

30. Panchenko L.F. Klinicheskaja biohimija mikrojelementov / L.F. Panchenko, I.V. Maev, K.G. Gurevich. – M. : GOU VUNMC MZ RF, 2004. – 363 s.
31. GAMK-jergicheskie korzinchato-piramidnaja i korzinchato-granuljarnaja sistema gippokampal'noj formacii koshki / [Ohotin V.E., Djuzen I.V., Kalinichenko S.G. i dr.] // Bjul. jeksp. biol. i med. – 1995. – № 6. – S. 644-646.
32. Sem'janov A.V. GAMK-jergicheskoe tormozhenie v CNS: tipy GAMK-receptorov i mehanizmy tonicheskogo GAMK-oposredovannogo tormoznogo dejstvija / A.V. Sem'janov // Nejrofiziologija. – 2002. – T. 34, №1. – S. 82-92.
33. Kryzhanovskij G.N. Nejroimmunopatologija. / [Kryzhanovskij G.N., Maeva S.V., Makarov S.V. i dr.]. – M. : izd-vo NII obshhej patologii i patofiziologii, 2003. – 437 s.
34. Nyitrai G. Glutamate uptake shapes low-[Mg²⁺] induced epileptiform activity in juvenile rat hippocampal slices / G. Nyitrai, B. Lasztóczy, J. Kardos // Brain. Res. – 2010. – Vol. 1309. – P. 172-178.
35. Bojarinova N.V. Vlijanie neprodolzhitel'noj gipokinezii na gljukokortikoidzavisimye izmenenija urovnja svobodnoradikal'nogo okislenija v gippokampe i pokazatelja trevozhnosti u krys. / N.V. Bojarinova, M.G. Davydovich, V.Je. Cejlikman // Jeksp. med. i biol. – 2009. – S. 59-62.
36. Diamond J.S. Deriving the glutamate clearance time course from transporter currents in CA1 hippocampal astrocytes: transmitter uptake gets faster during development / J.S. Diamond // J. Neurosci. – 2005. – Vol. 16, №25. – P. 2906-2916.
37. Facilitation of zinc influx via AMPA/kainate receptor activation in the hippocampus / [Takeda A., Sakurada N., Ando M. et al.] // Neurochem. Int. – 2009. – Vol. 55, № 6. – P. 376-382.
38. Ashmarin I.P. Nejrohimiya v tablicah i shemah / I.P. Ashmarin, N.D. Eshhenko, E.P. Karazeeva. – M. : Jekzamen, 2007. – 144 s.
39. Takeda A. Insight into glutamate excitotoxicity from synaptic zinc homeostasis / A. Takeda // Int. J. Alzheimers Dis. – 2010. – Vol. 2011. – Cited in PubMed; PMID 21234391.
40. GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks / [Bonifazi P., Goldin M., Picardo M.A. et al.] // Science. – 2009. – Vol. 326, № 5958. – P. 1419-1424.
41. Sivakumaran S. At immature mossy-fiber-CA3 synapses, correlated presynaptic and postsynaptic activity persistently enhances GABA release and network excitability via BDNF and cAMP-dependent PKA / S. Sivakumaran, M.H. Mohajerani, E. Cherubini // J. Neurosci. – 2009. – Vol. 29, № 26 – P. 8299-8301.
42. Uspеhi funkcional'noj nejrohiiii / Pod red. Dambinovoj S.A., Arutjunjana A.V. – S-Pb. : Sanktpiterburgskij universitet, 2003 – 516 s.

УДК 611.36:569.32.57.034.577.152.1

ВРЕМЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ АКТИВНОСТИ ДЕГИДРОГЕНАЗ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ В ТКАНЯХ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА МЫШЕЙ И КРОЛИКОВ

Омельянчик В.Н., Новосад Н.В., Колесник Н.В.

*Запорожский национальный университет
69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66*

kolesniknivas@yandex.ru

В условиях естественного освещения среды мая и неограниченного доступа к пище в тканях больших полушарий головного мозга (БПМ) белых мышей в активности глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы и 6-фосфоглюконат дегидрогеназы (6PGD) статистически достоверный суточный ритм с 24-часовым периодом (G6PD) отсутствует. Как при макро-, так и микроанализе, у обеих дегидрогеназ БПМ кроликов выявляется суточный ритм с 24-часовым периодом и большой амплитудой. Акрофазы биоритмов обеих дегидрогеназ соответствуют 20-22 часам, а ортофазы – 8-10 часам. Обсуждается возможная роль двигательной активности и пищи как датчиков времени согласования направленности метаболизма в периферических тканях.

Ключевые слова: мыши, кролики, головной мозг, суточный ритм, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа, 6-фосфоглюконат дегидрогеназа.

ЧАСОВА ОРГАНІЗАЦІЯ АКТИВНОСТІ ДЕГІДРОГЕНАЗ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ШЛЯХУ У ТКАНИНАХ ВЕЛИКИХ ПІВКУЛЬ МОЗКУ МИШЕЙ І КРОЛИКІВ

Омельянчик В.М., Новосад Н.В., Колесник Н.В.

*Запорізький національний університет,
69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

kolesniknadvas@yandex.ru

В умовах природного освітлення середини травня і необмеженого доступу до їжі в тканинах великих півкуль головного мозку (БПМ) білих мишей у глюкозо-6-фосфат дегідрогенази і 6-фосфоглюконат дегідрогенази (6PG) статистично достовірний добовий ритм з 24-годинним періодом (G6PD) відсутній. При макро- і мікроаналізі в обох дегідрогеназ БПМ кроликів виявляється добовий ритм з 24-годинним періодом і великою амплітудою. Акрофази біоритмів обох дегідрогеназ відповідають 20-22 годинам, а ортофази – 8-10 годинам. Обговорюється можлива роль рухової активності та їжі як датчиків часу узгодження спрямованості метаболізму в периферичних тканинах.

