

УДК 616.36:57.042

## ОСОБЛИВОСТІ ЦИРКАДІАННОЇ ДИНАМІКИ ВУГЛЕВОДНОГО ОБМІНУ ТА АКТИВНОСТІ МАРКЕРІВ ЦИТОЛІЗУ У ЩУРІВ

К.О.Калько, О.Я.Мищенко, А.В.Кононенко, Т.В.Горбач\*, Т.К.Юдкевич, С.М.Дроговоз

Національний фармацевтичний університет  
Харківський національний медичний університет\*

Ключові слова: печінка; циркадіанний ритм; вуглеводи; маркери цитолізу

### PECULIARITIES OF THE CIRCADIAN DYNAMICS OF THE CARBOHYDRATES METABOLISM AND CYTOLYSIS MARKERS IN RATS

K.O.Kalko, O.Ya.Mishchenko, A.V.Kononenko, T.V.Gorbach\*, T.K.Yudkevych, S.M.Drogovoz

National University of Pharmacy, Kharkiv National Medical University\*

Key words: liver; circadian rhythm; carbohydrates; marker cytolysis

*The aim of the study was to determine the circadian dynamics of the carbohydrate metabolism and the activity of cytolysis markers in females and male rats. For this purpose the chronopharmacological studies with collecting blood and liver tissues of the experimental rats at the scheduled time (03.00, 09.00, 15.00 and 21.00) have been carried out. As a result of the research conducted the presence of diurnal fluctuations in the glycogen level, the content of corticosterone and glucose in male rats with the lower rhythm expression in females, and the practical absence of the circadian rhythm in the activity of ALT and AST in animals of both sexes have been determined. Significant gender differences between male and female rats have not been revealed. The results of the circadian organization of the carbohydrate metabolism and the activity of cytolysis markers obtained in rats should be taken into account when analyzing a chronoprofile of hepatoprotectors and other drugs.*

Біоритмічність – одна з фундаментальних закономірностей організму, яка властива лише живій природі. Найбільш важливе практичне значення та найдетальніше вивчення серед біоритмів організму є циркадіанні (добові) ритми [3]. Провідна роль в їх організації серед периферичних осциляторів відводиться печінці, яка відіграє, в свою чергу, ключову роль в організації вуглеводного метаболізму [9].

Метою даної роботи було встановлення циркадіанної динаміки обміну вуглеводів та активності маркерів цитолізу у самиць та самців щурів.

#### Матеріали та методи

Дослідження проводили на інтактних щурах обох статей (березень 2015 року). У фіксовані години доби: 03.00; 09.00; 15.00; 21.00 тварин декапітува-

ли та проводили забір біоматеріалу (печінка, сироватка крові) для подальших досліджень. В експерименті було використано 64 щури, а в кожній групі із досліджуваних годин було по 8 самиць та 8 самців масою 170-220 г. У вечірній та нічний період досліди проводили під інфрачервоною лампою, що нівелює вплив світлового фактора на синтез мелатоніну [7]. В сироватці крові визначали: вміст глюкози, кортикостерону, активність АлАТ та АсАТ; в гомогенаті печінки вміст глікогену [2, 4].

Дані підлягали статистичному опрацюванню за допомогою програми Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP [3, 8] 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 реєструється максимальне значення досліджуваного показника); *батифази* (часу доби, коли реєструється мінімальне значення досліджуваного показника); *мезора* (середнього значення досліджуваного показника протягом доби) і *амплітуди* (найбільшого відхилення від мезора в обидва боки) показників вуглеводного обміну та активності маркерів цитолізу [3].

Усі втручання та евтаназію тварин проводили згідно з біоетичними нормами поводження з лабораторними тваринами (Страсбург, 1986) та I-го Національного конгресу з біоетики (Київ, 2001) [2].

