

УДК 612.67:57.034

© Коллектив авторов, 2012.

## ЦИРКАДНЫЙ РИТМ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗИСА ПРИ СТАРЕНИИ МЫШЕЙ

**Д.А. Толстун, В.В. Безруков, А.Н. Тимченко, И.Н. Пишель, Х.К. Мурадян***ГУ "Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева" НАМН Украины, лаборатория физиологии человека и животных (зав. – Акад. НАМН Украины В.В. Безруков), г. Киев.*

### CIRCADIAN RHYTHM OF THE METABOLIC HOMEOSTASIS IN AGING MICE

**D.A. Tolstun, V.V. Bezrukov, A.N. Timchenko, I.N. Pishel, Kh.K. Muradian**

#### SUMMARY

Circadian rhythms (CR) are adaptive mechanisms ensuring functional integrity of cellular and homeostatic variables. Round clock rates of O<sub>2</sub> consumption and CO<sub>2</sub> production, respiration quotient, motor activity, food and water consumption were measured in every hour basis in young, middle-aged and old CBA mice. Factorial ANOVA analysis revealed highly significant circadian component in practically all studied variables (P<10<sup>-30</sup>) accompanied by rather strong effects of aging (P<10<sup>-5</sup>) and age-associated changes of CR (P<10<sup>-3</sup>). Significant correlations were found between CR of the metabolic variables and illumination, however, declining with aging apparently due to elevated desynchronized CR in suprachiasmatic nuclei of the aging hypothalamus.

### ЦИРКАДНИЙ РИТМ МЕТАБОЛІЧНОГО ГОМЕОСТАЗИСУ ПРИ СТАРІННІ МИШЕЙ

**Д.О. Толстун, В.В. Безруков, А.М. Тимченко, І.М. Пішель, Х.К. Мурадян**

#### РЕЗЮМЕ

Циркадні ритми (ЦР) є важливими пристосувальними механізмами, що забезпечують координацію функцій різних клітин і гомеостатичних систем організму. У молодих, дорослих і старих мишей лінії СВА з "кроком" у 1 г вивчені ЦР показників, що характеризують швидкість споживання O<sub>2</sub> і продукції CO<sub>2</sub>, дихальний коефіцієнт, споживання їжі та води, режим сну-неспанья, спонтанну рухову активність та ін. За допомогою двофакторного дисперсійного аналізу показано, що для всіх вивчених метаболічних змінних характерний дуже сильний циркадний компонент (P <10<sup>-30</sup>). При цьому достовірність впливу факторів віку (P <10<sup>-5</sup>) і вікових змін ЦР (P <10<sup>-3</sup>) також зберігається на високому рівні. У всіх вікових групах між вивченими показниками і освітленістю виявлена достовірна кореляція. Ступінь такої кореляції знижується при старінні, ймовірно, через десинхронізації ЦР супрагіазматичних ядер гіпоталамуса.

**Ключевые слова: циркадный ритм, старение, мыши, газообмен, потребление пищи и воды.**

Известно, что функциональное состояние и защитные возможности организма зависят не только от потенциальных возможностей отдельных клеток и гомеостатических систем, но и согласованности их действия. В условиях целостного организма задача координированности различных молекулярных и физиологических переменных в определенной степени решается синхронизирующими сигналами, исходящими из супрагизматических ядер (СХЯ) переднего гипоталамуса, которые обусловлены периодичностью освещения поверхности Земли - циркадными ритмами (ЦР). ЦР являются важными приспособительными механизмами, имеющими много общего у разных видов животных, от дрозофилы до человека. Нарушения ЦР, индуцированные генетическими или средовыми факторами, особенно на фоне старения, приводят к развитию разных по этиологии заболеваний, в частности, инсульта и инфаркта, болезней Альцгеймера и Паркинсона, рака и диабета, катаракты и др. На различных фило- и онтогенетических моделях показано, что изменения амплитуды и временных характеристик ЦР сопровождаются повышением частоты патологии и смертности, тогда как восстановление ЦР приводит к

повышению жизнеспособности и продлению жизни [1, 2, 4, 6, 7].

