

RITMO GIORNALIERO DELLA LATTICODEIDROGENASI (LDH) NEL RATTO (*RATTUS NORVEGICUS*): VALUTAZIONE SU SIERO E FEGATO**DAILY RHYTHM OF LACTATE DEHYDROGENASE IN RAT (*RATTUS NORVEGICUS*): ASSESSMENT ON SERUM AND LIVER**

Costa A.,¹ Castañón-Cervantes O.,² Menaker M.,² Piccione G.,¹ Caola G.¹ ¹Dipartimento di Morfologia, Biochimica, Fisiologia e Produzioni Animali – Sezione di Fisiologia Veterinaria, Università di Messina. ²Department of Biology, University of Virginia.

Parole chiave: Western Blot, Latticodeidrogenasi, ritmo giornaliero, ratto.

Key words: Western Blot, Lactate dehydrogenase, daily rhythm, rat.

SUMMARY – Daily pattern of lactate dehydrogenase activity in serum and content in liver of *Per1*-luciferase homozygous Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were assessed in serum by means of a commercial kit and in liver using the Western Blot. Results showed rhythmicity of LDH both in liver and serum with different waveforms and acrophases. This may be explained by the presence of the 5 LDH isoenzymes in serum but not in tissues. The results show that LDH enzyme activity and protein levels have different daily pattern.

INTRODUZIONE – Il nucleo soprachiasmatico è il maggiore oscillatore circadiano⁽³⁾ che coordina sia attività comportamentali sia processi fisiologici nei mammiferi⁽¹¹⁾ e risulta sincronizzato dall'alternanza luce-buio. L'individuazione di un'attività ritmica che precede l'ingestione dell'alimento ed il suo mantenimento anche in condizioni di illuminazione costante, dimostra che i ritmi circadiani possono essere regolati da un sistema multioscillatorio⁽¹²⁾. In particolare, il fegato⁽⁸⁾ ed altri organi periferici hanno mostrato una ritmicità circadiana della luciferasi in ratti transgenici *Per1*-luciferasi⁽¹⁰⁾ e tale ritmicità è risultata essere influenzata da diversi sincronizzatori esterni come, ad esempio, l'ingestione dell'alimento^(1,2,7). Scopo della presente indagine è stato quello di valutare l'andamento giornaliero della latticodeidrogenasi, quale indicatore della funzionalità epatica, sul siero e su campioni di tessuto epatico nel ratto mantenuto in condizioni di fotoperiodo artificiale.

MATERIALI E METODI – Per la nostra indagine sono stati utilizzati 48 ratti omozigoti Wistar (*Rattus norvegicus*) transgenici (*Per1*-luciferasi) di 70 giorni di età (6 per ogni punto tempo). I soggetti, sottoposti ad un fotoperiodo di 12 ore di luce (dalle 05.00 EST) e 12 di buio (dalle 17.00 EST), previa anestesia con alotano, venivano sacrificati ogni 3 ore per 24 ore. Immediatamente dopo la decapitazione venivano prelevati i campioni di sangue e di fegato. Sui sieri ottenuti è stata determinata prontamente l'attività della latticodeidrogenasi mediante spettrofotometria in UV utilizzando kit commerciali (International Bio-Analytical Industries). I campioni di tessuto epatico venivano immediatamente stoccati a -80°C fino al momento dell'analisi che prevedeva l'omogeneizzazione dei campioni, la centrifugazione ed il trattamento termico a 95°C per 5 minuti del surnatante così ottenuto; sui campioni individuali è stata quindi applicata la tecnica Western Blot basata sulla precipitazione elettroforetica delle proteine in gel SDS al 10% utilizzando anticorpi anti-LDH ed anti- β -actina. Quest'ultimo anticorpo veniva utilizzato in qualità di controllo dato che, a livello epatico, non presenta alcuna ritmicità. La parte sperimentale è stata effettuata presso il Department of Biology – University of Virginia rispettando la vigente normativa sul trattamento degli animali da laboratorio emanata dal governo degli Stati Uniti e dalla ACUC (Animal Care and Use Committee). L'elaborazione statistica dei dati relativi ai campioni sierici e tissutali ottenuti nei differenti punti tempo equidistanti 3 ore è stata effettuata sui valori medi poiché la varianza intragruppo è risultata non significativa. Su tali valori sono stati applicati l'ANOVA ad una via ed il metodo del singolo cosinor come descritto da Nelson et al.⁽⁴⁾. Le migrazioni elettroforetiche ottenute su lastra di cellulosa mediante Western Blot sono state rappresentate graficamente utilizzando un programma di computerizzato di elaborazione di immagini (ImageJ).

RISULTATI – In figura 1 è riportato l'andamento dell'attività della latticodeidrogenasi sierica. L'applicazione dell'ANOVA ci ha permesso di evidenziare una differenza statisticamente significativa dell'enzima considerato ($F_{(7,40)}=3.03$; $P<0.05$), mentre l'applicazione del test di Bonferroni ai diversi punti tempo ha messo in evidenza differenze statisticamente significative soltanto per ZT14 vs. ZT2 e vs. ZT11