

УДК: 611.36:569.32:57.034:577.152.1

ЦИРКАДНЫЙ РИТМ АКТИВНОСТИ ДЕГИДРОГЕНАЗ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ В СЛИЗИСТОЙ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА МЫШЕЙ И КРОЛИКОВ

Омельянчик В.Н., к.м.н., доцент, Новикова К.В., ст. лаборант,
Колесник Н.В., д.б.н., профессор

Запорожский национальный университет

В грубых гомогенатах слизистой тонкого кишечника (СТК) мышей и кроликов, содержащихся в условиях естественного освещения мая без ограничения доступа к пище и отборе проб у 6-7 животных через каждые 6 часов, исследовали влияние времени суток на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы. С помощью косинор-анализа установлено, что активность обоих ферментов в СТК мышей и кроликов изменяется с периодом близким к 24 часов. Акрофаза активности ферментов в СТК мышей наблюдается со второй половины дня до полуночи; в СТК кроликов – с утра до полудня. Максимум активности G6PD СТК опережает таковой 6PGD на 3:00 часа.

Ключевые слова: мыши, кролики, слизистая тонкого кишечника, гомогенаты, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа, суточный ритм.

Омельянчик В.М., Новикова К.В., Колісник Н.В. Циркадний ритм активності дегідрогеназ пентозофосфатного шляху у слизовій оболонці тонкого кишківника мишей і кроликів / Запорізький національний університет, Україна.

У грубих гомогенатах слизової оболонці тонкого кишківника (СОТК) мишей і кроликів, яких утримували в умовах природного освітлення травня, без обмеження доступу до їжі й відборі проб у 6-7 тварин через кожні 6 годин, досліджували вплив часу доби на активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і 6-фосфоглюконатдегідрогенази. За допомогою косінор-аналізу встановлено, що активність обох ферментів в СОТК мишей і кроликів змінюється з періодом близьким до 24 годин. Акрофаза активності ферментів в СОТК мишей спостерігається з другої половини дня до півночі; в СОТК кролів – з ранку до півдня. Акрофаза G6PD СОТК випереджає таку 6PGD на три години.

Ключові слова: миші, кролики, слизова оболонка тонкого кишківника, гомогенати, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, 6-фосфоглюконатдегідрогеназа, добовий ритм.

Omelyanchik V.N., Novikova K.V., Kolesnik N.V. Circadian rhythms are the pentose phosphate pathway dehydrogenase activity in the small intestinal mucosa of mice and rabbits / Zaporizhzhya National University, Ukraine.

In crude homogenates of small intestinal mucosa (SIM) mice and rabbits, which are containing in natural light may, without limiting the access to food and sampling from 6-7 animals every 6 hours and examined the effect of time of day, the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD). With cosinor analysis established that the activity of both enzymes in mice and rabbits STK changes with a period close to 24 hours. Acrophase of enzyme activity in SIM mice is from the second half of the day until midnight at STK rabbits acrophase takes between 4-5 am to noon. Parameters individual sinusoids enzyme activity SIM inbred mice and rabbits vary within a wide range.

Keywords: mice, rabbits, mucosa of the small intestine homogenates, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, circadian rhythm.

ВВЕДЕНИЕ

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (G6PD) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6PGD) пентозофосфатного пути (ПФП) – ключевые ферменты, обеспечивающие гомеостаз НАДФН-зависимых редокс систем – цитохрома P 450 [1], тиоредоксина, глутаредоксина и глутатиона [2]. Определяющая роль структуры суточного ритма в направленности и степени выраженности ответа метаболического пути и организма в целом на то или иное воздействие [3] определяют актуальность сравнительного хронометрического анализа активности дегидрогеназ ПФП в слизистой тонкого кишечника (СТК) ночных и дневных животных. По данным литературы у ночных и дневных животных инвертированы суточные ритмы содержания кортикостероидов и ионов калия [4]. Сравнительных данных о суточных ритмах ферментов ПФП в СТК мышей и кроликов мы не встретили. Изложенное определило цель

нашего исследования: используя методологию макро- и микроанализа хронобиологии [5] определить суточную организацию активности G6PD и 6PGD в СТК мышей и кроликов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В эксперименте использовали половозрелых нелинейных самцов белых мышей и белых калифорнийских кроликов. Животных содержали на обычном стандартном рационе, в условиях естественного освещения мая, доступ к пище и воде не ограничивали. Забой животных, отбор проб СТК, приготовление гомогенатов и определение активности ферментов осуществляли, как описано ранее [6]. Макро- и микроанализ активности ферментов проводили в соответствии с [5] с использованием пакета прикладных программ SPSS v.15 (макроанализ) и программы косинор – микроанализ (6).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты однофакторного дисперсионного анализа – влияние времени суток на активность дегидрогеназ в СТК мышей (ANOVA) – отражены в таблице 1.