#### Результати та їх обговорення

Отримані дані свідчать про те, що у самиць рівень глюкози сироватки крові характеризується циркадіанною стабільністю з невиразною акрофазою о 03.00 –  $8,49 \pm 0,50$  мкмоль/л та батифазою о 09.00 –  $7,04 \pm 0,59$  мкмоль/л; амплітуда рит-

К.О.Калько – аспірант з відривом від виробництва кафедри фармакології, старший лаборант кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

Т.В.Горбач – канд. мед. наук, доцент кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету

Таблиця 1

## Циркадіанний стан вуглеводного обміну у щурів (n=64)

| Година доби           | Самиці      | Аналіз даних | Самці        | Аналіз даних |
|-----------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Глюкоза, мкмоль/л     |             |              |              |              |
| 03.00                 | 8,49±0,50   | ++++         | 7,07±0,43    | ++++         |
| 09.00                 | 7,04±0,59   | +            | 4,34±0,18*/^ | +            |
| 15.00                 | 7,06±0,49   |              | 5,46±0,35*/^ |              |
| 21.00                 | 8,16±0,79   |              | 7,01±0,70    |              |
| Глікоген, мг/г        |             |              |              |              |
| 03.00                 | 3,04±0,20   | ++++         | 3,02±0,10    | ++++         |
| 09.00                 | 1,85±0,18   | +            | 1,92±0,15    |              |
| 15.00                 | 2,25±0,21   |              | 2,40±0,11    |              |
| 21.00                 | 1,96±0,19   |              | 1,76±0,06    | +            |
| Кортикостерон, пкг/мл |             |              |              |              |
| 03.00                 | 139,97±6,35 | ++++         | 146,12±4,67  | ++++         |
| 09.00                 | 60,52±1,03  |              | 57,17±2,32   | +            |
| 15.00                 | 52,12±0,81  | +            | 66,84±6,80   |              |
| 21.00                 | 106,80±4,90 |              | 121,65±4,63  |              |

Примітки:

- 1) ++++ – акрофаза досліджуваного показника;
- 2) + – батифаза досліджуваного показника;
- 3) \* – відхилення показника в групі тварин однієї статі достовірно значущі ( $p < 0,05$ ) відносно акрофази показника;
- 4) ^ – відхилення показника в групі в межах одного досліджуваного періоду достовірно значущі ( $p < 0,05$ ) між самицями та самцями.

му складала  $0,91 \pm 0,36$  мкмоль/л при мезорі –  $7,69 \pm 0,23$  мкмоль/л (табл. 1, 2). На відміну від самиць у самців реєструється чітко виражена акрофаза вмісту глюкози о 03.00 –  $7,07 \pm 0,43$  мкмоль/л, що достовірно відрізняється від такої в батифазу о 09.00 –  $4,34 \pm 0,18$  мкмоль/л на 68% (табл. 1). Наявність виразного циркадіанного ритму коливання глюкози у самців у порівнянні з самицями підтверджується вищими величинами амплітуди ритму показ-

ника  $1,57 \pm 0,30$  мкмоль/л при мезорі  $5,97 \pm 0,14$  мкмоль/л (табл. 2).

Виявлене нами хоча і несуттєве для самиць та виразне для самців зростання рівня глюкози у вечірній (21.00) та нічний (03.00) періоди може бути зумовлене впливом катехоламінів на обмін вуглеводів [1]. Активізація симпатико-адреналової системи у нічних тварин спостерігається з настанням темного періоду доби: за С.С.Шаповаловою акрофаза вмісту адре-

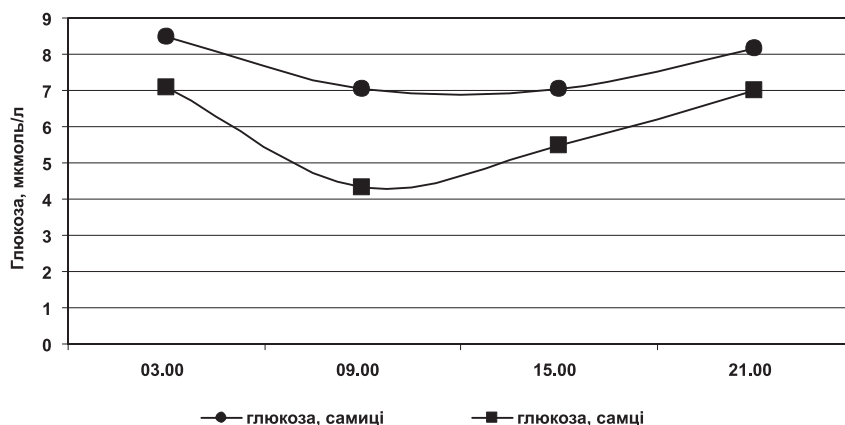


Рис. 1. Циркадіанний ритм коливання вмісту глюкози (n=64)

наліну настає о 18.00 год [5], що викликає різке зростання рівня глюкози шляхом активації фосфорилази. Норадреналіну також властивий гіперглікемічний ефект, проте він поступається такому в адреналіну. Крім того, для кортикостерону, акрофаза якого синфазна акрофазі вмісту глюкози (табл. 1), теж характерний гіперглікемічний ефект через механізм активації глюконеогенезу [1].