Цель работы – изучить ЦР метаболического гомеостата с помощью анализа суточных изменений скорости газообмена, потребления пищи и воды, спонтанной двигательной активности (СДА) и режима "сна-бодрствования" у мышей разного возраста.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на молодых (3-5 мес), взрослых (12-14 мес) и старых (24-26 мес) самцах мышей линии СВА. ЦР изучали с помощью круглосуточного измерения освещенности и различных неинвазивных показателей через каждый час последовательно в течение шести суток. Уровень газообмена оценивали по скорости потребления кислорода (Vo<sub>2</sub>) и продукции углекислого газа (Vco<sub>2</sub>), а также по величине дыхательного коэффициента (ДК). При каждом взятии проб воздуха фиксировали число спящих и бодрствующих животных для анализа режима "сна-бодрствования" и определяли количество потребленной пищи и воды. СДА определяли как долю активно перемещающихся животных. Освещенность в помещении

контролировали с помощью люксметра и поддерживали в пределах, рекомендуемых GLP. Возрастные отличия ЦР оценивали по анализу суточной динамики, результатов дисперсионного анализа (ANOVA) и корреляции физиологических переменных с освещенностью.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для всех изученных показателей характерен высоко достоверный циркадный компонент. Так, судя по F-критерию двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA с факторами ЦР и возраста), достоверность влияния ЦР на многие порядки превышает общепринятую границу ( $P < 10^{-10}$ ). При этом достоверность влияния “чистого” возрастного фактора или совместного действия факторов ЦР и возраста, который, по существу, оценивает значимость возрастных изменений ЦР, колебалась в широких пределах (от  $P > 0.58$  до  $P < 10^{-8}$ ).

Существенные возрастные отличия были обнаружены при детальном анализе динамики ЦР, что, по крайней мере, отчасти, можно объяснить двумя особенностями постановки наших опытов. Во-первых, в подавляющем большинстве случаев ЦР у лабораторных животных изучаются при искусственном режиме освещения (12:12 часов свет:темнота). Не отрицая преимущества этой модели, следует все же признать, что такой подход может исказить закономерности, установленные в естественных условиях, что, кстати, делает такие результаты менее приемлемыми для их аппроксимации на людей. Отличительной чертой нашей работы является то, что исследования на всех трех возрастных группах были проведены параллельно и в условиях естественного режима освещения. Более того, опыты были проведены в течение специально отобранного периода (19-25 марта), так, чтобы продолжительность светлой и темной части суток практически были равны (12:12). Во-вторых, был подобран комплекс информативных неинвазивных показателей, который позволяет не только избежать “кровопролития”, но и максимально детально изучить динамику ЦР (шагом 1 ч). В этом плане наши исследования выгодно отличались от большинства аналогичных работ, в которых интервал между последовательными измерениями редко бывает меньше 3 ч, что неизбежно приводит к «слиянию» экстремумов и искажению временной функции ЦР.

Анализ ЦР метаболического гомеостата, очевидно, целесообразно начинать с режима “сна-бодрствования”, так как изменения этого, казалось, простого показателя в действительности оказывают существенное влияние на практически все другие переменные. Кроме того, важно то, что при смене режима сна-бодрствования происходят не только количественные сдвиги, но и качественный переход

от процессов израсходования к восстановлению метаболических и энергетических ресурсов.

