

УДК 615:57.034

ОСОБЛИВОСТІ ЦИРКАДІАННОЇ ДИНАМІКИ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ТА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У ЩУРІВ

К.О.Калько, С.М.Дроговоз, А.Ю.Позднякова, Н.В.Захарко*

Національний фармацевтичний університет
Рівненський державний базовий медичний коледж*

Ключові слова: циркадіанний ритм; антиоксидантна система; щури-самиці; щури-самці

PECULIARITIES OF CIRCADIAN DYNAMICS OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM AND LIPID PEROXIDATION IN RATS

K.O.Kal'ko, S.M.Drogovoz, A.Yu.Pozdniakova, N.V.Zacharko*

National University of Pharmacy, State Basic Medical College of Rivne*

Key words: circadian rhythm; antioxidant system; female rats; male rats

The activity of the liver as the central metabolic laboratory of an organism has a clear circadian rhythm due to the dependence of the daily flow of metabolic processes in the body. An important linking element of the cellular metabolism of circadian rhythms is the body's antioxidant system (AOS) activity and lipid peroxidation (LPO). As a result of this research the circadian dependence of the LPO-AOS activity has been determined, however, not all of the components of the AOP system "work" equivalently during the day. According to the key components of the AOP activity the maximal "sustainability" of AOS is observed in the morning and the minimal – in the evening and at night. No significant sex differences between female-rats and male-rats have been found.

Ритмічність перебігу процесів в організмі від системного до клітинного рівня – добре відомий факт. Найбільш важливими та вивченими є циркадіанні (добові) ритми, функціонування яких забезпечує циркадіанна система. Дана ієрархічно структурована система включає центральний (супрахіазматичні ядра гіпоталамусу) та периферичні осцилятори, до яких відноситься і печінка [4, 9]. Печінка як метаболічна лабораторія організму за рахунок властивості циркадіанної залежності перебігу метаболічних процесів вносить свої корективи в загальноорганізмів організації циркадіанного ритму [11, 12]. Зокрема, стан антиоксидантної системи організму (АОС) та активність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) – важлива об'єднуюча ланка клітинного метаболізму і циркадіанних ритмів.

Метою нашої роботи було встановлення циркадіанної ди-

наміки стану АОС організму та добової активності процесів ПОЛ у гепатоцитах 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 декапітували під тіопенталовим наркозом та проводили забір біоматеріалу (печінки, сироватки крові) для подальших досліджень. Досліди проводились на 64 щурах, в кожній групі з 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 [8]. В гомогенаті печінки визначали: вміст ВГ і ТБК-АП, активність СОД і каталази – базових показників, що відображають стан системи ПОЛ-АОС [3, 5].

Дані підлягали статистичному опрацюванню 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 $p < 0,05$ [7]. Аналіз хронограм включав визначення: акрофази (часу доби, коли реєструється максимальне значення досліджуваного показника); батифази (часу доби, коли реєструється мінімальне значення досліджуваного показника); мезору (середнє значення досліджуваного показника протягом доби) і амплітуди (різниця між акрофазою та мезором) показників ПОЛ та АОС [4].

Результати та їх обговорення

Хроноритм вмісту ВГ в клітинах печінки в інтактних тварин в умовах фізіологічної норми мав синусоїдальний характер. Для тварин обох статей акрофаза вмісту ВГ синфазна – 15.00 год та становить відповідно $154,25 \pm 14,82$ ум. од. – самиці; $157,75 \pm 14,87$ ум. од. – самці,

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

Н.В.Захарко – викладач фармацевтичних дисциплін, методист Рівненського державного базового медичного коледжу

Таблиця 1

**Показники циркадіанних ритмів системи
«перекисне окиснення ліпідів – антиоксидантний захист»
у самиць та самців (n=64)**

