

Н.О. Утко, І.М. Пішель, В.В. Безруков, Х.К. Мурадян

## Швидкість газообміну, терморегуляція та активність антиоксидантних ферментів при старінні мишей лінії C57Bl/6

*На 62 молодих (3–5 міс) і 58 старих (23–26 міс) самцях мишей лінії C57Bl/6 изучены тип распределений и коррелятивные взаимоотношения комплекса показателей, характеризующих функциональное состояние систем газообмена, терморегуляции и антиоксидантной защиты. Показано, что коэффициент вариации существенно отличается для разных показателей, но мало изменяется с возрастом. При старении наблюдается снижение средних значений скорости газообмена ( $V_{O_2}$  и  $V_{CO_2}$ ), температуры тела и коэффициента теплопроводности, что, однако, не сопровождается снижением активности антиоксидантных ферментов печени. Более того, активность каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, которые непосредственно участвуют в регуляции содержания перекиси водорода, возрастает в старости. Коэффициенты корреляции  $V_{O_2}$  и  $V_{CO_2}$ ,  $V_{O_2}$  и температуры тела или  $V_{O_2}$  и pH, а также корреляции активности антиоксидантных ферментов мало изменяются при старении. Однако анализ с помощью трехмерных нелинейных моделей нередко указывает на существенные возрастные изменения взаимоотношений изученных переменных.*

### ВСТУП

Протягом еволюційного розвитку різні види тварин виробили захисні механізми, що дають змогу витримувати широкий діапазон коливань швидкості споживання кисню ( $V_{O_2}$ ), температури тіла та продукції активних форм кисню. Так, при максимальних фізичних навантаженнях  $V_{O_2}$  може збільшуватися на порядок та більше, у той час як деякі види амфібій, риб, черепах, морських і наземних ссавців здатні переносити тривалі періоди істотного зниження температури тіла, споживання кисню та навіть аноксії [11]. Такий широкий діапазон адаптивних можливостей, мабуть, забезпечується завдяки строго координованим змінам метаболізму, теплопродукції та антиоксидантного захисту. Погодженість роботи цих систем, безсумнівно, важлива для всіх видів і на всіх етапах клітинного циклу та може лежати в основі довголіття [4, 9]. Однак дослідження,

присвячені вивченню взаємозв'язків газообміну, температуру тіла й антиоксидантного захисту нечисленні не тільки у віковому, але й загальнобіологічному плані. Практично невивченим залишається популяційний аспект цієї проблеми. Тим часом відомо, що існують значні індивідуальні коливання зазначених показників, з'ясування діапазону мінливості яких може дати багато для розуміння принципів регуляції й стабільності цих систем.

Мета нашої роботи – вивчити особливості розподілів і корелятивних зв'язків між комплексом фізіологічних і біохімічних показників, які характеризують рівень метаболізму, терморегуляцію й антиоксидантний захист у популяціях молодих і старих лабораторних мишей.

### МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 62 молодих (3–5 міс) і 58 старих (23–26 міс) інтактних

© Н.О. Утко, І.М. Пішель, В.В. Безруков, Х.К. Мурадян

самцях мишей лінії C57Bl/6, яких утримували у віварії Інституту геронтології АМН України в окремому блоці та на спеціальних раціонах, передбачених для лінійних мишей. У всіх тварин проводили вимір  $Vo_2$  і  $Vco_2$  за допомогою газоаналізатора (Нідерланди). Температуру тіла вимірювали за допомогою спеціально сконструйованого електричного термометра з напівпровідниковим датчиком, вмонтованим у гнучку тонку (до 1 мм) трубку. Коефіцієнт теплопровідності обчислювали згідно з описаною методикою [6]. Тварин наркотизували за допомогою 100 %  $CO_2$  [8], печінку гомогенізували у фосфатному буфері з 0,1 N ЕДТА (рН 7,6) і центрифугували при 10 000 g протягом 20 хв. Частину печінки гомогенізували в дистильованій воді (1:10) для визначення рН за допомогою рН-метра фірми "Oakton" (США). Активність ферментів визначали за загальновідомими спектрофотометричними методами: супероксиддисмутази (СОД, ЄС 1.15.1.1) – [12]; каталази (ЄС 1.11.1.6) – [5]; глутатіонпероксидази (ГП, ЄС 1.11.1.9) – [14]; глутатіонредуктази (ГР, ЄС 1.6.4.2) – [15]; глутатіонтрансферази (ГТ, ЄС 2.5.1.18) – [10] і ксантиоксидази (КО, ЄС 1.2.3.2) – [16]. Отримані результати обробляли за допомогою пакета програм "Statistica-6." Важливим було з'ясувати тип розподілів показників, що вивчали, і, зокрема, перевірити гіпотезу про їх нормальність. Як відомо, наявність нормального розподілу може свідчити про стохастичну природу факторів, що визначають рівень досліджуваного показника, а також обґрунтувати правомірність застосування параметричних методів статистичної обробки результатів [1].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведений аналіз за допомогою специфічних тестів нормальності Колмогорова–Смирнова, Лілліфорса,  $\chi^2$  і Шапіро–Уїлка

(результати не представлено), а також недостовірні коефіцієнти асиметрії й ексцесу (таблиця) не відхилили гіпотезу про нормальність розподілу більшості показників, що вивчали.

Виходячи з відомих міркувань про гетерохронність вікових порушень регуляторних систем [3], передбачалося, що популяція старих тварин повинна відрізнятися більшою індивідуальною варіабельністю досліджуваних показників. З іншого боку, особини з неприпустимо більшими відхиленнями тих або інших показників можуть бути об'єктом селективного вимірювання й, отже, не дожити до старості. Таким чином, при старінні варіабельність біологічних показників може збільшуватися або зменшуватися залежно від того, яка із зазначених тенденцій буде превалювати. Найбільш простим і зручним критерієм для оцінки такої альтернативи є коефіцієнт варіації, що обчислюється відношенням стандартного відхилення та середніх значень. У результаті виходить свого роду «нормована» за середнім значенням безрозмірна величина варіації, що дає змогу порівняти мінливість перемінних з різною розмірністю. У досліджуваному нами комплексі показників найбільш низькі значення коефіцієнта варіації були знайдені для рН, температури тіла і дихального коефіцієнта, а найвищі – для активності ГП, ГТ і каталази. Інші показники мали коефіцієнт варіації у межах 10–20 %, що характерно для більшості біологічних перемінних [1]. Порівняння варіабельності показників у молодих і старих мишей свідчить, що коефіцієнт варіації мало змінюється з віком. У досліджуваному нами комплексі єдиний випадок достовірного збільшення цього показника відповідає температурі тіла, а єдиний випадок зменшення – активності ГП (див. таблицю).

Слід зазначити, що через високу спонтанну рухову активність, виміряти базальний рівень обміну в більшості видів інтакт-

них тварин і, зокрема, у мишей практично неможливо. У цьому разі можна говорити лише про рівень обміну в стані спокою. Але й у цьому стані фізична активність окремих особин і особливо у тварин різного віку істотно розрізняється. Відомо, що фізична

активність при старінні зменшується [3]. Хоча в цій роботі ми не проводили кількісного виміру спонтанної рухової активності, а під час виміру неінвазивних показників фізична активність у молодих мишей була візуально вище, ніж у старих

**Середні значення (СВ) та коефіцієнти варіації (КВ), асиметрії (КА) і ексцесу, а також їхні стандартні помилки ( $\pm$ S.E.) для комплексу вивчених фізіологічних і біохімічних показників у молодих і старих мишей**

