Отже, варіюванням  $P_{O_2}$  і  $P_{CO_2}$  в атмосфері можна модифікувати відповідні параметри в клітинах і тим самим цілеспрямовано змінювати інтенсивність обмінних процесів.

В цьому зв'язку важливо врахувати те, що зародження життя, а також основна частина еволюції відбувалася в атмосфері, де вміст  $CO_2$  був на порядки вищий, ніж  $O_2$  [106, 220, 273]. Поява автотрофів, що синтезують органічні сполуки з неорганічних, і в якості побічного продукту при цьому виділяють  $O_2$ , означала початок ко-еволюції атмосфери і живих систем [165]. Зміни атмосфери стимулювали пошук нових систем адаптації і ніш перебування, а наростаюча маса живих об'єктів індукувала черговий цикл змін атмосфери. Лише порівняно недавно за еволюційними мірками кількість  $O_2$  в атмосфері почала стрімко рости, і в наші дні вже не вміст  $CO_2$  на порядки перевищує вміст  $O_2$ , як це було протягом більшої частини еволюційного розвитку, а, навпроти, кількість  $O_2$  перевищує вміст  $CO_2$  в 700 разів [100]. Виживання в умовах високих концентрацій такого токсичного і генотропного фактору, як кисень, який, крім всього іншого, індукує виникнення вільних радикалів, очевидно, стимулювало створення нових захисних і адаптивних систем, які беруть участь у підтримці рівноваги в антиоксидантних, репаративних, окислювально-відновних і кислотно-лужних процесах [209]. Такі зміни ще більше ускладнили і без того складну біологічну організацію, що, зробило її менш надійною і енергетично більш витратною. Принаймні, частково цим можна пояснити те, що при утримуванні сучасних видів тварин у середовищах з високим вмістом  $CO_2$  і пропорційно низьким вмістом  $O_2$ , газовий склад яких

нагадує еволюційно древні атмосфери (ДА), вони, очевидно, можуть «відключити» або послабити навантаження на "нещодавно" (в еволюційному плані) придбані і тому часто недостатньо ефективні захисні системи [280]. Теоретично це повинно знизити інтенсивність метаболічних витрат і підвищити життєздатність. Як показали результати наших експериментів, дійсно, утримування в умовах ДА знижує рівень метаболічних витрат, підвищує життєздатність у стресорних умовах і збільшує тривалість життя (ТЖ) [95]. Важливо те, що ДА дозволяють вирішити проблему модуляції метаболічних процесів з мінімальною інвазією, тому що зміни газового складу атмосфери діють через еволюційно добре «відшліфовані» канали прямих і зворотних зв'язків. Більше того, існування безлічі газоподібних з'єднань і схем їхнього застосування збільшує ймовірність того, що при ретельному експериментальному підборі будуть знайдені варіанти з потрібними ефектами.

Сказане робить штучні атмосфери і, зокрема, середовища, що нагадують ДА, багатообіцяючими і універсальними засобами, як для керування нормальними фізіологічними процесами, так і для профілактики і лікування патологічних порушень. Важливо те, що, на відміну від найчастіше токсичних медикаментозних засобів, наприклад, антибіотиків і інших інгібіторів метаболізму, впливи за допомогою штучних атмосфер пов'язані з мінімальною зовнішньою інвазією.

У нашій роботі зроблена спроба з'ясувати вплив гіпоксичних, гіпероксичних і гіперкапнічних атмосфер, які створювались за допомогою додавання до повітря  $O_2$ ,  $CO_2$ , He, Ar,  $N_2$  і  $H_2$ , на інтенсивність газообміну, рухову активність, антиоксидантний захист, кислотно-лужну рівновагу і інші детермінанти довголіття у найбільш популярних в дослідницькій практиці видів тварин – мишей і дрозофіл. Особлива увага була приділена вивченню впливу штучних атмосфер на ТЖ і життєздатність у стресорних умовах. Адже такі дослідження не тільки допомагають зрозуміти можливі механізми дії, але і мають самостійне значення і можуть бути використані при розробці відповідних протекторних засобів. Відмінною рисою роботи є те, що вона

виконана на своєрідному «сплаві» порівняльно-фізіологічного аналізу і прямих експериментів на лабораторних тваринах різного виду, віку і статі. Використані нами тварини були паспортизовані, вирощувалися і утримувалися в нашій лабораторії або у віварії ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України» на стандартних умовах. Порівняльно-фізіологічні дані про ссавців різних видів були зібрані з відомих джерел, зокрема, відкритих баз даних PubMed і AnAge.

У філогенетичних дослідженнях з використанням інформації про більш, ніж 370 видів ссавців було показано, що між видовою ТЖ і рівнем теплопродукції існує зворотна залежність з дуже високою вірогідністю коефіцієнта кореляції ( $P < 10^{-30}$ ) (рис. 3.5). По суті, аналогічні результати були отримані нами і при аналізі залежності довголіття з рівнем обмінних процесів у дрозофіл, інкубованих при різних температурах (рис. 3.1). Було виявлено, що поряд з такими відомими детермінантами довголіття, як рівень метаболізму і маса тіла, прості по визначенню, але основні по суті показники, наприклад, що характеризують, кислотно-лужну рівновагу або  $P_{CO_2}$ , можуть бути важливими факторами, що визначають рівень метаболізму і довголіття. Такий висновок особливо чітко проявляється при аналізі видів з «екстремальним» довголіттям, які є представниками 4 різних класів тварин: молюск *Arctica islandica*, рептилія *Dermochelys coriacea* (гігантська морська черепаха), і ссавці – *Megaptera novaeangliae* (горбатий кит) і *Heterocephalus glaber* (голий землекоп).

Так, рекордсменом по тривалості життя в царстві тварин є двостулковий молюск *Arctica islandica*, що доживає до 500 років. Удвічі меншу максимальну тривалість життя має горбатий кит, який живе до 220-240 років, тоді як черепаха доживає до 160 років. Голий землекоп – чемпіон з довголіття в межах самого великого надряду ссавців – гризунів. Він живе більше 32 років, також істотно перевершуючи родичів по наряду (рис. 3.5).

При аналізі того, що може давати вищевказаній тварині таку явну перевагу по МТЖ над іншими видами у своєму таксоні загальним виявляється знижений метаболізм. Так, кит досягає цього характером дихання, роблячи 1-2 вдиха

протягом 10-15 сек і пірнаючи під воду на 15-20 хв. При цьому  $pO_2$  поступово знижується, а  $pCO_2$  росте. З черепахою, власне кажучи, відбувається те ж саме, з тією лише різницею, що вона здатна пірнати на годину. У землекопа подібний ефект досягається за рахунок життя під землею великими колоніями в норах з дуже вузькими проходами, і закупореними входами. Як показали прямі виміри, вміст  $O_2$  і  $CO_2$  у норі, стають порівнянними і близькими 10 %. Нарешті, *Arctica islandica*, мабуть, піддає себе найтривалішому періоду мінімізації газового і субстратного потоків, зариваючись у морський мул на строк до тижня.

Примітно, що довгожителем є не тільки горбатий кит, а весь підряд китоподібних, предки яких по еволюційним міркам порівняно недавно – кілька мільйонів років тому – жили на суші, але потім перейшли до життя в океані. Представники цього підряду, які також існують в умовах гіперкапнії і гіпоксії в середньому живуть в 1,5 рази довше, ніж ссавці в цілому.

Заслуговує на увагу те, що за допомогою врахування метаболічних і терморегуляторних факторів можна пояснити, здавалося, парадоксальні відмінності довголіття близькоспоріднених видів, наприклад, мишей і ГЗ.

Так, згідно з нашими оцінками, швидкість метаболізму ГЗ в 4-6 разів нижче, ніж у мишей [98, 182], що може забезпечити збільшення максимальної тривалості життя приблизно в 5 разів, тоді як більш низька температура тіла (на 3-4 °C) може привести до збільшення тривалості життя приблизно в 3 рази.

Окрім впливу атмосфери на метаболізм, не потрібно забувати і про інші шляхи можливої корекції обмінних процесів. Наприклад, споживання їжі, швидкість метаболізму і температура тіла зазвичай розглядаються як тісно взаємопов'язані змінні, які в першу чергу регулюються гіпоталамусом. Проте детальніший аналіз свідчить про те, що їх мішені і механізми дії можуть бути різними і незалежними. Так, вважають, що споживання їжі контролюється в основному хвостатим ядром гіпоталамуса [233], терморегуляція - нейронами преоптичної області [239], а інтенсивність метаболічних процесів управляється віссю гіпоталамус-гіпофіз-щитовидна залоза [85].

Таким чином, спільна дія зазначених чинників – гіпометаболізма і гіпотермії – може бути основою для приблизно 8-кратної різниці максимальної тривалості життя ГЗ і мишей [60, 155].

Дані про екстремальне довголіття свідчать про те, що підвищення  $P_{CO_2}$  і зниження  $P_{O_2}$  може бути ефективним засобом уповільнення інтенсивності метаболічних процесів, подовження життя і зниження частоти вікової патології [75, 138, 184].

З проведеного нами філогенетичного аналізу також слідує, що для довголіття тварин важливі не тільки та, бути може, не стільки середні величини, але і гомеостатична стабільність відповідних систем. [7, 136]. Сама ідея про те, що види з високою ТЖ повинні мати більш стабільні гомеостатичні системи, не нова і обговорювалася багатьма [104, 107, 174]. Однак такі обговорення, як правило, носили концептуальний характер і не були підтримані відповідним дослідницьким матеріалом. Нами зроблений такий кількісний аналіз за допомогою зіставлення коефіцієнта варіації рН крові ( $CV_p$ ) з видовою ТЖ, масою тіла і рівнем метаболізму у ссавців (рис. 3.7). Виявилось, що  $CV_p$  демонструє високо достовірні кореляції одночасно з видовою ТЖ ( $r = -0,670$ ;  $P < 0,00007$ ), рівнем метаболізму ( $r = 0,692$ ;  $P < 0,001$ ) і масою тіла ( $r = -0,689$ ;  $P < 0,00004$ ). Філогенетичний аналіз представляється цікавим не тільки тому, що він є спробою узагальнення результатів безпрецедентних за масштабами еволюційних пошуків. Він ще і раціональний і мало витратний, тому що проводиться з метою одержання додаткової інформації з даних, які вже були використані іншими дослідниками і не були призначені для вивчення довголіття.

Онтогенетична ж частина досліджень, як це характерно для піонерських робіт скринінгового характеру, була проведена з використанням короткоживучих видів лабораторних тварин – дрозофіл і мишей. Слід зазначити, що існують різні способи створення ША, з яких перевагу нами було віддано, так званому, гіперкапнічно-гіпоксичному середовищу (ГГС). Суть ГГС полягає в тому, що досліджувані біологічні об'єкти вміщують у середовище з

обмеженою вентиляцією. У результаті газообміну організму із середовищем вміст  $O_2$  у повітрі поступово знижується, а  $CO_2$  росте до настання рівноваги, тобто до моменту, коли кількість газів, які дифундують із середовища, стає рівною кількості вироблених газів. Цю величину в камері можна підтримувати в заданих межах, стабілізуючи атмосферу на необхідному рівні гіперкапнії і гіпоксії. Важливою перевагою моделі є те, що гіперкапнію і гіпоксію створюють самі випробувані тварини, що дозволяє обійтися без використання складних техногенних пристосувань і схем, наслідки застосування яких не завжди передбачувані. Гіперкапнія і гіпоксія при цьому розвиваються пропорційно і поступово, без небезпечних для біологічних об'єктів різких змін. Модель дозволяє легко замінити пропорційні (симетричні) зміни  $O_2$  і  $CO_2$  на асиметричні шляхом додавання певних кількостей  $O_2$  і  $CO_2$  або інших газів на початку або на будь-якому іншому етапі експерименту. Важливою представляється також та обставина, що в результаті життєдіяльності організму в навколишнє середовище виділяється не тільки  $CO_2$ , але і безліч інших (мінорних) газових компонентів, зокрема, летучі похідні ароматичних і неароматичних вуглеводнів, ефірів, спиртів, амінів, меркаптанів і ін. Вони є продуктами певних біохімічних ланцюгів, тому зміна їхнього парціального тиску в повітрі неодмінно повинна вплинути на відповідні біохімічні процеси в клітині, тим самим створюючи своєрідний метаболічний «шум». На відміну від більшості інших моделей ША, в атмосфері ГГС зберігаються всі мінорні компоненти, що повинно мінімізувати відповідні «шумові» впливи на метаболізм. Більше того, є підстави думати, що ГГС є самою древньою, еволюційно відшліфованою і розповсюдженою в природі моделлю ША. Вона характерна для видів, які проживають у глибоких норах під землею, особливо в зимовий час, коли поверхня землі покривається снігом, що утрудняє природну вентиляцію.

