

Е. А. Калько, С. М. Дроговоз, Л. Б. Иванчик

Влияние циркадианных и сезонных биоритмов на активность ферментов цитолиза у интактных крыс

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Ключевые слова: печень, циркадианный ритм, сезонный ритм, ферменты цитолиза

С развитием хронофизиологии, хронопатологии и хронофармакологии особое внимание в экспериментальной и клинической фармакологии уделяется оценке влияния циркадианных и сезонных ритмов на деятельность организма. Биологические ритмы охватывают широкий диапазон периодов – от долей секунды на молекулярном уровне до многих лет на надорганизменном уровне [1, 2]. Молекулярные часы имеют все клетки организма и они состоят из эволюционно консервативных часовых генов и их белков (белки часовых генов (clock-genes-proteins)) [3]. За счет наличия фоточувствительного PAS-домена – активность clock-genes-proteins (а именно Cry, Per 1, Per 2, Clock и др.) зависит от светового освещения. Функции белков часовых генов многообразны, особый интерес вызывает их участие в регуляции клеточного цикла и апоптоза [4].

Ведущая роль в реализации циркадианных ритмов принадлежит гормональной системе. Под контролем тех или иных гормонов находится активность большинства ферментов [5, 6].

Еще в 50–60 годах прошлого столетия зарубежными и отечественными исследователями получены данные относительно кортикостероидной индукции ферментов: триптофаноксигеназы и тирозинаминотрансферазы: активность этих ферментов в печени крысы возрастает (в 7–10 раз) после введения кортизона или гидрокортизона с характерной акрофазой на 4–5 часов после введения гормонов. Сходные данные были получены также *in vitro* на изолированных гепатоцитах [5, 7].

Также рядом ученых изучено влияние кортизола, кортизона и тироксина на активность АлАТ и АсАТ в гепатоцитах крыс и установлено повышение активности данных ферментов в клетках печени под действием этих гормонов [7].

Следовательно, активность ферментов во многом зависит от гормонального фона, который подвержен суточным и сезонным колебаниям [1]. Циркадианные и сезонные ритмы гормонов в свою очередь связаны с уровнем освещенности в течение суток или года. Так, максимум секреции мелатонина, гормона эпифиза, приходится на ночь и темное время года. Активность эпифиза находится в обратной зависимости от деятельности гипофиза: чем выше содержание мелатонина у крыс, тем ниже уровень глюкокортикостероидов (ГКСТ), и наоборот [1, 2].

Общеизвестно, что АлАТ и АсАТ – ферменты клеточного метаболизма, которые участвуют в процессах переноса аминокислот на кетокислоты (реакция трансминирования). АлАТ локализуется преимущественно в цитозоле, тогда как АсАТ – цитозольный и митохондриальный фермент (с митохондриями связано около 40 % ферментов).

Определение активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови – важный маркер в диагностике патологических процессов. Однако и у здоровых людей значения этих показателей подвержены суточным и сезонным колебаниям, что обусловлено особенностями биохимических процессов на уровне клеток, тканей, органов, систем и организма в целом [5, 7].

Повышение активности АлАТ или АсАТ в сыворотке крови тесно коррелирует с изменением их активности в

клетках печени. В физиологических условиях повышение активности клеточных ферментов в сыворотке крови может быть обусловлено:

- эндогенной индукцией ферментов гормонами;
- выходом ферментов цитолиза в межклеточное пространство в результате повышения проницаемости клеточных мембран или активизации апоптоза [1].

Следовательно, активность АлАТ и АсАТ колеблется в зависимости от времени суток и сезона года. Данные о влиянии биологических ритмов на активность этих ферментов в экспериментальной фармакологии очень важны для анализа патологических изменений при моделировании патологии и также при доклиническом изучении перспективных лекарств. Значение хронопортета препаратов является основой адекватного режима их дозирования для эффективной и безопасной фармакотерапии.

Цель исследования – изучение влияния сезонных и циркадианных биоритмов на активность ферментов цитолиза у интактных крыс.

Материалы и методы. Исследование проводили на половозрелых крысах-самцах массой 250–350 г в четыре сезона года. Животных подвергали эвтаназии с дальнейшим получением сыворотки крови в четыре сезона: зима (февраль 2014 года); весна (апрель 2014 года); лето (июль 2014 года); осень (октябрь 2014 года). В каждом сезоне была утренняя (10 ч) и вечерняя группа (22 ч) по 6–8 животных в каждой. Забор крови повторяли трижды в каждом сезоне с целью исключения погрешности исследования. В течение апреля, июля и октября сезонные ритмы организма наиболее стойкие и лучше всего отображают состояние организма, характерное для определенного сезона. В сыворотке крови определяли активность АлАТ, АсАТ (тест-наборы «Филисит-Диагностика», Украина) и вычисляли коэффициент де Ритиса [9, 10].