Слід зазначити, що хронограми циркадіанної динаміки глюкози у щурів двох статей характеризуються тотожною архітектонікою ритму, однак рівень глюкози у самиць стабільно вищий за аналогічний у самців, а о 09.00 та 15.00 годинах достовірно вищий на 62% та 29% відповідно, що може бути пов'язано з гормональним фоном самиць, оскільки естрогенам властивий прояв гіперглікемічного ефекту (табл. 1, рис. 1) [1].

Вміст глікогену в печінці характеризується наявністю чітко виразного циркадіанного ритму. Зокрема, акрофаза (03.00) даного показника у тварин двох статей складає  $3,04 \pm 0,20$  мг/г для самиць та  $3,02 \pm 0,10$  мг/г – для самців, а батифаза о 09.00 год у самиць складає  $1,85 \pm 0,18$  мг/г та о 21.00 у самців –  $1,76 \pm 0,06$  мг/г відповідно. Слід зазначити, що величина даного показника в момент акрофази перевищує таку в батифазу в 1,6 рази у самиць і в 1,7 рази у самців, що підтверджується значною амплітудою ритму  $0,40 \pm 0,13$  мг/г для самиць та  $0,32 \pm 0,05$  мг/г для самців при мезорі  $2,27 \pm 0,09$  мг/г і  $2,27 \pm 0,07$  мг/г відповідно (табл. 1, 2). Хронограма вмісту глікогену у тварин обох статей характеризується подібною архітектонікою ритму, що вказує на синхронність циркадіанного коливання вмісту даного показника у тварин обох статей та підтверджує відсутність суттєвих міжстатевих відмінностей між самицями та самцями в динаміці його зміни протягом доби (рис. 2).

Аналіз отриманих даних свідчить, що акрофаза вмісту глікогену в печінці синфазна акрофазі рівня кортикостерону сироватки крові у тварин двох статей. Зокрема о 03.00 год вміст кортикостерону максимальний і становить  $139,97 \pm 6,35$  пкг/мл для самиць та  $146,12 \pm 4,67$  пкг/мл для самців, тоді як о 15.00 год він мінімальний у самиць і становить  $52,12 \pm 0,81$  пкг/мл, а о 09.00 у самців становить  $57,17 \pm 2,32$  пкг/мл. Вміст кортикостерону в акрофазу перевищує такий в батифазу в 2,7 рази у самиць та в 2,5 рази у самців (табл. 1, 2). Суттєва динаміка вмісту кортикостерону протягом доби підтверджується амплітудою ритму даного показника  $49,64 \pm 3,62$  пкг/мл для самиць та  $51,09 \pm 2,31$  пкг/мл для самців при мезорі  $89,85 \pm 2,07$  пкг/мл і  $97,94 \pm 2,46$  пкг/мл відповідно (табл. 2). Хронограма рівня кортикостерону щурів обох статей характеризується тождоною архітектонікою ритму, що свідчить про відсутність міжстатевих відмінностей добового ритму даного показника в сироватці крові та підтверджує добову організацію життєдіяльності тварин з нічним типом активності, яким властивий інвертований людському організму ритм синтезу та секреції глюкокортикостероїдів (ГКС) [6].

Аналіз хронограм вмісту глікогену та кортикостерону у тварин обох статей, за винятком вечірнього періоду о 21.00 год, а у самиць і о 15.00 год, свідчить про синфазність коливань даних показників впродовж доби та підтверджує загальновідомий органоспецифічний ефект кортикостерону щодо стимулювання синтезу глікогену в печінці. Вечірнє зниження вмісту глікогену в гепатоцитах може бути обумовлено іншими механізмами регулювання його вмісту в тканинах печінки [1] (рис. 2).