Показник, група тварин	СВ $\pm$ S.E.	КВ $\pm$ S.E.	КА $\pm$ S.E.	КЕ $\pm$ S.E.
Швидкість споживання кисню, мл $\cdot$ хв <sup>-1</sup> $\cdot$ М <sup>-1</sup>				
молоді	80,4 $\pm$ 1,5	14,7 $\pm$ 1,4	0,22 $\pm$ 0,3	0,23 $\pm$ 0,6
старі	68,4 $\pm$ 1,7*	18,2 $\pm$ 1,8	0,25 $\pm$ 0,3	-0,67 $\pm$ 0,7
Швидкість споживання вуглекислого газу, мл $\cdot$ хв <sup>-1</sup> $\cdot$ М <sup>-1</sup>				
молоді	68,6 $\pm$ 1,4	15,4 $\pm$ 1,5	0,19 $\pm$ 0,3	0,66 $\pm$ 0,6
старі	58,8 $\pm$ 1,5*	19,3 $\pm$ 1,9	0,52 $\pm$ 0,3	-0,23 $\pm$ 0,6
Дихальний коефіцієнт				
молоді	0,85 $\pm$ 0,01	4,1 $\pm$ 0,4	0,20 $\pm$ 0,31	-0,65 $\pm$ 0,61
старі	0,86 $\pm$ 0,01	3,3 $\pm$ 0,3	0,17 $\pm$ 0,32	0,16 $\pm$ 0,63
Температура тіла, °С				
молоді	37,9 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	-0,67 $\pm$ 0,31	-0,72 $\pm$ 0,61
старі	37,1 $\pm$ 0,1*	3,3 $\pm$ 0,3*	-0,32 $\pm$ 0,32	-0,63 $\pm$ 0,63
Коефіцієнт теплопровідності, кДж $\cdot$ г <sup>-1</sup> $\cdot$ хв <sup>-1</sup> $\cdot$ °С <sup>-1</sup>				
молоді	5,86 $\pm$ 0,10	13,7 $\pm$ 1,3	-0,11 $\pm$ 0,31	0,75 $\pm$ 0,61
старі	5,22 $\pm$ 0,11*	16,3 $\pm$ 1,6	0,28 $\pm$ 0,32	-0,34 $\pm$ 0,63
РН печінки				
молоді	6,67 $\pm$ 0,02	1,9 $\pm$ 0,2	-0,17 $\pm$ 0,38	-0,66 $\pm$ 0,74
старі	6,71 $\pm$ 0,02	1,6 $\pm$ 0,2	0,75 $\pm$ 0,38*	0,34 $\pm$ 0,74
Супероксиддисмутаза, од $\cdot$ хв <sup>-1</sup> $\cdot$ МГ <sup>-1</sup>				
молоді	38,2 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 0,7	0,40 $\pm$ 0,3	0,19 $\pm$ 0,6
старі	37,2 $\pm$ 0,3	9,1 $\pm$ 0,9	-0,49 $\pm$ 0,3	1,84 $\pm$ 0,6*
Каталаза, мкмоль $\cdot$ хв <sup>-1</sup> $\cdot$ МГ <sup>-1</sup>				
молоді	88,8 $\pm$ 2,2	19,3 $\pm$ 1,8	0,43 $\pm$ 0,3	0,30 $\pm$ 0,6
старі	97,3 $\pm$ 2,9*	22,5 $\pm$ 2,2	0,34 $\pm$ 0,3	-0,10 $\pm$ 0,6
Глутатіонпероксидаза, мкмоль $\cdot$ хв <sup>-1</sup> $\cdot$ МГ <sup>-1</sup>				
молоді	22,4 $\pm$ 1,5	51,1 $\pm$ 5,7	0,92 $\pm$ 0,30	0,12 $\pm$ 0,6
старі	29,3 $\pm$ 1,3*	33,3 $\pm$ 3,4*	0,31 $\pm$ 0,3*	0,03 $\pm$ 0,6
Глутатіонредуктаза, нмоль $\cdot$ хв <sup>-1</sup> $\cdot$ МГ <sup>-1</sup>				
молоді	35,7 $\pm$ 0,5	10,8 $\pm$ 1,0	-0,01 $\pm$ 0,3	-0,25 $\pm$ 0,6
старі	38,5 $\pm$ 0,5*	9,7 $\pm$ 0,9	-0,02 $\pm$ 0,3	0,67 $\pm$ 0,6
Глутатіонтрансфераза, нмоль $\cdot$ хв <sup>-1</sup> $\cdot$ МГ <sup>-1</sup>				
молоді	507 $\pm$ 18	28,7 $\pm$ 2,8	0,57 $\pm$ 0,3	0,57 $\pm$ 0,6
старі	532 $\pm$ 21	29,5 $\pm$ 3,0	-0,47 $\pm$ 0,3	-0,02 $\pm$ 0,6
Ксантиноксидаза, нмоль $\cdot$ хв <sup>-1</sup> $\cdot$ МГ <sup>-1</sup>				
молоді	13,2 $\pm$ 0,2	12,8 $\pm$ 1,2	0,98 $\pm$ 0,3	1,04 $\pm$ 0,6
старі	12,6 $\pm$ 0,3	14,9 $\pm$ 1,4	0,88 $\pm$ 0,3	1,33 $\pm$ 0,6