Відомо, що еволюційні зміни газового складу атмосфери частково відбувалися завдяки фотосинтетичним аутотрофам, у результаті чого частина атмосферного  $CO_2$  була замінена на пропорційну кількість  $O_2$ . При ГГС мають

місце такі ж пропорційні і протилежно спрямовані зміни  $O_2$  і  $CO_2$  атмосфери, тільки спрямовані у зворотну сторону – вміст  $CO_2$  росте, а  $O_2$  знижується. Тому, ГГС може бути розглянуте, як модель повернення до ДА. При цьому доречно підкреслити, що перехід із древніх до сучасних атмосфер, очевидно, не мав видимих необоротних або катастрофічних наслідків. Більше того, для сучасних видів ДА є не тільки цілком прийнятною альтернативою, але і середовищем, у якому вони себе почувають краще і, ймовірно, відчують певну «ностальгію». ДА повинні бути більш комфортними, принаймні, у тому розумінні, що вони дозволяють перейти до режимів життєдіяльності з меншими енерговитратами, підвищують життєздатність у стресорних умовах і забезпечують більше довголіття. Так, отримані нами результати показують, що зниження вмісту  $O_2$  і особливо ріст  $CO_2$  в атмосфері викликає істотне ослаблення інтенсивності окисних процесів. Старіння не має помітного впливу на цей феномен. Результати факторного ANOVA показали, що вплив  $CO_2$  атмосфери на  $V_{CO_2}$  мишей характеризується високим ступенем вірогідності ( $F = 41,6$ ;  $P < 10^{-30}$ ), тоді як вікові відмінності були статистично недостовірними ( $F_v = 1,9$ ;  $P < 0,07$ ). Аналогічні F-критерії їхньої вірогідності були отримані для  $V_{O_2}$  ( $F = 22,2$ ;  $P < 10^{-15}$  і  $F_v = 0,3$ ;  $P > 0,6$ ). При цьому для молодих і старих самців і самок мишей характерні чотирифазні зміни окисних процесів залежно від вмісту  $CO_2$  атмосфери. При малих концентраціях (до 2-3 %) підвищення  $CO_2$  приводить до парадоксальної стимуляції газообміну, як видно, через розширення капілярів і стимуляції кардіопульмональної системи [39, 43, 184]. Наступне підвищення вмісту  $CO_2$  до 4 % не викликає видимих змін  $V_{CO_2}$ , імовірно через те, що організму вдається підтримати відносно стабільні  $P_{O_2}$  і  $P_{CO_2}$  у крові і тканинах завдяки гіпервентиляції. Однак з огляду на те, що  $P_{CO_2}$  у крові більшості видів наземних ссавців підтримується в районі 40 мм рт. ст., при подальшому підвищенні вмісту  $CO_2$  в атмосфері гіпервентиляція вже не тільки не допоможе видалити з організму вироблений ендогенний  $CO_2$ , а, навпроти, призведе до прискореного проникнення екзогенного атмосферного  $CO_2$ , у результаті чого  $P_{CO_2}$  неминуче збільшиться і приведе до інгібування окисних процесів. Дійсно,

у наших дослідах у діапазоні 5-10 %  $\text{CO}_2$  в атмосфері спостерігається прогресивне зниження рівня газообміну приблизно у 5-10 разів. Зниження теплопродукції при цьому настільки сильне, що терморегуляційні центри, очевидно, не справляються із завданням підтримки нормальної температури тіла, і вона також знижується. Як нам відомо, це – одна з деяких моделей хронічного зниження температури тіла теплокровних.

Аналіз розподілу вивчених змінних показав, що коефіцієнти асиметрії і скошеності  $V_{\text{CO}_2}$  і  $V_{\text{O}_2}$  вірогідно не відрізнялися від нуля. Це не суперечить гіпотезі про нормальність розподілів змінних і застосовності параметричних методів аналізу, зокрема регресійного і кореляційного, а також одно- і двофакторного ANOVA. При цьому привертає на себе увагу те, що зміни температури тіла вірогідно корелювали з вмістом  $\text{CO}_2$  атмосфери, але не проявляли значимої кореляції із вмістом  $\text{O}_2$ . Це може свідчити про те, що  $\text{CO}_2$  перебуває ближче до причинно-наслідкових взаємин між рівнем метаболізму і вмістом газів в атмосфері, ніж  $\text{O}_2$ . При оцінці залежності між  $V_{\text{CO}_2}$  і вмістом  $\text{CO}_2$  атмосфери у всьому діапазоні змін (від 1 % до 9 %) було виявлено статистично високо достовірне зниження  $V_{\text{CO}_2}$  як у молодих ( $P < 10^{-5}$ ), так і у старих мишей ( $P < 10^{-8}$ ) (рис. 3.8). Практично аналогічні залежності були виявлені нами при оцінці впливу  $\text{O}_2$  атмосфери на  $V_{\text{O}_2}$  (рис. 3.9). Регресійний же аналіз залежності між  $V_{\text{CO}_2}$  і вмістом  $\text{CO}_2$  при ГГС указує на те, що швидкість окисних процесів молодих і старих мишей знижується на 8-10 % з розрахунку на кожен відсоток збільшення  $\text{CO}_2$ . Цей показник, власно кажучи, є кількісною мірою пригнічуючої дії  $\text{CO}_2$ . Ми запропонували назвати його коефіцієнтом інгібування метаболізму (КИМ). Інгібування окисних процесів при ГГС супроводжується не тільки зниженням температури поверхні тіла, але і деяким перерозподілом частки сплячих, не сплячих і рухливих особин. Привертає на себе увага те, що миші досить легко переносять ГГС, принаймні, до 9-10 %  $\text{CO}_2$ , не проявляючи особливих ознак занепокоєння або нездужань незалежно від віку і статі. Більша частина мишей у денний час нерухома або перебуває у стані сну, що є типовим для гризунів з нічним періодом активності.

Заслуговує на увагу те, що хронічне утримування мишей в ГГС призводить до зниження інтенсивності газообміну і споживання їжі на 30-50% (3.44, 3.45), що типово також для найбільш ефективних режимів калорійно-обмежених раціонів (КОР) [20], Принципова відмінність ГГС і КОР полягає в тому, що обмеження споживання їжі при КОР відбувається примусово, тоді як при ГГС дотримується режим годівлі *ad libitum*, тобто без будь-якого зменшення доступності їжі. У цьому сенсі ГГС можна вважати своєрідною моделлю «добровільного» КОР.

Як уже відзначалося, використана нами модель дозволяє легко замінити симетричного ГГС на асиметричну з посиленням компонентом гіпоксії або гіперкапнії за допомогою додавання до повітря інших газів. Зокрема, при додаванні до повітря 25 %  $N_2$  з початку сеансу ГГС починалась не з нульових значень, а приблизно з 5 % гіпоксії. У таких умовах інкубація молодих і старих самців мишей лінії СВА характеризується високо достовірною залежністю між  $V_{CO_2}$  і вмістом  $CO_2$  у мишей обох вікових груп. КІМ росте до приблизно 10 %, що на 25 % більше, ніж при ГГС. При цьому зберігається типова послідовність фаз росту, стабільності і зниження  $V_{CO_2}$  у міру підвищення вмісту  $CO_2$  в атмосфері. Аналогічна залежність між  $V_{O_2}$  і  $O_2$ , яка чітко проявляється при симетричному ГГС, при ГГС, розпочатому з 5 % гіпоксії, була відсутня у молодих і старих мишей (рис. 3.14). При цьому змінюється пропорція між сплячими, не сплячими і особинами, що рухаються, в обох вікових групах. Це може бути інтерпретовано як прояв деякої сторожкості піддослідних тварин особливо до кінця 3-годинної експозиції. До цього моменту в обох вікових групах спостерігається також приблизно однакове зниження ТПТ, яке корелює з  $V_{CO_2}$ , але не з  $V_{O_2}$ . У цілому, ці дані ще раз підтверджують те, що кількість  $CO_2$  може бути ближчою до причинних факторів регуляції метаболізму, ніж  $O_2$ .

Аналогічні досліді з додаванням 25 %  $N_2$  на початку сеансу ГГС мали додаткове значення в силу того, що  $N_2$  займає унікальне положення в природі і, зокрема, у виникненні живих систем. Він є найменшим за розміром і домінуючим за поширеністю хімічним елементом у Всесвіті, майже в 20 разів

перевершуючи по числу атомів всі інші елементи, разом узяті [100]. Велика кількість атомів водню і в біологічних системах [120, 276]. Крім того, на відміну від  $N_2$ , який практично інертний у клітинах тварин,  $H_2$ , очевидно, має певну біологічну активність, насамперед, діючи як антиоксидант і відновлювач [108, 135, 191]. Тому, можна було очікувати, що ефекти додавання  $H_2$  до повітря для посилення гіпоксичного компоненту ГГС можуть трохи відрізнятися від  $N_2$ . З коефіцієнтів лінійної регресії між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$  слідує, що КІМ  $H_2$  у молодих (11,9 %) і старих мишей (12,1 %) перевершує контрольний рівень на майже 50 % (див. рис. 3.8 і 3.17). Додавання  $H_2$ , мабуть, підсилює пригнічуючий ефект ГГС особливо при високих концентрація атмосферного  $CO_2$  у старих мишей. При цьому зберігається послідовність проходження фаз росту, стабільності і інгібування в міру підвищення вмісту  $CO_2$ . Динаміка змін частки сплячих, не сплячих і рухливих молодих і старих мишей при асиметричному ГГС, модельованому додаванням  $H_2$ , багато в чому нагадувала аналогічні зміни, виявлені при додаванні  $N_2$ . На перших етапах експерименту приблизно 70-80 % молодих і старих самців мишей сплять. З накопиченням  $CO_2$  в атмосфері ці тварини поступово пробуджуються, тому до кінця сеансу 70-80 % особин перебувають у стані пильнування. Особливою рисою цієї серії дослідів є те, що тварини поведуться спокійно, і частка особин, що рухаються, не перевищувала 5 % протягом усього експерименту (рис. 3.20).

За атомною масою і поширеністю у Всесвіті He посідає друге місце слідом за  $H_2$  [100]. Відомо, що він належить до групи інертних газів, у яких хімічна інертність дивним образом сполучається з різноманіттям біологічних ефектів. Судячи з КІМ і динаміки залежності  $V_{CO_2}$  від  $CO_2$ , ефекти He на швидкість окисних процесів ближче до таких контрольної групи, а за залежністю між  $V_{O_2}$  від  $O_2$  вони більше нагадують ефекти  $H_2$ . При цьому підсилювалася позитивна корелятивна залежність між ТПТ і рівнем газообміну. Відповідно до величин КІМ і коефіцієнтів кореляції, і на цій моделі асиметричного ГСА зберігається домінуючий вплив гіперкапнії, у порівнянні з гіпоксією (рис. 3.21).