Таким чином, аналіз показників вуглеводного обміну: рівень глюкози, глікогену та кор-

Таблиця 2

### Хронобіологічна характеристика показників вуглеводного обміну (циркадіанний ритм) за програмою Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP (n=64)

| Показники             |        | Мезор            | Амплітуда        |
|-----------------------|--------|------------------|------------------|
| Глюкоза, мкмоль/л     | самиці | $7,69 \pm 0,23$  | $0,91 \pm 0,36$  |
|                       | самці  | $5,97 \pm 0,14$  | $1,57 \pm 0,30$  |
| Глікоген, мг/г        | самиці | $2,27 \pm 0,09$  | $0,40 \pm 0,13$  |
|                       | самці  | $2,27 \pm 0,07$  | $0,32 \pm 0,05$  |
| Кортикостерон, пкг/мл | самиці | $89,85 \pm 2,07$ | $49,64 \pm 3,62$ |
|                       | самці  | $97,94 \pm 2,46$ | $51,09 \pm 2,31$ |

тикостерону як суттєво важливого в регуляції даного метаболізму свідчить про синфазність акрофаз даних показників у тварин обох статей о 03.00 год, що може вказувати на інтенсифікацію циркадіанних процесів обміну вуглеводів у цей період. Тоді як о 09.00 год вміст глюкози у тварин обох статей та глікогену у самиць мінімальний, а у самців також батифаза вмісту кортикостерону, що вказує на протифазність перебігу тим процесам, що простежуються в період акрофазі (о 03.00 год).

Загальновідомий вплив кортикостерону на процеси мембраностабілізації клітин [1]. Показник, що віддзеркалює ступінь мембраностабілізації, – активність амінотрансфераз сироватки крові, оскільки у фізіологічних умовах дані ферменти у великій кількості локалізовані в

гепатоцитах (АлАТ – у цитозолі; АсАТ – у цитозолі та мітохондріях), а їх вихід у міжклітинний простір є результатом зміни проникності клітинних мембран.

Аналіз отриманих даних свідчить, що активність АлАТ та АсАТ сироватки крові не характеризується наявністю виразного циркадіанного ритму. Акрофаза і батифаза ритму активності АлАТ у тварин обох статей синхронна та спостерігається о 15.00 год – акрофаза зі значенням показника  $1,19 \pm 0,09$  мкмоль/год×мл для самиць та  $0,97 \pm 0,13$  мкмоль/год×мл для самців, тоді як батифаза о 21.00 год складала  $0,87 \pm 0,05$  мкмоль/год×мл для самиць та  $0,88 \pm 0,06$  мкмоль/год×мл – для самців (табл. 3). Амплітуда ритму АлАТ складала  $0,11 \pm 0,03$  мкмоль/год×мл для самиць і  $0,01 \pm 0,02$  мкмоль/год×мл – для самців при мезо-

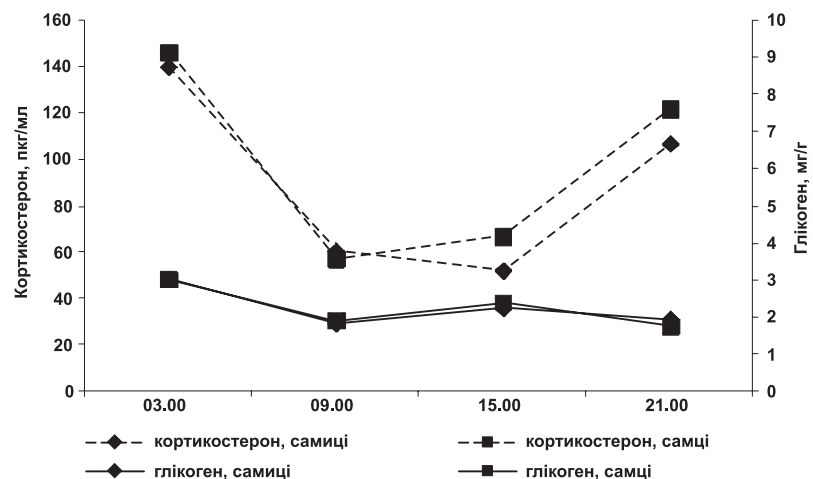


Рис. 2. Циркадіанний ритм коливання вмісту глікогену та кортикостерону (n=64)