Из представленных на рис. 1 данных следует, что промежуток между 12-18 часами соответствует периоду минимальной доли бодрствующих животных (до 10%). Примечательно, что даже в течение ночных часов пиковой активности до 30-40 % мышей независимо от возраста продолжают спать. У молодых мышей рост уровня бодрствования соответствует 12-часовому промежутку времени от 6ч вечера до 6 часов утра, что совпадает с периодом темной половины суток. У взрослых и особенно старых животных активный период начинается и завершается на 1-2 ч позже, чем у молодых. Такая замедленная реакция на изменения освещенности, возможно, может объяснить, почему при содержании в полной темноте ЦР старых животных обычно растягивается с 24 ч до 25-26 ч [5]. Обращает на себя внимание то, что в группе молодых мышей видны два пика бодрствования – в 21 ч вечера и 4 ч утра. У взрослых и старых мышей первый пик активности менее выражен и наступает позже, но зато пик в 4 ч несколько выше. После этого момента доля бодрствующих молодых мышей резко снижается. В группах взрослых и старых особей такое снижение происходит медленнее. Более того, в старших возрастных группах до 15-20 % особей продолжают бодрствовать до 12 ч полудня, возможно, из-за хорошо известного феномена “старческой бессонницы” [2, 6]. Судя по результатам двухфакторного дисперсионного анализа, влияние циркадного фактора при этом было высоко достоверным ( $P < 10^{-30}$ ). Влияние факторов возраста ( $P < 10^{-5}$ ) и совместного действия ЦР и возраст ( $P < 10^{-3}$ ) также были достаточно сильными (рис. 1).

Между долей бодрствующих животных и освещенностью была обнаружена высоко достоверная отрицательная корреляция во всех трех группах. Однако при этом наблюдается прогрессивное возрастное снижение степени корреляции ( $r = -0,79$ ,  $P < 10^{-15}$  у молодых;  $r = -0,69$ ,  $P < 10^{-11}$  у взрослых и  $r = -0,63$ ;  $P < 10^{-9}$  у старых мышей). Практически идентичная динамика была обнаружена при анализе ЦР СДА. И для этого показателя характерна двугорбая зависимость с пиками в 20 ч вечера и 4 ч утра, причем первый пик выше у молодых, а второй – у старых мышей (данные не представлены). Итак, при старении наблюдается «запаздывание» ЦР и снижение корреляции с освещенностью, что может быть следствием ослабления реакции и десинхронизации нейронов СХЯ старых особей [3].

Возрастные отличия суточной динамики  $Vo_2$  были во многом идентичны с таковыми, обнаруженными для режима сна-бодрствования или СДА (рис. 2).

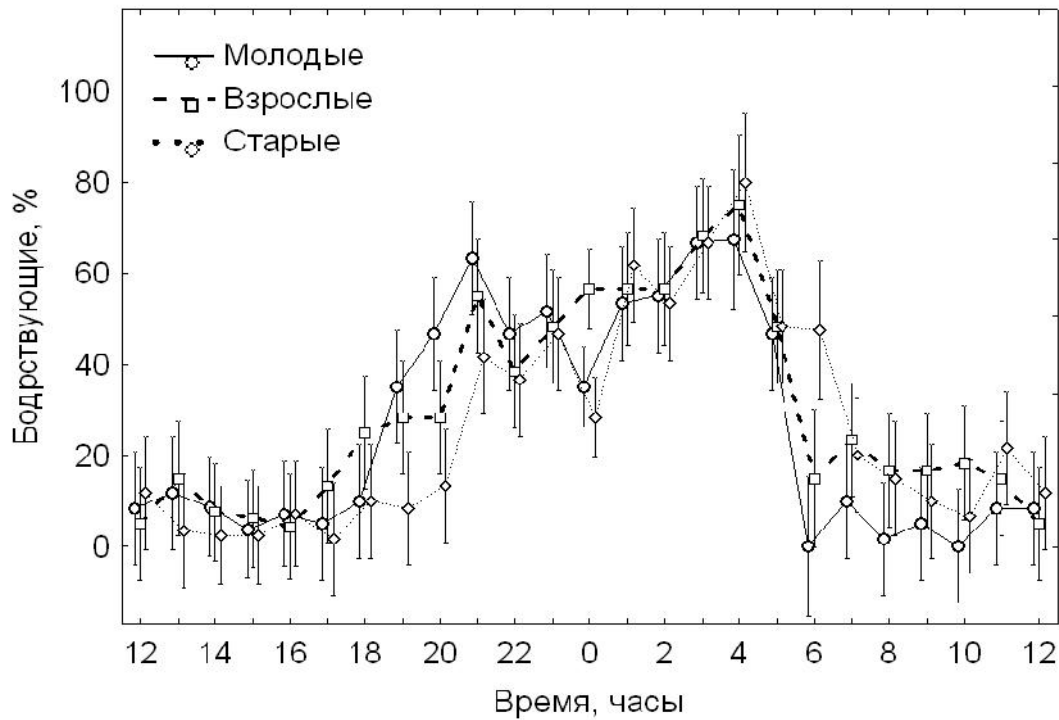


Рис. 1. Циркадный ритм доли (%) бодрствующих молодых, взрослых и старых мышей.