Ключові слова: миші, кролики, головний мозок, добовий ритм, глюкозо-6-фосфат дегідрогеназ, 6-фосфоглюконат дегідрогеназа.

TEMPORAL ORGANIZATION OF THE PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY DEHYDROGENASE ACTIVITY IN THE CEREBRAL HEMISPHERES TISSUE OF MICE AND RABBITS

Omelyanchik V.M., Novosad N.V., Kolesnik N.V.

*Zaporizhzhya National University
69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovskiy str., 66*

kolesniknadvas@yandex.ru

Objective: chronometric analysis of indicators of daily activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) – dehydrogenases (DG) of the pentose phosphate pathway (PPP) of carbohydrate metabolism in the tissues of the cerebral hemispheres (CM) albino mice (nocturnal omnivores animals) and californian white rabbits (twilight, herbivores) under natural light and free access to food and water.

Investigations were carried out in the middle of May, the albino male mice weighing 18-20 g, and California white male rabbits weighing 2.5-3.0 kg. Animals were kept under standard conditions vivarium under natural light without limiting access to food and water. Every 6 hours under light chloroform anesthesia 6-7 animals were bled by opening the jugular vein.

Removed from the skull brain, the cerebral hemispheres were separated, washed with cold 0.15 M KCl, excess wash solution was removed with filter paper. Weighed portion of tissue (200 mg) was homogenized in a glass homogenizer with a teflon pestle 30 s at 1000 rev / min to a cooled solution of 0.15 M KCl in relation 1:9. After 60 minutes extraction at 4°C. Homogenates was centrifuged for 20 minutes at 6000 g. Enzyme activity was determined in the supernatant. G6PD activity and 6PGD was evaluated by of reduced NADPH at 340 nm. The composition of the incubation medium (final concentration in mM) Tris-HCl buffer, pH 7.6 – 100, MgCl₂ – 100, NADP – 0.5; 0.1 ml of the working dilution of the extract organ tissue. The reaction was started by adding substrates for G6PD glucose-6-phosphate to 6PGD – phosphogluconate-6 at a final concentration of 2 mM. The total volume of 3.0 ml of the incubation mixture. The medium consisted the excess of substrate and coenzyme, the kinetics of the reaction for 3 min. incubation was linear. Enzyme activity expressed as mkmol NADPH, reduced in a minute at 25°C per 1 g of tissue, and 1 mg of protein sample. The molar extinction coefficient NADPH 340 nm 6.22 x 10⁶. Protein was determined by Lowry. All assays were performed in duplicate samples.

Results were analyzed in accordance with hronobiometrii – embodiments the macroscopic and microscopic analysis. In the first phase of the macroscopic analysis determined the mean values of enzyme activity in each test hour days, standard deviation, standard error of the mean and 95% confidence interval (95% CI) of the mean. Estimate the true time effect on enzymatic activity in the liver tissue was performed using ANOVA (ANOVA); definition of significant differences of enzyme activity on the scale of the time of day was performed using multiple post hoc comparisons, Fisher's exact test. Statistical and graphical procedures were performed using a software package for Windows XP SPSS Art. 13. True differences at $p < 0.05$. Microanalysis was performed using kosinor analysis.

Found that under the experimental conditions in the tissue of the cerebral hemispheres of mice factor «time of day» has no effect on the activity of the enzymes (ANOVA). No statistically significant rhythm with a 24 hour period is confirmed in the test of Fisher (a posteriori multiple comparisons). Credible rhythm is not detected and kosinor analysis. Calculated chronograms G6PD and 6PGD activity in the brain tissue of mice were sinusoidal, with different amplitude fluctuations of enzyme activity and

the different position of acrophase . Suggests that inbred mice have different chronotype, which defines the parameters of the statistical unreliability of the average 24 hour rhythm sinusoid . Not excluded phenomenon reset the circadian rhythm dehydrogenases pentose phosphate pathway in brain tissue of mice with free access to food. The average G6PD activity per 1 g of mouse brain tissue was higher 6PGD activity nearly doubled, in contrast, the specific activity 6PGD was 5-fold higher specific activity of G6PD. Perhaps this activity ratio DG PPP reflects differences in the compartmentalization of the enzymes in the cells of the brain tissue of mice.

In the tissue of the cerebral hemispheres of rabbits time factor has a pronounced effect on the activity of both dehydrogenases as per 1 g of tissue, and per 1 mg of protein samples ($P < 0.00$). In the diurnal profile of enzyme activity per 1 tissue (a posteriori multiple comparisons) revealed a single maximum at 21 hours ($P < 0,01$). In the diurnal profile of specific activity as G6PD, and two maximum detected 6PGD – 3 hours and 15 hours ($P < 0,01$).

When kosinor assay G6PD activity streak pictures and 6PGD with 95% confidence level revealed 24 hour circadian rhythm . Mezor amplitude both dehydrogenases and close; acrophase rhythms correspond to 20-22 hours. Draws the attention of virtually inverted circadian both DG brain tissue of rabbits in the calculation of enzyme activity per 1 g of tissue and 1 mg of protein sample. With this phenomenon, we have encountered previously when determining the circadian enzymes in rat brain tissue. One would assume that this phenomenon reflects the different contents of protein extracted from the samples. However, the content of protein in the brain extracts of tissue samples during a day was not statistically different in the experiment with rats and mice and rabbits

Thus, under natural light and unrestricted access to food in the tissue BPM white mice, a statistically significant circadian rhythm activity DG PPP 24 hour period is reset, while at the Californian rabbits under the same experimental conditions, such a rhythm is detected. When comparing the mean activity sinusoids DG PPP BPM mice and rabbits seem possible to say that the acrophase of enzyme activity in mice occurs during the rest of the motor, which is logical, taking into account the key role in ensuring recovery PPP syntheses. The fact that rabbits maximum enzyme activity is observed in the late evening and pronounced minimum in the morning, the assumption is that their physical activity in the early morning, which is typical for twilight animals.