Година доби	Показник	Самиці	Аналіз даних	Самці	Аналіз даних
АОЗ	ВГ, ум. од.				
	03.00	87,52±9,04*	++	70,74±19,64*	+
	09.00	105,21±12,85*	+++	105,65±11,98*	+++
	15.00	154,25±14,82	++++	157,75±14,87	++++
	21.00	78,33±15,93*	+	89,71±19,15*	++
	СОД, ум. од.				
	03.00	42,59±4,37	++	47,09±4,00	+++
	09.00	48,83±2,84	++++	48,35±3,73	++++
	15.00	46,04±3,98	+++	44,28±3,67	++
	21.00	39,36±3,74	+	40,16±4,09	+
	Каталаза, мккат/л				
	03.00	43,60±3,17*	+	45,77±7,07*	+
	09.00	50,46±6,77*	+++	48,13±6,33*	++
	15.00	78,22±4,74	++++	81,37±1,43	++++
	21.00	50,08±2,94*	++	50,27±4,88*	+++
	ПОЛ	ТБК-АП, мкмоль/г тканини			
03.00		25,85±3,13*	+++	26,93±2,46	+++
09.00		16,24±2,58	+	16,12±5,46	+
15.00		17,21±3,58	++	19,74±10,04	++
21.00		30,51±1,14*	++++	34,40±3,13*	++++

Примітки:

- 1) * – відхилення показника в групі достовірно значущі (p<0,05) відносно показника в групі тварин 15.00;
2) + – батифаза досліджуваного показника; ++; +++ – мезор досліджуваного показника; ++++ – акрофаза досліджуваного показника.

Таблиця 2

**Хронобіологічна характеристика стану системи
«перекисне окиснення ліпідів – антиоксидантний захист»
(циркадіанний ритм); (n=64)
(програма Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP)**

Показники		Мезор	Амплітуда
ВГ, ум. од.	самиці	106,33±5,02	35,97±6,63
	самці	107,68±5,52	44,97±11,06
СОД, ум. од.	самиці	44,21±1,18	2,13±1,23
	самці	45,88±1,95	4,69±1,79
Каталаза, мккат/л	самиці	55,49±2,40	17,31±3,01
	самці	56,39±1,48	17,83±2,87
ТБК-АП, мкмоль/г тканини	самиці	21,94±1,01	8,91±2,13
	самці	24,27±0,75	9,86±1,77

тоді як батифаза реєструвалась о 21.00 год для самиць та 03.00 год для самців (табл. 1, рис. 1). Мезор даного показника АОЗ знаходиться на одному рівні: 106,33±5,02 ум. од. (самиці) та 107,68±5,52 ум. од. (самці) (табл. 2). Слід зазначити, що величина вмісту ВГ в період акрофази в 2 рази достовірно перевищує значення даного показника в батифазу у самиць та в 2,2 рази у самців, що свідчить про високу амплітуду ритму коливання рівня ВГ в гепатоцитах в залежності від часу доби.

Отже, хронограми циркадіанного ритму вмісту ВГ самиць та самців характеризується подібною архітектонікою ритму, за винятком мінімумів рівня ВГ (самиці – 21.00 год; самці – 03.00 год), а числові значення показника ВГ в однакові години достовірно значущо не відрізняються, що вказує на відсутність міжстатевих відмінностей циркадіанних коливань вмісту ВГ у тварин обох статей (рис. 1).

Вищевказана циркадіанна динаміка вмісту ВГ може бути обумовлена добовим ритмом активності ферментів пентозофосфатного циклу (ПФЦ), який як відомо є основним генератором НАДФН [1, 2]. Вміст НАДФН у клітині відіграє ключову роль для системи глутатіону, оскільки він необхідний для переходу окисненої форми глутатіону (ОГ) у відновлену (ВГ) під впливом ферменту глутатіонредуктази, та саме відновлена форма глутатіону виступає в якості «активного стабілізатора» системи ПОЛ-АОЗ і поряд з антиоксидантними ферментами відіграє лідируючу роль у забезпеченні «стабільності антиоксидантного гомеостазу» клітин і організму в цілому [1]. Дослідження циркадіанного ритму активності ключових ферментів ПФЦ: глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г6ФДГ) та 6-фосфоглюконат дегідрогенази (6ФГДГ) науковцями проводяться, починаючи з минулого століття і до