Таблиця 3

**Циркадіанна активність АлАТ і АсАТ  
в сироватці крові щурів (n=64)**

| Година доби         | Самиці     | Аналіз даних | Самці     | Аналіз даних |
|---------------------|------------|--------------|-----------|--------------|
| АлАТ, мкмоль/год×мл |            |              |           |              |
| 03.00               | 0,97±0,12  |              | 0,96±0,06 |              |
| 09.00               | 0,94±0,05* |              | 0,90±0,09 |              |
| 15.00               | 1,19±0,09  | ++++         | 0,97±0,13 | ++++         |
| 21.00               | 0,87±0,05  | +            | 0,88±0,06 | +            |
| АсАТ, мкмоль/год×мл |            |              |           |              |
| 03.00               | 0,74±0,16  |              | 0,72±0,13 |              |
| 09.00               | 0,75±0,09  |              | 0,68±0,07 |              |
| 15.00               | 0,95±0,05  | ++++         | 0,90±0,13 | ++++         |
| 21.00               | 0,51±0,09  | +            | 0,58±0,07 | +            |

Примітки:

- 1) ++++ – акрофаза досліджуваного показника;
- 2) + – батифаза досліджуваного показника;
- 3) \* – відхилення показника в групі тварин однієї статі достовірно значущі (p<0,05) відносно акрофази показника.

Таблиця 4

**Хронобіологічна характеристика активності  
АлАТ та АсАТ (циркадіанний ритм) за програмою  
Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP (n=64)**

| Показники           |        | Мезор     | Амплітуда |
|---------------------|--------|-----------|-----------|
| АлАТ, мкмоль/год×мл | самиці | 0,99±0,03 | 0,11±0,03 |
|                     | самці  | 0,93±0,04 | 0,01±0,02 |
| АсАТ, мкмоль/год×мл | самиці | 0,74±0,05 | 0,16±0,06 |
|                     | самці  | 0,72±0,02 | 0,10±0,06 |

рі – 0,99±0,03 мкмоль/год×мл та 0,93±0,04 мкмоль/год×мл відповідно (табл. 4).

Активність АсАТ теж характеризується синфазністю акрофази та батифази показника у щурів обох статей: акрофаза спостерігається о 15.00 год – 0,95±0,05 мкмоль/год×мл для самиць та 0,90±0,13 мкмоль/год×мл для самців, батифаза о 21.00 год складала 0,51±0,09 мкмоль/год×мл та 0,58±0,07 мкмоль/год×мл відповідно (табл. 3). Амплітуда ритму АсАТ – 0,16±0,06 мкмоль/год×мл для самиць та 0,10±0,06 мкмоль/год×мл – для самців при мезорі

показника 0,74±0,05 мкмоль/год×мл та 0,72±0,02 мкмоль/год×мл відповідно (табл. 4).

Таким чином, експериментальним шляхом встановлено, що акрофаза активності АлАТ у самиць та АсАТ у самиць і самців о 15.00 (табл. 3) синхронна батифазі вмісту кортикостерону (табл. 1), що можна пояснити проявом мембраностабілізаційних властивостей даного ГКС безпосередньо шляхом зниження клітинної проникності [1].

#### ВИСНОВКИ

1. Вміст глюкози протягом доби не характеризується сут-

тєвими коливаннями у самиць та наявністю більш виразної циркадіанної динаміки у самців з акрофазою о 03.00 год та батифазою о 09.00 год.

2. Вміст глікогену печінки суттєво коливається протягом доби у щурів обох статей, а величина показника в акрофазу (03.00) перевищує таку в батифазу (09.00) у 2,7 рази у самиць та у 2,6 рази у самців.

3. Рівень кортикостерону суттєво коливається протягом доби: акрофаза 03.00 (самиці та самці), батифаза 15.00 – самиці та 09.00 – самці. Встановлені циркадіанні максимуми та мінімуми вмісту показника підтверджують нічний тип активності даних тварин.

4. У нічний період (03.00) у щурів обох статей спостерігається синхронність акрофази вмісту глюкози, глікогену та кортикостерону та ранковий (09.00) мінімум глюкози у тварин обох статей, глікогену у самиць та кортикостерону у самців, що вказує на протифазність перебігу тим процесам, що простежуються в період акрофази.

