

# БИОЛОГИЯ СТАРЕНИЯ

---

“Пробл. старения и долголетия”, 2010, 19, № 2.- С.121-127

УДК 577.7:612.67-019

## ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ КИСЛОРОДНОЙ ДЕПРИВАЦИИ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ *Drosophila melanogaster*

В. А. Березовский, А. М. Вайсерман\*, И. Г. Литовка,  
Е. Г. Чака, П. В. Лахин, Н. М. Кошель\*, Л. В. Мехова\*,  
В. П. Войтенко\*

Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, 01024 Киев  
\*Государственное учреждение “Институт геронтологии им. Д. Ф. Чебогарева  
НАМН Украины”, 04114 Киев

Исследовано влияние гипоксического стресса различной длительности на ранних этапах жизни имаго на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*. Гипоксическое воздействие ( $pO_2 \sim 3$  мм рт. ст. в азоте) продолжительностью 20 мин не повлияло на среднюю продолжительность жизни (СПЖ) самцов, продолжительность 30 и 35 мин достоверно увеличивало, а продолжительностью 25, 40 и 45 мин снижало СПЖ по сравнению с контролем. У самок ни в одной из экспериментальных групп не выявлено увеличения СПЖ; причем гипоксия на протяжении 25, 40 и 45 мин привела к достоверному уменьшению СПЖ самок по сравнению с контролем. Гипоксический стресс при всех примененных режимах воздействия способствовал достоверному увеличению максимальной продолжительности жизни (МПЖ) самцов по сравнению с контролем. Особенно выраженным было увеличение МПЖ при применении гипоксического стресса на протяжении 20 и 30 мин. У самок же гипоксическое воздействие, независимо от его длительности, привело к уменьшению МПЖ по сравнению с контролем. Таким образом, наряду с ожидаемым отрицательным влиянием (уменьшением ПЖ) у самцов при некоторых вариантах гипоксического воздействия были выявлены проявления гормезиса (парадоксального стимулирования) по показателю ПЖ.

**Ключевые слова:** *Drosophila melanogaster*, продолжительность жизни, гипоксия, гормезис.

Кислород — обязательный компонент энергетического метаболизма любого организма. Лишь одиночные виды анаэробных микроорганизмов могут существовать при его полном отсутствии. Все животные существуют в условиях обязательного наличия субстратов окисления и акцептора электронов в цепях окисления. Недостаток кислорода или его низкое парциальное давление закономерно влияют на интенсивность окислительного метаболизма и объем освобожденной энергии. Поэтому проблема кислородной депривации (гипоксии) в биологии и медицине разрабатывается со времен открытия Пристли и Лавуазье роли кислорода в биологических структурах (цит. по [3, 6]).

Установлено, что существуют высокорезистентные к недостатку кислорода виды животных (например, креветки и черепахи). Тем не менее, большинство организмов имеют определенную границу чувствительности к кислородной депривации [7]. При превышении этого уровня включаются молекулярные и системные механизмы адаптации, которые действуют лишь в определенных границах уровня парциального давления кислорода ( $pO_2$ ). По физиологическим эффектам принято различать следующие уровни гипоксии:

- 1) индифферентный, который не вызывает ощутимых изменений в состоянии организма;
- 2) саногенный, который активирует метаболические процессы, пролиферацию и регенерацию клеток;
- 3) патогенный, который вызывает нарушение нормальной жизнедеятельности клеток, органов и систем;
- 4) абиогенный, который несовместим с сохранением жизни клетки или организма в целом [1].

Известно, что повторное влияние гипоксии первого или второго уровня способно инициировать адаптивную перестройку соотношения мощности аэробного и анаэробного путей освобождения энергии, которая обеспечивает новое метаболическое состояние организма, повышает его выносливость к новым условиям существования. Это состояние может оставлять “метаболический шлейф”, растормаживая “спящие гены”, а также приводить к перестройке энергетического метаболизма. Об этом свидетельствуют известные факты чрезвычайно высокой резистентности к недостатку кислорода морских свинок (*Guinea Pigs*), лам и других эндемических видов животных, которые постоянно проживают в условиях высокогорья [7].

Для систематических исследований особенностей адаптивных процессов при гипоксии представляется целесообразным использование такого классического модельного объекта с коротким периодом развития и жизни, как *Drosophila melanogaster*. В связи с этим целью нашей работы было исследование влияния кратковременной нормобарической гипоксии различной длительности на ранних этапах жизни имаго на продолжительность жизни (ПЖ) самцов и самок *Drosophila melanogaster*.

