

ЗМІНИ ВМІСТУ БІЛІРУБІНУ ТА СЕЧОВОЇ КИСЛОТИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ МОЛОДИХ І СТАРИХ ЩУРІВ ПІД ЧАС ЦИКЛІЧНОГО РЕЖИМУ ГОДУВАННЯ

Досліджено вплив циклічного режиму годування на вміст білірубину та сечової кислоти в сироватці крові молодих (3-місячних) і старих (19-місячних) щурів. Виявлено суттєві вікозалежні зміни цих параметрів при даному типі дієтичного обмеження. Отримані результати важливі для з'ясування механізмів сприятливих ефектів циклічного режиму годування і розробки терапевтичних стратегій для низки патологій.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: білірубін, сечова кислота, циклічний режим годування.

ВСТУП. Нещодавно було показано, що так званий циклічний режим годування (ЦРГ), при якому тварини підлягають кільком циклам періодичного голодування (годування кожен другий день) та відгодовування *ad libitum*, викликає ефекти, подібні до калорійнообмежувальних дієт (КОД), що, як відомо, є потужними засобами збільшення тривалості життя, профілактики і терапії великої кількості залежних від віку та хронічних захворювань [1, 17]. Припускається, що в основі сприятливих ефектів ЦРГ лежать метаболічні зміни та індукція неспецифічних захисних реакцій організму. Серед факторів, що визначають ефекти ЦРГ, особливе місце займають білірубін та сечова кислота через їх здатність легко реагувати на дієтичні обмеження, відобразити статус антиоксидантного потенціалу сироватки крові, де ці речовини відіграють роль основних неглютаціонових антиоксидантів, і функціонування печінки як основного органа метаболізму та детоксикації [13, 19]. Більше того, є багато робіт відносно ефекту голодування та класичних КОД на метаболізм білірубину і сечової кислоти, де зазначається, що такі дієтичні обмеження впливають на пов'язані з цими речовинами метаболічні та сигнальні шляхи, проте нічого невідомо про ефекти ЦРГ [3, 15]. Таким чином, метою даного дослідження було вивчення впливу ЦРГ на вміст білірубину та сечової кислоти в сироватці крові молодих (3-місячних) і старих (19-місячних) щурів, а також стійкості такого впливу та можливих адаптаційних змін у відповідь на

повторне використання цього дієтичного обмеження.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Усі експериментальні процедури відповідали постановам комітету з біоетики при Президії НАН України. Щурів-самців лінії Вістар (3- та 19-місячних) було отримано у віварії НДІ біології (Харків, Україна). Тварин обох вікових груп розсаджували в окремі клітки і випадково розподіляли у 5 груп (по 3 щури): контроль – тварини, які перебували на стандартному раціоні віварію; 1ПГ – дієта з годуванням кожен другий день протягом 14 днів (4 г/100 г і 2 г/100 г комбікорму на масу тіла для молодих та старих щурів відповідно); 1В – відгодовування *ad libitum* протягом 14 днів після 1ПГ, за яким слідувало 30 днів стандартного раціону; 2ПГ – те ж саме, що і в разі 1ПГ, але після 1ПГ та 1В; 2В – відгодовування *ad libitum* протягом 14 днів після 2ПГ. Після 12-годинного періоду голодування щурів кожної групи усипляли ефірним наркозом та умертвляли шляхом декапітації між 7:00 та 9:00 годинами ранку. Кров негайно збирали в поліпропіленові пробірки та залишали для згортання на 20 хв при 15 °С, після чого проводили центрифугування при 3000 g протягом 10 хв. Сироватку крові зберігали в рідкому азоті до використання. Вміст загального білірубину і сечової кислоти визначали за методами Tolman et al. [20] та Varham et al. [5], відповідно, з використанням фірмових наборів колориметричних, фотометричних тестів для кількісного визначення цих речовин у сироватці крові на

автоматичному біохімічному аналізаторі-фото-метрі AU 480 Beckman-Coulter (Beckman Coulter Inc., USA). Для даних кожної експериментальної групи робили попарне множинне порівняння середніх за методом Шеффе у середовищі OriginPro. Різницю між групами вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як видно з рисунка 1, у вмісті білірубину сироватки крові контрольних тварин спостерігались виражені вікозалежні відмінності: в молодих щурів рівень цього параметра був на ~45 % вищим, ніж у старих.