Аргон, який є третім за поширеністю газом сучасної атмосфери землі, є також найпоширенішим і доступним інертним газом атмосфери [29]. У молодих і старих самців мишей вплив аргону на КІМ (відповідно 9,2 % і 8,2 %), коефіцієнти кореляції і динаміка зниження  $V_{CO_2}$  у міру підвищення  $CO_2$  були приблизно такими ж, як у контрольній групі.

На відміну від описаних вище дослідів з початковим посиленням гіпоксичного компоненту ГГС, у наступній серії були проведені досліди, у яких гіпоксію, навпроти, послабляли шляхом додавання близько 8%  $O_2$  в атмосферу перед початком ГГС. При такій постановці миші починали сеанс із гіпероксії, яка після короткого проміжку практичної нормоксії, переходила в гіпоксію до кінця експерименту, тоді як гіперкапнія при цьому продовжувала прогресивно рости протягом усього сеансу. Виявилось, що КІМ і коефіцієнти кореляції при цьому менші, ніж у нормі або аналогічних дослідах з посиленням гіпоксії. Зокрема, кореляція між  $V_{O_2}$  і  $O_2$  була недостовірною в обох вікових групах, тоді як негативна залежність між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$  залишалася незмінно високою (рис. 3.29). Імовірно, через менше інгібування окисних процесів, зниження ТПТ у цій серії було найменшим з випробуваних атмосфер і становило близько 1°C.

Досліди з асиметричним ГГС із посиленням гіперкапнічним компонентом, модельованою додавання  $CO_2$  до повітря з початку сеансу, показали, що додавання 4 %  $CO_2$  до повітря було досить, щоб майже вдвічі знизити  $V_{CO_2}$  із самого початку експозиції. Судячи з коефіцієнтів регресії і кореляції, у такій атмосфері рівень  $V_{CO_2}$  падає нижче контрольного рівня із самого початку експозиції і зберігається на такому низькому рівні протягом усього досліджуваного періоду. На відміну від дослідів із симетричним ГГС, а також дослідів з посиленням гіпоксичного компоненту за допомогою додавання до повітря  $N_2$ ,  $H_2$ ,  $He$  і  $Ar$ , початкове посилення гіперкапнії всього на кілька відсотків, виявляється достатнім для того, щоб знизити рівень газообміну майже вдвічі. Цей рівень зберігається майже стабільним протягом всієї експозиції, що відбивається на статистичній невірності коефіцієнтів кореляції між  $V_{CO_2}$  і  $CO_2$  і  $V_{O_2}$  і  $O_2$ . При цьому зниження ТПТ (на 3-4°C) було

більшим, ніж при інших випробуваних моделях ГГС, як видно, тому, що істотне інгібування окисних процесів настає практично із самого початку експозиції.

ГГС становить інтерес, як модель тривалого зниження температури тіла і метаболізму теплокровних. Справа в тому, що гіпотермія і гіпометаболізм можуть мати широке застосування в самих різних галузях біології та медицини. Але реалізувати таке зниження вкрай складно, і нам не відомі інші аналогічні по потужності моделі гіпотермії і гіпометаболізму (рис. 3.45, 3.46). Обмеження калорій або генетичні модифікації в деяких випадках викликають помірне зниження температури тіла (на  $0,5-1^{\circ}\text{C}$ ) [95], яке однак помітно нижче аналогічних ефектів ГГС. Унікальність газового середовища проживання ГЗ та використаної в даній роботі моделі ГГС, щонайменше, частково обумовлена збалансованістю зміни вмісту  $\text{O}_2$  і  $\text{CO}_2$  і пов'язаних з ними зрушень  $\Delta\text{P}_{\text{O}_2}$  і  $\Delta\text{P}_{\text{CO}_2}$  в тканинах. Через те, що дихальний коефіцієнт зазвичай коливається в межах 80-95%, в закритих системах вміст  $\text{CO}_2$  зростає майже настільки, наскільки знижується  $\text{O}_2$ . Таким чином, підсумкові гіпоксія і гіперкапнія майже рівні ( $\Delta\text{P}_{\text{O}_2} / \Delta\text{P}_{\text{CO}_2}$  близький до 1:1). Це є важливою особливістю використаної нами моделі, оскільки таке співвідношення мінімізує небезпечні непропорційні зрушення в генерації енергії, індуковані гіпоксією і гіперкапнією. Важливим є те, що при ГГС спостерігається зниження інтенсивності метаболічних процесів, ймовірно фізіологічно кероване, про що свідчить зниження FT3 і FT4 в плазмі крові піддослідних тварин (рис. 3.47).

Використана нами ГГС може бути привабливою моделлю також для нормалізації надлишкової маси тіла і пов'язаних з нею порушень метаболічного синдрому. При цьому зниження загальної маси тіла, ймовірно, відбувається за рахунок втрати жирових запасів, оскільки маса більшості внутрішніх органів при цьому істотно не змінюється (рис. 3.48).

Вміст загального холестерину, тригліцеридів і гемоглобіну в плазмі крові дещо знижувався при ГГС. Однак, таке зниження не досягала до статистичної

достовірності ( $P < 0.05$ ). Достовірно знижувався (більш ніж на третину) тільки вміст глюкози (рис. 3.49).

Вивчення ПТТГ підтвердило, що у мишей, що утримуються в умовах ГГС, відбувається зниження вмісту глюкози в крові майже на 1/3. До початку і при завершенні тесту цукрового навантаження (120 хв) рівень глюкози в крові, взятої з кінчика хвоста, був на 30-40% нижче, ніж у тварин, що утримуються в звичайних умовах (рис. 3.50). Таке зниження цукру крові, можливо, є результатом ослаблення окисного фосфорилування, компенсаторного посилення гліколізу і утилізації глюкози, яке настає під впливом гіпоксії.

Дані про зниження надлишкової маси тіла і цукру в плазмі і цільної крові (рис 3.48, 3.49, і 3.50), дають підстави припустити, що експозиція в ГГС може бути багатообіцяючим немедикаментозним впливом для нормалізації вмісту глюкози в крові і лікування діабету, перш за все, діабету I типу. На жаль, моделювання діабету I типу на мишах досить проблематичне, тому ми обмежилися вивченням впливу ГГС на вивченій і доступній моделі стрептозотоцинового моделі діабету II типу [124]. З'ясувалося, що хронічна експозиція в ГГС, призводить до істотного послаблення зростання вмісту глюкози в крові, яке настає в результаті руйнуванням  $\beta$ -клітин підшлункової залози під впливом стрептозоточина (рис. 3.51).

Хронічна гіпоксія і гіперкапнія представляються досить сильним стресом, який, здавалося, повинен викликати індукцію експресії відповідних генів. Однак, в наших експериментах на тлі істотних змін комплексу фізіологічних змінних не були виявлені достовірні зміни експресії генів, зокрема, стрес білків HSP-90 або білків роз'єднання UCP-2 (рис. 3.51). А експресія *HIF-1 $\alpha$*  стабільно і достовірно ( $P < 0,05$ ) зменшувалася майже в два рази, починаючи з першої доби експозиції і зберігалася до кінця досліджуваного періоду (рис. 3.51).

Як вже було неодноразово зазначено вище, рівень метаболізму, а також пов'язані з ним біологічні змінні, наприклад, що характеризують антиоксидантну систему, фізичну активність, і ін., можуть бути інформативними детермінантами довголіття. Тому перед вивченням впливу

ША на темпи старіння і ТЖ, ми оцінили зміни життєздатності організму, використовуючи як об'єкт дослідження дрозофілу. Численні переваги цього модельного об'єкту, зокрема, відносна простота розмноження і утримування, добре вивчена генетика і, що особливо важливо в геронтологічних дослідженнях, коротка ТЖ, добре відомі і пояснюють широке застосування дрозофіл для вивчення біологічних проблем різного профілю. У наших дослідженнях із дрозофілами був обраний комплекс із п'яти показників, які характеризували швидкість продукції  $\text{CO}_2$  ( $V_{\text{CO}_2}$ ), стан антиоксидантної системи, кислотно-лужна рівновага і рухову активність. Досліди з утримуванням молодих і старих дрозофіл протягом 10 діб у ША, створеними додаванням до повітря 50%  $\text{N}_2$ ,  $\text{He}$  або  $\text{Ar}$ , показали, що інтенсивність газообміну спочатку трохи знижується, але повертається до вихідного рівня до кінця досліджуваного строку. Згідно ANOVA, тривалість експозиції і вік не мали статистично значимого впливу на динаміку обмінних процесів у дрозофіл, що утримувались в гіпоксичній атмосфері з додавання 50 %  $\text{N}_2$  ( $F_e=2,4$ ;  $P < 0,08$  і  $F_b=1,6$ ;  $P < 0,2$ ), але викликали істотні зміни в аналогічній серії дослідів з додаванням до повітря 50 %  $\text{He}$  ( $F_e=6,2$ ;  $P < 0,001$  і  $F_b=17,1$ ;  $P < 0,0001$ ) або  $\text{Ar}$  ( $F_e=6,1$ ;  $P < 0,01$  і  $F_b=6,4$ ;  $P < 0,001$ ) (рис. 3.44). Виявлені відмінності між  $\text{N}_2$  і  $\text{He}$  або  $\text{Ar}$  не виключають можливість того, що крім гіпоксії,  $\text{He}$  і  $\text{Ar}$  можуть мати специфічні ефекти на швидкість метаболізму. При цьому відбувалися однотипні зміни рН гомогенатів, що до 3 діб трохи знижувалися, але потім поверталися до нормального рівня до 6 діб і 10 діб (Рис. 3.46). У жодній із зазначених штучних атмосфер СРА статистично значимо не змінювалася, що може вказати на відсутність явних ознак занепокоєння у піддослідних тварин (рис. 3.45). Хронічна експозиція в гіпоксичних атмосферах, які створювали додаванням 50 %  $\text{N}_2$ ,  $\text{He}$  або  $\text{Ar}$  до повітря може індукувати розвиток окисного стресу з наступним компенсаторним ростом ключових ферментів антиоксидантного захисту. Принаймні, про це свідчать дані про активність СОД і каталази у молодих і старих імаго дрозофіл. У всіх випробуваних атмосферах активність СОД і каталази трохи знижувалася до 3 діб, але

вірогідно збільшувалася до 6-10 діб (рис. 3.47 і 3.48). У цілому, отримані дані демонструють певну подібність, що може бути обумовлене тим, що всі випробувані атмосфери моделювали рівний ступінь гіпоксії (приблизно 10 %  $O_2$ ). Разом з тим подібності між He і Ar помітно більше, ніж між ними і  $N_2$ , що може бути проявом специфічного ефекту інертних газів.

Серії дослідів з вивченням впливу ША на виживаність при різних стресорних умовах також показали певну подібність і розходження впливу газового складу атмосфери. Зокрема, відомо, що опромінення дрозофіл УФ багато в чому аналогічно з дією іонізуючої радіації. В обох випадках критичним для виживання клітини є функціональний стан тих самих репаративних систем, відповідальних за відновлення ДНК; в обох випадках є дозо-залежний прихований період дії, протягом якого навіть смертельно опромінені тварини зовні практично не відрізняються від інтактних особин. Тільки після завершення прихованого періоду спостерігається різкий ріст смертності. Порівняння виживаності дрозофіл, у яких пост-радіаційний період після УФ опромінення відбувався в повітрі (контрольна група) або в ША показало, що гіпоксія не мала достовірного впливу на виживаність молодих імаго дрозофіл у випадку  $N_2$  і He, прискорювало загибель при додаванні до повітря Ar,  $PO_2$  і  $CO_2$ , і тільки додавання  $H_2$  сповільнювало загибель опромінених УФ тварин (рис. 3.50). З огляду на подібність УФ і радіаційного опромінення, а також те, що  $H_2$  може діяти як антиоксидант і відновлювач, для якого, завдяки неполярності і малим розмірам молекули, не існує субклітинних або органних бар'єрів, варто звернути особливу увагу на  $H_2$ , як на можливий радіопротекторний засіб.