Taking into account the fundamental role of circadian rhythms in the preservation of health and the development of pathological conditions, the effects of food on the structure of biorhythms metabolic processes epidemic manifestations of metabolic disorders in modern humans, topical study of tissue-specific manifestations of the effect of time of day of food on the internal clock.

In ambient light mid-May and unrestricted access to food in the tissues of the cerebral hemispheres (BPM) in white mice, glucose-6 -phosphate dehydrogenase and 6 - phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) was statistically significant circadian rhythm with a 24 hour period (G6PD) is absent, rhythm reset. As with macro- and microanalysis both dehydrogenases BPM rabbits revealed circadian rhythm with a 24 hour period and large amplitude. Acrophase biorhythms both dehydrogenases match 20-22 hours and ortophase – 8-10 hours. The possible role of motor activity and food as sensors time in agreeing directivity of metabolism in peripheral tissues.

Key words: mice, rabbits, brain, circadian rhythm, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase.

ВВЕДЕНИЕ

В процессе адаптации живых существ к смене цикла свет-темнота при вращении Земли вокруг своей оси сформировалась циркадная система (ЦС) [1]. У млекопитающих ЦС организована в иерархию осцилляторов. На вершине иерархии – супрахиазматическое ядро (СХЯ) переднего гипоталамуса с центральным генератором 24-часовых ритмов. На периферии каждый орган и ткань имеют свои водители ритмов (ВР). СХЯ осуществляет координацию периферических ВР и на организменном уровне обеспечивает формирование гармоничного суточного ритма [2, 3].

На молекулярном уровне часовые механизмы СХЯ и ВР в периферических тканях подобны. Их образует сеть транскрипционно-посттранскрипционных петель положительной и отрицательной обратной связи, которые управляют 24-часовой экспрессией компонентов ядра часов. Компоненты ядра часов представлены часовыми генами, продукты которых генерируют и регулируют циркадные ритмы как в клетках СХЯ, так и в клетках часов периферических органов (4).

Для поддержания синхронности между несколькими физиологическими или поведенческими ритмами и внешними датчиками времени биологические ритмы в тканях увлекаются внешним таймером. Ведущим таймером для млекопитающих является экологический цикл свет-темнота. У большинства млекопитающих цикл свет-темнота увлекает двигательную активность в определенной фазе или фазах каждого дня (день / ночь / сумерки), которая обычно используется для определения видов как ночного образа жизни, дневного или сумеречного. Эти фазы являются отражением сигналов окружающей среды [5].

Цикл свет-темнота не влияет на работу таймеров периферических органов. Мощным сигналом, вовлекающим периферические часы, является время приема пищи. Сообщалось, что у ночных животных ограничение пищи в течение короткого времени во время световой фазы суток полностью инвертирует фазу экспрессии часовых генов в печени, не влияя на функцию часов в СХЯ [6,7].

В то же время СХЯ сбрасывает циркадный ритм одновременно с таковым в периферических тканях при ограничении калорийности пищи [8,9]. Предполагают, что стимулы, которые связаны с питательной ценностью пищи и с количеством калорий воздействуют на центральный циркадный генератор. В поддержку этой гипотезы показано, что пища с высоким содержанием жиров приводит к изменениям периода циркадных ритмов у мышей [10].

Принимая во внимание данные литературы о том, что двигательная активность животных – это отражение настройки часовых генов СХЯ, а прием пищи и особенность рациона – ключевой сигнал в настройке часовых генов в периферических тканях, цель работы – хронометрический анализ показателей суточной активности глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (G6PD) и 6-фосфоглюконат дегидрогеназы (6PGD) – дегидрогеназ (ДГ) пентозофосфатного пути (ПФП) обмена углеводов в тканях больших полушарий мозга (БПМ) белых мышей (ночные животные, всеядные) и белых калифорнийских кроликов (время двигательной активности спорно, травоядные) [11] в условиях естественного освещения и свободного доступа к пище и воде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены в мае на белых беспородных мышках-самцах, весом 18-20 г, и белых калифорнийских кроликах, весом 2,5-3,0 кг, содержащихся в обычных условиях вивария, без ограничения доступа к корму и воде. Через каждые 6 часов под легким хлороформным наркозом 6-7 животных обескровливали путем вскрытия яремной вены. Все процедуры отбора проб, приготовление гомогената ткани, определение и расчет активности ферментов, статистический и хронометрический анализ данных проводили, как описано ранее [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка влияния фактора «время суток» на активность исследованных ферментов осуществляли с помощью ANOVA. Полученные результаты отражены в таблице 2.

Таблица 1 – Показатели влияния времени суток на активность ДГ ПФП в мозге белых мышей (ANOVA).

Ферменты	Сравнение	F	P
G6PD NADPH mkmol/min/g	Между группами	,968	,427
G6PD NADPH mkmol/min/mg	Между группами	1,753	,189
6PGD NADPH mkmol/min/g	Между группами	,749	,536
6PGD NADPH mkmol/min/mg	Между группами	,560	,648

Данные табл.1 свидетельствуют об отсутствии влияния времени на активность ДГ ПФП в ткани мозга мышей в условиях эксперимента. Показатели описательной статистики активности ферментов в разное время суток отражены в таблице 2.

Достоверность различий между значениями активности ферментов в разное время суток определяли путем множественных апостериорных сравнений средних в тесте Фишера (LSD).