Таблица 1 – Временя суток и активность дегидрогеназ ПФП в СТК мышей (ANOVA)

| Фермент | Сравнение | F | P |
|---------------------------|----------------|-------|-------|
| 6PGD мкмоль НАДФН/г/мин | Между группами | 0,701 | 0,025 |
| | Внутри групп | | |
| G6PD мкмоль НАДФН/г/мин | Между группами | 0,274 | 0,042 |
| | Внутри групп | | |
| 6PGD мкмоль НАДФН /мг/мин | Между группами | 0,495 | 0,028 |
| | Внутри групп | | |
| G6PD мкмоль НАДФН/мг/мин | Между группами | 4,286 | 0,138 |
| | Внутри групп | | |

В соответствии с результатами ANOVA в условиях эксперимента в СТК мышей истинное влияние времени суток проявляется в отношении активности G6PD в расчете на 1 г ткани (табл. 1) и в отношении активности 6PGD при обоих способах расчета.

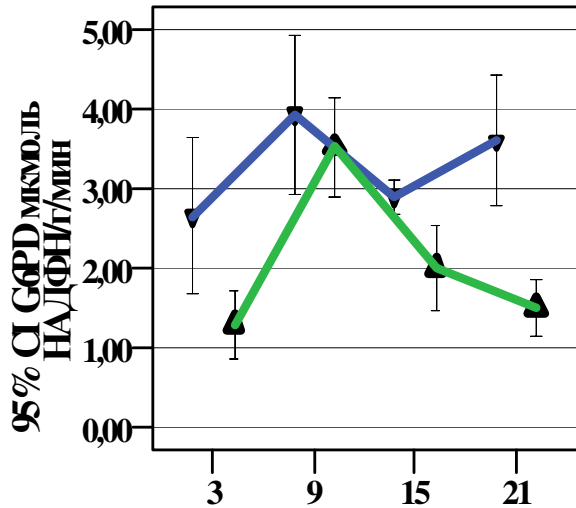
Результаты ANOVA влияния времени суток на активность дегидрогеназ в СТК кроликов отражены в таблице 2.

Таблица 2 – Фактор времени и активность дегидрогеназ ПФП в СТК кроликов

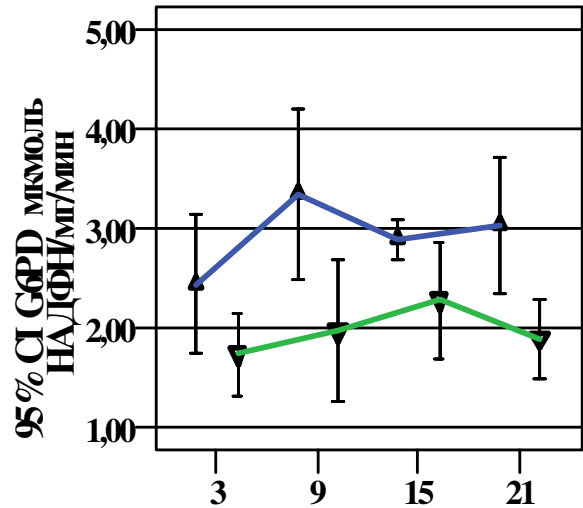
| Фермент | Сравнение | F | P |
|-----------------------------|----------------|--------|-------|
| 6PGD мкмоль НАДФН/ г /мин | Между группами | 3,786 | 0,035 |
| | Внутри групп | | |
| G6PD мкмоль НАДФН / г / мин | Между группами | 1,928 | 0,000 |
| | Внутри групп | | |
| 6PGD мкмоль НАДФН /мг/мин/ | Между группами | 22,099 | 0,000 |
| | Внутри групп | | |
| G6PD мкмоль НАДФН/мг/мин | Между группами | 15,377 | 0,352 |
| | Внутри групп | | |

Как следует из данных табл. 2 время суток достоверно влияет на активность обеих дегидрогеназ ПФП в СТК в расчете на 1 ткани; в расчете на 1 мг белка только на активность бPGD.