\*P<0,05 порівняно з молодими тваринами.

тварин. Як видно, саме ослабленням спонтанної рухової активності можна пояснити вікове зниження газообміну та коефіцієнта теплопровідності у старих тварин (див. таблицю).

Деякою мірою низька рухова активність може бути причиною також зниження температури тіла у старих мишей, хоча при цьому не можна недооцінювати вікове ослаблення термогенезу, зумовлене зниженням експресії та функції мітохондріальних білків-роз'єднувачів, зокрема UCP-1 та UCP-2 [7, 8, 13]. Слід зазначити, що старіння мишей супроводжується не лише зниженням середньої температури тіла, але й зміною типу розподілу. Якщо в популяції молодих мишей більша частина особин має температуру тіла у межах 38,0–38,5 °C, а мінімальна за популяцією температура тіла була вище ніж 36,5 °C, то в групі старих мишей з'являється досить значна за розміром субпопуляція (майже третина особин), температура тіла яких нижча від 36,5 °C (рис. 1).

При старінні середні значення  $Vo_2$  і  $Vco_2$  знижуються (див. таблицю). Однак жорстка пропорційність між цими показниками зберігається до старості, про що свідчать високі позитивні коефіцієнти кореляції  $Vo_2$  і  $Vco_2$  в обох вікових групах ( $r=0,95$ ;  $P<0,00000001$ ). Між  $Vo_2$  і температурою тіла також було виявлено позитивну кореля-

цію як у молодих ( $r=0,34$ ;  $P=0,01$ ), так і у старих мишей ( $r=0,56$ ;  $P=0,00001$ ). У цілому, ці результати збігаються з отриманими нами раніше даними у дослідях на самицях мишей лінії СВА [2].

Індивідуальними розбіжностями моторної активності, ймовірно, можна пояснити також негативну кореляцію між  $Vo_2$  і рН печінки у молодих ( $r= - 0,33$ ;  $P<0,05$ ) і старих мишей ( $r= - 0,34$ ;  $P<0,05$ ). Як відомо, підвищення моторної активності призводить до накопичення проміжних продуктів окиснення кислої природи з наступним зниженням рН організму [3, 9].

Багатомірні моделі мають більшу "чутливість" і дають змогу виявити закономірності, які неможливо побачити за допомогою більш простих, наприклад двомірних, методів. Тривимірний нелінійний аналіз залежності коефіцієнта теплопровідності від температури тіла і  $Vo_2$  показав, що у молодих мишей спостерігається мінімальне значення коефіцієнта теплопровідності при температурі тіла і  $Vo_2$ , які близькі до середніх. В обидва боки від таких, очевидно, оптимальних значень температури тіла і  $Vo_2$  коефіцієнт теплопровідності підвищується. У старих мишей такого мінімального значення коефіцієнта теплопровідності не виявлено (рис. 2).