Циркадіанний ритм коливання вмісту ВГ та ТБК-АП у клітинах печінки

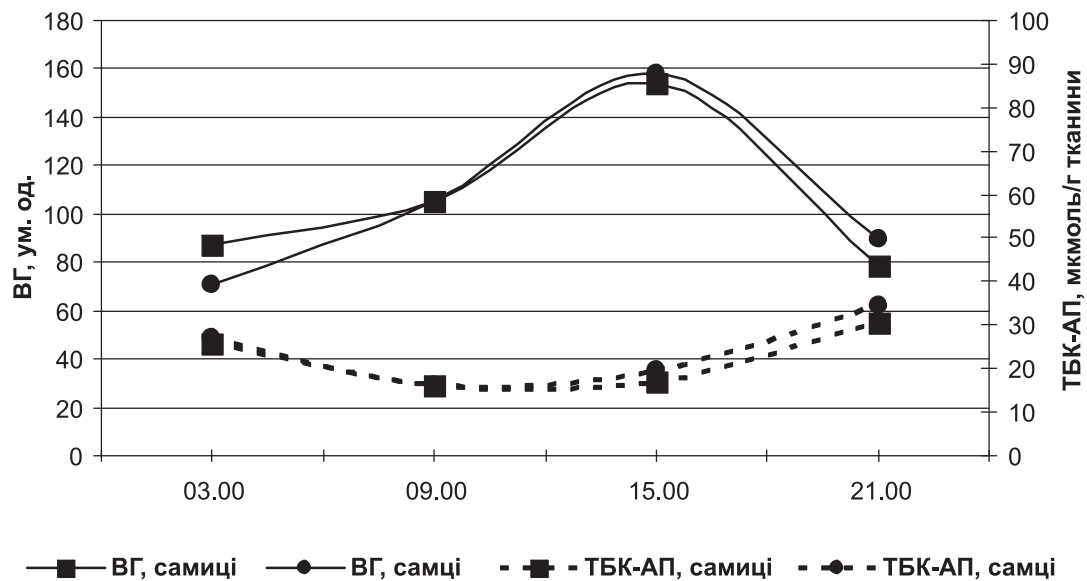


Рис. 1. Циркадіанний ритм коливання вмісту ВГ та ТБК-АП у клітинах печінки (n=32)

сьогодні у тварин з денним і нічним типом життєдіяльності в різні сезони року [2, 12]. Аналіз та систематизація цих даних щодо добового піку активності Г6ФДГ та 6ФДГ не дає можливості чітко виділити акрофазу останніх в період доби. Проте більшість результатів свідчить, що у тварин з нічним типом активності, як і у нашому випадку у щурів, акрофаза припадає на першу половину світлового дня [2]. Вищенаведене дозволяє припустити, що пік вмісту ВГ у клітинах печінки та суттєва амплітуда ритму протягом доби значною мірою зумовлена активністю ферментів ПФЦ.

СОД та каталаза – базисні ферменти системи АОЗ клітин. Статистичне опрацювання отриманих даних цих показників дозволило встановити циркадіанну динаміку активності даних ферментів у гепатоцитах. Зокрема, хронограма активності СОД відображає відносну стабільність даного фермента протягом доби, що і підтверджує мезор даного показника: $44,21 \pm 1,18$ ум. од. – самиці та $45,88 \pm 1,95$ ум. од. – самці (табл. 2). Значення амплітуди $2,13 \pm 1,23$ ум. од. – самиці та $4,69 \pm 1,79$ ум. од. – самці. Синфазність акрофази та бати-

фази в особин обох статей і аналогічна архітектоніка ритму свідчать про відсутність міжстатевих відмінностей циркадіанного коливання активності СОД у клітинах печінки.

Залишався цікавим стан циркадіанної динаміки коливання активності каталази в клітинах печінки, оскільки саме гепатоцити характеризуються її високим вмістом та активністю відносно інших клітин (еритроцити крові, кістковий мозок, нирки та слизові оболонки) [1]. Аналіз хронограм вказує на наявність чітко вираженої акрофази о 15.00 год у особин обох статей (табл. 1, рис. 1), значення якої достовірно відрізняється (в 1,6 рази) від аналогічного в батифазу (21.00 год) у самиць та в самців. Мезор ритму активності каталази у тварин був однаковий: $55,49 \pm 2,40$ мккат/л – самиці; $56,39 \pm 1,48$ мккат/л – самці. Амплітуда даного показника: $17,31 \pm 3,01$ мккат/л – самиці; $17,83 \pm 2,87$ мккат/л – самці (табл. 2).

