

УДК 616.36:57.034:577.12

К. О. Калько¹, С. М. Дроговоз¹, Т. К. Юдкевич², Н. В. Бездітко¹¹Національний фармацевтичний університет²Центральна науково-дослідна лабораторія НФаУ

ОСОБЛИВОСТІ ЦИРКАДІАННОЇ ДИНАМІКИ ОБМІННИХ ТА ЖОВЧОСЕКРЕТОРНИХ ПРОЦЕСІВ У ЩУРІВ

Метою даної роботи було встановлення циркадіанної динаміки обмінних та синтетичних процесів у самиць та самців щурів. Для реалізації даної мети проведені відповідні хронофармакологічні дослідження із забором крові у дослідних щурів у наступні години доби: 03.00, 09.00, 15.00 та 21.00. У результаті проведених досліджень встановлена наявність циркадіанних коливань рівня загального білка, альбуміну, холестеролу, загального білірубину і активності ЛФ при відсутності виразних циркадіанних змін вмісту сечовини та сечової кислоти. Суттєвих статевих відмінностей між щурами-самицями та щурами-самцями не виявлено. Отримані результати циркадіанної організації обмінних та синтетичних процесів у щурів слід враховувати при аналізі хронопортрету гепатопротекторів та інших препаратів.

Ключові слова: печінка; циркадіанний ритм; обмін речовин

ВСТУП

Дослідження організації циркадіанних ритмів – актуальне питання хронобіології, хрономедицини та хронофармакології, базова роль серед периферичних осциляторів яких відводиться печінці. В даному органі створюється загальний обмінний пул для метаболізму білків, жирів і вуглеводів [10, 11].

Метою даної роботи було встановлення циркадіанної динаміки обмінних та синтетичних процесів у самиць та самців щурів, оскільки ці дані є важливими при аналізі виразності циркадіанної ефективності гепатопротекторів в експерименті.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В експерименті використано 32 самиці щурів та 32 самці щурів по 8 тварин у кожній з циркадіанних груп. У фіксовані години доби: 03.00; 09.00; 15.00; 21.00 тварин декапітували та проводили забір крові з наступним отриманням сироватки крові. В сироватці крові визначали: вміст загального білка, альбуміну, холестеролу, сечовини, сечової кислоти, загального білірубину та активність лужної фосфатази (ЛФ) [2, 3].

Отримані результати опрацювали за допомогою програми Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP та пакету статистичних програм «Statistica 8,0». Використовували непараметричний критерій Манна-Уїтні. При порівнянні статистичних показників був прийнятий рівень значущості $p < 0,05$ [6]. Аналіз хронограм включав визначення: акрофази (часу доби, коли реєстру-

ється максимальне значення досліджуваного показника); батифази (часу доби, коли реєструється мінімальне значення досліджуваного показника). Мезор (середнє значення досліджуваного показника протягом доби) та амплітуду (найбільше відхилення в два боки від мезору) вираховували за допомогою програми Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP [4, 8].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В якості показників білкового обміну нами було досліджено рівень загального білка, альбуміну, сечовини як основного продукту метаболізму білків та сечової кислоти [1].

Аналіз отриманих результатів свідчить, що коливання вмісту загального білка характеризується несуттєвою циркадіанною динамікою. Акрофаза даного показника у тварин двох статей синфазна – 03.00 із вмістом загального білка $80,22 \pm 4,05$ г/л – самиці та $84,79 \pm 5,83$ г/л – самці; батифаза інвертована у часі акрофази та спостерігається о 15.00 – вміст показника: $71,06 \pm 4,16$ г/л – самиці та $68,37 \pm 1,73$ г/л – самці. Як видно з аналізу, вміст загального білка у самців в акрофазу достовірно вищий за такий в батифазу на 25 % (табл. 1). Мезор показника практично однаковий у тварин двох статей: $74,98 \pm 2,07$ г/л – самиці та $77,36 \pm 2,08$ г/л – самці з амплітудою ритму $4,64 \pm 1,48$ г/л та $9,12 \pm 2,07$ г/л відповідно (табл. 2).