На тлі зниження газообміну, активність антиоксидантних ферментів печінки старих

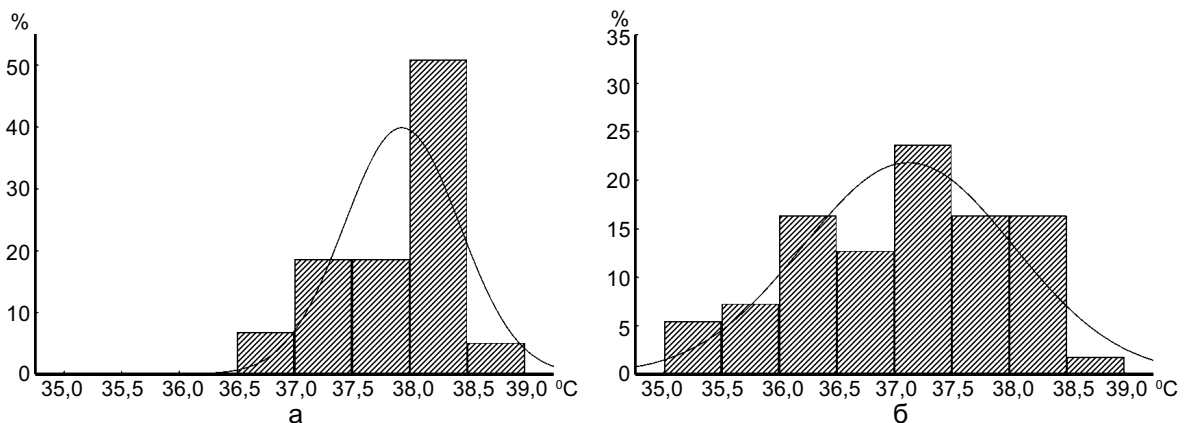


Рис. 1. Частота (%) і лінії нормального розподілу температури тіла (°C) молодих (а) і старих (б) самців мишей лінії C57Bl/6