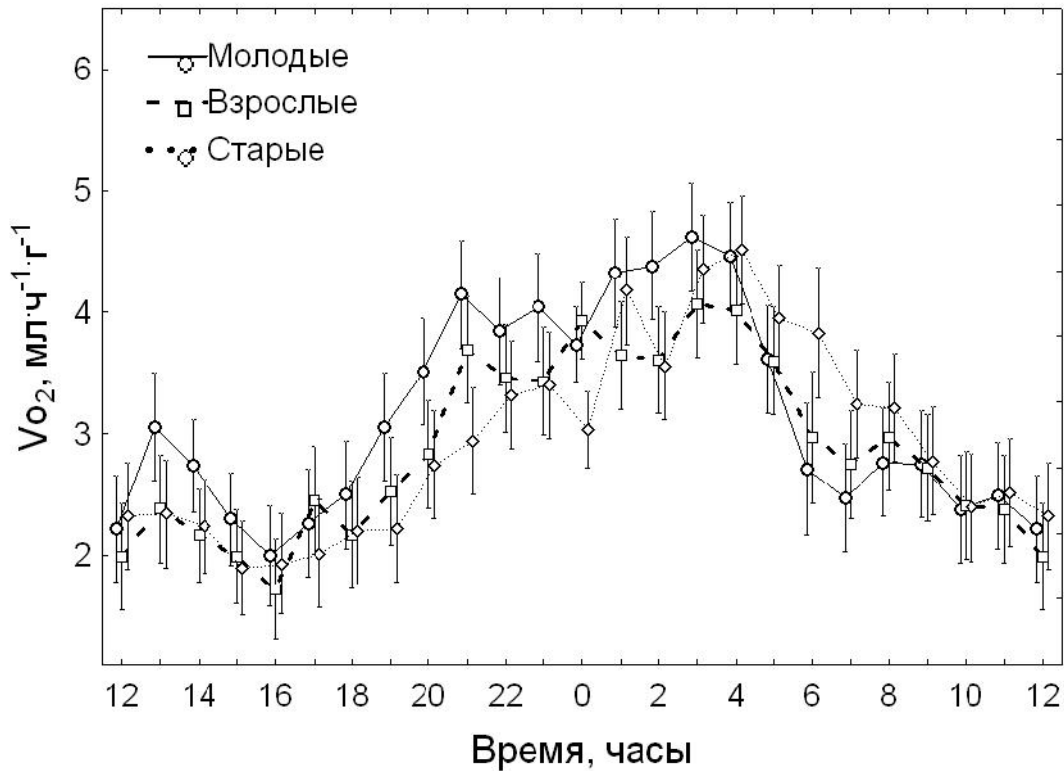


Рис. 2. Циркадный ритм скорости потребления кислорода ( $V_{O_2}$ ) молодых, взрослых и старых мышей.

И здесь наблюдается чрезвычайно сильное влияние циркадного компонента ( $P < 10^{-30}$ ) на фоне сохранного эффекта факторов возраста ( $P < 10^{-5}$ ) и совместного действия возраста и ЦР ( $P < 10^{-3}$ ).

Минимальные уровни газообмена соответствуют периоду от 6 утра до 6 вечера, максимальные - от 21 ч вечера до 4 часов утра. Как и в случае бодрствования, у молодых мышей усиление

газообмена начинается и завершается на 1-2 часа раньше, чем у взрослых и старых особей. Корреляции  $Vo_2$  с освещенностью также прогрессивно снижались в ряду “молодые-взрослые-старые” (соответственно  $r=-0,74$ ;  $P<10^{-14}$ ,  $r=-0,67$ ;  $P<10^{-11}$  и  $r=-0,59$ ;  $P<10^{-6}$ ). Аналогичные закономерности были получены при анализе ЦР  $Vso_2$  (данные не приведены).