Аналогічно вмісту загального білка протягом доби рівень альбуміну також характеризується не суттєвою виразною циркадіанною динамікою. Акрофаза у тварин двох статей спостерігається о 21.00 із вмістом альбуміну $45,17 \pm 3,48$ г/л – самиці та $47,56 \pm 4,02$ г/л –

самці, тоді як батифаза о 09.00 з величиною показника $37,31 \pm 1,18$ г/л та $38,03 \pm 1,59$ г/л відповідно (табл. 1). Амплітуда ритму альбуміну $3,94 \pm 1,48$ г/л – самиці та $4,98 \pm 1,21$ г/л – самці з мезором, що знаходиться практично на одному рівні у тварин двох статей – $41,65 \pm 1,22$ г/л – самиці та $41,59 \pm 1,80$ г/л – самці (табл. 2). Також слід зазначити, що у самиць вміст альбуміну о 15.00 та о 21.00 достовірно вищий за такий в батифазу на 11 % та 12 % відповідно.

На відміну від рівня загального білка та альбуміну, для яких циркадіанний ритм невиразний, спостерігається, що для вмісту сечовини практично відсутня циркадіанна ритміка. Акрофаза у тварин двох статей реєструється о 03.00 з вмістом сечовини $13,61 \pm 1,53$ ммоль/л – самиці та $11,02 \pm 1,46$ ммоль/л – самці, тоді як батифаза о 15.00 у самиць складає $11,51 \pm 1,12$ ммоль/л та о 09.00 у самців – $9,19 \pm 0,54$ ммоль/л (табл. 3). Мезор ритму сечовини – $12,41 \pm 0,55$ ммоль/л для самиць та $10,20 \pm 0,62$ ммоль/л – для самців з амплітудою $1,06 \pm 0,34$ ммоль/л та $0,6 \pm 0,72$ ммоль/л відповідно (табл. 4). Отже, наведений аналіз додатково підтверджує відсутність циркадіанної динаміки коливання вмісту сечовини в сироватці крові щурів.

До показників білкового обміну відносять сечову кислоту, яка є продуктом розпаду пуринових основ. Акрофаза вмісту сечової кислоти у самиць о 09.00 складає $14,24 \pm 1,37$ мкмоль/л з батифазою о 15.00 $12,44 \pm 0,83$ мкмоль/л; акрофаза у самців – 03.00 – $14,29 \pm 1,37$ мкмоль/л з батифазою о 21.00 – $10,89 \pm 0,88$ мкмоль/л (табл. 1). Відсутність чітко вираженого циркадіанного ритму вмісту сечової кислоти підтверджується величиною амплітуди: $0,69 \pm 0,33$ мкмоль/л для самиць та $1,71 \pm 0,74$ мкмоль/л для самців при мезорі ритму $13,23 \pm 0,62$ мкмоль/л та $12,09 \pm 0,80$ мкмоль/л відповідно (табл. 2).

Таким чином, аналіз отриманих результатів циркадіанного стану білкового обміну за вмістом загального білка, альбуміну, сечовини та сечової кислоти в сироватці крові самиць та самців свідчить, що о 03.00 спостерігається акрофаза вмісту загального білка та середні величини рівня альбуміну, тоді як вміст загального білка о 15.00, а альбуміну о 09.00 – мінімальний у тварин обох статей. Для вмісту сечовини та сечової кислоти чітко виразної циркадіанної ритміки не встановлено. Загальновідомі дані щодо ключової ролі печінки в процесах обміну білків, та встановлена батифаза вмісту загального білка о 15.00 дозволяє зробити припущення відносно інтенсифікації саме процесів розпаду білків в організмі в даний період часу.

Аналіз вмісту холестеролу має велике практичне значення, оскільки даний показник є не лише характеристикою стану ліпідного обміну, а і процесів жовчовиведення, тому що постійний рівень холестеролу підтримується в результаті синтезу, катаболізму та виведення його надлишкової кількості з жовччю в кишечник [8]. Акрофаза у щурів двох статей синфазна та спостерігається о 15.00 – $1,89 \pm 0,06$ ммоль/л

Таблиця 1

ЦИРКАДІАННА ДИНАМІКА БІЛКОВОГО ОБМІНУ У ЩУРІВ (n=64)