5. Активність АлАТ та АсАТ суттєво не змінюється протягом доби, а незначне зростання активності ферментів о 15.00 ймовірно зумовлене циркадіанним мінімумом вмісту кортикостерону, вплив якого на клітинну проникність загальновідомий.

6. Проведені хронометричні дослідження на самицях та самцях дозволили встановити відсутність суттєвих міжстатевих відмінностей у циркадіанній динаміці вмісту даних показників у щурів, що при постановці подальших хронофармакологічних досліджень з вивчення хроноефективності препаратів нівелює питання відбору статі щурів.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Біохімія: Підруч. / За заг. ред. проф. А.Л.Загайка, 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. Дрогозов С.М. Хронофармакология наглядно (Хронофармакология в таблицах и рисунках): Справочник – учебное пособие. – Х.: Титул, 2014. – 128 с.
4. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2-х т. – Мн: Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с.
5. Парахонский А.П. // Успехи современного естествознания. – 2006. – №12. – С. 68-69.
6. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – 3-е изд. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
7. Семененко С.Б. // Буковинський мед. вісник. – 2014. – Т. 18, №2 (70). – С. 99-101.
8. Хильдебрандт Г., Мозер М., Лехофер М. Хронобиология и хрономедицина. – М.: Арнебия, 2006. – 144 с.
9. Tong X. // Compr. Physiol. – 2013. – №3. – P. 917-940.

#### **ОСОБЛИВОСТІ ЦИРКАДІАННОЇ ДИНАМІКИ ВУГЛЕВОДНОГО ОБМІНУ ТА АКТИВНОСТІ МАРКЕРІВ ЦИТОЛІЗУ У ЩУРІВ**

**К.О.Калько, О.Я.Мищенко, А.В.Кононенко, Т.В.Горбач\*, Т.К.Юдкевич, С.М.Дрогозов**

**Національний фармацевтичний університет, Харківський національний медичний університет\***

Ключові слова: печінка; циркадіанний ритм; вуглеводи; маркери цитолізу

Метою даної роботи було встановлення циркадіанної динаміки вуглеводного обміну та активності маркерів цитолізу у самиць та самців щурів. Для реалізації даної мети проведені відповідні хронофармакологічні дослідження із забором крові і тканини печінки у дослідних щурів у наступні години доби: 03.00, 09.00, 15.00 та 21.00. В результаті проведених досліджень встановлена наявність добових коливань рівня глікогену, вмісту кортикостерону, глюкози у самців при меншій виразності ритму останньої у самиць та практична відсутність циркадіанного ритму активності АлАТ та АсАТ у тварин обох статей. Суттєвих статевих відмінностей між щурами-самицями та щурами-самцями не виявлено. Отримані результати циркадіанної організації вуглеводного обміну і активності маркерів цитолізу у щурів слід враховувати при аналізі хронопортрету гепатопротекторів та інших препаратів.

#### **ОСОБЕННОСТИ ЦИРКАДИАНОЙ ДИНАМИКИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА И АКТИВНОСТИ МАРКЕРОВ ЦИТОЛИЗА У КРЫС**

**Е.А.Калько, О.Я.Мищенко, А.В.Кононенко, Т.В.Горбач\*, Т.К.Юдкевич, С.М.Дрогозов**

**Национальный фармацевтический университет, Харьковский национальный медицинский университет\***

Ключевые слова: печень; циркадианный ритм; углеводы; маркеры цитолиза

Целью данной работы было установление циркадианной динамики углеводного обмена и активности маркеров цитолиза у самок и самцов крыс. Для этого проведены соответствующие хронофармакологические исследования с забором крови и ткани печени исследуемых крыс в следующие часы суток: 03.00, 09.00, 15.00 и 21.00. В результате проведенных исследований установлено наличие суточных колебаний уровня гликогена, содержания кортикостерона, глюкозы у самцов при меньшей выраженности ритма последней у самок и практическом отсутствии циркадианного ритма активности АлАТ и АсАТ у животных двух полов. Существенных половых отличий между крысами-самками и крысами-самцами не выявлено. Полученные результаты циркадианной организации углеводного обмена и активности маркеров цитолиза у крыс следует учитывать при анализе хронопортрета гепатопротекторов и других препаратов.

Адреса для листування:

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

Тел. (57) 706-30-69. E-mail: kalko\_sonkina@mail.ru.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 06.01.2016 р.