Благодаря наличию циркадных механизмов, организм успевает вовремя подготовиться к очередной смене деятельности. Так, во время сна синтезируется большая часть суточной нормы гликогена, как источника легкодоступной глюкозы, которая расходуется во время бодрствования. Как известно, синтезу гликогена предшествует этап

усиленного глюконеогенеза, во время которого из жиров и белков синтезируются углеводы. Поэтому, есть основания полагать, что ДК, который неизбежно снижается при усилении глюконеогенеза, также подвергается циркадным изменениям, но с динамикой, опережающей динамику бодрствования или СДА. Действительно, проведенные исследования показали, что по аналогии с ЦР бодрствования или СДА наблюдаются двухфазные изменения ЦР ДК. Причем, у молодых мышей первый минимум ДК более выражен и регистрируется в 13 ч дня, а второе снижение происходит к 18-19 ч. У взрослых и старых мышей, наоборот, заметнее второе снижение, которое происходит на 1-2 часа позже, чем у молодых (рис. 3).

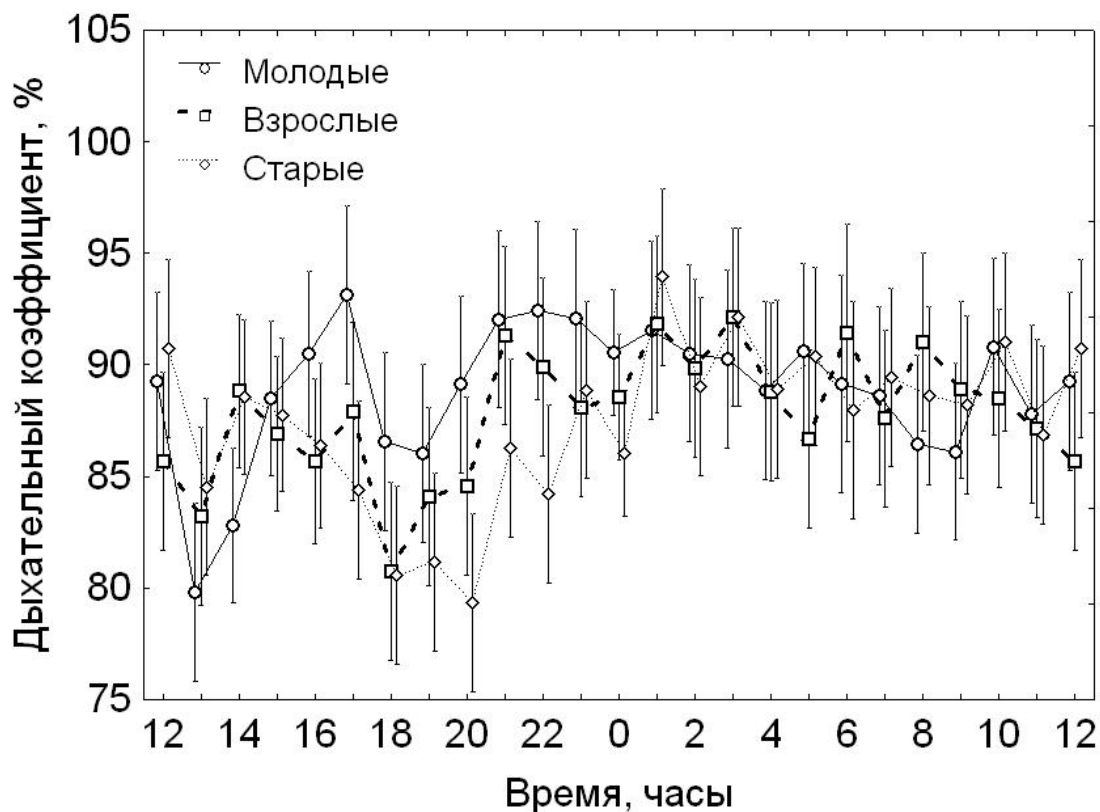


Рис. 3. Циркадный ритм дыхательного коэффициента (%) молодых, взрослых и старых мышей