Година доби Показник	Самиці	Аналіз даних	Самці	Аналіз даних
Загальний білок, г/л				
03.00	$80,22 \pm 4,05$	++++	$84,79 \pm 5,83$	++++
09.00	$75,06 \pm 2,05$		$74,15 \pm 3,72$	
15.00	$71,06 \pm 4,16$	+	$68,37 \pm 1,73^*$	+
21.00	$73,60 \pm 2,44$		$82,12 \pm 3,67$	
Альбумін, г/л				
03.00	$41,85 \pm 1,52$		$41,85 \pm 1,30$	
09.00	$37,31 \pm 1,18$	+	$38,03 \pm 1,59$	+
15.00	$42,26 \pm 0,91^{**}$		$38,91 \pm 3,46$	
21.00	$45,17 \pm 3,48^{**}$	++++	$47,56 \pm 4,02$	++++
Сечовина, ммоль/л				
03.00	$13,61 \pm 1,53$	++++	$11,02 \pm 1,46$	++++
09.00	$12,10 \pm 1,03$		$9,19 \pm 0,54$	+
15.00	$11,51 \pm 1,12$	+	$10,37 \pm 0,65$	
21.00	$12,43 \pm 1,12$		$10,20 \pm 0,97$	
Сечова кислота, мкмоль/л				
03.00	$13,16 \pm 1,01$		$10,89 \pm 0,89$	++++
09.00	$14,24 \pm 1,37$	++++	$11,74 \pm 1,05$	
15.00	$12,44 \pm 0,83$	+	$14,29 \pm 1,37$	
21.00	$13,07 \pm 0,73$		$11,44 \pm 1,21$	+

Примітки: ++++ – акрофаза досліджуваного показника; + – батифаза досліджуваного показника; * – відхилення показника в групі однієї статі тварин достовірно значущі ($p < 0,05$) відносно акрофази показника; ** – відхилення показника в групі однієї статі тварин достовірно значущі ($p < 0,05$) відносно батифази показника.

Таблиця 2

ХРОНОБІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПОКАЗНИКІВ БІЛКОВОГО ТА ЛІПІДНОГО ОБМІНІВ (ЦИРКАДІАННИЙ РИТМ) ЗА ПРОГРАМОЮ COSINOR-ANALISIS 2.4 FOR EXCEL 2000/XP

Показники		Мезор	Амплітуда
Загальний білок, г/л	самиці	$74,98 \pm 2,07$	$4,64 \pm 1,48$
	самці	$77,36 \pm 2,08$	$9,12 \pm 2,07$
Альбумін, г/л	самиці	$41,65 \pm 1,22$	$3,94 \pm 1,48$
	самці	$41,59 \pm 1,80$	$4,98 \pm 1,21$
Сечовина, ммоль/л	самиці	$12,41 \pm 0,55$	$1,06 \pm 0,34$
	самці	$10,20 \pm 0,62$	$0,6 \pm 0,72$
Сечова кислота, мкмоль/л	самиці	$13,23 \pm 0,62$	$0,69 \pm 0,33$
	самці	$12,09 \pm 0,80$	$1,71 \pm 0,74$

для самиць та $2,04 \pm 0,04$ ммоль/л для самців з батифазою о 03.00 – $1,60 \pm 0,11$ ммоль/л та $1,59 \pm 0,12$ ммоль/л відповідно; амплітуда ритму – $0,14 \pm 0,06$ ммоль/л для самиць та $0,24 \pm 0,08$ ммоль/л для самців при мезорі показника $1,71 \pm 0,05$ ммоль/л та $1,75 \pm 0,07$ ммоль/л відповідно (табл. 3, 4). Слід зазначити, що у самців вміст холестеролу в акрофазу достовірно вищий за такий в батифазу в 1,3 рази.

Таблиця 3

**ЦИРКАДІАННА ДИНАМІКА ПОКАЗНИКІВ
СИНТЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ ПЕЧІНКИ У ЩУРІВ
(n=64)**

Година доби Показник	Самиці	Аналіз даних	Самці	Аналіз даних
Холестерол, ммоль/л				
03.00	1,60 ± 0,11		1,59 ± 0,12*	
09.00	1,70 ± 0,06		1,75 ± 0,07*	
15.00	1,89 ± 0,06	++++	2,04 ± 0,04	++++
21.00	1,66 ± 0,13	+	1,60 ± 0,11*	+
Загальний білірубін, ммоль/л				
03.00	9,01 ± 0,39	+	9,85 ± 0,61	+
09.00	12,46 ± 0,97**		13,03 ± 1,16	
15.00	17,82 ± 1,16**	++++	16,28 ± 1,88**	++++
21.00	12,12 ± 0,98**		10,34 ± 0,84	
ЛФ, Од/л				
03.00	105,97 ± 11,04	+	117,23 ± 20,04	+
09.00	140,07 ± 14,74		149,28 ± 11,76	
15.00	219,27 ± 38,30	++++	179,60 ± 23,79	++++
21.00	140,07 ± 21,27		143,63 ± 17,10	

Примітки: ++++ – акрофаза досліджуваного показника;
+ – батифаза досліджуваного показника; * – відхилення показника в групі однієї статі тварин достовірно значущі (p < 0,05) відносно акрофази показника; ** – відхилення показника в групі однієї статі тварин достовірно значущі (p < 0,05) відносно батифази показника.