**Материал и методы.** Исследование проводили на аутбредной лабораторной популяции *Drosophila melanogaster* линии *Canton S*. Разведение и содержание мух

осуществляли в стандартных условиях: на полноценном корме, который содержит в 100 мл воды 4 г сахара, 4 г манной крупы, 2,5 г дрожжей, 1 г агар-агара и 1 мл 10 % спиртового раствора нипагина (для угнетения роста плесени), при температуре ( $25 \pm 0,5$ ) °С, режиме постоянной влажности и освещения (12 ч света — 12 ч темноты в сутки).

Дрозофилы являются чрезвычайно стойкими к влиянию гипоксии, поэтому для гипоксического стресса мы использовали атмосферу 0,4-0,5 % кислорода в азоте, что соответствует  $pO_2 = 3$  мм рт. ст. Для создания таких условий применяли устройство, которое состояло из герметически закрытой стеклянной камеры, в которой размещали пробирки с мухами. Пробирки закрывали сетчатыми пробками, которые не создавали препятствий для газообмена. К камере присоединяли вакуумный насос, с помощью которого на протяжении 3 мин создавали разрежение воздуха до 0,2 атм., что соответствует высоте 12000 м над уровнем моря. С помощью иглистого вентиля плавно регулировали скорость разрежения и “подъема и спуска насекомых с высоты” (скорость “подъема” составляла 70 м/с). Прозрачные стенки камеры позволяли визуально контролировать состояние мух в условиях гипоксии. Отрицательное давление в камере измеряли альтиметром. После достижения давления 0,2 атм. в камеру подавали 99,6 % азот из баллона. Скорость подачи газа составляла ( $6 \pm 1$ ) см<sup>3</sup>/с, для ее контроля использовали ротационный вентилметр. На протяжении эксперимента состав газовой смеси в камере контролировали магнитоэлектрическим газоанализатором МИК-М. Эксперименты проводили при постоянной температуре воздуха ( $27,5 \pm 0,5$ ) °С.

Для осуществления разовой гипоксии насекомых на стадии имаго в возрасте 2 сут помещали в пробирки без пищевой смеси высотой 70 мм и диаметром 20 мм по 25 особей одного пола в пробирку, по 6 пробирок (повторов) на каждый из вариантов опыта. Перед воздействием насекомые находились без пищи 90 мин и еще 40 мин — после гипоксии. Время гипоксической экспозиции составляло 20, 25, 30, 35, 40, и 45 мин. Диапазон доз подбирали в предыдущих экспериментальных сериях таким образом, чтобы после максимально длительного гипоксического воздействия (45 мин) все насекомые оставались живыми, а их двигательная активность восстанавливалась в короткие сроки после экспозиции.

Для определения имагинальной ПЖ через 40 мин после гипоксического стресса мух рассаживали в пробирки высотой 150 мм и диаметром 15 мм, которые содержали по 2 мл корма, при плотности популяции 25 особей на пробирку (самцы и самки — отдельно). Во всех экспериментальных сериях пересадку на свежий корм осуществляли три раза в неделю, одновременно проводили подсчет умерших мух. После полного вымирания насекомых определяли показатели средней ПЖ (СПЖ) и максимальной ПЖ (МПЖ), которые рассчитывали как СПЖ последних 10 % мух, оставшихся в живых [4]. Каждый из вариантов эксперимента включал в себя по шесть повторов. Таким образом, в каждой экспериментальной группе СПЖ определяли у 150 насекомых, а МПЖ — как СПЖ последних 15 мух, оставшихся в живых в каждой группе.

Достоверность различий средних значений показателей определяли по

t-критерию Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Гипоксическое воздействие продолжительностью 20 мин не повлияло на СПЖ самцов, продолжительностью 30 и 35 мин способствовало ее достоверному увеличению, а продолжительностью 25, 40 и 45 мин привело к достоверному снижению СПЖ по сравнению с контролем (табл. 1). У самок ни в одной из экспериментальных групп не выявлено увеличения СПЖ; причем гипоксия на протяжении 25, 40 и 45 мин привела к ее достоверному уменьшению по сравнению с контролем (табл. 2).