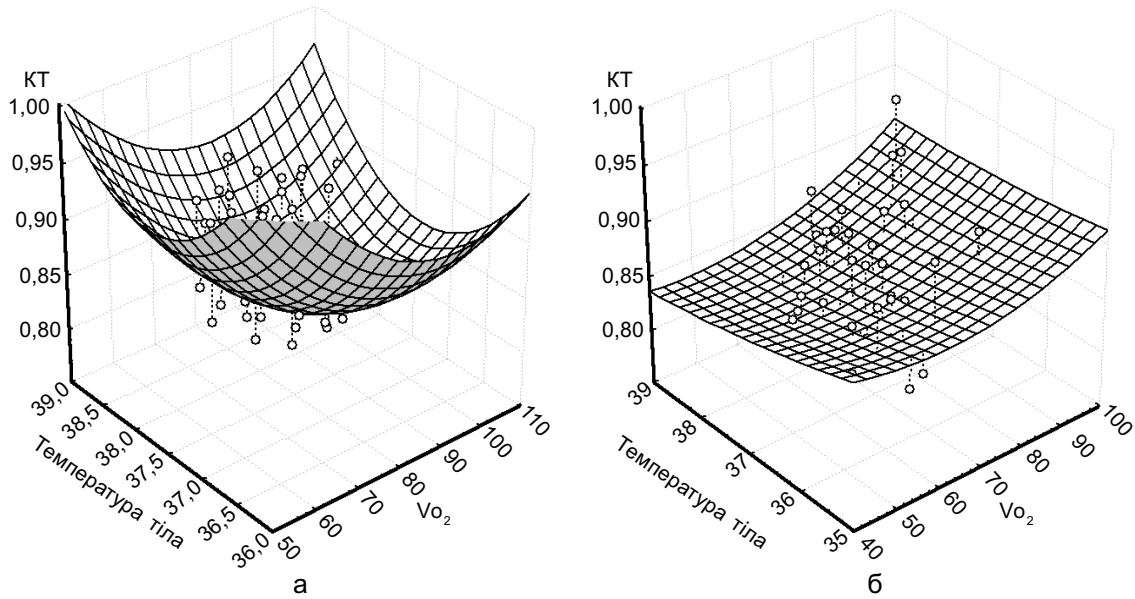


Рис. 2. Тривимірна залежність коефіцієнта теплопровідності (КТ, кДж·г<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>·°С<sup>-1</sup>) від температури тіла (°С) і швидкості споживання кисню (Vo<sub>2</sub>, л·кг<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>) у молодих (а) і старих (б) самців мишей лінії С57В1/6

мишей зберігається на стабільному рівні або навіть підвищується (див. таблицю). Слід зазначити, що посилюється активність тільки каталази, ГП і ГР, тобто трьох ферментів, які безпосередньо беруть участь у регуляції вмісту перекису водню. Підвищення активності цих ферментів може бути наслідком необхідності знизити вміст перекису або бути адаптивною відповіддю на можливе підвищення утворення та витоку активних форм кисню із мітохондрій старих клітин [7, 8, 11].

Для ефективного функціонування анти-оксидантного захисту, мабуть, важливі не лише середні значення активності ферментів, але й погодженість їх змін, що можна оцінити, наприклад за допомогою корелятивного аналізу. При такому аналізі слід відмітити, що між активністю каталази та ГП існує негативна корелятивна залежність в обох вікових групах, що, ймовірно, є відбиттям існування реципрокних взаємин цих двох, по суті «паралельних» каналів утилізації перекису водню (рис. 3).

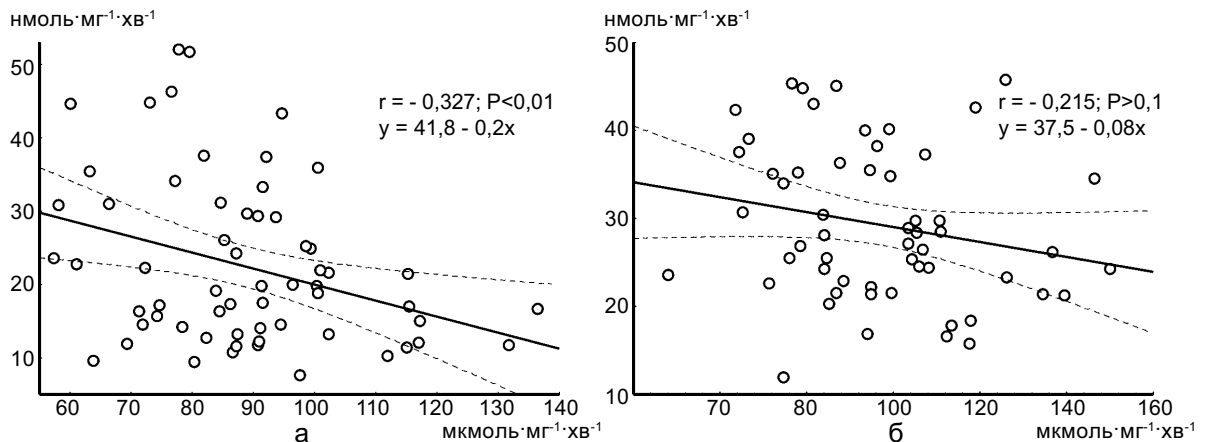


Рис. 3. Діаграми розсіювання, лінії регресії та коефіцієнти кореляції (r) між активністю каталази (вісь абсцис) та глутатіонпероксидази (вісь ординат) печінки молодих (а) і старих (б) самців мишей лінії С57В1/6