Таблиця 4

**ХРОНОБІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА
ПОКАЗНИКІВ СИНТЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ
(ЦИРКАДІАННИЙ РИТМ) ЗА ПРОГРАМОЮ
COSINOR-ANALYSIS 2.4 FOR EXCEL 2000/XP**

Показники		Мезор	Амплітуда
Холестерол, ммоль/л	самиці	1,71 ± 0,05	0,14 ± 0,06
	самці	1,75 ± 0,07	0,24 ± 0,08
Загальний білірубін, ммоль/л	самиці	12,85 ± 0,39	4,41 ± 0,51
	самці	12,38 ± 0,87	3,49 ± 0,72
ЛФ, Од/л	самиці	151,34 ± 3,14	56,65 ± 16,40
	самці	147,44 ± 11,64	31,32 ± 8,97

Встановлена нами акрофаза вмісту холестеролу сироватки крові о 15.00 у тварин обох статей може бути обумовлена затримкою виділення холестеролу жовчю в цей період, що призводить до компенсаторного зростання показника в сироватці крові та відтворює циркадіанний стан жовчосекреторної та жовчовидільної функції на даний момент часу.

Показник, що характеризує жовчосекреторні властивості печінки – прямий та непрямий білірубін, які разом складають фракцію загального білірубину [1]. Акрофаза вмісту загального білірубину сироватки крові

о 15.00 – 17,82 ± 1,16 ммоль/л для самиць та 16,28 ± 1,88 ммоль/л для самців, батифаза о 03.00 – 9,01 ± 0,39 ммоль/л та 9,85 ± 0,61 ммоль/л відповідно (табл. 3). Слід зазначити, що величина даного показника у самиць та самців в акрофази достовірно вища за такий в батифази в 2,0 та 1,6 рази відповідно, що підтверджується суттєвою амплітудою ритму 4,41 ± 0,51 ммоль/л для самиць та 3,49 ± 0,72 ммоль/л для самців. Мезор даного показника знаходиться практично на одному рівні в тварин двох статей: 12,85 ± 0,39 ммоль/л для самиць та 12,38 ± 0,87 ммоль/л для самців (табл. 4).

Суттєві циркадіанні коливання вмісту загального білірубину у самиць та самців щурів з акрофазою о 15.00, що корелює з циркадіанною батифазою вмісту загального білка в тварин двох статей, а у самців з батифазою рівня альбуміну (табл. 3), дозволяє припустити, що в даний період найбільш виразно перебігають процеси катаболізму зі станом холестази, що може бути обумовлено активізацією детоксикаційних процесів у печінці.

Активність ЛФ є показником, що відображає стан жовчосекреторної функції печінки [1]. Згідно з результатами дослідження акрофази активності ЛФ в сироватці крові спостерігається о 15.00 у щурів двох статей: 219,27 ± 38,30 Од/л для самиць та 179,60 ± 23,79 Од/л для самців, тоді як батифаза інвертована в акрофази та реєструється о 03.00 з величиною показника 105,97 ± 11,04 Од/л та 117,23 ± 20,04 Од/л відповідно. Слід зазначити, що величина активності ЛФ в момент акрофази вище за таку в батифази в 2,0 рази у самок та в 1,4 рази у самців (табл. 3). Амплітуда досліджуваного показника – 56,65 ± 16,40 Од/л для самиць та 31,32 ± 8,97 Од/л для самців з мезором ритму: 151,34 ± 3,14 Од/л та 147,44 ± 11,64 Од/л відповідно (табл. 4).

Таким чином, пік активності ЛФ синфазний акрофази вмісту загального білірубину, що можна пояснити системністю роботи печінки в реалізації детоксикаційної функції.

ВИСНОВКИ

1. Встановлена нами батифаза вмісту загального білка та середні величини альбуміну о 15.00 дозволяють зробити припущення відносно інтенсифікації саме процесів катаболізму білків в організмі в даний період часу, тоді як о 03.00 – анаболізму у тварин обох статей.
2. Для рівня сечовини та сечової кислоти не спостерігається виразної циркадіанної динаміки вмісту даних показників у тварин обох статей.
3. Акрофаза вмісту холестеролу сироватки крові о 15.00 у тварин обох статей може бути обумовлена затримкою виділення холестеролу жовчю, що призводить до компенсаторного зростання показника в сироватці крові.
4. Акрофаза активності ЛФ о 15.00 синхронна акрофази вмісту загального білірубину, що пояснює

ться системністю роботи печінки в реалізації детоксикаційної функції.