З метою підтримки балансу системи АОЗ клітин ферменти СОД та каталаза «працюють» у фізіологічному тандемі: зокрема під дією СОД продукт дисмутації супероксиданіону – пере-

кис водню є активним субстратом для каталази [1]. Правомірно припустити, що підвищена активність каталази о 15.00 (акрофаза) є рецепроктною реакцією на зростання вмісту в клітинах перекису водню – активного субстрату даного ферменту, однак вищевказаний механізм не є єдиним можливим обґрунтуванням даного експериментального факту. Зокрема в наших дослідженнях встановлено, що о 15.00 год в сироватці крові щурів обох статей спостерігається батифаза рівня загального білка, а у самців також і батифаза рівня альбуміну [10], що дозволяє припустити інтенсифікацію саме синтетичних і детоксикаційних процесів у дані години. За умов активної детоксикації купферовими клітинами печінки із системного кровотоку в дані клітини потрапляє велика кількість формених елементів, а загальновідомо, що в еритроцитах вміст каталази також надзвичайно високий [1]. Вищенаведене дозволяє припустити, що висока активність каталази о 15.00 год зумовлена не лише власне печінковою каталазою, але й еритроцитарною.

Вищенаведений аналіз циркадіанного стану системи АОЗ

Циркадіанна динаміка активності ферментів системи АОЗ

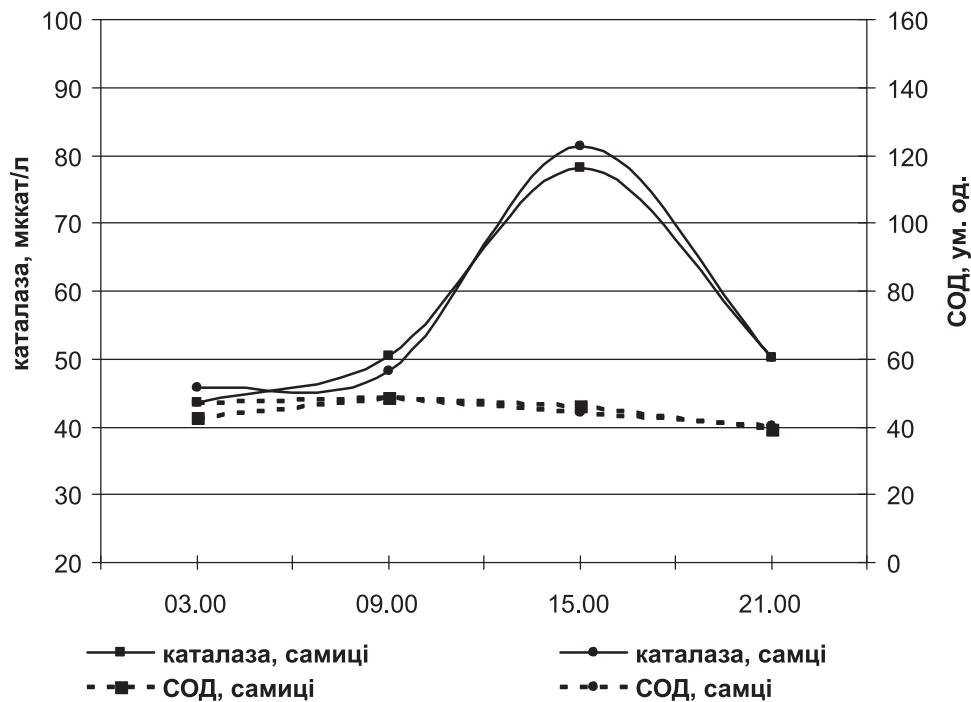


Рис. 2. Циркадіанна динаміка активності ферментів системи АОЗ (n=32)

корелює з циркадіанними коливаннями активності процесів ПОЛ. Зокрема, аналіз добової динаміки і ритмометричних параметрів вмісту ТБК-АП у гепатоцитах щурів свідчить, що концентрація даного показника має чітко виражену циркадіанну залежність із синфазною акрофазою та батифазою у самиць та самців (табл. 1). Акрофаза – 21.00 год інвертована батифазі – 09.00 год. Мезор вмісту ТБК-реактантів $21,94 \pm 1,01$ мкмоль/г (самиці) $24,27 \pm 0,75$ мкмоль/г (самці). Амлітуда даного показника складає $8,91 \pm 2,13$ мкмоль/г у самиць та $9,86 \pm 1,77$ у самців (рис. 1).