Таблица 1

Средняя и максимальная продолжительность жизни самцов *D. melanogaster* после влияния на имаго в возрасте 2 сут гипоксического стресса различной длительности, сут ( $M \pm m$ )

Длительность гипоксии	СПЖ	МПЖ
0 (контроль)	62,5 ± 1,8	86,06 ± 0,53
20 мин	60,9 ± 3,0	97,19 ± 0,64***
25 мин	55,2 ± 3,0*	88,52 ± 0,62**
30 мин	69,5 ± 1,8**	93,87 ± 0,80***
35 мин	68,0 ± 2,0*	87,92 ± 0,57*
40 мин	46,9 ± 3,7***	87,62 ± 0,51*
45 мин	52,9 ± 3,2**	88,53 ± 0,39**

Примечания (здесь и в табл. 2): \* —  $P < 0,05$ , \*\* —  $P < 0,01$ , \*\*\* —  $P < 0,001$  по сравнению с контролем.

Гипоксический стресс в начале имагинальной жизни при всех применяемых режимах воздействия способствовал достоверному увеличению МПЖ самцов по сравнению с контролем (см. табл. 1). Особенно выраженным было увеличение МПЖ при применении гипоксического стресса на протяжении 20 и 30 мин. У самок же гипоксическое воздействие, независимо от его длительности, привело к уменьшению МПЖ по сравнению с контролем (см. табл. 2). Отсутствие стимулирующего эффекта у самок было прогнозируемым, поскольку, как выявлено в некоторых предыдущих исследованиях, самки намного менее чувствительны к продлевающим жизнь влияниям, чем самцы [9].

Ранее адаптивные изменения при гипоксии были выявлены в ряде экспериментов на *Drosophila melanogaster*. Так, у мух, которых на протяжении многих поколений подвергали экспериментальному отбору на способность выживать в условиях гипоксии и содержали для этого на протяжении всего жизненного цикла в атмосфере 4 %  $O_2$  в  $N_2$  ( $pO_2 = 30$  мм Hg вместо 159,6 мм Hg в обычном атмосферном воздухе), были выявлены сокращение времени восстановления от аноксичного ступора, более высокий уровень потребления  $O_2$  в условиях гипоксии, снижение размеров и массы тела как следствие уменьшения числа и размеров клеток [16]. Авторы определили ряд генов (*Best1*, *broad*, *CG7102*, *dunce*, *lin 19-line* и *secb*), которые играют важную роль в выживании выведенной линии дрозофил в условиях крайне низкой концентрации  $O_2$  на протяжении многих поколений. Высказано мнение, что именно эти гены имеют решающее значение для адаптации к гипоксии, причем как в физиологических, так и в патологических условиях не только у дрозофил, но и у млекопитающих [16]. Адаптивные изме-

Таблица 2

Средняя и максимальная продолжительность жизни самок *D. melanogaster* после влияния на имаго в возрасте 2 сут гипоксического стресса различной длительности, сут ( $M \pm m$ )

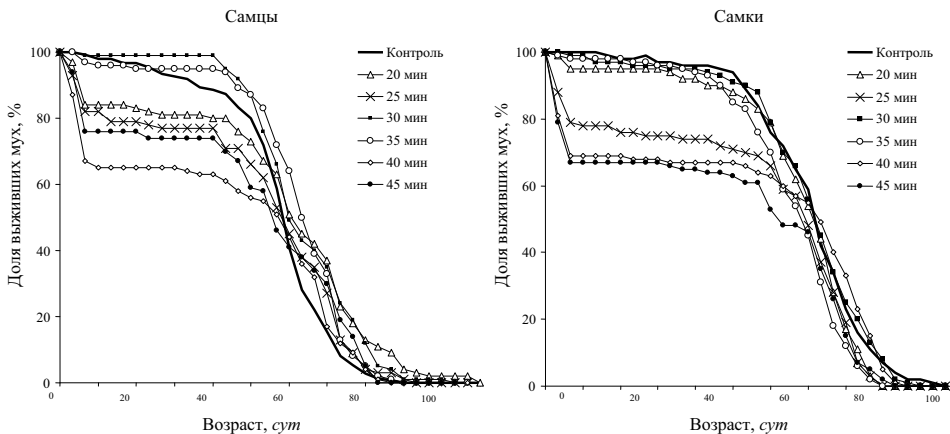
Длительность гипоксии	СПЖ	МПЖ
0 (контроль)	76,29 ± 2,35	97,97 ± 0,50
20 мин	73,09 ± 2,47	93,00 ± 0,41***
25 мин	60,51 ± 3,40***	92,41 ± 0,40***
30 мин	76,22 ± 2,48	96,47 ± 0,35*
35 мин	71,34 ± 2,10	91,57 ± 0,47***
40 мин	58,32 ± 3,94***	97,18 ± 0,51
45 мин	53,22 ± 3,81***	93,21 ± 0,44***