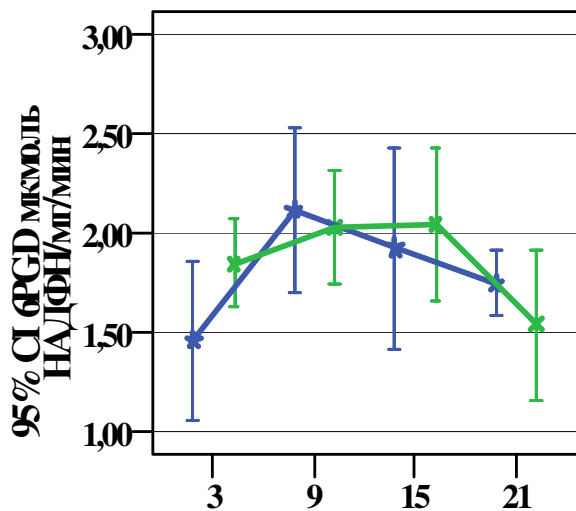
Суточный профиль активности ферментов в СТК мышей и кроликов и результаты множественных апостериорных сравнений активности ферментов в часы отбора проб отражены на рис. 1.



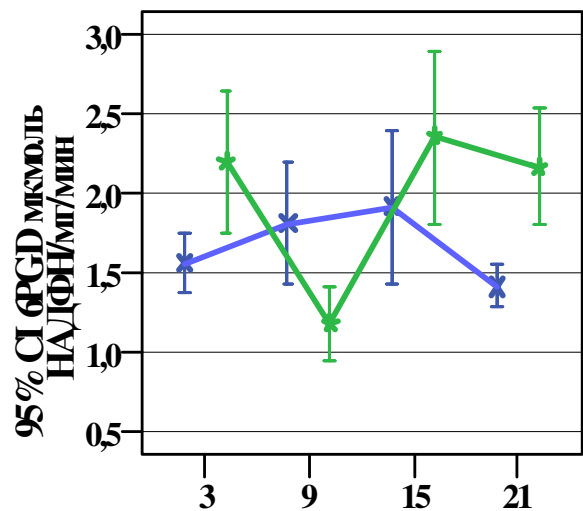
Мыши: P 9 – 3, 15 < 0,05;
Кролики: P 9 – 3, 15, 21 < 0,05;



Мыши: P 3-9 < 0,05.
Кролики: отличия отсутствуют



Мыши: P 3 - 9, 15 < 0,05.
Кролики: P 21 - 9, 15 < 0,05.



Мыши: P 15 – 21 < 0,05.
Кролики: P 9 - 3, 15, 21 < 0,02.

Рисунок 1 – Суточный профиль активности дегидрогеназ ПФП в СТК мышей (синяя линия) и кроликов (зеленая линия)

Данные графического анализа активности дегидрогеназ ПФП в СТК ночных животных – мыши и дневных – кролики – на протяжении суток (рис. 1) отражают схожие профили активности G6PD и несколько различные 6PGD.

С целью подтверждение или отрицания наличия ритмов активности дегидрогеназ ПФП в СТК мышей и кроликов с 24 часовым периодом, и получения характеристик суточных гармоник мы провели косинор-анализ хронограмм активности ферментов. Результаты косинор-анализа активности дегидрогеназ ПФП в СТК мышей отражены в табл. 3.