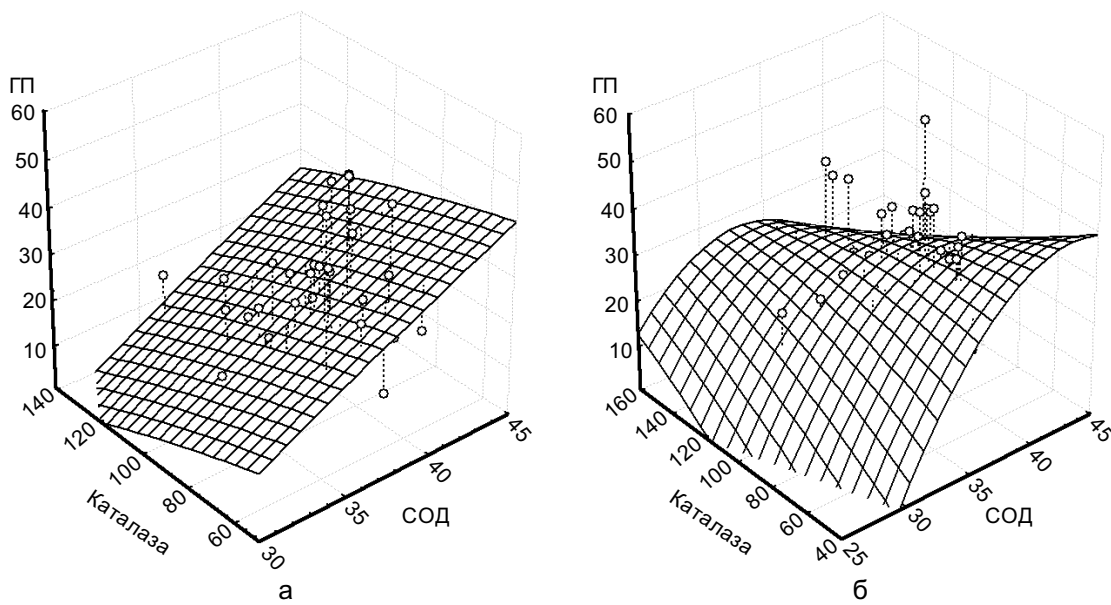


Рис. 4. Тривимірний залежності активності супероксиддисмутази (СОД, од. · хв<sup>-1</sup> · мг<sup>-1</sup>) від каталази (мкмоль · хв<sup>-1</sup> · мг<sup>-1</sup>) і глутатіонпероксидази (ГП, нмоль · хв<sup>-1</sup> · мг<sup>-1</sup>) печінки молодих (а) і старих (б) самців мишей лінії С57В1/6

Тривимірний квадратичний аналіз залежності між активністю трьох ключових ферментів антиоксидантного захисту – СОД, каталази та ГП печінки мишей різного віку показав, що в молодих мишей залежність ГП від СОД і каталази описується майже плоскою поверхнею, з якої видно, що активність ГП позитивно корелює з СОД ( $r=0,31$ ;  $P<0,05$ ), але негативно з каталазою. У старих тварин залежність між цими ферментами антиоксидантного захисту складніша й погано вкладається в рамки використаної множинної регресії (рис. 4).

Таким чином, при старінні самців мишей лінії С57В1/6 на тлі відносно стабільного коефіцієнта варіації спостерігається зниження показників, що характеризують швидкість газообміну ( $V_{O_2}$  і  $V_{CO_2}$ ) і терморегуляцію організму (температура тіла та коефіцієнт теплопровідності). Однак ослаблення інтенсивності окисних процесів і терморегуляції не супроводжується зниженням активності ключових антиоксидантних ферментів печінки. Більше того, активність каталази, ГП і ГР підвищується у старості.