Певний інтерес представляло вивчення аліментарного деприваційного стресу на виживаність дрозофіл, інкубованих у ША. Виявилось, що утримування у гіпоксичних атмосферах, створених додавання до повітря 50 %  $N_2$ ,  $H_2$ , He і Ar, приводило до покращення динаміки виживання, тоді як гіпероксичні і гіперкапнічні атмосфери, навпроти, прискорювали загибель дрозофіл.

У роботі надавалося особливе значення з'ясуванню впливу ША на вікову динаміку смертності і ГЖ. Отримані результати свідчать про те, що гіпоксичні атмосфери, модельовані додаванням до повітря помірних концентрацій  $N_2$ ,  $He$  і  $Ar$  (до 33 %), у більшості випадків приводили до вповільнення смертності і подовження життя. Крім постійних концентрацій нами були випробувані гіпоксичні атмосфери змінної сили, створювані наростаючими або зменшуваними концентраціями газів. Виявлено, що гелій не має істотного впливу на виживаність при режимі лінійного росту зі швидкістю 1 %/добу від 0 до 80 %, але помітно покращує динаміку вимирання при спадаючих концентраціях з такою же швидкістю (рис. 3.59). В аналогічних умовах  $Ar$  також сприятливо впливав на динаміку виживаності самок, але прискорював динаміку смертності самців (рис. 3.59). Виживаність імаго, вирощених в атмосфері з 50 %  $He$ , які потім переводились на утримування в повітрі, також поліпшувалася, тоді як в аналогічних умовах  $Ar$  скорочував строки існування через прискорення смертності протягом першої половини життя імаго.

Таким чином, проведений філогенетичний аналіз і результати прямих дослідів свідчать про те, що збалансована гіпоксія і гіперкапнія, ймовірно, є найбільш ефективним фізіологічним засобом зниження інтенсивності обмінних процесів і температури тіла теплокровних. Така модель проста у виконанні і надійна в експлуатації. Вона створюється самими біологічними об'єктами і пов'язана із застосуванням мінімуму техногенних засобів, вплив яких на біологічні процеси нерідко важко передбачити. Більш того, ГГС є своєрідною моделлю «добровільного» КОР і засобом боротьби з надмірною вагою. Діючи як немедикаментозний засіб активації гліколізу і зниження рівня глюкози, ГГС, за аналогією з ГЗ та інших екстремально довгоживучих видів, може бути ефективним для усунення залежної від віку патології, зокрема, діабету.

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення й нове вирішення проблеми зниження інтенсивності обмінних процесів і температури тіла теплокровних тварин за допомогою гіпоксично-гіперкапнічного середовища (ГГС). 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. Хронічна експозиція 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. Утримання мишей у ГГС не впливає на експресію генів, які зазвичай активуються при стресі (*hsp-90*) і роз'єднанні окиснення і фосфорилування (*ucp-2*).

4. ГГС значно прискорює закриття молодою шкірою на місці 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 та на  $29,2 \pm 1,6$  день у контрольних мишей ( $p < 0,02$ ).

5. ГГС перешкоджає розвитку діабету I типу. Рівень глюкози в крові мишей в ГГС був істотно нижчим (110-160 %), ніж у контрольних мишей з діабетом (до 250-300 %) протягом 12 тижнів спостережень ( $p < 0,02$ ).

6. Утримування дрозодів в штучних атмосферах з додаванням до повітря оптимальних концентрацій  $N_2$ ,  $He$  і  $Ar$  призводить до уповільнення газообміну і підвищення виживаності в стресорних умовах.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика: В 3-х т. Т. 2. Пер. с англ.: М.: Мир, 1988. 368 с.
2. Березовский ВА., Назаренко АИ., Говоруха ТН. Влияние гелия на газообмен и тканевое дыхание. Физiol. журнал. 1982;28(3):353-358.
3. Березовский ВА, Говоруха ТН, Назаренко АИ. Влияние замены азота воздуха инертными газами на потребление кислорода тканью печени белых крыс, находившихся на разных жировых диетах. Физиол. Журнал. 1989;35(5):75-78.
4. Березовский ВА, Литовка ИГ, Костюченко АС. Дозированные биофизические воздействия стабилизируют биохимические показатели костной ткани при моделированной остеопении. IV Украинская конф. по космическим исследованиям. Понизовка, Крым, 19-26.09.2004:209.
5. Беспалов АГ, Куликов ВП, Лепилов АВ. Тренировки с гипоксической гиперкапнией как средство увеличения толерантности головного мозга к ишемии. Патология кровообращения и кардиохирургия, 2004;3:60-63.
6. Бочков НП, Чеботарев АН. Наследственность человека и мутагены внешней среды. М.: Медицина, 1989. 270 с.
7. Воронов ЕМ, Пупков КА, Трофимова ЕЮ. Компенсационные процессы гомеостаза в динамических системах естественной технологии организма, экологии и интеллектуальных технических системах на основе стабильно-эффективных компромиссов. Успехи совр. естествознания. 2005;6:93-94.
8. Гершензон С. М. Мутации. К.: Наук, думка, 1991. 112с.
9. Гланц С. Медико-биологическая статистика. McGraw-Hill, 1994; М.: Практика, 1998. 459 с.
10. Говоруха ТН, Назаренко АИ. Влияние замены азота воздуха гелием и аргоном на интенсивность тканевого дыхания. Физиол. журнал. 1987;33(3)58-62.

11. Гурьева ТС, Дадашева ОА, Солдатов ПЕ, Медникова ЕИ, Смирнов ИА, Смоленская ТС, Дадашева МТ. Эффект гипоксической аргон-содержащей газовой смеси на развитие организма. Авиакосм. экология и медицина. 2008;42:40-43.

12. Ершов Ю, Попков ВА, Берлянд АЗ, Книжник А. Общая химия. Биофизическая химия. Химия биогенных элементов. М.: Высшая школа, 2010. Изд-е 8-е. С. 560 3 000 экз.

13. Козлова ЕВ, Леонова ИС, Падалко ВИ. Влияние 2,4-динитрофенола на интенсивность окислительных процессов в печени крыс в длительном эксперименте. Успехи геронтологии. 2010;1:98-103.

14. Коркушко ОВ, Серебровська ТВ, Шатило ВБ. Вибір оптимальних режимів для проведення інтервальних нормобаричних гіпоксичних тренувань у медичній практиці та спортивній медицині: Метод. рекомендації. Київ. 2010. 30 с.

15. Коркушко ОВ, Писарук АВ, Лишневська ВЮ, Асанов ЕО, Чеботарьов МД. Вікові особливості реакції кардіореспіраторної системи до гіпоксії. Фізіол. журнал. 2005;51(6):11-17.

16. Куликов ВП, Полухина МГ, Беспалов АГ, Усынин ВВ. Влияние гипоксически – гиперкапнического прекодиционирования на гемостаз, гемореологию и толерантность головного мозга к ишемии. Региональное кровообращение и микроциркуляция, 2004;3(11)27-32.

17. Куликов ВП, Осипов ИС, Трегуб ПП. Оптимальные параметры воздействия гиперкапнической гипоксии для увеличения резистентности к гипоксии. Авиакосмическая и экологическая медицина. 2015;5:25-28.

18. Куликов ВП, Трегуб ПП, Беспалов АГ, Введенский АЮ. Сравнительная эффективность гипоксии, гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии в увеличении резистентности организма к острой гипоксии в эксперименте. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2013;3:59-62.

19. Мацнев ЕИ, Сигалева ЕЕ, Тихонова ГА, Буравкова ЛБ. Отопротективный эффект аргона при экспозиции к шуму. Вест. оториноларинголог. 2007;3:22-26.
20. Никитин ВН. Экспериментальные подходы к продлению жизни Биология старения. Л., 1984. С. 548–562.
21. Павлов НБ. Аргон – биологический активный компонент атмосферы. Авиакосмическая экология и медицина. 2006;40:3-6.
22. Самойлова К. А. Действие ультрафиолетовой радиации на клетку. Л.: Наука, 1967. 145 с.
23. Соловьева ЭЮ. Чипова ДТ. От концепции окислительного стресса к модуляции клеточной сигнализации. Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2015;8:105-111.
24. Степовая ЕА, Шахристова ЕВ, Рязанцева НВ. Окислительная модификация белков и система глутатиона при модуляции редокс-статуса клеток эпителия молочной железы. Биомед. химия. 2016;62(1):64-68.
25. Стрельчук С. И. Основы экспериментального мутагенеза. К.: Вища школа, 1981. 215 с.
26. Тимченко АН, Утко НА, Мурадян ХК. Повышение содержания кислорода в атмосфере сокращает, а углекислого газа увеличивает продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*. Пробл. старения и долголетия. 2008;17(2):230-239.
27. Трегуб ПП, Куликов ВП, Беспалов АГ, Введенский АЮ, Осипов ИС. Нейропротективная эффективность тренировок с изолированным и сочетанным воздействием гипоксией и гиперкапнией в эксперименте. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013;155(3):302-304.
28. Трегуб ПП, Куликов ВП, Мотин ЮГ, Нагибаева МЕ. Стресс эндоплазматического ретикулума нейронов при инсульте максимально ограничивается сочетанием гиперкапнии и гипоксии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016;4:457-461.

29. Финкельштейн Д. Н. Глава IV. Инертные газы на Земле и в космосе. Инертные газы. Изд. 2-е. М.: Наука, 1979. С. 76-110. 200 с. («Наука и технический прогресс»). 19 000 экз.
30. Фролькис В. В. Старение: Нейрогуморальные механизмы. Киев, 1981. 310 с.
31. Abdel-Malek ZA, Knittel J, Kadearo AL, Swope VB, Starner R. The melanocortin 1 receptor and the UV response of human melanocytes-a shift in paradigm. *Photochem. Photobiol.* 2008;84(2):501-508.
32. Abraini JH, Kriem B, Balon N, Rostain JC, Risso JJ. Gamma-aminobutyric neuropharmacological investigations on narcosis produced by nitrogen, argon, or nitrous oxide. *Anesth. Analg.* 2003;96:746-749.
33. Adeva M, Souto G. Diet-induced metabolic acidosis. *Clin. Nutr.* 2011;4:416-421.
34. Aebi H. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 1984;105:121-126.
35. Allada R, Nash HA. *Drosophila melanogaster* as a model for study of general anesthesia: the quantitative response to clinical anesthetics and alkanes. *Anesthesia and Analgesia.* 1993;77(1):19-26.
36. Alterio V, Di Fiore A, D'Ambrosio K, Supuran C, Simone G. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chem. Rev.* 2012;112:4421-4468.
37. Andrews R, Lynch M. Heliox in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Emerg. Med. J.* 2004;21(6):670-675.
38. Andziak B, et al. High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Aging Cell.* 2006;5:463-471.
39. Ambrosino N, Vitacca M, Polese G. et al. Short-term effects of nasal proportional assist ventilation in patients with chronic hypercapnic respiratory insufficiency // *Eur. Respir J.* 1997;10(12):2829-2834.
40. Amunugama K, Jiao L, Olbricht GR, et al. Cellular oxidative damage is more sensitive to biosynthetic rate than to metabolic rate: A test of the theoretical model on hornworms (*Manduca sexta* larvae). *Exp. Gerontol.* 2016;11(82):73-80.