Таблица 3 – Параметры средних синусоид группового косинор-анализа хронограмм активности дегидрогеназ ПФП в СТК мышей

| Период | Средние | x | y | h | A | Phi | Delta |
|---|---------|--------|--------|--------|-------|--------|---------|
| G6PD мкмоль НАДФН /г/мин | | | | | | | |
| 24 ч | Средние | -0,095 | 0,042 | 1,212 | 0,104 | 10,396 | 0,000 |
| | Эллипс | Sx | Sy | r | a | b | Teta |
| P = 95 % | | 0,128 | 0,121 | -0,966 | 0,655 | 0,086 | -43,241 |
| Параметры эллипса ошибок 24 часового периода активности G6PD мкмоль НАДФН /г/мин | | | | | | | |
| Amin | Amax | PhiMin | PhiMax | СкоН/n | MinH | MaxH | Amin |
| 0,05 | 0,75 | 0,01 | 24,00 | 0,16 | 0,83 | 2,01 | 0,05 |
| G6PD мкмоль НАДФН /мг/мин | | | | | | | |
| 24 ч | Средние | -1,766 | -1,737 | 8,372 | 2,477 | 14,968 | 0,000 |
| | Эллипс | Sx | Sy | r | a | b | Teta |
| P = 95 % | | 1,412 | 0,540 | -0,759 | 5,528 | 1,264 | -17,113 |
| Параметры эллипса ошибок 24 часового периода активности G6PD мкмоль НАДФН /мг/мин | | | | | | | |
| Amin | Amax | PhiMin | PhiMax | СкоН/n | MinH | MaxH | Amin |
| 0,59 | 7,47 | 12,47 | 22,51 | 0,79 | 6,07 | 11,67 | 0,59 |
| 6PGD мкмоль НАДФН /г/мин | | | | | | | |
| 24 ч | Средние | 0,891 | -0,862 | 0,847 | 1,240 | -2,938 | 0,000 |
| | Эллипс | Sx | Sy | r | a | b | Teta |
| P = 95 % | | 0,783 | 0,762 | -0,998 | 4,096 | 0,133 | -44,202 |
| Параметры эллипса ошибок 24 часового периода активности 6PGD мкмоль НАДФН /г/мин | | | | | | | |
| Amin | Amax | PhiMin | PhiMax | СкоН/n | MinH | MaxH | |
| 0,66 | 5,11 | 12,64 | 23,12 | 0,06 | 0,65 | 1,15 | |
| 6PGD мкмоль НАДФН /мг/мин | | | | | | | |
| 24 ч | Средние | 0,302 | -0,467 | 5,969 | 0,556 | -3,805 | 0,000 |
| | Эллипс | Sx | Sy | r | a | b | Teta |
| P = 95 % | | 0,585 | 0,376 | -0,837 | 2,518 | 0,672 | -30,678 |
| Параметры эллипса ошибок 24 часового периода активности 6PGD мкмоль НАДФН /мг/мин | | | | | | | |
| Amin | Amax | PhiMin | PhiMax | СкоН/n | MinH | MaxH | Amin |
| 0,22 | 2,88 | 0,00 | 24,00 | 0,33 | 4,62 | 7,13 | 0,22 |

Из данных табл. 3 следует, что в СТК белых мышей 24 часовый суточный ритм определяется для удельной активности G6PD и 6PGD в расчете на 1 г ткани. Параметры биоритма G6PD: мезор – 8,37 мкмоль НАДФН /мг/мин, акрофаза – PhiMin – 12,47 часа; PhiMax – 22,51 часа; параметры биоритма 6PGD: мезор равен 0,847 мкмоль НАДФН /г/мин, амплитуда – 1,240 мкмоль НАДФН /г/мин., PhiMin – 12,64; PhiMax – 23,12, при разных способах расчета активности дегидрогеназ ПФП в СТК мышей повышение активности наблюдается со второй половины дня до полуночи.

Результаты косинор-анализа хронограмм активности дегидрогеназ ПФП в СТК кроликов отражены в табл. 4.

Таблица 4 – Параметры средних синусоид группового косинор-анализа суточного профиля активности дегидрогеназ ПФП в СТК кроликов