Хронограми циркадіанного коливання вмісту ТБК-АП у самиць та самців характеризуються ідентичною архітектонікою ритму, що дозволяє нівелювати міжстатеві відмінності добового ритму даного показника в клітинах печінки.

Правомірно припустити, що вечірній максимум вмісту ТБК-АП обумовлений катехоламіновою стимуляцією процесів ПОЛ [6, 13]. Оскільки у щурів акти-

вація симпатико-адреналової системи спостерігається з настанням темного періоду доби: акрофаза вмісту адреналіну – 18.00 год; батифаза – 06.00-09.00 год (за С.С.Шаповаловою). Тенденція до зниження вмісту ТБК-АП о 03.00 год відносно 21.00 год, та досягнення свого мінімуму о 09.00 год може бути обумовлена зростанням нічної секреції та рівня мелатоніну – сильного ендogenousного поглинача вільних радикалів [13]. Також, як видно на графіку (рис. 1), піки максимального вмісту ТБК-АП корелюють з мінімумом вмісту ВГ та активності СОД і каталази, що і визначає антиоксидантний статус клітини і динаміку процесів ПОЛ. Вміст ТБК-АП о 15 год несуттєво відрізнявся від такого в період батифази, та саме даний період доби характеризується найбільш вираженою активністю каталази і вмістом ВГ у клітинах (табл. 1).

Проведені дослідження в області хронобіології дозволили встановити наявність циркадіанної ритміки стану системи антиоксидантного захисту орга-

нізму (АОЗ) та активності процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ).

ВИСНОВКИ

1. У результаті проведених досліджень встановлена циркадіанна залежність стану системи АОЗ та активності процесів ПОЛ.

2. Вечірні години характеризуються інтенсифікацією процесів ПОЛ, про що свідчить акрофаза вмісту ТБК-АП о 21.00 год (для тварин обох статей) і характеризується достовірним його зростанням в 1,9 рази у самиць та у 2,1 рази у самців відносно батифази. О 21.00 год прослідковується мінімум рівня ВГ у самиць; батифаза активності СОД (самиці і самці); дещо вище за мінімальну активність каталази (самиці та самці).

3. В нічні години (03.00 год) простежується тенденція до зменшення вмісту ТБК-АП (самиці та самці), що може бути зумовлено загальновідомим піком синтезу мелатоніну – 02.00 год. У тварин обох статей реєструється батифаза активності каталази; у самиць батифаза СОД, тоді як

рівень ВГ дещо зростає відносно вечірнього (21.00 год); у самців батифаза рівня ВГ з незначним зростанням активності СОД відносно вечірніх даних.

4. Ранкові години (09.00 год) характеризуються повною синфазністю ритму у тварин двох статей, зокрема реєструється батифаза вмісту ТБК-АП та акрофаза активності СОД, тоді як вміст ВГ – дещо нижчий за вміст в акрофазу, а активність каталази вища відносно періоду батифази.

5. В денні години (15.00 год) спостерігається акрофаза вмісту ВГ та активності каталази у тварин обох статей; активність СОД дещо вища за активність у батифазу; вміст ТБК-АП несуттєво вищий в період батифази.

6. Гармонічність гомеостазу системи АОЗ та активності процесів ПОЛ у фізіологічних умовах забезпечується динамічним хронорежимом різних ланок АОЗ. Однак не всі компоненти АОС рівноцінно «працюють» протя-

гом доби. За показниками активності ключових компонентів системи АОЗ – найбільша «стійкість» АОС спостерігається в ранково-денний, а мінімальна – у вечірньо-нічний періоди.