нения у дрозофил также выявлены при их содержании с 20-суточного возраста в искусственной атмосфере с повышенным содержанием  $O_2$  (45-60 %). При этих условиях изменения ПЖ сопровождались сдвигами интенсивности газообмена в противоположном (обратном) направлении, т. е. увеличение ПЖ сопровождалось снижением газообмена и наоборот [5]. Таким образом, уменьшение парциального давления кислорода может действовать аналогично ограничению субстратов окисления, создавая адаптивные предпосылки для снижения уровня оксидативного стресса и увеличения ПЖ.

Как отмечалось выше, в нашем исследовании наряду с ожидаемым отрицательным влиянием (уменьшением ПЖ) у самцов при некоторых вариантах гипоксического воздействия были выявлены проявления гормезиса (парадоксального стимулирования) по показателю ПЖ. Подобные стимулирующие проявления у *Drosophila melanogaster* ранее были выявлены при применении других стрессов умеренной интенсивности на протяжении раннего онтогенеза насекомых, в том числе при рентгеновском облучении на стадии яйца [2, 14] и личинки [13], а также при применении кратковременного холодового шока [10], теплового шока [9, 12] и гипергравитации [11] на протяжении раннего имагинального онтогенеза мух.

Особенно выраженным в нашем исследовании было увеличение МПЖ. Оно выглядит достаточно парадоксальным, особенно после применения гипоксического стресса на протяжении 20 мин, который привел к вымиранию приблизительно 15 % самцов на протяжении недели непосредственно после экспозиции, т. е., являлся для них достаточно сильным стрессом (рисунок).

Можно предположить, что использованный вариант стресса привел к разным последствиям у представителей различных субпопуляций мух: насекомые, принадлежащие к менее резистентной к стрессу субпопуляции вымирали в короткие сроки после воздействия, а у представителей более резистентной субпопуляции происходила индукция адаптивных (гормезисных) изменений, которая способствовала продлению их жизни. Подобные парадоксальные результаты получены и в других исследованиях, в том числе на человеческих популяциях. Например, А. И. Яшин и соавт. [15], изучая когорты долгожителей, обнаружили, что многие из них в детстве были более болезненными, чем их сверстники. "Гормезисное" объяснение было предложено для объяснения парадоксального уменьшения



Кривые выживаемости самцов и самок *Drosophila melanogaster* после влияния на имаго в возрасте 2 сут гипоксического стресса различной длительности.

темпа смертности в старших возрастных группах, которое неоднократно наблюдали в демографических исследованиях [8]. Было высказано предположение, что развитие в неблагоприятных средовых условиях может способствовать у некоторых людей устойчивой (сохраняющейся на протяжении всей жизни) активации генов систем антиоксидантной защиты, а также генов, продуцирующих стресс-белки, вследствие чего эти люди становятся долгожителями. Такая “гормезисноиндуцированная” адаптация к неблагоприятным условиям существования может, по мнению авторов, уменьшать в когортах долгожителей темп смертности на поздних этапах их жизни [8].

Продление ПЖ при применении кратковременного гипоксического влияния в раннем онтогенезе у *Drosophila melanogaster* выявлено нами впервые. Для проверки того, может ли воспроизводиться выявленный у самцов гормезисный эффект, необходимы дальнейшие исследования.