Таблица 2 – Показатели описательной статистики активности ДГ ПФП в ткани больших полушарий мозга мышей в разное время суток

Ферменты	Время суток	N	Среднее	Стд. отклонение	Стд. ошибка	95% доверительный интервал для среднего	
						Нижняя граница	Верхняя граница
G6PD NADPH mkmol/min/g	3	6	,952	,1341	,0547	,811	1,092
	9	6	,938	,2183	,0891	,709	1,167
	15	6	,912	,2710	,1106	,627	1,196
	21	6	,782	,1067	,0435	,670	,894
	Итого	24	,896	,1935	,0395	,814	,978
G6PD NADPH mkmol/min/mg	3	6	1,413	,3315	,1353	1,065	1,761
	9	6	1,400	,2031	,0829	1,187	1,613
	15	6	1,685	,2921	,1192	1,378	1,992
	21	6	1,300	,3686	,1505	,913	1,687
	Итого	24	1,450	,3197	,0653	1,315	1,585
6PGD NADPH mkmol/min/g	3	6	,368	,0417	,0170	,325	,412
	9	6	,430	,1691	,0690	,253	,607
	15	6	,355	,0695	,0284	,282	,428
	21	6	,360	,0620	,0253	,295	,425
	Итого	24	,378	,0971	,0198	,337	,419
6PGDp NADPH mkmol/min/mg	3	6	6,017	1,4176	,5787	4,529	7,504
	9	6	6,683	2,6881	1,0974	3,862	9,504
	15	6	6,720	,5797	,2366	6,112	7,328
	21	6	5,717	1,0226	,4175	4,644	6,790
	Итого	24	6,284	1,5817	,3229	5,616	6,952

В соответствии с данными табл. 2, в ткани мозга мышей среднесуточная активность G6PD в расчете на 1 г ткани выше активности 6PGD практически вдвое, напротив, удельная активность 6PGD – в 5 раз выше удельной активности G6PD. Вероятно, такое соотношение активностей ДГ ПФП отражает их разную компартментализацию в клетках мозга мышей [12]. Достоверных различий между показателями активности ДГ ПФП в тканях БПМ мышей в разное время суток не выявлено, что согласуется с результатами ANOVA (табл.1).

Результаты однофакторного дисперсионного анализа (влияние времени суток на активность ДГ ПФП в мозге кроликов) представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Показатели влияния времени суток на активность ДГ ПФП в мозге белых кроликов (ANOVA)

Ферменты	Сравнение	F	P
G6PD NADPH mkmol/min/g	Между группами	102,109	,000
G6PD NADPH mkmol/min/mg	Между группами	27,085	,000
6PGD NADPH mkmol/min/g	Между группами	24,269	,000
6PGD NADPH mkmol/min/mg	Между группами	52,081	,000

Данные ANOVA (табл.3) свидетельствуют о высоком достоверном влиянии времени суток на активность G6PD и 6PGD в ткани мозга кроликов (оба способа расчета).

Показатели описательной статистики активности ДГ ПФП в ткани мозга кроликов в разное время суток отражены в таблице 4.

Таблица 4 – Показатели описательной статистики активности ДГ ПФП в ткани больших полушарий мозга кроликов в разное время суток

Ферменты	Время суток	N	Среднее	Стд отклонение	Стд ошибка	95% доверительный интервал для среднего	
						Нижняя граница	Верхняя граница
G6PD NADPH mkmol/min/g	3,2	6	,622	,1584	,0647	,455	,788
	9,2	6	,635	,1161	,0474	,513	,757
	15,2	6	,750	,1441	,0588	,599	,901
	21,2	6	2,303	,3137	,1281	1,974	2,633
	Итого	24	1,078	,7480	,1527	,762	1,393
G6PD NADPH mkmol/min/mg	3,2	6	1,750	,4220	,1723	1,307	2,193
	9,2	6	,815	,1896	,0774	,616	1,014
	15,2	6	1,530	,1956	,0799	1,324	1,735
	21,2	6	,508	,2266	,0925	,271	,746
	Итого	24	1,151	,5781	,1180	,907	1,395
6PGD NADPH mkmol/min/g t	3,2	6	,803	,2426	,0991	,549	1,058
	9,2	6	,637	,1178	,0481	,513	,760
	15,2	6	,790	,2161	,0882	,563	1,017
	21,2	6	1,827	,4200	,1715	1,386	2,267
	Итого	24	1,014	,5463	,1115	,784	1,245
6PGD NADPH mkmol/min/mg	3,2	6	2,095	,3879	,1584	1,688	2,502
	9,2	6	,848	,2162	,0883	,621	1,075
	15,2	6	1,548	,1356	,0553	1,406	1,691
	21,2	6	,503	,1349	,0551	,362	,645
	Итого	24	1,249	,6692	,1366	,966	1,531

В соответствии с данными табл.4, в ткани мозга кроликов среднесуточная активность обеих дегидрогеназ близка. Суточный профиль активности ДГ ПФП в расчете на 1 г ткани и 1 мг белка пробы мозга кроликов отражен на рис.1