7. Подібна архітектоніка циркадіанної динаміки вмісту досліджуваних показників у тварин двох статей вказує на відсутність відмінностей між самицями та самцями та свідчить, що їх відбір за статтю не має суттєвого значення для експерименту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Біохімія: Підручник / За заг. ред. проф. А.Л.Загайка, проф. К.В.Александрової. – Х.: Вид-во «Форт», 2014. – 728 с.
2. Бышевский А.Ш., Колесник Н.В. // Вопросы мед. химии. – 1978. – Вып. 3. – С. 338-341.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації. / За ред. чл.-кор. НАМН України О.В.Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – 528 с.
4. Дрогозов С.М. Хронофармакологія наглядно (Хронофармакологія в таблицях і рисунках): Справочник: Учеб. пособие. – Х.: Титул, 2014. – 128 с.
5. Камышиников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2-х т. – Мн: Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с.
6. Парахонский А.П. // Успехи современного естествознания. – 2006. – №12. – С. 68-69.
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – 3-е изд. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
8. Семененко С.Б. // Буковинський мед. вісник. – 2014. – Т. 18, №2 (70). – С. 99-101.
9. Akhilesh B. Reddy // Current Biol. – 2006. – №16. – P. 1107-1115.
10. Kalko K.O., Drogovoz S.M., Pozdniakova A.Yu. Circadian rhythm of albumin and total protein content in blood serum of intact rats and on the background of paracetamol hepatitis // Actual Questions of Development of New Drugs: Abstracts of International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students (April 23-24, 2015). – Kh.: NUPh, 2015. – P. 317.
11. Shigenobu Shibata // The Anatomical Record. Part A. – 2004. – P. 901-909.
12. Tong X., Yin L. // Compr. Physiol. – 2013. – №3. – P. 917-940.
13. Rutter J. // Ann. Rev. Biochem. – 2002. – Vol. 71. – P. 307-331.

ОСОБЛИВОСТІ ЦИРКАДІАННОЇ ДИНАМІКИ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ТА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У ЩУРІВ

К.О.Калько, С.М.Дрогозов, А.Ю.Позднякова, Н.В.Захарко*

Національний фармацевтичний університет, Рівненський державний базовий медичний коледж*

Ключові слова: циркадіанний ритм; антиоксидантна система; щури-самиці; щури-самці

Діяльність печінки як центральної метаболічної лабораторії організму має чітку циркадіанну ритміку, що обумовлено добовою залежністю перебігу метаболічних процесів в органі. Важливою об'єднуючою ланкою клітинного метаболізму і циркадіанних ритмів є стан антиоксидантної системи організму (АОС) та активність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). У результаті проведених досліджень встановлена циркадіанна залежність активності ПОЛ-АОС, однак не всі компоненти системи АОЗ рівноцінно «працюють» протягом доби. За показниками активності ключових компонентів системи АОЗ – найбільша «стійкість» АОС спостерігається в ранково-денний, а мінімальна – у вечірньо-нічний періоди. Суттєвих статевих відмінностей між щурами-самицями та щурами-самцями не виявлено.

ОСОБЕННОСТИ ЦИРКАДИАННОЙ ДИНАМИКИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У КРЫС**Е.А.Калько, С.М.Дроговоз, А.Ю.Позднякова, Н.В.Захарко*****Национальный фармацевтический университет, Ровенский государственный базовый медицинский колледж****Ключевые слова: циркадианный ритм; антиоксидантная система; крысы-самки; крысы-самцы*

Деятельность печени как центральной метаболической лаборатории организма характеризуется четкой циркадианной ритмикой, что обусловлено суточной зависимостью течения метаболических процессов в ней. Важным объединяющим звеном клеточного метаболизма и циркадианных ритмов есть состояние антиоксидантной системы организма (АОС) и активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). В результате проведенных исследований установлена циркадианная зависимость активности ПОЛ-АОС, хотя не все компоненты системы АОЗ равноценно «работают» в течение суток. По показателям активности ключевых компонентов системы АОЗ наивысшая «стойкость» АОС наблюдается в утренне-дневной, а минимальная – в вечерне-ночной периоды. Существенных отличий между крысами-самками и крысами-самцами не установлено.

Адреса для листування:

61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12.

Тел. (57) 706-30-69. E-mail: kalko_sonkina@mail.ru.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 20.08.2015 р.