### Литература

1. Березовский В. А., Левашов М. И. Введение в оротерапию. – Киев: Изд-во Академии проблем гипоксии, 2000. – 76 с.
2. Вайсерман А. М., Литошенко А. Я., Квитницкая-Рыжова Т. Ю. и др. Молекулярные и клеточные аспекты радиационного гормезиса у *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика. – 2003. – 37, № 3. – С. 41-48.
3. Ван Лир Э., Стикней К. Гипоксия: Пер. с англ. – М.: Медицина, 1967. – 367 с.
4. Дубина Т. Л., Разумович А. Н. Введение в экспериментальную геронтологию. – Минск: Наука и техника, 1975. – 166 с.
5. Мурадян Х. К. Искусственная атмосфера, омоложение и долголетие // Пробл. старения и долголетия. – 2008. – 17, № 4. – С. 457-477.
6. Холдэн Дж. С., Пристли Дж. Г. Дыхание: Пер. с англ. – М.-Л.: Гос. изд-во биологической и медицинской литературы, 1937. – 463 с.
7. Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных. Приспособление и среда: Пер с англ. – М.: Мир, 1982. – Кн. 1. – 416 с.
8. Arking R., Gironx C. Antioxidant genes, hormesis, and demographic longevity // J. Anti-



- Aging Med.- 2001.- 4.- P. 125-136.
9. Khazaeli A. A., Tatar M., Pletcher S. D., Curtsinger J. W. Heat-induced longevity extension in *Drosophila*. I. Heat treatment, mortality, and thermotolerance // J. Gerontol.- 1997.- 52A.- P. B 48-B 52.
  10. Le Bourg E. Hormetic effects of repeated exposures to cold at young age on longevity, aging and resistance to heat or cold shocks in *Drosophila melanogaster* // Biogerontology.- 2007.- 8.- P. 431-444.
  11. Le Bourg E., Minois N., Bullens P., Baret P. A mild stress due to hypergravity exposure at young age increases longevity in *Drosophila melanogaster* males // Biogerontology.- 2000.- 1.- P. 145-155.
  12. Le Bourg E., Valenti P., Lucchetta P., Payre F. Effects of mild heat shocks at young age on aging and longevity in *Drosophila melanogaster* // Biogerontology.- 2001.- 2.- P. 155-164.
  13. Vaiserman A. M., Koshel N. M., Voitenko V. P. Effect of X-irradiation at larval stage on adult life span in *Drosophila melanogaster* // Biogerontology.- 2004.- 5.- P. 49-54.
  14. Vaiserman A. M., Koshel N. M., Litoshenko A. Y. et al. Effects of X-irradiation in early ontogenesis on the longevity and amount of the S1 nuclease-sensitive DNA sites in adult *Drosophila melanogaster* // Biogerontology.- 2003.- 4.- P. 9-14.
  15. Yashin A. I., Ukraintseva S.V., De Benedictis G. et al. Have the oldest old adults ever been frail in the past? A hypothesis that explains modern trends in survival // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.- 2001.- 56.- P. B432-B442.
  16. Zhou D., Xue J., Chen J. et al. Experimental selection for *Drosophila* survival in extremely low O<sub>2</sub> environment // PLoS ONE.- 2007.- 2, № 5.- P. E490.

Поступила 17.12.2009

## INFLUENCE OF SHORT-TERM OXYGEN DEPRIVATION IN EARLY LIFE ON LONGEVITY OF *Drosophila melanogaster*

V. A. Berezovsky, A. M. Vaiserman\*, I. G. Litovka, E. G. Chaka, P. V. Lahin, N. M.  
Koshel\*, L. V. Mekhova\*, V. P. Voitenko\*

A. A. Bogomolets Institute of Physiology NAS Ukraine, 01024 Kyiv

\*State Institution "D. F. Chebotarev Institute of Gerontology NAMS Ukraine",  
04114 Kyiv

The influence of hypoxic stress of varying duration at early stages of imaginal life on life span of *Drosophila melanogaster* is investigated. A 20-min hypoxia (pO<sub>2</sub> ~ 3 mm of mercury pole in nitrogen) did not influence the mean lifespan (LS) of the male flies. A 30- and 35-min hypoxia has resulted in a significant increase of the mean LS, whereas a 25-, 40- and 45-min hypoxia — in a decrease of mean LS vs. control. No increase of mean LS was observed in females in any of the experimental groups; 25-, 40- and 45-min hypoxia has resulted in a significant decrease of mean LS of females vs. control. Hypoxic stress in all applied regimens promoted a significant increase of maximal LS of males vs. control. The increase of maximal LS was especially marked when hypoxic stress was applied for 20 and 30 min. As regards females, all hypoxia regimens (irrespective of duration) have resulted in a decrease of maximal LS vs. control. Thus, alongside with the expected negative effects (decrease of LS) in males, there were manifestations of LS-related hormesis (paradoxical stimulation) at certain regimens of hypoxia.