Среди полученных экспериментальных данных в выше указанные сезоны дифференцировали акрофазу (максимальное значение показателя), мезор

(среднее значение показателя) и батифазу (минимальное значение показателя) [1].

Экспериментальные данные обрабатывали с помощью стандартного пакета статистических программ «Statistica 6,0». Применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. При сравнении статистических показателей был принят уровень значимости $p < 0,05$ [11].

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований установлены отличия показателей функциональной активности печени интактных крыс в зависимости от сезона года и времени суток.

Согласно экспериментальным данным, прослеживаются колебания активности АлАТ и АсАТ в течение года. В частности, батифаза активности АлАТ – весна (утро – $1,1 \pm 0,06$; вечер – $1,54 \pm 0,07$), тогда как в остальные сезоны года активность АлАТ находится практически на одном уровне утром и вечером (таблица). Что касается активности АсАТ – акрофаза значений утром и вечером – осенне-зимний период, батифаза, как и для АлАТ – весной, а мезор показателя – летом (таблица).

Значения коэффициентов де Ритиса не имеют достоверных различий между сезонами года и временем суток (таблица).

Что касается влияния циркадианных ритмов, то у животных статистически достоверно повышена активность ферментов цитолиза АлАТ и АсАТ вечером (22 ч) относительно утра (10 ч) во все сезоны года (таблица). Данная закономерность обусловлена циркадианным состоянием гипоталамо-гипофизарно-надпочечной системы. В частности, известно, что у крыс акрофаза выделения АКТГ и ГКСТ приходится на первые 3–4 часа темной фазы суток, что соответствует активному периоду их функционирования. Кроме того, синтез и секреция мелатонина (акрофаза – 2 ч ночи) также повышается с наступлением темноты. В норме активность эпифиза находится в обратной зависимости от деятельности гипофиза и регулируется посредством ингибирующего влияния мелатонина на синтез АКТГ. Поэтому вечернее повышение активности ферментов цитолиза у

**Влияние циркадианных и сезонных биоритмов на активность ферментов
цитолита в сыворотке крови**

Время суток	Осень	Зима	Весна	Лето
Длительность фотопериода в течение суток, ч	10	10	14	16
АлАТ, ммоль/ч·л				
Утро	1,70 ± 0,08	1,46 ± 0,17	1,10 ± 0,06	1,37 ± 0,09
Вечер	1,98 ± 0,17	1,92 ± 0,12	1,54 ± 0,07	2,12 ± 0,20
Разница значений вечерних показателей относительно утренних, %	+ 16	+ 31*	+ 40*	+ 55*
АсАТ, ммоль/ч·л				
Утро	1,58 ± 0,13	1,34 ± 0,05	0,95 ± 0,04	1,11 ± 0,07
Вечер	1,86 ± 0,05	1,60 ± 0,04	1,09 ± 0,02	1,19 ± 0,10
Разница значений вечерних показателей относительно утренних, %	+ 18*	+ 19*	+ 15*	+ 7
Коэффициент де Ритиса				
Утро	0,95 ± 0,13	1,01 ± 0,12	0,88 ± 0,03	0,95 ± 0,06
Вечер	0,96 ± 0,06	0,85 ± 0,05	0,72 ± 0,04	0,74 ± 0,10

Примечание. *Достоверные отличия вечерних показателей относительно утренних, $p \leq 0,05$.

интактных крыс совпадает с вечерней акрофазой секреции ГКСТ, которые способствуют повышению активности АлАТ и АсАТ в клетках печени [1].

Кроме того, в хронобиологии хорошо известно, что синтез и секреция мелатонина зависят от длительности темной фазы суток, чем короче фотопериод, тем выше его уровень и наоборот: уровень ГКСТ находится в обратно пропорциональной зависимости от мелатонина.

Разница вечерних показателей относительно утренних для АлАТ увеличивается в ряду осень – зима – весна – лето (16 % – 31 % – 40 % – 55 %), что совпадает с сезонным увеличением уровня ГКСТ и может быть обусловлено выше указанной индукцией ферментов ГКСТ, тогда как для АсАТ уменьшается (18 % – 19 % – 15 % – 7 %) в эти же сезоны (таблица).