41. Aristotle. *On Longevity and Shortness of Life*. The University of Adelaide Library: eBooks@Adelaide, 2007.
42. Ash SA, Valchev GI, Looney M, Ni Mhathuna A, Crowley PD, Gallagher HC, Buggy DJ. Xenon decreases cell migration and secretion of a pro-angiogenesis factor in breast adenocarcinoma cells: comparison with sevoflurane. *Br. J. Anaesth.* 2014;113(1):14-21.
43. Babb TG, DeLorey DS, Wyrick BL. Ventilatory response to exercise in aged runners breathing He-O<sub>2</sub> or inspired CO<sub>2</sub>. *J. Appl. Physiol.* 2003;94(2):685-693.
44. Balajee AS, May A, Bohr VA. DNA repair of pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts in the ribosomal DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 1999;27(12):2511-2520.
45. Bantel C, Maze M, Trapp S. Neuronal preconditioning by inhalational anesthetics: evidence for the role of plasmalemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Anesthesiology.* 2009. 110, № 5. P. 986-995.
46. Barach A. Use of helium as a new therapeutic gas. *Proc. Soc. Exp. Bio.* 1934; 32:462–464.
47. Baumert JH, Hein M, Gerets C, Baltus T, Hecker KE. The effect of xenon anesthesia on the size of experimental myocardial infarction. *Anesth. Analg.* 2007;105:1200-1206.
48. Beerling DJ, Berner RA. Feedbacks and the coevolution of plants and atmospheric CO<sub>2</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102:1302-1305.
49. Behnke AR, Yarbrough, OD. Respiratory resistance, oil water solubility and mental effects of argon compared with helium and nitrogen. *Am. J. Physiol.* 1939;126:409-415.
50. Berneburg M, Trelles M, Friguet B, Ogden S, Esrefoglu M, Kaya G. How best to halt and/or revert UV-induced skin ageing: strategies, facts and fiction. *Exp. Dermatol.* 2008;17(3):228-240.
51. Berner RA. Atmospheric oxygen over Phanerozoic time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96:10955-10957.
52. Berner RA. The long-term carbon cycle, fossil fuels and atmospheric composition. *Nature.* 2003;426(6964):323-326.

53. Berezovskii VA, Litovka IG, Kostyuchenko AS. Low tension may defence the bone tissue from unloading simulated osteopenia. *J. Gravit. Physiol.* 2004;11(2):153-154.
54. Berwick M. Can UV exposure reduce mortality? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2011;20(4):582-584.
55. Bordini H.P, Kremer JL, Fagundes TR. et al. Protective effect of metformin in an aberrant crypt foci model induced by 1,2-dimethylhydrazine: Modulation of oxidative stress and inflammatory process. *Mol. Carcinog.* 2016;1. doi: 10.1002/mc.22545.
53. Boyle J, Kill IR, Parris CN. Heterogeneity of dimer excision in young and senescent human dermal fibroblasts. *Aging Cell.* 2005;4(5):247-255.
57. Bucher DB, Kufner CL, Schlueter A, Carell T, Zinth W. UV-Induced Charge Transfer States in DNA Promote Sequence Selective Self-Repair. *J. Am. Chem. Soc.* 2016;138(1):186-90.
58. Buchheit RG, Schreiner HR, Doebbler GF. Growth responses of *Neurospora crassa* to increased partial pressures of the noble gases and nitrogen. *J. Bacteriol.* 1966;91(2):622-627.
59. Buffenstein R, Woodley R, Thomadakis C, Daly TJ, Gray DA. Cold-induced changes in thyroid function in a poikilothermic mammal, the naked mole-rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001;280(1):149-155.
60. Buffenstein R. Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: insights from a successfully aging species. *J. Comp. Physiol. B.* 2008;178(4):439-145. doi: 10.1007/s00360-007-0237-5.
61. Burtscher M. Effects of living at higher altitudes on mortality: a narrative review. *Aging Dis.* 2013;5:274-280.
62. Campos Costa I, Nogueira CH, Fernandes L. Aging, circadian rhythms and depressive disorders: a review. *Am. J. Neurodegener. Dis.* 2013;2:228-246.
63. Cassidy PB, Abdel-Malek ZA, Leachman SA. Beyond Red Hair and Sunburns: Uncovering the Molecular Mechanisms of MC1R Signaling and Repair of UV-Induced DNA Damage. *J. Invest. Dermatol.* 2015;135(12):2918-2921.

64. Catling DC, Zahnle KJ, McKay C. Biogenic methane, hydrogen escape, and the irreversible oxidation of early Earth. *Science*. 2001;293(5531):839-843.
65. Charton R, Guintini L, Peyresaubès F, Conconi A. Repair of UV induced DNA lesions in ribosomal gene chromatin and the role of "Odd" RNA polymerases (I and III). *DNA Repair (Amst)*. 2015;36:49-58.
66. Cheung SG, Chan HY, Liu CC, Shin PK. Effect of prolonged hypoxia on food consumption, respiration, growth and reproduction in marine scavenging gastropod *Nassarius festivus*. *Mar. Pollut. Bull.* 2008;57:280-286.
67. Chevrolet JC. Helium oxygen mixtures in the intensive care unit. *Crit. Care*. 2001;5(4):179-181.
68. Chung D, Dzal YA, Seow A, et al. Naked mole rats exhibit metabolic but not ventilatory plasticity following chronic sustained hypoxia. *Proc. Biol. Sci.* 2016;283:1827-1836.
69. Coburn M, Sanders RD, Ma D, Fries M, Rex S, Magalon G, Rossaint R. Argon: The "lazy" noble gas with organoprotective properties. *Eur. J. Anaesthesiol.* 2012;29:549-551.
70. Condelli V, Crispo F, Pietrafesa M, Lettini G, Matassa D. S, Esposito F, Landriscina M, Maddalena F. HSP90. Molecular Chaperones, Metabolic Rewiring, and Epigenetics. *Cells*. 2019;8(6). pii: E532. doi: 10.3390/cells8060532.
71. Conti B, Sanchez-Alavez M, Winsky-Sommerer R, Morale MC, Lucero J, Brownell S, Fabre V. Transgenic mice with a reduced core body temperature have an increased life span. *Science*. 2006;314(5800):825-828.
72. Conti B. Considerations on temperature, longevity and aging. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008;65(11):1626-1630.
73. Copeland JM, Cho J, Lo T. Jr, Hur JH, Bahadorani S, Arabyan T. Extension of *Drosophila* life span by RNAi of the mitochondrial respiratory chain. *Curr. Biol.* 2009;13:1591-1598.
74. Csiszar A, Labinskyy N, Orosz Z, Xiangmin Z, Buffenstein R, Ungvari Z. Vascular aging in the longest-living rodent, the naked mole rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007;293(2):919-927.

75. Curi R, Newsholme P, Marzuca-Nassr GN. et al. Regulatory principles in metabolism-then and now. *Biochem. J.* 2016;473(13):1845-1857.
76. David HN, Ansseau M, Lemaire M, Abraini J. H. Nitrous oxide and xenon prevent amphetamine-induced carrier-mediated dopamine release in a memantine-like fashion and protect against behavioral sensitization. *Biol. Psych.* 2006;60:49-57.
77. David HN, Dhilly M, Poisnel G, Degoulet M, Meckler C, Vallee N, Blatteau JE, Risso JJ, Lemaire M, Debruyne D, Abraini J. H. Argon prevents the development of locomotor sensitization to amphetamine and amphetamine-induced changes in mu opioid receptor in the nucleus accumbens. *Med. Gas Res.* 2014;4(1):14-21.
78. David S. The molecular perspective: Ultraviolet light and pyrimidine dimers. *The Oncologist.* 2001;6(3):298-299.
79. Davy P, Allsopp R. Hypoxia: are stem cells in it for the long run? *Cell Cycle.* 2011;10:206-211.
80. Dell'agnello C, Leo S, Agostino A, Szabadkai G, Tiveron C, Zulian A. Increased longevity and refractoriness to Ca<sup>2+</sup>-dependent neurodegeneration in Surf1 knockout mice. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16:431-444.
81. Dingley J, Tooley J, Porter H, Thoresen M. Xenon provides short-term neuroprotection in neonatal rats when administered after hypoxia-ischemia. *Stroke.* 2006;37:501-506.
82. Eckel-Mahan K, Sassone-Corsi P. Metabolism and the circadian clock converge. *Physiol. Rev.* 2013;93:107-135.
83. Etheridge D, Steele L, Langenfelds R, Francey R, Barnola J.-M, Morgan V. Natural and anthropogenic changes in atmospheric CO<sub>2</sub> over the last 1000 years from air in Antarctic ice and firn. *J. Geophys. Res.* 1996;101:4115–4128.
84. Everaert N, Willemsen H, Willems E, Franssens L, Decuyper E. Acid-base regulation during embryonic development in amniotes, with particular reference to birds. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2011;178:118-128.

85. Fekete C, Lechan RM. Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocr. Rev.* 2014;35(2):159-94. doi: 10.1210/er.2013-1087.
86. Vallerga MB, Radl A, Paviolo NS, Bocco JL, Di Giorgio M, Soria G, Gottifredi V. Chromosomal Integrity after UV Irradiation Requires FANCD2-Mediated Repair of Double Strand Breaks. *PLoS Genet.* 2016;12(1): e1005792.
87. Feller L, Khammissa RA, Kramer B, Altini M, Lemmer J. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the head and face. *Head Face Med.* 2016;12(1):2-11.
88. Feng J, Bussiere F, Hekimi S. Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Cell.* 2001;1:633-644.
89. Fenn WO, Bale WF, Mullins LJ. The radioactivity of potassium from human sources. *J. Gen. Physiol.* 1942;25(3):345-353.
90. Flouris AD, Piantoni C. Links between thermoregulation and aging in endotherms and ectotherms. *Temperature.* 2014;2(1):73–85. doi:10.4161/23328940.2014.989793
91. Forgan LG, Forster ME. Oxygen-dependence of metabolic rate in the muscles of craniates. *J. Comp. Physiol B.* 2010;180:715-729.
92. Franks NP, Dickinson R, de Sousa SLM, Hall A.C, Lieb W.R. How does xenon produce anaesthesia? *Nature.* 1998;396:324-330.
93. Frassetto L, Morris RC. Jr, Sellmeyer DE, Todd K, Sebastian A. Diet, evolution and aging – the pathophysiologic effects of the post-agricultural inversion of the potassium-to-sodium and base-to-chloride ratios in the human diet. *Eur. J. Nutr.* 2001;200:213-220.
94. Friedberg EC, Walker GC, Siede W et al. DNA repair and mutagenesis. ASM Press. 2006. P. 1118.
95. Frolkis VV, Muradian KK Life span prolongation. Boca Raton: CRC Press. 1991.
96. Gilmour KM, Perry SF. Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish. *J. Exp. Biol.* 2009;212:1647-1661.

97. Goldblatt C, Lenton TM, Watson AJ. Biostability of atmospheric oxygen and the Great Oxidation. *Nature*. 2006;443:643-645.
98. Goldman BD, Goldman SL, Lanz T, Magaurin A, Maurice A. Factors influencing metabolic rate in naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*). *Physiol. Behav.* 1999;66(3):447-459.
99. Greinert R, Boniol M. Skin cancer – primary and secondary prevention (information campaigns and screening) – with a focus on children & sunbeds. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2011;107(3):473-476.
100. Gribbin J. *Science. A History (1543-2001)*. – L.: Penguin Books, 2003. – 648 p. – ISBN 978-0-140-29741-6.
101. Grimes KM, Barefield DY, Kumar M, McNamara JW, Weintraub ST, de Tombe PP, Sadayappan S, Buffenstein R. The naked mole-rat exhibits an unusual cardiac myofibrillar protein profile providing new insights into heart function of this naturally subterranean rodent. *Pflügers Arch.* 2017;469(12):1603-1613.
102. Guo Z, Heydari A, Richardson A. Nucleotide excision repair of actively transcribed versus nontranscribed DNA in rat hepatocytes: effect of age and dietary restriction. *Exp. Cell Res.* 1998;245(1):228-238.
103. Hahn JS, Hu Z, Thiele DJ, Iyer, VR. Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 2004;24:5249–5256.
104. Harman D. Extending functional life span. *Exp. Gerontol.* 1998;33:95–112.
105. Harris K, Armstrong SP, Campos-Pires R, Kiru L, Franks NP., Dickinson R. Neuroprotection against traumatic brain injury by xenon, but not argon, is mediated by inhibition at the N-methyl-D-aspartate receptor glycine site. *Anesthesiology.* 2013;119(5):1137-1148.
106. Harrison J, Frazier MR, Henry JR, Kaiser A, Klok CJ, Rascon B. Responses of terrestrial insects to hypoxia or hyperoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2006;154:4-17.
107. Hayflick L. How and why we age. *Exp. Gerontol.* 1998;33:639–653.