N.A. Utko, I.N.Pishel, V.V. Bezrukov, Kh.K. Muradian

#### THE GASEOUS EXCHANGE, THERMOREGULATION AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES IN AGING C57BL/6 MICE

The distribution type and correlative links between physiological and biochemical indices characterizing functional condition of the systems of gaseous exchange ( $V_{O_2}$  and  $V_{CO_2}$ ), thermoregulation (body temperature and coefficient of thermoconductivity) and antioxidant defense have been studied in 62 young (3-5 mo.) and 58 old (23-26 mo.) male C57Bl/6 mice. The coefficients of variation differed significantly depending on the variable but not the age-group. Mean values of  $V_{O_2}$  and  $V_{CO_2}$ , body temperature and thermoconductivity, but not activities of the antioxidant enzymes, declined in aging. Moreover, the activities of catalase, glutathione-peroxidase and glutathionereductase, i.e. enzymes involved in regulation of hydrogen peroxide level, increased in aging. The correlations between  $V_{O_2}$  and  $V_{CO_2}$ ,  $V_{O_2}$  and body temperature or  $V_{O_2}$  and the liver pH, as well as between the antioxidant enzyme activities exhibited little age-changes. However, three-dimensional non-linear models revealed significant age-changes in relations between the studied variables.

*Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Боровиков В. STATISTICA. Искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов. – СПб:

- Питер, 2003. – 688 с
2. Мурадян Х.К., Утко Н.А., Мозжухіна Т.Г. та ін. Кореляційна залежність між газообміном, температурою тіла та вмістом мітохондріального білка печінки мишей // Фізіол. журн. – 2002. – **48**, № 4. – С. 14–18.
  3. Фролькіс В.В. Регулирование, приспособление и старение. – Л.: Наука, 1970. – 432 с.
  4. Фролькіс В.В., Мурадян Х.К. Старение, эволюция и продление жизни. – К.: Наук. думка, 1992. – 238 с.
  5. Aebi H. Catalase in vitro // Meth. Enzymol. – 1984. – **105**. – P. 121–126.
  6. Balmagiya T., Rozovsky S.J. Age-related changes in thermoregulation in male albino rats // Exp. Gerontol. – 1983. – **18**, №3. – P.199–210.
  7. Brand M.D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing // Exp. Gerontol. – 2000. – **35**, № 6–7. – P. 811–820.
  8. Brand M.D., Esteves T.C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3 // Cell Metab. – 2005. – **2**, № 2. – P. 85–93.
  9. Frolkis V.V., Muradian Kh.K. Life span prolongation // Boca Raton: CRC Press, 1991. – 425 p.
  10. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W. Glutathione S-transferases // J. Biol. Chem. – 1974. – **249**, № 22. – P. 7130–7139.
  11. Hermes-Lima M., Zenteno-Savin T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress // Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. – 2002. – **133**, №4. – P. 537–556.
  12. McCord J.M., Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein) // J. Biol. Chem. – 1969. – **244**, № 22. – P. 6049–6055.
  13. Nubel T., Ricquier D. Respiration under control of uncoupling proteins: Clinical perspective // Horm. Res. – 2006. – **65**, № 6. – P. 300–310.
  14. Paglia D.E., Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase // J. Clin. Med. – 1967. – **70**. – P. 158–169.
  15. Roos D., Weening R.S., Voetman A.A. et al. Protection of phagocytic leukocytes by endogenous glutathione: Studies in family with glutathione reductase deficiency // Blood. – 1979. – **53**. – P.851–866.
  16. Waud W.R., Rajagopalan K.V. Purification and properties of the NAD<sup>+</sup>-dependent (type D) and O<sup>-</sup>-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase // Arch. Biochem. and Biophys. – 1976. – **172**, № 2. – P. 354–364.

*Ин-т геронтології АМН України*  
*E-mail: kkt@geront.kiev.ua*