Один из возможных механизмов увеличения активности АлАТ и АсАТ вечером относительно утра – интенсификация апоптоза в вечернее время. Выше указывалась зависимость активности апоптоза от длительности фотопериода посредством активации светочувствительных часовых генов, которые, в свою очередь, контролируют

активность генов, регулирующих деление клеток и апоптоз. Также согласно данным литературы увеличение эндогенного уровня ГКСТ является мощным проапоптотическим фактором (активация апоптоза развивается по механизму активации каспаз) [11, 12]. Роль в ингибировании пролиферативной активности клеток и активации апоптоза характерна и для мелатонина [12].

Выводы

1. Активность ферментов цитолита в сыворотке крови интактных крыс подвержена влиянию сезонных и циркадианных биоритмов.

2. Батифаза активности АлАТ в сыворотке крови интактных крыс в утренние и вечерние часы суток – весна; мезор – лето, осень, зима.

3. Батифаза активности АсАТ в утренние и вечерние часы – весна; акрофаза – осень и зима; мезор – лето.

4. Отличия активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови интактных крыс в зависимости от времени суток и сезона года следует учитывать для адекватной оценки результатов экспериментов при изучении традиционных и перспективных гепатопротекторов.

1. Хронофармакология наглядно (Хронофармакология в таблицах и рисунках): Справочник – учебное пособие / С. М. Дроговоз, С. И. Рапопорт, А. В. Кононенко [и др.]. – Х. : Титул, 2014. – 128 с.
2. Мелешен М. И. Роль биологических ритмов в реализации токсических эффектов химических веществ у млекопитающих в эксперименте: дис. кандидата биол. наук; специальность 03.02.14 / Мелешен Марат Игоревич. – Владикавказ, 2010. – 127 с.
3. Наймарк Е. П. Наука во власти сна / Наймарк Е. П. // Что нового в науке и технике. – 2005. – № 7–8 [Электронный ресурс]. URL: <http://elementy.ru/lib/164545/164546> (дата обращения: 11.09.2014).
4. Expression of circadian clock genes Per1 and Per2 in sporadic and familial breast tumors / L. Winter, L. Bosnoyan-Collins, D. Pinnaduwege, I. Andrulis // Neoplasia. – 2007– V. 9, № 10. – P. 797–800.
5. Dallmann R. Chronopharmacology: new insights and therapeutic implications / R. Dallmann, S. A. Brown, F. Gachon // Pharmacology and toxicology. – 2014 – V. 54. – P. 339–361.
6. Джандарова Т. И. Роль околощитовидных желез в организации циркадианных ритмов физиологических функций и поведенческих реакций: дис. доктора биол. наук; специальность 03.00.13 / Джандарова Тамара Исмаиловна. – Ставрополь, 2003. – 440 с.
7. Протасова Т. Н. Гормональная регуляция активности ферментов / Т. Н. Протасова. – М. : Медицина, 1975. – 125 с.
8. Арушанян Э. Б. Суточные колебания концентрации кортикостерона в плазме и локомоции у крыс при локальном разрушении гиппокампа / Э. Б. Арушанян, Э. В. Бейер, Е. В. Белик // Российский физиологический журнал. – 1999. – № 5. – С. 616–620.
9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под. ред. док. мед. наук. А. Н. Миронова. – М. : Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – 944 с.
10. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. / В. С. Камышников. – Мн. : Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с.
11. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – [3-е изд.]. – М. : МедиаСфера, 2006. – 312 с. –
12. Мелатонин – теория и практика / С. И. Рапопорт, В. А. Голиченкова [и др.]. – М. : Медпрактика-М, 2009. – 51 с.

Е.А. Калько, С. М. Дроговоз, Л. Б. Иванчик

Влияние циркадианных и сезонных биоритмов на активность ферментов цитолиза у интактных крыс

Цель исследования – изучение влияния циркадианных и сезонных биоритмов на активность ферментов цитолиза в сыворотке крови интактных крыс. Крыс-самцов подвергали эвтаназии с дальнейшим получением сыворотки крови в четыре сезона года. В каждом сезоне была утренняя (10 ч) и вечерняя группы (22 ч) по 6–8 животных в каждой. Забор крови повторяли трижды в каждом сезоне с целью исключения погрешности исследования. Влияние циркадианных ритмов определяли, сравнивая экспериментальные данные утренних и вечерних групп, а сезонных ритмов – на основании анализа показателей четырех сезонов (зима, весна, лето, осень).