108. He Y, Shi JZ, Zhang RJ et al. Effects of Hydrogen Gas Inhalation on Endometriosis in Rats. *Reprod Sci.* 2016 Jun 23. pii: 1933719116655622.
109. Hess DR, Fink JB, Venkataraman ST, Kim IK, Myers TR, Tano BD. The history and physics of heliox. *Respir. Care.* 2006;51(6):608-612.
110. Hoehler TM. Biogeochemistry of dihydrogen (H<sub>2</sub>). *Met. Ions Biol. Syst.* 2005;43:9-48.
111. Holland HD. The oxygenation of the earth and oceans. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2006;361:903–915.
112. Höllig A, Schug A, Fahlenkamp AV, Rossaint R, Coburn M. Argon Organo-Protective Network Aon6. Argon: Systematic Review on Neuro- & Organoprotective Properties of an "Inert" Gas. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15(10):18175-18196.
113. Homi HM, Yokoo N, Ma D, Warner DS, Franks NP, Maze M, Grocott HP. The neuroprotective effect of xenon administration during transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Anesthesiology.* 2003;99:876–881.
114. Honda S, Ishii N, Suzuki K, Matsuo M. Oxygen-dependent perturbation of life span and aging rate in the nematode. *J. Gerontol.* 1993;48:57-61.
115. Hong Z, Jiang J, Hashiguchi K, Hoshi M, Lan L, Yasui A. Recruitment of mismatch repair proteins to the site of DNA damage in human cells. *J. Cell Sci.* 2008;21(19):3146-3154.
116. Huang W, Ramsey K.M, Marcheva B, Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J. Clin. Invest.* 2011;121:2133-2141.
117. Huey RB, Ward PD. Hypoxia, global warming, and terrestrial late Permian extinctions. *Science.* 2005;308:398-401.
118. Hwang AB, Lee SJ. Regulation of life span by mitochondrial respiration: the HIF-1 and ROS connection. *Aging (Albany NY).* 2013;3:304-310.
119. Ilacqua AN, Kirby AM, Pamenter ME. Behavioural responses of naked mole rats to acute hypoxia and anoxia. *Biol. Lett.* 2017;13(12). pii: 20170545.
120. Iketani M, Ohsawa I. Molecular Hydrogen as a Neuroprotective Agent. *Curr Neuropharmacol.* 2016, Jun 7. [Epub ahead of print].

121. Imtaiyaz HM, Shajee B, Waheed A, Ahmad F, Sly WS. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorg. Med. Chem.* 2013;21:1570-1582.
122. Jawad N, Rizvi M, Gu J, Adeyi O, Tao G, Maze M, Ma D. Neuroprotection (and lack of neuroprotection) afforded by a series of noble gases in an in vitro model of neuronal injury. *Neurosci Lett.* 2009;460:232–236.
123. Jedlicka P, Mortin MA, Wu C. Multiple functions of *Drosophila* heat shock transcription factor in vivo. *EMBO J.* 1997;16:2452–2462.
124. Jia JJ, Zeng XS, Song XQ, Zhang PP, Chen L. Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: The Protection of Epigallocatechin-3-gallate in Streptozotocin Injection-Induced Models. *Front. Pharmacol.* 2017;16(8):834.
125. Jia P, Teng J, Zou J, Fang Y, Jiang S, Yu X, Kriegel AJ, Liang M, Ding X. Intermittent exposure to xenon protects against gentamicin-induced nephrotoxicity. *PLoS One.* 2013;8(5):64-72.
126. Jia P, Teng J, Zou J, Fang Y, Zhang X, Bosnjak ZJ, Liang M, Ding X. miR-21 contributes to xenon-conferred amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Anesthesiology.* 2013;119(3):621-630.
127. Kanno Sh, Iwai S, Takao M, Yasui A. Repair of apurinic/aprimidinic sites by UV damage endonuclease; a repair protein for UV and oxidative damage. *Nucleic Acids Research.* 1999;27:3096–3103.
128. Kayser B. Nutrition and high altitude exposure. *Int. J. Sports Med.* 1992;13:129-132.
129. Keane M, Craig T, Alföldi J, et al. The naked Mole Rat genome resource: facilitating analyses of cancer and longevity-related adaptations. *Bioinformatics.* 2014;30(24):3558-60.
130. Keil G, Cummings E, de Magalhães JP. Being cool: how body temperature influences ageing and longevity. *Biogerontology.* 2015;16(4):383-97.
131. King V, Tower J. Aging specific expression of *Drosophila* hsp22. *Dev. Biol.* 1999;207:107-118.

132. Kim HM, Colaiacovo MP. DNA Damage Sensitivity Assays in *Caenorhabditis elegans*. *Bio. Protoc.* 2015;5(11):1487-1501.
133. Kim EB, Fang X, Fushan AA, Huang Z, et al. Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat. *Nature.* 2011;479 (7372):223-227.
134. Klok CJ, Harrison JF. Atmospheric hypoxia limits selection for large body size in insects. *PLoS One.* 2009;4:3876-3881.
135. Kohama K, Yamashita H, Aoyama-Ishikawa M. et al. Hydrogen inhalation protects against acute lung injury induced by hemorrhagic shock and resuscitation. *Surgery.* 2015;158(2):399-407.
136. Koltover VK. Free radical theory of aging: view against the reliability theory. *EXS.* 1992;62:11-19.
137. Korkushko OV, Shatilo VB, Ishchuk VA. Effectiveness of intermittent normobaric hypoxic trainings in elderly patients with coronary artery disease // *Adv. Gerontol.* 2010;23(3):476-482.
138. Kurbel S. Animal evolution and atmospheric pO<sub>2</sub>: is there a link between gradual animal adaptation to terrain elevation due to ural orogeny and survival of subsequent hypoxic periods? *Theor. Biol. Med. Model.* 2014;11:11-47.
139. Kuznetsova DV, Kulikov VP. Cerebrovascular and systemic hemodynamic response to carbon dioxide in humans. *Blood Press. Monit.* 2014;19(2):81-89.
140. Lachmann B, Armbruster S, Schairer W. Safety and efficacy of xenon in routine use as an inhalational anaesthetic. *The Lancet.* 1990;335(8703):1413–1415.
141. Landis G, Shen J, Tower J. Gene expression changes in response to aging compared to heat stress, oxidative stress and ionizing radiation in *Drosophila melanogaster*. *Aging (Albany NY).* 2012;11:768-789.
142. Lans H, Marteijn JA, Schumacher B, Hoeijmakers JH, Jansen G, Vermeulen W. Involvement of global genome repair, transcription coupled repair, and chromatin remodeling in UV DNA damage response changes during development. *PLoS Genet.* 2010;6(5):941-950.

143. Larson J, Drew KL, Folkow LP, et al. No oxygen? No problem! Intrinsic brain tolerance to hypoxia in vertebrates. *J. Exp. Biol.* 2014;217(7):1024-1039.
144. Larson J, Park TJ. Extreme hypoxia tolerance of naked mole-rat brain. *Neuroreport.* 2009;20:1634–1637.
145. Latorre-Pellicer A, Moreno-Loshuertos R, Lechuga-Vieco AV et al. Mitochondrial and nuclear DNA matching shapes metabolism and healthy ageing. *Nature.* 2016; Jul 6. doi: 10.1038/nature18618.
146. Le May N, Egly JM, Coin F. True lies: the double life of the nucleotide excision repair factors in transcription and DNA repair. *J.Nucleic.Acids.* 2010;(10):4061-4071.
147. Lee SJ, Hwang AB, Kenyon C. Inhibition of respiration extends *C. elegans* life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. *Curr. Biol.* 2010;20:2131-2136.
148. Lehmann G, Segal E, Muradian KK. and Fraifeld VE. Do mitochondrial DNA and metabolic rate complement each other in determination of the mammalian maximum longevity? *Rejuvenation Res.* 2008;11:409-417.
149. Lehmann G, Muradian KK, Fraifeld VE. Telomere length and body temperature—-independent determinants of mammalian longevity? *Front Genet.* 2013;4:111.
150. Lehmann G, Muradian KK, Fraifeld VE. Telomere length and body temperature-independent determinants of mammalian longevity? *Front. Genet.* 2013;4:111.
151. Leiser SF, Fletcher M, Begun A, Kaeberlein M. Life-span extension from hypoxia in *caenorhabditis elegans* requires both HIF-1 and DAF-16 and is antagonized by SKN-1. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2013;10:1135-1144.
152. Lenart P, Krejci L. DNA, the central molecule of aging. *Mutat.Res.* 2016;786:1-7.
153. Lenihan CR, Taylor CT. The impact of hypoxia on cell death pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 2013;41:657-663.

154. Li H, Mitchell JR, Hasty P. DNA double-strand breaks: a potential causative factor for mammalian aging? *Mech. Ageing Dev.* 2008;129(7-8):416-24.
155. Lewis KN, Rubinstein ND, Buffenstein R. A window into extreme longevity; the circulating metabolomic signature of the naked mole-rat, a mammal that shows negligible senescence. *Geroscience.* 2018; doi: 10.1007/s11357-018-0014-2.
156. Liang S, Mele J, Wu Y, Buffenstein R, Hornsby PJ. Resistance to experimental tumorigenesis in cells of a long-lived mammal, the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). *Aging Cell.* 2010;9:626–635.
157. Lindinger MI, Heigenhauser GJ. Effects of gas exchange on acid-base balance. *Compr. Physiol.* 2012;2:2203-2254.
158. Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. *Annu. Rev. and stress-responsive. Genet.* 1988;22:631-677.
159. Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME, Erroi E, Schettino T. Carbonic anhydrase as pollution biomarker: an ancient enzyme with a new use. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 2012;9:3965-3977.
160. Liu X, Jiang N, Hughes B, Bigras E, Shoubridge E, Hekimi S. Evolutionary conservation of the clk-1-dependent mechanism of longevity: loss of mclk1 increases cellular fitness and lifespan in mice. *Genes. Dev.* 2005;19:2424-2434.
161. Loeb J, Northrop JH. On the influence of food and temperature-upon duration of life. *J. Biol. Chem.* 1917;32:103–126.
162. Loeb J, Northrop JH. Is there a temperature coefficient for the duration of life? *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 1916;2:456-457.
163. Loetscher PD, Rossaint J, Rossaint R, Weis J, Fries M, Fahlenkamp A, Ryang Y.M, Grottke O, Argon M.C. Neuroprotection in in vitro models of cerebral ischemia and traumatic brain injury. *Crit. Care.* 2009;13:206-214.
164. Luo X, Puig O, Joogyung H, Bohmann D, Jasper H. Foxo and Fos regulate the decision between cell death and survival in response to UV irradiation. *EMBO J.* 2007;26(2):380-390.