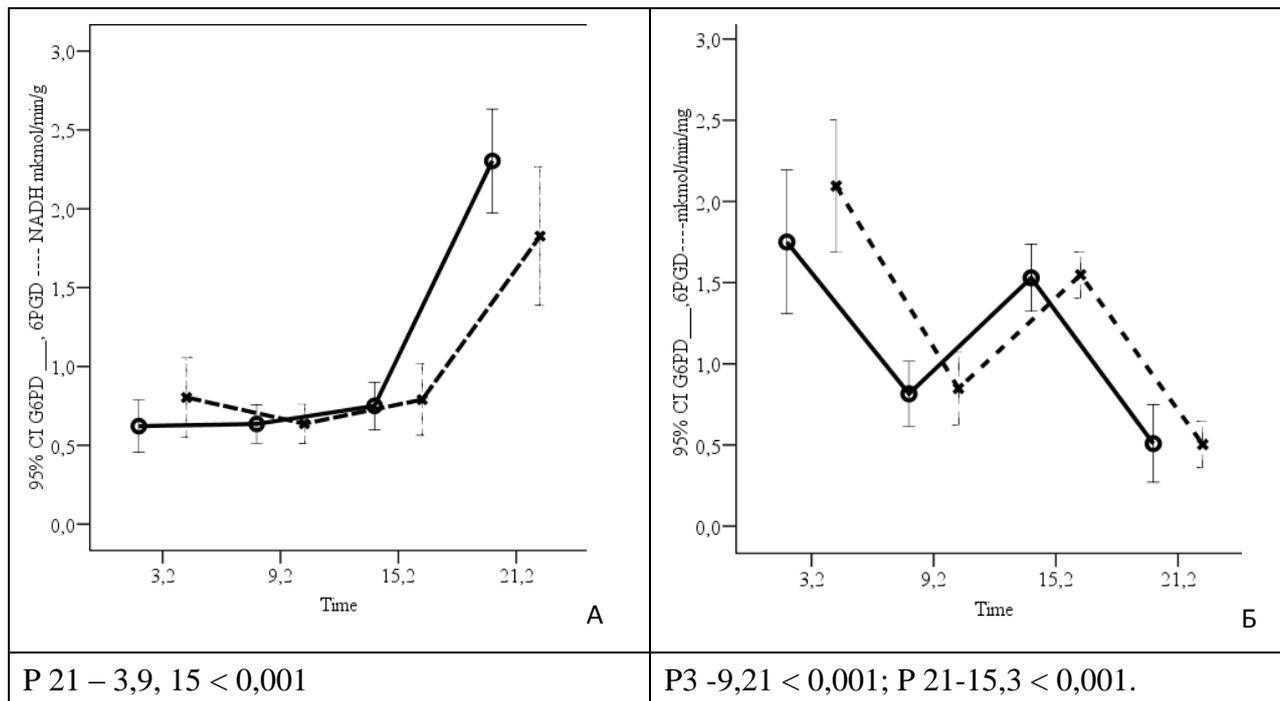


Рис. 1 Суточный профиль показателей активности дегидрогеназ ПФП мозга кроликов в расчете на 1 г ткани (А) и 1 мг белка пробы (Б)

В соответствии с данными рис.1, суточные профили обеих ДГ ткани мозга при расчете активности ферментов в расчете на 1 г ткани и на 1 мг белка пробы практически инвертированы. С этим явлением мы сталкивались ранее при определении суточного профиля дегидрогеназ в ткани мозга крыс. Нам не удалось связать профиль активности ферментов с содержанием белка в солевых экстрактах ткани мозга крыс [11].

Результаты микроанализа хронограмм активности ДГ ПФП в тканях БПМ мышей и кроликов отражены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5 – Показатели косинор-анализа активности ДГ ПФП в ткани БПМ мышей

Период	Средние	x	Y	h	A	Phi	Delta
G6PD НАДФН мкмоль /мин/г							
24 ч	<i>Средние</i>	-0,108	0,112	0,936	0,156	8,931	0,000
	<i>Эллипс</i>	<i>Sx</i>	<i>Sy</i>	<i>r</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>Teta</i>
P = 95%		0,091	0,046	-0,350	0,347	0,157	-12,579
Параметры эллипса ошибок 24-часового периода активности G6PD НАДФН мкмоль / мин/г							
Amin	Amax	PhiMin	PhiMax	СкоН/n	MinH	MaxH	Amin
0,16	0,86	0,00	23,99	0,04	1,43	1,74	0,16
G6PD НАДФН мкмоль /мин/мг							
24 ч	<i>Средние</i>	-0,282	0,104	1,582	0,301	10,644	0,000
	<i>Эллипс</i>	<i>Sx</i>	<i>Sy</i>	<i>r</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>Teta</i>
P = 95%		0,149	0,090	-0,309	0,573	0,312	-15,120

Период	Средние	x	Y	h	A	Phi	Delta
Параметры эллипса ошибок 24-часового периода активности G6PD мкмоль НАДФН/мин/мг							
Amin	Amax	PhiMin	PhiMax	СкоН/n	MinH	MaxH	Amin
0,04	0,47	0,01	24,00	0,05	0,77	0,94	0,04
6PGD НАДФН мкмоль /мин/г							
24 ч	<i>Средние</i>	0,004	0,006	0,363	0,007	4,054	0,000
	<i>Эллипс</i>	<i>Sx</i>	<i>Sy</i>	<i>r</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>Teta</i>
P = 95%		0,026	0,014	-0,140	0,099	0,050	-5,492
Параметры эллипса ошибок 24-часового периода активности 6PGD НАДФН мкмоль /мин/г							
Amin	Amax	PhiMin	PhiMax	СкоН/n	MinH	MaxH	Amin
0,04	0,10	0,00	24,00	0,01	0,34	0,37	0,04
6PGD НАДФН мкмоль / мин/мг							
24 ч	<i>Средние</i>	-0,761	0,126	6,454	0,771	11,375	0,000
	<i>Эллипс</i>	<i>Sx</i>	<i>Sy</i>	<i>r</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>Teta</i>
P = 95%		0,288	0,173	0,406	1,123	0,570	18,675
Параметры эллипса ошибок 24-часового периода активности 6PGD НАДФН мкмоль /мин/мг							
min	Amax	PhiMin	PhiMax	СкоН/n	MinH	MaxH	min
0,24	1,89	0,02	24,00	0,26	5,37	7,50	0,24