Согласно результатам исследования активность ферментов цитолиза АлАТ и АсАТ в сыворотке крови интактных животных статистически достоверно выше вечером по сравнению с утром во все четыре сезона года. Разница вечерних показателей относительно утренних для АлАТ колеблется в диапазоне от 16 % (осень) до 55 % (лето). Данная динамика также характерна для АсАТ, но с меньшей разницей (от 7 % до 18 % в зависимости от сезона года).

Анализ полученных данных свидетельствует о влиянии сезонных и циркадианных биоритмов на активность ферментов цитолиза у интактных крыс.

Отличия показателей активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови интактных крыс в зависимости от времени суток и сезона года следует учитывать для адекватной оценки результатов экспериментов при изучении традиционных и перспективных гепатопротекторов.

Ключевые слова: печень, циркадианный ритм, сезонный ритм, ферменты цитолиза

К. О. Калько, С. М. Дроговоз, Л. Б. Иванчик

Вплив циркадіанних і сезонних біоритмів на активність ферментів цитолізу в інтактних щурів

Мета дослідження – вивчення впливу циркадіанних та сезонних біоритмів на активність ферментів цитолізу в сироватці крові інтактних щурів. Щурів-самців декапітували з подальшим отриманням сироватки крові у чотири сезони. В кожному сезоні була ранкова (10 год) та вечірня групи (22 год) по 6–8 тварин у кожній. Збір крові повторювали тричі в кожному сезоні з метою уникнення похибки дослідження. Вплив циркадіанних ритмів оцінювали, порівнюючи експериментальні дані ранкових та вечірніх груп, а сезонних ритмів – на основі аналізу даних чотирьох сезонів (зима, весна, літо, осінь).

Згідно із результатами дослідження, в сироватці крові інтактних тварин статистично підвищена активність ферментів цитолізу АлАТ та АсАТ ввечері відносно ранку в усі чотири сезони року. Різниця

вечірніх показників відносно ранкових для АлАТ коливається в діапазоні від 16 % (осінь) до 55 % (літо). Така динаміка також характерна для АсАТ, проте з меншою різницею (від 7 % до 18 %) залежно від сезону року. Аналіз отриманих даних свідчить про вплив циркадіанних і сезонних біоритмів на активність ферментів цитолізу інтактних щурів.

Відмінності показників активності АлАТ та АсАТ у сироватці крові інтактних щурів залежно від часу доби та сезону року слід враховувати для адекватної оцінки результатів експериментів при вивченні традиційних і перспективних гепатопротекторів.

Ключові слова: печінка, циркадіанний ритм, сезонний ритм, ферменти цитолізу

E. A. Kalco, S. M. Drogozov, L. B. Ivantsik

Influence of circadian and seasonal biorhythms on the cytolytic enzymes activity in intact rats

The aim of this paper was to study the influence of circadian and seasonal biorhythms on the cytolytic enzymes activity in intact rats. Rats (males) were decapitated and blood serum samples for four seasons were obtained. Each season consisted the morning (10 a.m.) and evening group (10 p.m.) with 6–8 animals in each. Blood sampling was repeated three times in each season, in order to avoid the error of the study. Circadian rhythms influence was determined by comparing the experimental results of the morning and evening groups, and seasonal rhythms based on an analysis of the four seasons (winter, spring, summer, autumn).

The data obtained indicate that in intact animals the cytolytic activity of the enzymes AlAT and AsAT were significantly increased in the evening as compared to the morning in all four seasons of the year. The difference in percentage between evening and morning markers for AlAT was in the range from 16 % (autumn) to 55 % (summer). These dynamics is also a characteristic of the AsAT, but with little difference (from 7 % to 18 % depending on the season). Analysis of the data indicates the influence of seasonal and circadian biorhythms on cytolytic enzymes activity in intact rats.

Differences of AlAT and AsAT activity in intact rats, depending on the time of a day and a season of the year, should be considered for an adequate assessment of the results of experimental study of traditional and advanced hepatoprotectors.

Key words: a liver, a circadian rhythm, a seasonal rhythm, cytolytic enzymes

Надійшла: 19.12.2014 р.

Контактна особа: Дрогозов С. М., Національний фармацевтичний університет, буд. 12, вул. Мельникова, м. Харків, 61140. Тел.: + 38 0 57 706 35 81.