165. Lyons TW, Reinhard CT, Planavsky NJ. Atmospheric oxygenation three billion years ago. *Nature*. 2014;506:307-315.
166. Lyons TW, Reinhard CT, Planavsky NJ. Evolution: a fixed-nitrogen fix in the early ocean? *Curr. Biol*. 2014;24:276-278.
167. Ma D, Lim T, Xu J, Tang H, Wan Y. Xenon preconditioning protects against renal ischemic-reperfusion injury via HIF-1 $\alpha$  activation. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2009;20:713-720.
168. Ma D, Yang H, Lynch J, Franks NP, Maze M, Grocott HP. Xenon attenuates cardiopulmonary bypass-induced neurologic and neurocognitive dysfunction in the rat. *Anesthesiol*. 2003;98:690-698.
169. Madhunapantula SV, Robertson GP. Chemoprevention of melanoma. *Adv. Pharmacol*. 2012;65:361-398.
170. Makhnevych T, Houry WA. The role of Hsp90 in protein complex assembly. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(3):674-82.
171. Martin JL, Ma D, Hossain M, Xu J, Sanders RD. Asynchronous administration of xenon and hypothermia significantly reduces brain infarction in the neonatal rat. *Br. J. Anaesth*. 2007;98:236-240.
172. Masoro EJ. Metabolism. *Handbook of the biology of aging* (2 edition). C.E. Finch and E.L. Shneider. NY.: Van Nostrand, 1985:540–557.
173. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem*. 1969;244(22):6049-6055.
174. Mills DB, Ward LM, Jones C, Sweeten B, Forth M, Treusch A. H, Canfield D. E. Oxygen requirements of the earliest animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111:4168-72.
175. Miskin R, Tirosh O, Pardo M, Zusman I, Schwartz B, Yahav S, Dubnov G, Kohen R. AlphaMUPA mice: a transgenic model for longevity induced by caloric restriction. *Mech. Ageing Dev*. 2005;126(2):255-261.
176. Mitchell SJ, Madrigal-Matute J, Scheibye-Knudsen M. Effects of sex, strain, and energy intake on hallmarks of aging in mice. *Cell Metab*. 2016;23(6):1093-1112.

177. Muradian KK. Artificial atmosphere, rejuvenation and longevity. *Probl. Aging Longevity*. 2008;17:457-477 (in Russian).

178. Muradian KK, Vaiserman AM. Atmosphere, longevity and metabolism. *Life Extension. Healthy Aging and Longevity*. Springer. 2015. 285-299.

179. Muradian K. "Pull and push back" concepts of longevity and life span extension. Muradian K. *Biogerontology*. 2013;14(6):687-691.

180. Nagele P, Metz LB, Crowder M. Xenon acts by inhibition of non-N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamatergic neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. *Anesthesiology*. 2005;103(3):508-513.

181. Nara K, Nagashima F, Yasui A. Highly elevated ultraviolet-induced mutation frequency in isolated Chinese hamster cell lines defective in nucleotide excision repair and mismatch repair proteins. *Cancer Res*. 2001;61(1):50-52.

182. Nathaniel TI, Otukonyong E, Abdellatif A, Soyinka JO. Effect of hypoxia on metabolic rate, core body temperature, and c-fos expression in the naked mole rat. *Int. J. Dev. Neurosci*. 2012;30(6):539-544.

183. Nathaniel TI, Otukonyong EE, Okon M, Chaves J, Cochran T, Nathaniel AI. Metabolic regulatory clues from the naked mole rat: toward brain regulatory functions during stroke. *Brain. Res. Bull*. 2013;98:44-52.

184. Netzer NC, Breitenbach M. Metabolic changes through hypoxia in humans and in yeast as a comparable cell model. *Sleep Breath*. 2010;14:221-225.

185. Neukirchen M, Hipp J, Schaefer MS, Brandenburger T, Bauer I, Winterhalter M, Kienbaum P, Werdehausen R. Cardiovascular stability and unchanged muscle sympathetic activity during xenon anaesthesia: role of norepinephrine uptake inhibition. *Br. J. Anaesth*. 2012;109(6):887-896.

186. Nicot C. HTLV-I Tax-mediated inactivation of cell cycle checkpoints and DNA repair pathways contribute to cellular transformation: "A random mutagenesis model". Nicot C. *J. Cancer Sci*. 2015;2:45-53.

187. Nowrangi DS, Tang J, Zhang JH. Argon gas: A potential neuroprotectant and promising medical therapy. *Med. Gas Res*. 2014;4(3):123-134.

188. Oei GT, Heger M, Van Golen RF, Alles LK, Flick M, Van Der Wal AC. Reduction of cardiac cell death after helium postconditioning in rats: transcriptional analysis of cell death and survival pathways. *Mol. Med.* 2014;20:516-526.
189. Oei GT, Weber NC, Hollmann MW, Preckel B. Cellular effects of helium in different organs. *Anesthesiology.* 2010;112:1503–1510.
190. Okano S, Kanno S, Nakajima S, Yasui A. Cellular responses and repair of single-strand breaks introduced by UV damage endonuclease in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 2000;275(42):32635-32641.
191. Ostojic SM. Molecular hydrogen: An inert gas turns clinically effective. *Ann. Med.* 2015;47(4):301-304.
192. Owerkowicz T, Elsey RM, Hicks JW. Atmospheric oxygen level affects growth trajectory, cardiopulmonary allometry and metabolic rate in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *J. Exp. Biol.* 2009;212:1237-1247.
193. Pagel PS. Cardioprotection by noble gases. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2010;24(1):143-163.
194. Pavlov AA, Kasting JF, Brown LL, Rages KA. Greenhouse warming by CH<sub>4</sub> in the atmosphere of early Earth. *J. Geophys. Res.* 2000;105:11981-11990.
195. Pavlov NB. Argon – a biologically active component of atmosphere. *Aerosp. Environ. Med.* 2006;40:3-6.
196. Pearl R. *The rate of living.* Alfred Knopf. New York. 1928.
197. Pelloux J, Tremblay M, Wellinger RJ, Conconi A. UV-induced DNA damage and DNA repair in ribosomal genes chromatin. *Methods Mol. Biol.* 2012;809:303-320.
198. Pérez VI. Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. 106. P. 3059–3064.
199. Petzelt C, Taschenberger G, Schmehl W, Kox W. J. Xenon-induced inhibition of Ca<sup>2+</sup> transitions in the cell cycle of human endothelial cells. *Pflugers. Archiv. European. Journal of Physiology.* 1999. 437, № 5. P. 737–744.

200. Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Oct; 59(10):1640-8.

201. Planavsky NJ, Reinhard CT, Wang X, Thomson D, McGoldrick P, Rainbird RH, Johnson T, Fischer WW, Earth history. Low mid-Proterozoic atmospheric oxygen levels and the delayed rise of animals. *Science.* 2014. 346. P. 635-638.

202. Pollock JP, Patel HM, Randolph BJ, Heffernan MJ, Leuenberger UA, Muller MD. Ascorbic acid does not enhance hypoxia-induced vasodilation in healthy older men. *Physiol. Rep.* 2014. 2. 57-68.

203. Pratt WB. The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998 Apr; 217(4):420-34.

204. Preckel B, Weber NC, Sanders RD, Maze M, Schlack W. Molecular mechanisms transducing the anesthetic, analgesic, and organ-protective actions of xenon. *Anesthesiology.* 2006. 105, № 1. P. 187-197.

205. Prodromou C. Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem J.* 2016 Aug 15; 473(16):2439–2452.

206. Puente-Sanchez F, Olsson S, Gomez-Rodriguez M, Souza-Egipsy V, Altamirano-Jeschke M, Amils R. Solar Radiation Stress in Natural Acidophilic Biofilms of *Euglena mutabilis* Revealed by Metatranscriptomics and PAM Fluorometry. *Protist.* 2016;167(1):67-81.

207. Quillin ML, Breyer WA, Griswold II., Matthews BW. Size versus polarizability in protein-ligand interactions: binding of noble gases within engineered cavities in phage T4 lysozyme. *J. Mol. Biol.* 2000;302(4):955-977.

208. Raguso CA, Luthy C. Nutritional status in chronic obstructive pulmonary disease: role of hypoxia. *Nutrition.* 2011;27:138-143.

209. Riordan CJ, Randsbeck F, Storey JH. et al. Effects of oxygen, positive end-expiratory pressure, and carbon dioxide on oxygen delivery in an animal model of the univentricular heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1996;112(3):644-654.

210. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*. 1962;18:571-573.
211. Rizvi M, Jawad N, Li Y, Vizcaychipi MP, Maze M, Ma D. Effect of noble gases on oxygen and glucose deprived injury in human tubular kidney cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2010;235(7):886-891.
212. Robey IF. Examining the relationship between diet-induced acidosis and cancer. *Nutr. Metab. (Lond)*. 2012;9:72-83.
213. Rochette PJ, Brash DE. Human telomeres are hypersensitive to UV-induced DNA damage and refractory to repair. *PLoS. Genet*. 2010;6(4):98-110.
214. Rolfe DF, Brand MD. The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissues. *Biosci Rep*. 1997;17(1):9-16.
215. Rostain JC, Lavoute C, Risso JJ, Vallee N. A review of recent neurochemical data on inert gas narcosis. *Undersea Hyperb. Med*. 2011;38(1):49-59.
216. Ruby JG, Smith M, Buffenstein R. Naked Mole-Rat mortality rates defy gompertzian laws by not increasing with age. *Elife*. 2018;24:7. pii:e31157.
217. Ruzicka J, Benes J, Bolek L, Markvartova V. Biological effects of noble gases. *Physiol Res*. 2007;56(1):39-44.
218. Sabir H, Walloe L, Dingley J, Smit E, Liu X, Thoresen M. Combined treatment of xenon and hypothermia in newborn rats-additive or synergistic effect? *PLoS One*. 2014;9:201-209.
219. Salkoff L, Baker K, Butler A, Covarrubias M, Pak MD, Wei A. An essential "set" of K<sup>+</sup> channels conserved in flies, mice and humans. *Trends in Neurosciences*. 1992;15(5):161-166.
220. Sanchez-Gomez FJ, Diez-Dacal B, Garcia-Martin E, et al. Detoxifying enzymes at the cross-roads of inflammation, oxidative stress, and drug hypersensitivity: role of glutathione transferase P1-1 and aldose reductase. *Front Pharmacol*. 2016;7:237-249.
222. Schiltz M, Fourme R, Broutin I, Prange T. The catalytic site of serine proteinases as a specific binding cavity for xenon. *Structure*. 1995;3(3):309-316.

221. Schaper C, Höcker J, Böhm R, Roeder T, Bein B. The shaker potassium channel is no target for xenon anesthesia in short-sleeping *Drosophila melanogaster* mutants. *The Scientific World Journal*. 2012. ID 373709. 4 p.

223. Schlanger LE, Bailey JL, Sands JM. Electrolytes in the aging. *Adv. Chronic. Kidney. Dis.* 2010;17(4):308-319.

224. Seluanov A, Gladyshev VN, Vijg J, Gorbunova V. Mechanisms of cancer resistance in long-lived mammals. *Nat. Rev. Cancer.* 2018;5. doi: 10.1038/s41568-018-0004-9.

225. Sessions AL, Doughty DM, Summons RE, Newman DK. The continuing puzzle of the great oxidation event. *Curr. Biol.* 2009;19:567-574.

226. Schwerin A. Shaping vulnerable bodies at the thin boundary between environment and organism: skin, dna repair, and a genealogy of DNA care strategies. *Sci. Context.* 2015;28(3):427-464.

227. Shatilo VB, Korkushko OV, Ischuk VA, Downey HF, Serebrovskaya TV. Effects of intermittent hypoxia training on exercise performance, hemodynamics, and ventilation in healthy senior men. *High Alt. Med. Biol.* 2008;9(1):43-52.

228. Singer MA. Insights into biomedicine from animal adaptations. *Compr. Physiol.* 2011;1(4):2063-2081.

229. Slawuta P, Nicpon J, Skrzypczak P. Contemporary approach to acid-base balance and its disorders in dogs and cats. *Pol. J. Vet. Sci.* 2010;13:561-567.

230. Smit KF, Oei GT, Brevoord D, Stroes ES, Nieuwland R, Schlack WS, Hollmann MW, Weber NC, Preckel B. Helium induces preconditioning in human endothelium in vivo. *Anesthesiology.* 2013;118(1):95-104.

231. Schmidt H, Malik A, Bicker A, Poetzsch G, Avivi A, Shams I, Hankeln T. Hypoxia tolerance, longevity and cancer-resistance in the mole rat *Spalax* a liver transcriptomics approach. *Sci Rep.* 2017;7:14348.

232. Schreckenber R, Kutsche H. S, Weber M, Hirschhäuser C, Rohrbach S, Li L, Niemann B, Schulz R, Schlüter K. Alterations in Glucose Metabolism During the Transition to Heart Failure: The Contribution of UCP-2. *Cells.* 2020;9(3):552.