Таким образом, ни при макро-, ни при микроанализе показателей активности ДГ ПФП в ткани мозга мышей ритм с 24-часовым периодом не выявлен. Поскольку в эксперименте использовали беспородных мышей, одной из причин отсутствия статистически достоверного ритма мог быть разный хронотип животных, который выявляется при графическом анализе пучка расчетных хронограмм (рис. 2)

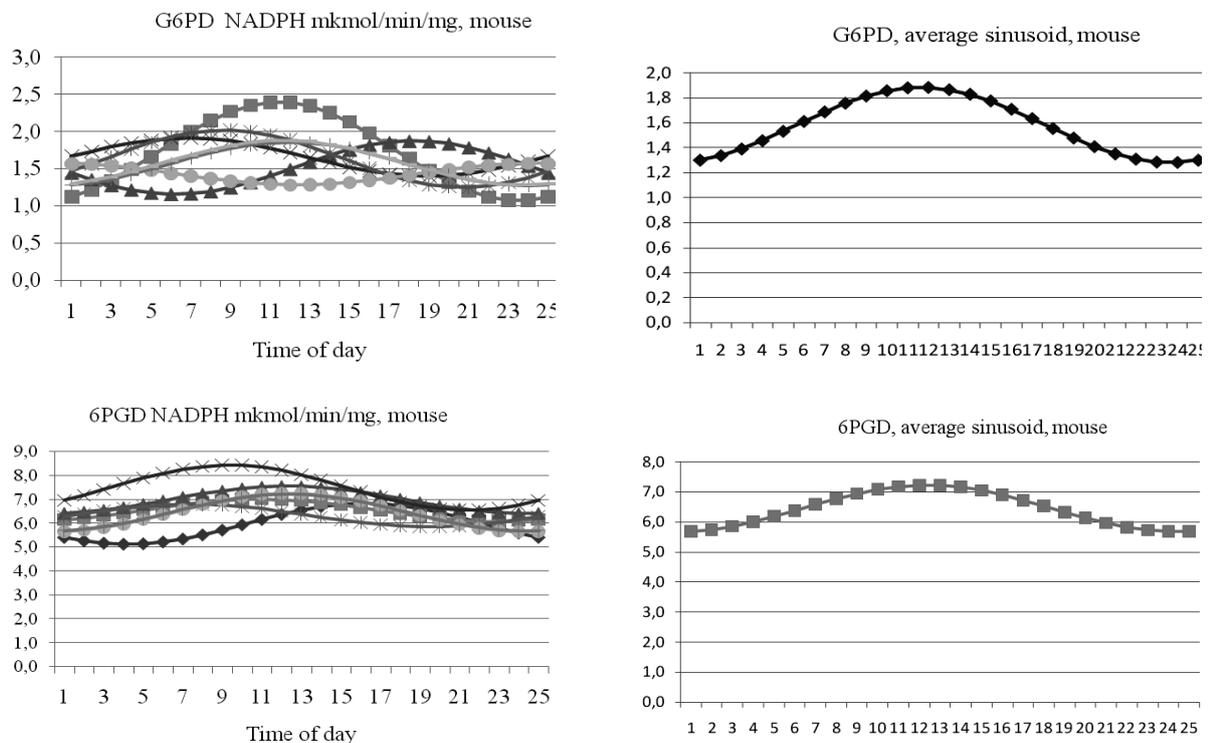


Рис. 2 Профиль расчетных хронограмм биоритма с 24-часовым периодом удельной активности G6PD и 6PGD в ткани мозга мышей

Как следует из рис.2, расчетные хронограммы активности дегидрогеназ ПФП БПМ мышей у отдельных особей имеют вид синусоид с минимумом и максимумом на протяжении суток, но акрофазы синусоид не согласованы, амплитуды малы, что, вероятно, и определяет недостоверность параметров суточного ритма средних синусоид как у G6PD, так и бPGD. Лимитирующим ферментом в ткани БПМ мышей является G6PD – её активность существенно ниже, чем у бPGD, что соответствует данным литературы [13].

Таблица 6 – Показатели косинор-анализа активности ДГ ПФП в ткани БПМ кроликов

G6PD мкмоль НАДФН/ мин/мг							
24 ч	<i>Средние</i>	1,089	-1,173	0,691	1,600	-3,142	0,000
	<i>Эллипс</i>	<i>Sx</i>	<i>Sy</i>	<i>r</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>Teta</i>
P = 95%		0,098	0,122	-0,924	0,576	0,112	128,511
Параметры эллипса ошибок 24-часового периода активности G6PD мкмоль НАДФН/мин/г							
Amin	Amax	PhiMin	PhiMax	СкоН/н	MinH	MaxH	Amin
янв.00	1,96	19,47	21,86	0,05	0,053	0,92	янв.00
G6PD мкмоль НАДФ. Н /мин/мг							
24 ч	<i>Средние</i>	32,446	-29,602	17,309	43,920	-2,825	0,000
	<i>Эллипс</i>	<i>Sx</i>	<i>Sy</i>	<i>r</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>Teta</i>
P = 95%		2,700	2,628	-0,670	12,917	5,738	-43,840
Параметры эллипса ошибок 24-часового периода активности G6PD мкмоль НАДФН / мин/мг							
Amin	Amax	PhiMin	PhiMax	СкоН/н	MinH	MaxH	Amin
33,62	55,05	20,03	21,86	1,2	13,75	18,38	33,62
бPGD мкмоль НАДФН/мин/г							
24 ч	<i>Средние</i>	0,775	-0,766	0,796	1,089	-2,977	0,000
	<i>Эллипс</i>	<i>Sx</i>	<i>Sy</i>	<i>r</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>Teta</i>
P = 95%		0,114	0,092	-0,911	0,540	0,113	-38,307
Параметры эллипса ошибок 24-часового периода активности бPGD мкмоль НАДФН/мин/г							
Amin	Amax	PhiMin	PhiMax	СкоН/н	MinH	MaxH	Amin
0,74	1,54	19,19	21,96	0,07	0,60	0,80	0,74
бPGD мкмоль НАДФН /мин/мг							
24 ч	<i>Средние</i>	24,785	-20,897	18,191	32,419	-2,676	0,000
	<i>Эллипс</i>	<i>Sx</i>	<i>Sy</i>	<i>r</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>Teta</i>
P = 95%		3,128	3,547	-0,942	17,485	2,991	131,186
Параметры эллипса ошибок 24-часового периода активности бPGD мкмоль НАДФ. Н /мг/мин							
Amin	Amax	PhiMin	PhiMax	СкоН/н	MinH	MaxH	Amin
24,78	45,22	19,15	22,56	0,55	16,61	19,35	24,78