Перше періодичне голодування (1ПГ) призводило до статистично значущого зниження рівня білірубину тільки в молодих тварин (на ~50 %), хоча медіана цього параметра у старих щурів також мала тенденцію до зменшення. Після періоду відгодовування та реабілітації (1В) відзначали повернення рівня загального білірубину до значення, близького до контрольного, проте різниці між віковими групами вже не спостерігали. Повторне застосування періодичного голодування у тварин обох вікових груп призводило до набагато більш різкого зниження вмісту білірубину (на 72 та 59 % для

молодих і старих тварин відповідно), ніж у випадку 1ПГ, тоді як після повторного відгодовування (2В) відновлення цього параметра до контрольного значення відзначали тільки у групі старих щурів. Менший вміст білірубину в старих тварин, як вважають, є наслідком підвищення з віком активності УДФ-глюкуронілтрансферази, ключового ферменту екскреції цієї сполуки [8, 11]. Поряд із тим, значне збільшення активності даного ферменту спостерігали в щурів, які перебували на КОД [7, 10]. Подібним чином зниження рівня білірубину після етапів періодичного голодування може бути наслідком зміни активності УДФ-глюкуронілтрансферази. Також відомо, що низький вміст білірубину в крові є індикатором послаблення прооксидантних процесів і зменшення ризику розвитку інсулінорезистентності [12, 17]. З огляду на це, зниження даного параметра в процесі ЦРГ можна розглядати як один із сприятливих ефектів цього дієтичного обмеження. Більше того, подальше дослідження механізму стабільного зменшення вмісту білірубину в крові після ЦРГ, виявленого в молодих тварин, становить великий інтерес для розробки терапій патологій, які супроводжуються гіпербілірубінемічними токсикозами [6, 9].

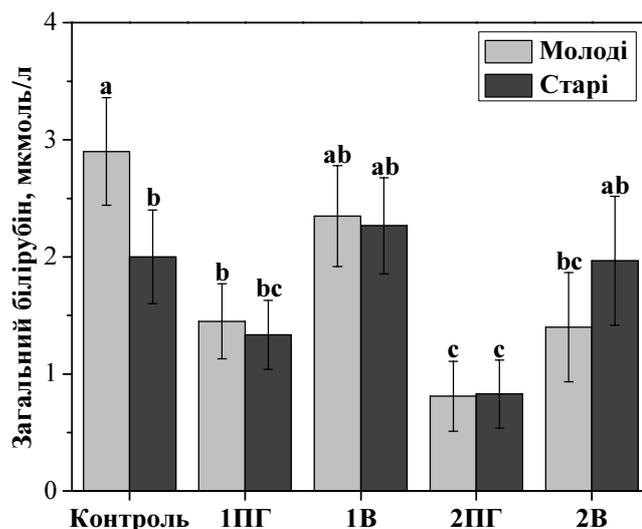


Рис. 1. Вміст загального білірубину в сироватці крові щурів 3- та 19-місячного віку (молодих і старих відповідно) при циклічному режимі годування. Стовпці, позначені різними латинськими літерами (a, b, c,), мають статистично значущі відмінності ($p < 0,05$).

Після обох етапів періодичного голодування і в молодих, і у старих тварин спостерігали статистично значуще збільшення вмісту сечової кислоти в сироватці крові (рис. 2), причому максимально цей параметр зростав у випадку 2ПГ у молодих щурів (на ~62 % порівняно з контролем). Відхилення від рівня контролю після завершення етапів відновлення

маси тіла відзначали лише в молодих тварин після першого відгодовування та реабілітації (зниження на ~21 %). Сечова кислота є одним з головних антиоксидантів крові, де вона поглинає до 60 % вільних радикалів [2, 4], а також важливим внутрішньоклітинним антиоксидантним агентом у відповідях на різноманітні метаболічні стреси [16, 21].