Следует отметить, что изучение динамики ДК сопряжено с определенными трудностями, прежде всего, потому, что изначально предельные изменения ДК не превышают 25% (от 75% до 100%). Для того, чтобы получить необходимой точности данные ДК, важно жестко следить за точностью определения одновременно  $O_2$  и  $CO_2$ . В наших опытах это обеспечивалось калиброванием соответствующих блоков газоанализатора перед каждым измерением. В итоге оказалось, что примерно за 8 часов до пиков бодрствования или СДА наблюдается снижение ДК, очевидно, благодаря сигналам СХЯ, которые обычно достигают периферийные органы за 3-9 часов до

пика их функциональной активности [1, 5]. При этом изменения ЦР ДК во многом повторили аналогичные характеристики доли бодрствующих особей или СДА, с той лишь разницей, что все происходило на 8 часов раньше. Естественно, прямое вычисление степени коррелятивной связи между ДК и бодрствованием или СДА указывает на отсутствие значимой корреляции, так как эти переменные смещены по фазе. Однако использование метода кросс-корреляции показывает, что при смещении на 8 часов между показателями метаболической активности и ДК обнаруживаются достоверные корреляции, которые существенно не изменяются при старении

(данные не представлены).

#### ВЫВОДЫ

Таким образом, имеющегося в литературе и полученные нами данные позволяют заключить, что ЦР являются важными приспособительными механизмами, координирующими функции отдельных гомеостатических систем и организма в целом, подготавливая базу для перехода между фазами расходования к восстановлению метаболических и защитных ресурсов. Благодаря изучению ЦР при естественном режиме освещенности и частым измерениям переменных (с интервалом 1 час), удалось обнаружить, что у мышей существуют два пика физической и метаболической активности (2-3 часа после наступления темноты и примерно столько же времени до наступления рассвета). Старение сопровождается снижением амплитуды и “запаздыванием” ЦР исследованных метаболических переменных. Сдвиги ДК имеют такую же динамику, как СДА и  $Vo_2$  или  $Vco_2$  с той лишь разницей, что они примерно на 8 опережают изменения физической активности и газообмена. При старении наблюдается снижение корреляции с освещенностью, что указывает на ослабление синхронизирующего эффекта СХЯ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Antoch M., Gorbacheva V., Vykhovanets O., Toshkov I., Kondratov R., Kondratova A., Lee C., Nikitin A. Disruption of the circadian clock due to the Clock mutation has discrete effects on aging and carcinogenesis // *Cell Cycle*. – 2008. – 9. – P. 1197–1204.
2. Froy O. Circadian rhythms, aging, and life span // *Physiol*. – 2011. – 26. – P. 225–235.
3. Farajnia S., Michel S., Deboer T., Vanderleest H., Houben T., Rohling J., Ramkisoensing A., Yassenkov R., Meijer J. Evidence for neuronal desynchrony in the aged suprachiasmatic nucleus clock // *J. Neurosci*. – 2012. – 17. – P. 5891–9.
4. Li H., Satinoff E. Fetal tissue containing suprachiasmatic nucleus restores multiple circadian rhythms in old rats // *Am Physiol Regul Integr Compar Physiol*. – 1998. – 275. – P. 1735–1744.
5. Rakshit K., Krishnan N., Guzik E., Pyza E., Giebultowicz J. Effects of aging on the molecular circadian oscillations in *Drosophila* // *Chronobiol Int*. – 2012. – 1. – P. 5–14.
6. Reddy A., O'Neill J. Healthy clocks, healthy body, healthy mind // *Trends Cell Biol*. – 2010. – 1. – P. 36–44.
7. Wyse C., Coogan N., Selman C., Hazlerigg D., Speakman J. Association between mammalian lifespan and circadian free-running period: the circadian resonance hypothesis revisited // *Biol Lett*. – 2010. – 6. – P. 696–698.