При косинор-анализе активности ДГ ПФП в ткани БПМ кроликов (табл.6) выявляется суточный ритм с 24-часовым периодом. Параметры средних синусоид обеих ДГ как в расчете на 1 г ткани, так и на 1 мг белка пробы практически одинаковы. Максимум активности ферментов приходится на 20-22 часа. На рис. 3 отражены средние расчетные синусоиды активности G6PD и 6PGD в ткани БПМ кроликов.

Представленные на рис. 3 данные отражают наличие выраженного суточного ритма активности обеих ДГ ПФП в ткани БПМ кроликов. Колебания активности ферментов на протяжении суток осуществляются практически синхронно, с одинаково выраженной амплитудой. Минимум активности ферментов в ортофазе соответствует 10 часам, а максимум в акрофазе – 22 часам.

Таким образом, в условиях естественного освещения, неограниченного доступа к пище в ткани БПМ белых мишей статистически значимый суточный ритм активности ДГ ПФП с 24-часовым периодом не выявляется, в то время как у калифорнийских кроликов в тех же условиях эксперимента активность ферментов изменяется периодически, период ритма – 24-часа. При сравнении средних расчетных синусоид активности ДГ ПФП в ткани БПМ мышей и кроликов представляется возможным говорить том, что акрофаза активности ферментов у мышей приходится на период двигательного покоя, что логично, принимая во внимание ключевую роль ПФП в обеспечении восстановительных синтезов [14]. Тот факт, что у кроликов максимум активности наблюдается поздним вечером, а выраженный минимум утром, позволяет допустить, что их двигательная активность приходится на раннее утро (с 3 часов), что характерно для сумеречных животных [11].

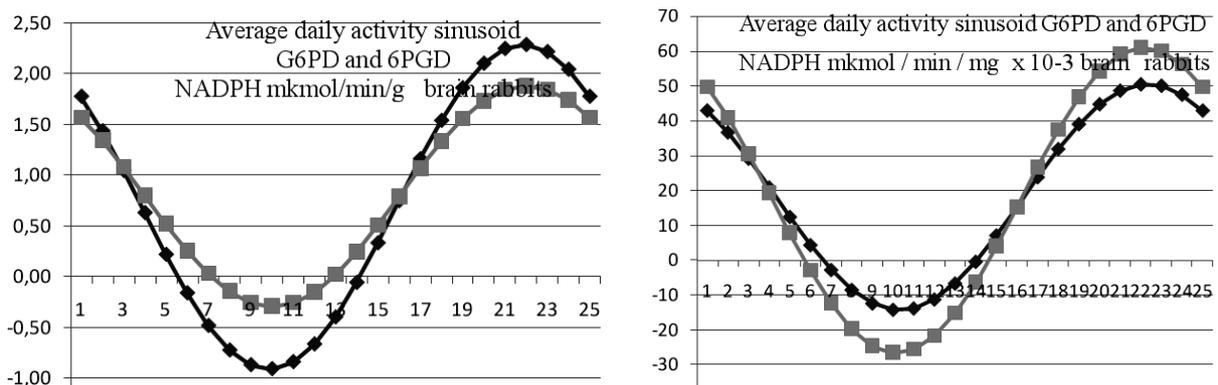


Рис. 3. Расчетные средние синусоиды с 24-часовым периодом активности ДГ ПФП в ткани БПМ кроликов.

Полученные нами данные согласуются с современными представлениями о пластичности внутренних часов млекопитающих, которая обеспечивает гомеостаз физиологических и метаболических процессов на уровне организма [6-10].

Принимая во внимание фундаментальную роль суточных ритмов в сохранении здоровья и развитии патологических состояний, влиянии пищи на структуру биоритмов метаболических процессов, эпидемию проявления нарушений обмена веществ у современного человека, актуально исследование тканеспецифического проявления на уровне метаболических систем влияния времени приема пищи на внутренние часы.

ВЫВОДЫ

1. В условиях естественного освещения мая и свободного доступа животных к пище у белых беспородных мышей биоритм с 24-часовым периодом активности G6PD и 6PGD тканей БПМ отсутствует.