| Период | Средние | X | Y | H | A | Phi | Delta |
|--|---------|--------|--------|--------|-------|--------|---------|
| G6PD мкмоль НАДФН /г/мин | | | | | | | |
| 24 ч | Средние | -0,353 | -0,144 | 1,649 | 0,381 | 13,485 | 0,000 |
| | Эллипс | Sx | Sy | r | a | b | Teta |
| P = 95 % | | 0,133 | 0,103 | -0,529 | 0,560 | 0,293 | -32,200 |
| Параметры эллипса средней синусоиды активности G6PD мкмоль НАДФН /г/мин | | | | | | | |
| Amin | Amax | PhiMin | PhiMax | СкоH/n | MinH | MaxH | |
| 0,06 | 0,92 | 0 | 23,96 | 0,13 | 1,14 | 2,25 | |
| G6PD мкмоль НАДФН /мг/мин | | | | | | | |
| 24 ч | Средние | -2,721 | -1,068 | 20,118 | 2,923 | 13,428 | 0,000 |
| | Эллипс | Sx | Sy | r | a | b | Teta |
| P = 95 % | | 1,512 | 1,006 | -0,148 | 5,718 | 3,700 | -9,746 |
| Параметры эллипса ошибок средней синусоиды активности G6PD мкмоль НАДФН /мг/мин | | | | | | | |
| Amin | Amax | PhiMin | PhiMax | СкоH/n | MinH | MaxH | |
| 1,96 | 8,52 | 0 | 23,99 | 1,13 | 17,52 | 25,66 | |
| 6PGDG мкмоль НАДФН /г/мин | | | | | | | |
| 24 ч | Средние | -0,349 | 0,201 | 1,936 | 0,402 | 10,002 | 0,000 |
| | Эллипс | Sx | Sy | r | a | b | Teta |
| P = 95 % | | 0,093 | 0,111 | -0,242 | 0,437 | 0,322 | 116,904 |
| Параметры эллипса ошибок средней синусоиды активности 6PGD мкмоль НАДФН /г/мин | | | | | | | |
| Amin | Amax | PhiMin | PhiMax | СкоH/n | MinH | MaxH | |
| 0,03 | 0,81 | 4,31 | 13,66 | 0,05 | 1,72 | 2,1 | |
| 6PGDG мкмоль НАДФН /мг/мин | | | | | | | |
| 24 ч | Средние | -1,328 | 0,216 | 22,785 | 1,346 | 11,384 | 0,000 |
| | Эллипс | Sx | Sy | r | a | b | Teta |
| P = 95 % | | 1,053 | 1,668 | 0,224 | 6,356 | 3,789 | 77,407 |
| Параметры эллипса ошибок средней синусоиды активности 6PGD мкмоль НАДФН /мг/мин | | | | | | | |
| Amin | Amax | PhiMin | PhiMax | СкоH/n | MinH | MaxH | |
| 1,66 | 7,66 | 0,00 | 23,99 | 0,61 | 20,44 | 25,64 | |

В СТК кроликов достоверный 24 часовый суточный ритм выявлен только для активности бРD в расчете на 1 ткани: мезор – 1,94 НАДФН /г/мин, амплитуда -0,40 мкмоль НАДФН /г/мин.; PhiMin – 4,31 часа; PhiMax –13,66 часа. Таким образом, в СТК кроликов у статистически достоверного ритма активности бРGD с 24 часовым периодом подъем активности фермента соответствует восходу солнца в мае и завершается в полдень.

Данные косинор-анализа не в полной мере согласуются с результатами ANOVA (табл. 1, 2) и множественных апостериорных сравнений (рис. 1, 2), что может отражать как наличие у дегидрогеназ СТК экспериментальных животных ритмов, отличных от 24 часовых, так и разные хронотипы беспородных животных.

Для выявления ритмов с более коротким периодом необходим отбор проб у животных как минимум через 4 часа, а ритмов с периодом, превышающим 24 часа – многодневный эксперимент.

Как было показано нами ранее, при разных хронотипах беспородных крыс параметры суточных профилей активности одного и того же фермента в органе разных животных изменяются в широком диапазоне, особенно выражено смещение акрофаз на шкале времени [7].

Результаты графического анализа 24 часовых синусоид активности дегидрогеназ в расчете на 1 г ткани СТК мышей и кроликов отражены на рис. 3 и 4.