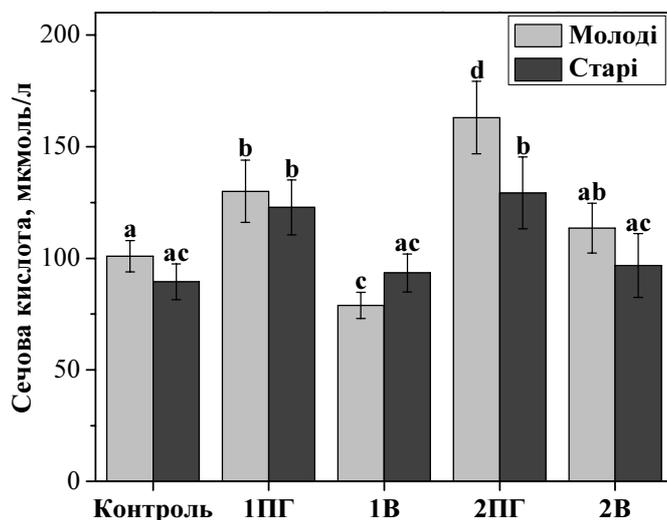


Рис. 2. Вміст сечової кислоти в сироватці крові щурів 3- та 19-місячного віку (молодих і старих відповідно) при циклічному режимі годування.

Антиоксидантні властивості сечової кислоти важливі для захисту від старіння, окислятивного стресу та окиснювального пошкодження клітин, особливо кардіоміоцитів, ендотеліоцитів та нейронів [18, 22]. З огляду на це, збільшення вмісту сечової кислоти у крові протягом ЦРГ, з одного боку, може бути одним із шляхів реалізації сприятливих ефектів періодичного голодування, а з іншого – може бути використане як спосіб посилення антиоксидантного захисту організму.

ВИСНОВКИ. 1. Протягом обох циклів періодичного голодування/відгодовування спостерігають значні вікозалежні відмінності в динаміці зміни вмісту білірубину сироватки крові, причому після завершення ЦРГ молоді тварини характеризуються стійким зниженням цього параметра.

2. Два етапи періодичного голодування призводять до значного збільшення вмісту сечової кислоти в сироватці крові, досягаючи максимальної величини після повторного використання цього дієтичного обмеження у молодих тварин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Божков А. И. Циклический режим кормления – новая модель экспериментальной геронтологии / А. И. Божков, Н. И. Кургузова, Т. В. Криворучко // Усп. геронтол. – 2014. – № 2. – С. 328–335.
2. Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress / Y. Y. Sautin, T. Nakagawa, S. Zhari-kov, R. J. Johnson // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2007. – № 2. – P. 584–596.
3. A hypocaloric diet enriched in legumes specifically mitigates lipid peroxidation in obese subjects / A. B. Crujeiras, D. Parra, I. Abete, J. A. Martinez // *Free Radic. Res.* – 2007. – № 41. – P. 498–506.
4. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus / S. R. Maxwell, H. Thomason, D. Sandler [et al.] // *Eur. J. Clin. Invest.* – 1997. – № 6. – P. 484–490.
5. Barham D. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system / D. Barham, P. Trinder // *Analyst.* – 1972. – № 97. – P. 142–145.
6. Chowdhury N. R. Disorders of Bilirubin Metabolism / N. R. Chowdhury, J. R. Chowdhury // *The Liver: Biology and Pathobiology*: John Wiley & Sons, 2009. – 1216 p.
7. Duvaldestin P. Effect of fasting on substrate specificity of rat liver UDP-glucuronosyltransferase / P. Duvaldestin, J. Mahu, P. Berthelot // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1975. – № 28. – P. 81–86.
8. Effects of caloric restriction on rodent drug and carcinogen metabolizing enzymes: implications for mutagenesis and cancer / M. Manjgaladze, S. Chen, L. T. Frame [et al.] // *Mutat. Res.* – 1993. – № 295. – P. 201–222.
9. Fevery J. What can we learn from analysis of serum bilirubin? / J. Fevery, N. Blanckaert // *J. Hepatol.* – 1986. – № 2. – P. 113–121.
10. Hart. Effects of aging and caloric restriction on hepatic drug metabolizing enzymes in the Fischer 344 rat / J. E. Leakey, H. C. Cunney, J. Bazare [et al.] // *Mech. Ageing Dev.* – 1989. – № 48. – P. 145–155.
11. Kayali R. Effect of gender on main clinical chemistry parameters in aged rats / R. Kayali, S. Aydin, U. Cakatay // *Curr. Aging Sci.* – 2009. – № 2. – P. 67–71.
12. Kim S. Y. Physiological antioxidative network of the bilirubin system in aging and age-related

diseases / S. Y. Kim, S. C. Park // Front. Pharmacol. – 2012. – № 14. – P. 3–45.