233. Sohn JW. Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB Rep.* 2015;48(4):229-233.
234. Spaggiari S, Kepp O, Rello-Varona S, Chaba K, Adjemian S, Pype J, Galluzzi L, Lemaire M, Kroemer G. Antiapoptotic activity of argon and xenon. *Cell Cycle.* 2013;12:2636-2642.
235. Stockard TK, Levenson DH, Berg L, Fransioli JR, Baranov EA, Ponganis PJ. Blood oxygen depletion during rest-associated apneas of northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*). *J. Exp. Biol.* 2007;10(15):2607-2617.
236. Stoll EA, Karapavlovic N, Rosa H, Woodmass M, Rygiel K, White K. Naked mole-rats maintain healthy skeletal muscle and Complex IV mitochondrial enzyme function into old age. *Aging (Albany NY).* 2016;19/8(12):3468-3485.
237. Strehler B. The distribution of cellular aging. In *Time, Cells, and Aging*. New York: Academic Press, 1962.
238. Strobel A, Bennecke S, Leo E, Mintenbeck K, Pörtner HO, Mark FC. Metabolic shifts in the Antarctic fish *Notothenia rossii* in response to rising temperature and PCO<sub>2</sub>. *Front. Zool.* 2012;9(1):28-37.
239. Tabarean I, Morrison B, Marcondes M. C, Bartfai T. Hypothalamic and dietary control of temperature-mediated longevity. *Ageing Res. Rev.* 2010;9(1):41-50.
240. Timchenko AN, Utko NA, Muradian KK. Decreased O<sub>2</sub> or increased CO<sub>2</sub> content in the atmosphere extend life span of *Drosophila melanogaster*. *Probl. Aging and Longevity.* 2008;17:230-9.
241. Tacutu R, Craig T, Budovsky A, Wuttke D, Lehmann G, Taranukha D, Costa J, Fraifeld VE. Human Ageing Genomic Resources: integrated databases and tools for the biology and genetics of ageing. *Nucleic. Acids Res.* 2013;41:1027-1033.
242. Tacutu R, Thornton D, Johnson E, Budovsky A, Barardo D, Craig T, Diana E, Lehmann G, Toren D, Wang J, Fraifeld VE. Human Ageing Genomic Resources: new and updated databases. *Nucleic. Acids. Res.* 2018;4(46):1083-1090.
243. Tahara Y, Shibata S. Chrono-biology, Chrono-pharmacology, and Chrono-nutrition. *J. Pharmacol. Sci.* 2014;124:320-335.

244. Takahashi Y, Moriwaki S, Sugiyama Y, Endo Y, Yamazaki K, Mori T, Takigawa M, Inoue S. Decreased gene expression responsible for post-ultraviolet DNA repair synthesis in aging: a possible mechanism of age-related reduction in DNA repair capacity. *J. Invest. Dermatol.* 2005;124(2):435-442.
245. Takai H, Xie Y, de Lange T. Tel structure and function in the Hsp90-dependent maturation of mTOR and ATR complexes. *Genes Dev.* 2010;24(18):2019-30.
246. Tareen N, Zadshir A, Martins D, Nagami G, Levine B, Norris KC. Alterations in acid-base homeostasis with aging. *J. Natl. Med. Assoc.* 2004;96:921-926.
247. Taylor CT, McElwain JC. Ancient atmospheres and the evolution of oxygen sensing via the hypoxia-inducible factor in metazoans. *Physiology (Bethesda).* 2010;25(5):272-279.
248. Taylor KR, Milone NA, Rodriguez CE. Four cases of spontaneous neoplasia in the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*), a putative cancer-resistant species. *J. Gerontol. a Biol. Sci. Med. Sci.* 2016. pii: glw047.
249. Thies F, Mills LM, Moir S, Masson LF. Cardiovascular benefits of lycopene: fantasy or reality? *Proc. Nutr. Soc.* 2016;9:1-8.
250. Thom SR, Bhopale VM, Yang M. Neutrophils generate microparticles during exposure to inert gases due to cytoskeletal oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 2014;289:18831-18845.
251. Tian XY, Ma S, Tse G, Wong WT, Huang Y. Uncoupling Protein 2 in Cardiovascular Health and Disease. *Front Physiol.* 2018;2(9):1060.
252. Tower J. Heat shock proteins and *Drosophila* aging. *Exp. Gerontol.* 2011;46(5):355-362.
253. Tsuji T, Aoshiba K, Itoh M, Nakamura H, Yamaguchi K. Hypercapnia Accelerates Wound Healing in Endothelial Cell Monolayers Exposed to Hypoxia. *Open Respir Med J.* 2013;7:6-12.

254. Turin L, Skoulakis EM, Horsfield AP. Electron spin changes during general anesthesia in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111(34):3524-3533.
255. Valentive RC, Valentine DL. In: Human longevity. CRC Press. Boca Raton. 2014.
256. Vermeulen CJ, Loeschcke V. Longevity and the stress response in *Drosophila*. *Exp. Gerontol*. 2007;42(3):153-159.
257. Vihervaara A, Sistonen L. HSF1 at a glance. *J. Cell Sci*. 2014;127(2):261-266.
258. Voellmy R, Boellmann F. Chaperone regulation of the heat shock protein response. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2007;594:89-99.
259. Walker JC. Carbon dioxide on the early earth. *Orig. Life Evol. Bioph*. 1985;16:117-127.
260. Wang H, Shu S, Li J, Jiang H. Management of liver cancer argon-helium knife therapy with functional computer tomography perfusion imaging. *Technol. Cancer Res. Treat*. 2016;15(1):29-35.
261. Weber NC, Smit KF, Hollmann MW, Preckel B. Targets involved in cardioprotection by the non-anaesthetic noble gas helium. *Curr. Drug. Targets*. 2015;16(8):786-792.
262. Welsh JS, Traum TL. Regarding mole rats and cancer. *Vet. Pathol*. 2016;53(6):1264-1265.
263. Whitmore SE, Potten CS, Chadwick CA, et al. Effect of photoreactivating light on UV radiation-induced alterations in human skin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. 2001;17(5):213-217.
264. Wołoszyn Ł, Ilczyszyn M, Ilczyszyn MM. Experimental evidence on interaction between xenon and bovine serum albumin. *Spectrochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc*. 2014;125:449-452.
265. Xiao B, Li L, Xu C, Zhao S, Yang W, Cong W, Kan G, Cui S. Transcriptome sequencing of the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*) and identification of hypoxia tolerance genes. *Biol. Open*. 2017;6(12):1904-1912.

266. Xiao R, Liu J, Xu XZ. Thermosensation and longevity. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 2015;201(9):857-867.
267. Yamada M, Udono MU, Hori M, Hirose R, Sato S, Mori T, Nikaido O. Aged human skin removes UVB-induced pyrimidine dimers from the epidermis more slowly than younger adult skin in vivo. *Arch. Dermatol. Res.* 2006;297(7):294-302.
268. Yanai H, Toren D, Vierlinger K, Hofner M, Nothhammer C, Chilosi M, Budovsky A, Fraifeld VE. Wound healing and longevity: lessons from long-lived aMUPA mice. *Aging (Albany NY)*. 2015;7:167–176. <https://doi.org/10.18632/aging.100726>
269. Yang J, Tower J. Expression of hsp22 and hsp70 transgenes is partially predictive of drosophila survival under normal and stress conditions. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2009;64:828-838.
270. Yang L, Lof M, Veierød MB, Sandin S, Adami HO, Weiderpass E. Ultraviolet exposure and mortality among women in Sweden. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2011;20(4):683-690.
271. Yasuhira S, Yasui A. Alternative excision repair pathway of UV-damaged DNA in *Schizosaccharomyces pombe* operates both in nucleus and in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2000;275(16):11824-11828.
272. Yasui A, McCready SJ. Alternative repair pathways for UV-induced DNA damage. *Bioessays*. 1998;20(4):291-297.
273. Zahnle K, Schaefer L, Fegley B. "Earth's Earliest Atmospheres". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010;2(10):49-56.
274. Zhao H, Watts HR, Chong M, Huang H, Maxwell P. H, Maze M, George A. J, Ma D. Xenon treatment protects against cold ischemia associated delayed graft function and prolongs graft survival in rats. *Am. J. Transplant.* 2013;8:2006-2018.
275. Zhao H, Yoshida A, Xiao W, Ologunde R, O'Dea KP, Takata M, George AJ, Ma D. Xenon treatment attenuates early renal allograft injury associated with prolonged hypothermic storage in rats. *FASEB J.* 2013;27(10):4076-4088.

276. Zhang CB, Tang YC, Xu XJ, et al. Hydrogen gas inhalation protects against liver ischemia/reperfusion injury by activating the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Exp. Ther. Med.* 2015;9(6):2114-2120.

277. Zheng L, Zhou M, Guo Z, Lu H, Qian L, Dai H. Human DNA is a mitochondrial nuclease/helicase for efficient processing of DNA replication and repair intermediates. *Mol. Cell.* 2008;32(3):325-336.

278. Zhuang L, Yang T, Zhao H, Fidalgo AR, Vizcaychipi MP, Sanders RD, Yu B, Takata M, Ma D. The protective profile of argon, helium, and xenon in a model of neonatal asphyxia in rats. *Crit. Care Med.* 2012;40(6):1724-1730.

279. Ziemba EA, Cabrera JA, Colbert R, Kelly RF, Kuskowski M, Arriaga E, Sluiter W. Uncoupling Protein-2 Expression and Effects on Mitochondrial Membrane Potential and Oxidant Stress in Heart Tissue. *Transl Res.* 2012;159(5):383–390.

280. Zwemer CF, Whitesall SE, D'Alecy LG. Cardiopulmonary-cerebral resuscitation with 100% oxygen exacerbates neurological dysfunction following nine minutes of normothermic cardiac arrest in dogs. *Resuscitation.* 1994;27:159-170.

281. <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/#mlo>

282. [http://www.grida.no/publications/other/ipcc\\_tar/?src=/climate/ipcc\\_tar/wg1/221.htm#tab61](http://www.grida.no/publications/other/ipcc_tar/?src=/climate/ipcc_tar/wg1/221.htm#tab61)

## Список публікацій здобувача

*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. [1]
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. [2]
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. [3] *(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. [4]

*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). [5] *(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. [6] *(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. [7] *(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. [8]

**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. [9] *(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. [10]

**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. [11]

**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. старен. и долголет. 2010;19(3):255. [12]

**13. Толстун ДА,** Мурадян ХК, Тимченко АН. Влияние гипоксии, моделированной гелием, на развитие и стрессоустойчивость дрозофил. Матеріали X конференції молодих вчених «Актуальні проблеми геронтології і

геріатрії», присвяч. пам'яті акад. В. В. Фролькіса; 2011 Січ 26; Київ. К.: ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України». 2011:57 с. [13]

**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. [14]

**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-біологич. вестник. 2012;15(3/2)(59):383. [15]

**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. [16]

**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 долголет. 2012;21:43-44. [17]

**18. Толстун ДА.** Естественный и аномальный циркадный ритм у мышей разного возраста. Мат. XI наук. конф. молодых вчених з міжнар. участю «Актуальні питання геронтології та геріатрії», присвяч. пам'яті акад. В. В. Фролькіса 2013 Січ 25; Київ. К.: 2013:61. [18]

**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. [19]

**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. [20]

**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. [21]

**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. 2017:20-23. [22]

**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 10-12<sup>th</sup>; Rome, Italy. 2018:20-23. [23]

**24. Толстун ДА.** Влияние гиперкапнии и гипоксии на скорость газообмена, температуру тела и двигательную активность мышей. 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. [24]

**25. Толстун ДА**, Мурадян ХК, Дубилей ТА, Тушинская ТВ, Безруков ВВ, Фрайфельд ВЭ, Князер АН. Метаболическое ремоделирование мышей 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. [25]

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