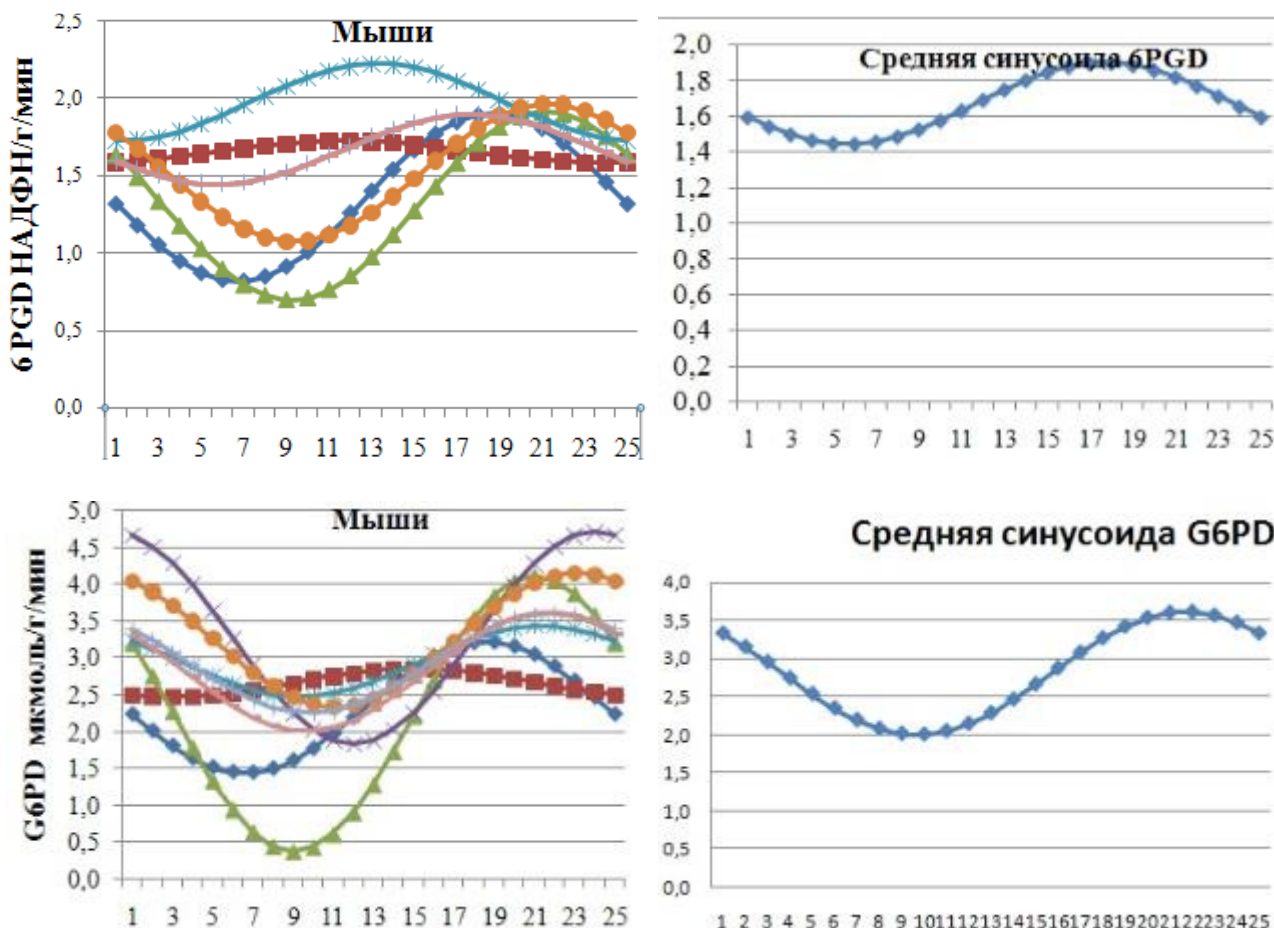


Рисунок 3 – Пучок расчетных синусоид хронограмм удельной активности дегидрогеназ ПФП в СТК мышей

Представленные на рис. 3 синусоиды активности ферментов отражают разное положение мини – и акрофаз, разное значение мезоров, разные амплитуды. Это обстоятельство определяет широкий временной интервал акрофаз, усредненные значения

мезоров и амплитуд и, как следствие, широкий диапазон параметров эллипса ошибок и недостоверность среднего 24 часового ритма. В соответствии с положением мини - и акрофаз на шкале времени суток (рис. 3) четко видно, что в 8-10 часов утра активность обеих дегидрогеназ в СТК мышей минимальна, а 21- 22 часа вечера – она максимальна.-

Пучок синусоид хронограмм удельной активности G6PD и 6PGD СТК кроликов представлен на рис. 4. Синусоиды активности ферментов так же отражают разное положение мини – и акрофаз, разное значение мезоров, разные амплитуды. Тем не менее, в пучке синусоид активности 6PGD согласованность фаз на протяжении суток более выражена, чем у G6PD и, как следствие, параметры средней синусоида характеризуют достоверный 24 часовой суточный ритм активности фермента; максимум активности фермента соответствует 10-11 часам утра, а минимум – 23-24 часам.