13. Lin J. P. Serum bilirubin and genes controlling bilirubin concentrations as biomarkers for cardiovascular disease / J. P. Lin, L. Vitek, H. A. Schwertner // Clin. Chem. – 2010. – № 10. – P. 1535–1543.

14. Masoro E. J. Overview of caloric restriction and ageing / E. J. Masoro // Mech. Ageing Dev. – 2005. – № 9. – P. 913–922.

15. Molecular basis of bilirubin UDP-glucuronosyl-transferase induction in spontaneously diabetic rats, acetone-treated rats and starved rats / L. Braun, M. J. Coffey, F. Puskas [et al.] // Biochem. J. – 1998. – № 15. – P. 587–592.

16. Oxidation of urate in human skeletal muscle during exercise / Y. Hellsten, P. C. Tullson, E. A. Richter, J. Bangsbo // Free Radic. Biol. Med. – 1997. – № 22. – P. 169–174.

17. Serum bilirubin is inversely associated with insulin resistance and metabolic syndrome among children and adolescents / L.Y. Lin, H. K. Kuo,

J. J. Hwang [et al.] // Atherosclerosis. – 2009. – № 203. – P. 563–568.

18. Stocker R. Role of oxidative modifications in atherosclerosis / R. Stocker, J. F. Keaney // Physiol. Rev. – 2004. – № 4. – P. 1381–1478.

19. The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease / G. Lippi, M. Montagnana, M. Franchini [et al.] // Clin. Chim. Acta. – 2008. – № 1. – P. 1–7.

20. Tolman K. G. Liver Function / K. G. Tolman, R. Rej // Fundamentals of clinical chemistry. Philadelphia: Saunders Company, 1999. – P. 1136–1137.

21. Tourniquet-induced exsanguination in patients requiring lower limb surgery. An ischemia-reperfusion model of oxidant and antioxidant metabolism / M. Mathru, D. J. Dries, L. Barnes [et al.] // Anesthesiology. – 1996. – № 1. – P. 14–22.

22. Uric acid and oxidative stress / G. K. Glantzounis, E. C. Tsimoyiannis, A. M. Kappas, D. A. Galaris // Curr. Pharm. Des. – 2005. – № 11. – P. 4145–4151.

М. С. Гирич, Н. И. Кургузова, А. И. Божков
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. Н. КАРАЗИНА

ІЗМЕНЕНІЯ СОДЕРЖАННЯ БІЛІРУБІНА І МОЧЕВОЇ КИСЛОТИ В СЫВОРОТКЕ КРОВІ МОЛОДЫХ І СТАРЫХ КРЫС ПРИ ЦИКЛІЧЕСКОМ РЕЖИМЕ КОРМЛЕНИЯ

Резюме

Исследовано влияние циклического режима кормления на содержание билирубина и мочевой кислоты в сыворотке крови молодых (3-месячных) и старых (19-месячных) крыс. Выявлены существенные возрастзависимые изменения этих параметров при данном типе диетического ограничения. Полученные результаты важны для установления механизмов благоприятных эффектов циклического режима кормления и разработки терапевтических стратегий для ряда патологий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: билирубин, мочевая кислота, циклический режим кормления.

M. S. Hirych, N. I. Kurhuzova, A. I. Bozhkov
V. N. KARAZIN KHARKIV NATIONAL UNIVERSITY

CHANGES IN THE CONTENT OF BILIRUBIN AND URIC ACID IN SERUM OF OLD AND YOUNG RATS UPON CYCLIC FEEDING REGIMEN

Summary

The effects of cyclic feeding regimen on the content of bilirubin and uric acid in serum of young (3-month) and old (19-month) rats. Considerable changes of these parameters were found upon the examined type of dietary restriction. The results obtained are of importance for clarifying the mechanisms of beneficiary effects of cyclic feeding regimen and development of therapeutic strategies for a range of pathologies.

KEY WORDS: bilirubin, uric acid, cyclic feeding regimen.

Отримано 10.07.14

Адреса для листування: М. С. Гирич, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, площа Свободи, 4, Харків, 61022, Україна.