5. Проведені дослідження на щурах самицях та самках дозволили встановити відсутність суттєвих міжстатевих відмінностей у циркадіанній динаміці вмісту даних показників у тварин, що при подальших хронофармакологічних дослідженнях нівелює питання відбору статі дослідних щурів, однак наявність добових коливань рівня загального білка, альбуміну, холестеролу, загального білірубіну та активності ЛФ свідчить про необхідність врахування даної циркадіанної ритміки при аналізі хронопортрету гепатопротекторів та інших препаратів.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Біохімія: [підруч.] / За заг. ред. проф. А. Л. Загайко, проф. К. В. Александрової. – Х.: Вид-во «Форт», 2014 – 728 с.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації] / За ред. чл.-кор. НАМН України О. В. Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – 528 с.
3. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2-х т. / В. С. Камышников. – Мн: Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с.
4. Карп В. П. Вычислительные методы анализа в хронобиологии и хрономедицине / В. П. Карп, Г. С. Катинас. – С.Пб., 1997. – 115 с.
5. Парахонский А. П. Ритмическая природа иммунного ответа / А. П. Парахонский // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 12. – С. 68-69.
6. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – 3-е изд. / О. Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
7. Семененко С. Б. Особливості структури хроноритмів екскреторної функції нирок за умов гіперфункції шишкоподібної залози / С. Б. Семененко // Буковинський мед. вісник. – 2014. – Т. 18, № 2 (70). – С. 99-101.
8. Хильдебрандт Г. Хронобиология и хрономедицина / Г. Хильдебрандт, М. Мозер, М. Лехофер. – М.: Арнебия, 2006. – 144 с.
9. Хронофармакология наглядно (Хронофармакология в таблицах и рисунках): [Справ. – учеб. пособие.] / С. М. Дроговоз. – Х.: Титул, 2014. – 128 с.
10. Rutter J. Metabolism and the control of circadian rhythms / J. Rutter // Annu. Rev. Biochem. – 2002. – Vol. 71. – P. 307-331.
11. Tong X. Circadian rhythms in liver physiology and liver diseases / X. Tong, L. Yin // Compr. Physiol. – 2013. – № 3. – P. 917-940.

УДК 616.36:57.034:577.12**Е. А. Калько, С. М. Дроговоз, Т. К. Юдкевич, Н. В. Бездетко****ОСОБЕННОСТИ ЦИРКАДИАНОЙ ДИНАМИКИ ОБМЕННЫХ И ЖЕЛЧЕСЕКРЕТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ У КРЫС**

Целью данной работы было определение циркадианной динамики обменных, желчсекреторных и детоксикационных процессов у самок и самцов крыс. Для реализации данной цели проведены соответствующие хронофармакологические исследования с забором крови у опытных крыс в следующие часы суток: 03.00, 09.00, 15.00 и 21.00. В результате проведенных исследований установлено наличие суточных колебаний уровня общего белка, альбумина, холестерина, общего билирубина и активности ЛФ при отсутствии выраженных циркадианых изменений уровня мочевины и мочевой кислоты. Существенных половых отличий между крысами-самками и крысами-самцами не установлено. Полученные результаты циркадианной организации обменных, желчсекреторных и детоксикационных процессов у крыс следует учитывать при анализе хронопортрета гепатопротекторов и других препаратов.

Ключевые слова: печень; циркадианный ритм; обмен веществ

UDC 616.36:57.034:577.12**K. O. Kalko, S. M. Drogovoz, T. K. Yudkevich, N. V. Bezdetko****CIRCADENCE DYNAMICS FEATURES OF METABOLIC AND BILE SECRETION PROCESSES IN RATS**

The aim of the study was to establish the circadence dynamics of metabolic, bile secretion processes in female and male rats. The chronopharmacology study with blood sampling in experimental rats four times of day (3 am, 9 am, 3 pm and 9 pm) was carried out. As a result of the conducted investigation it was established the existence of circadian fluctuations in the general protein, albumin, cholesterol, general bilirubin levels and activity of alkaline phosphatase and the absence of a clear circadence dynamics of the content of urea and uric acid in blood serum. Significant differences between male and female rats was not revealed. The results of circadence organization of metabolic and bile secretion processes in rats should be taken into account in analyzing of hepatoprotectors and other drugs' chronofomname.

Key words: liver; circadian rhythm; metabolism

Адреса для листування:

61002, м. Харків, вул. Куликівська, 12.

Тел. 0969431794; 0960850254.

E-mail: kalko_sonkina@mail.ru.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 08.02.2016 р.