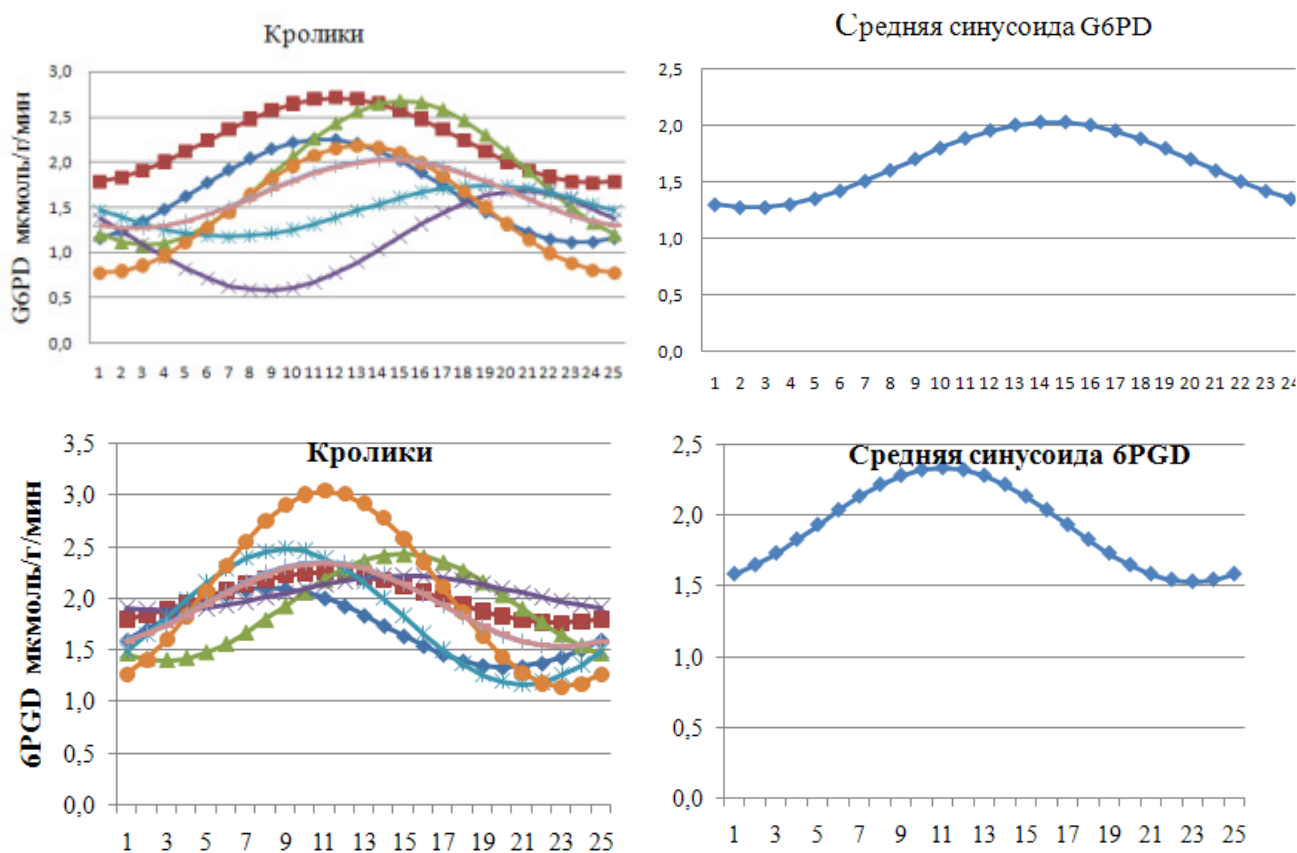


Рисунок 4 – Пучок расчетных синусоид хронограмм удельной активности дегидрогеназ ПФП в СТК кроликов