2. В тех же условиях в тканях БПМ калифорнийских кроликов активность ДГ ПФП изменяется периодически, величина периода 24-часа. Акрофаза активности обеих ферментов соответствует 20-22 часам, ортофаза – 9 – 11.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lowrey P.L. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization / P.L. Lowrey, J.S. Takahashi // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* – 2004. – Vol. 5. – P. 407-441.
2. Reppert S.M. Coordination of circadian timing in mammals / S.M. Reppert, D.R. Weaver // *Nature.* – 2002. – Vol. 418. – P. 935-941.
3. Quiniero J.E. The biological clock nucleus: a multiphasic oscillator network regulated by light / J.E. Quiniero, S.J. Kuhlman, D.G. McMahon // *J. Neurosci.* – 2003. – Vol. 23. – P. 8070-8076.
4. Reppert S.M. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms / S.M. Reppert, D.R. Weaver // *Ann Rev. Physiol.* – 2001. – Vol.63. – P. 647-676.
5. Circadian regulation of locomotor activity and skeletal muscle gene expression in the horse / [Ann-Marie Martin, J. A. Elliott, P. Duffy et al.] // *Journal of Applied Physiology.* – 2010. – Vol.109. – P.1328-1336.
6. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus / [F.Damiola, N. L. Minh, N. Preitner et al.] // *Genes & Development.* – 2000. – Vol. 14. – P.2950-2961.
7. Stokkan K.A. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding / [K.A. Stokkan, S. Yamazaki, H. Tei et al.] // *Science.* – 2001. – Vol. 291. – P. 490–493.
8. Synchronization of the Molecular Clockwork by light- and Food-Related Cues in Mammals / [E. Challet. I. Caldelas, C. Graff, P. Pevet] // *Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 384. – P.711-719.
9. Resuehr D. Caloric restriction and melatonin substitution: Effects on murine circadian parameters / D. Resuehr, J. Olcese // *Brain Research.* – 2005. – Vol.1048. – 146-152.
10. High-fat feeding alters the clock synchronization to light / J. Mendoza, P. Pevet, E. Challet // *J. Physiology.* – 2008. – Vol. 586. – P. 5901-5910.
11. Fuentes G.C. Physiology and Clinical Pathology of Laboratory New Zealand White Rabbits Housed Individually and in Groups/ G. C Fuentes and J. Newgren // *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* – 2008. – Vol. 47, №2. – P. 35-38.
12. Хронобиометрический анализ суточной variability активности дегидрогеназ ПФП в тканях больших полушарий мозга беспородных крыс [Электронный ресурс] / [Н.В. Колесник, Л.А. Омелянчик, К.В. Новикова и др.] // *Актуальні питання біології, екології та хімії.* – 2011. – №1. – С. 44-51. – Режим доступу до журн. http://sites.znu.edu.ua/bio-eco-chem-sci/issues/files/2011/11/45/6614_1320752541_11knvmbk.pdf
13. Glucose conversion by multiple pathways in brain extract: theoretical and experimental analysis/[F. Orosz, G.Wagner, F. Ortega et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 2003. – 309. – P. 792-797.
14. Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequence / W. Ying // *Antioxid Redox Signal.* – 2008. – Vol.10, №2. – P.179-206.

REFERENCES

1. Lowrey P.L. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization / P.L. Lowrey, J.S. Takahashi // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* – 2004. – Vol.5. – P. 407-441.
2. Reppert S.M. Coordination of circadian timing in mammals / S.M. Reppert, D.R. Weaver // *Nature.* – 2002. – Vol. 418. – P. 935-941.
3. Quiniero J.E. The biological clock nucleus: a multiphasic oscillator network regulated by light / J.E. Quiniero, S.J. Kuhlman, D.G. McMahon // *J. Neurosci.* – 2003. – Vol. 23. – P. 8070-8076.
4. Reppert S.M. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms / S.M. Reppert, D.R. Weaver // *Annu Rev. Physiol.* – 2001. – Vol.63. – P. 647-676.
5. Circadian regulation of locomotor activity and skeletal muscle gene expression in the horse / [Ann-Marie Martin, J.A. Elliott, P. Duffy et al.] // *Journal of Applied Physiology.* – 2010. – Vol. 109. – P.1328-1336.
6. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus / [F.Damiola, N. L. Minh, N. Preitner et al.] // *Genes & Development.* – 2000. – Vol. 14. – P.2950-2961.
7. Stokkan K.A. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding / [K.A. Stokkan, S. Yamazaki, H. Tei et al.] // *Science.* – 2001. – Vol. 291. – P. 490–493.
8. Synchronization of the Molecular Clockwork by light- and Food-Related Cues in Mammals / [E. Challet. I. Caldelas, C. Graff, P. Pevet] // *Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 384. – P. 711-719.
9. Resuehr D. Olcese J. Caloric restriction and melatonin substitution: Effects on murine circadian parameters / D. Resuehr, J. Olcese // *Brain Research.* – 2005. – Vol.1048. – 146-152.
10. High-fat feeding alters the clock synchronization to light / J. Mendoza, P. Pevet E. Challet // *J. Physiology.* – 2008. – Vol. 586. – P. 5901-5910.
11. Fuentes G.C. Physiology and Clinical Pathology of Laboratory New Zealand White Rabbits Housed Individually and in Groups / G. C Fuentes and J. Newgren // *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* – 2008. – Vol. 47, №2. – P. 35-38.
12. Hronobiometricheskiy analiz sutochnoy variabel'nosti aktivnosti degidrogenaz PFP v tkanjah bol'shih polushariy mozga besporodnyh krysh [Elektronniy resurs] / [N.V. Kolesnik. L.A., Omel'janchik, K.V. Novikova i dr.] // *Aktual'ni pitanija biologii, ekologii ta himii.* – 2011. – №1. – S. 44-51. – Rezhim dostupu do zhurn http://sites.znu.edu.ua/bio-eco-chem-sci/issues/files/2011/11/45/6614_1320752541_11knvmbk.pdf
13. Glucose conversion by multiple pathways in brain extract: theoretical and experimental analysis / [F. Orosz, G.Wagner, F. Ortega et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 2003. – Vol. 309. – P. 792-797.
14. Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequence / W. Ying // *Antioxid Redox Signal.* – 2008. – Vol. 10, №2. – P. 179-206.