Таким образом, результаты макро- и микро - хронометрического анализа активности дегидрогеназ ПФП в СТК мышей и кроликов свидетельствуют про присущие как G6PD, так и 6PGD суточные и околосуточные ритмы. Параметры средних синусоид активности ферментов в СТК мышей и кроликов свидетельствуют о близости значений мезоров и амплитуд, но разном положении акрофаз. У дневных животных – кроликов максимум активности G6PD в СТК приходится на 14-15 часов, 6PGD – на 11 -12 часов. У ночных животных – мышей – максимум активности G6PD соответствует 21-22 часам, 6PGD – 18-19 часам. Таким образом, акрофазы активности дегидрогеназ ПФП в СТК ночных и дневных животных смещены практически на 8 часов; акрофазы активности G6PD опережают таковые 6PGD как у мышей, так и кроликов на 3 часа.

Механизмы регуляции активности дегидрогеназ ПФП в СТК ночных и дневных животных еще предстоит изучить с использованием современных методических возможностей [7,8].

Принимая во внимание ключевую роль структуры суточных ритмов в современной хронобиологии, хронотоксикологии и хронофармакологии [3], новейшие данные литературы о влиянии времени приема пищи на структуру суточных ритмов в органах и тканях, определяющей роли структуры суточного ритма метаболизма в сохранении здоровья [2], расширение и углубление исследований суточных ритмов ключевых ферментов метаболических путей – актуальная проблема современности.

ВЫВОДЫ

1. Активность G6PD и 6PGD СТК нелинейных белых мышей и белых калифорнийский кроликов зависит от времени суток.
2. Акрофаза активности G6PD и 6PGD в СТК мышей наблюдается во второй половине дня с максимумом у G6PD в 21-22 часа, у 6PGD 18-19 часов.
3. Акрофаза активности G6PD и 6PGD в СТК кроликов наблюдается в первой половине дня с максимумом у G6PD в 14-15 часов, у 6PGD – 11-12 часов.
4. Параметры суточного ритма активности дегидрогеназ ПФП в СТК инбредных мышей и кроликов характеризует широкий диапазон колебаний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Circadian variation of mitochondrial succinic dehydrogenase and microsomal cytochrome P-450 dependent monooxygenase activity in the liver of sexually immature and mature rats / E. Wielgus-Seraficska, A. Plewka, M. Kamiecki // *J Physiol Pharmacol.* – 1993. – V. 44, №1. – P. 55-63.
2. Калинина Е. В. Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редокс-зависимых процессах / Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, А. Н. Саприн // *Успехи биологической химии.* – 2008. – Т. 48. – С. 319-331.
3. Singh Rupali. Review on Chronotherapeutics – A New Remedy in the Treatment of Various Diseases / Singh Rupali, Kumar Sharma Pramod and Malviy Rishabha // *European Journal of Biological Sciences.* – 2010. – V. 2, 3. – P. 67-76.
4. Рузак Б. Ритмы поведения позвоночных / Б. Рузак // *Биологические ритмы* Т. 1 Под ред. Ю. Ашоффа. – М.: Мир, 1984 – С. 200-228.
5. Cugini P. Chronobiology: Principles and Methods / P. Cugini // *Annali Istituto Superiore di Sanita* – 1993. – V. 29. – P. 483-500.
6. Омелянчик Л.А. Суточный ритм активности глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы и 6-фосфоглюконат дегидрогеназы в СТК крыс / Л.А. Омелянчик, Н.В. Колесник, Е.А. Бражко // *Актуальні питання біології, екології та хімії. [Електронний ресурс] / Запорізький національний університет* // 2011. – Т. 3, №1. – С. 37-43. Режим доступу <http://sites.znu.edu.ua/bio-eco-chem-sci/>.
7. Eckel-Mahan K. Metabolism and the Circadian Clock Converge / Kristin Eckel-Mahan, Paolo Sassone-Corsi // *Physiol Rev.* – 2013. – V. 93, № 1 – P. 107-135.
8. Oren Froy Metabolism and Circadian Rhythms—Implications for Obesity / Oren Froy // *Endocrine Reviews.* – 2010. – V. 31, № 1. – P. 1-24.