

<https://doi.org/10.3176/biol.1978.2.03>

УДК 616.36:612.015.1:612.018

Линда КИЛЬДЕМА

ВЛИЯНИЕ ГИДРОКОРТИЗОНА НА АКТИВНОСТЬ ИЗОФЕРМЕНТОВ ПИРУВАТКИНАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫС

Пируваткиназа (ПК; КФ 2.7.1.40) является катализатором одной из трех термодинамически необратимых реакций гликолиза — превращения фосфоэнолпирувата в пируват. Этот фермент имеет в органах животных различные молекулярные формы — изоферменты (Fellenberg и др., 1963; Tanaka и др., 1965; Susor, Rutter, 1968; Bigley и др., 1968; Kahn и др., 1976). В ткани печени существуют две различные по иммунологическим, электрофоретическим и кинетическим свойствам формы ПК (Tanaka и др., 1965; Susor, Rutter, 1968). Из них количественно преобладающий *L*-тип изофермента ПК чувствителен к аллостерическому влиянию метаболитов (Tanaka и др., 1967; Susor, Rutter, 1968; Taylor, Bailey, 1967; Seubert, Schoner, 1971) и адаптирован к действию гормональных и алиментарных факторов (Tanaka и др., 1967; Middleton, Walker, 1972; Seubert, Schoner, 1971). Экспериментальные данные показывают, что *L*-тип изофермента активируется фруктозо-1,6-дифосфатом, а также другими фосфорилированными гексозами (Susor, Rutter, 1968; Krebs, Eggleston, 1965; Taylor, Bailey, 1967; Berkel и др., 1974; Rozengurt и др., 1973) и ингибируется АТФ и *l*-аланином (Tanaka и др., 1967; Susor, Rutter, 1968; Taylor, Bailey, 1967). Второй изофермент ПК печени — *M*-тип — мало чувствителен к действию гормонов, и влияние метаболитов на нем значительно менее выражено, чем у *L*-типа (Tanaka и др., 1965, 1967).

В литературе имеются данные, что биосинтез ПК печени крыс уменьшается при аллоксановом диабете и индуцируется инсулином (Weber и др., 1966). Показано также, что гидрокортизон при многократном введении приводит к снижению активности ПК печени у крыс (Dakshinamurti, Ho Chong Hong, 1970), которую можно в значительной степени нормализовать введением биотина. Данные литературы о влиянии гормона на изоферменты ПК печени очень немногочисленны. Т. Танака и сопр. (Tanaka и др., 1967) показали, что из двух изоферментов ПК печени крыс инсулин-чувствительным является только *L*-тип. Показано также, что активность изофермента ПК *L*-типа понижается при голодании и повышается при высокоуглеводной диете (Sandoval, Carbonell, 1973).

Эти наблюдения, а также необратимость пируваткиназной реакции указывают на то, что ПК играет важную роль в определении динамического баланса между гликолизом и глюконеогенезом (Krebs, Eggleston, 1965; Weber, 1969). Ввиду этого, изучение ее регуляции с помощью гормонов, несомненно, представляет интерес.

Материал и методика

Исследования проводили на взрослых крысах-самцах линии Вистар. Гидрокортизон (фирма «Рихтер», Венгрия) вводили животным внутримышечно в течение 7 дней. В первый день вводили один раз 2,5 мг препарата на 100 г веса крысы, а в следующие 6 дней такую же дозу вводили два раза в день. Таким образом, общая доза гидрокортизона составляла 32,5 мг на 100 г веса животного. После последней инъекции, т. е. за 17 ч до опыта, животным не давали корма, они получали только воду.

Опыты проводились в двух сериях. В первой серии определяли общую активность ПК печени у контрольных крыс и у крыс, получивших гидрокортизон, во второй — с помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе выделяли изоферменты ПК как у контрольных, так и у подопытных животных.

Для получения растворимой фракции (цитозоля) клеток печени животных декапировали, печень извлекали и 2 г (для выделения изоферментов 4 г) ткани печени гомогенизировали с двойным объемом 0,01 М трис-НСI-буфера (рН 7,5), содержащего 0,25 М сахарозы и 0,001 М ЭДТА. Гомогенат центрифугировали на холоду при 9000 г в течение 10 мин, а затем при 15 000 г в течение 20 мин. Полученную надосадочную жидкость (цитозоль) использовали после разведения вышеуказанным раствором для определения общей активности ПК. Для выделения изоферментов ПК после первого центрифугирования супернатант подвергали второму центрифугированию в центрифуге VAC-60 при 50 000 г в течение 60 мин.

Хроматографирование изоферментов ПК печени проводили в колонке (20×150 мм), заполненной ДЭАЭ-целлюлозой (номинальная емкость 0,60—0,80 экв/г), в 0,01 М трис-буфере, содержащем 0,25 М сахарозы и 0,001 М ЭДТА. Разделение изоферментов ПК осуществляли в ступенчатом градиенте концентраций КСI (0—0,5 М). На колонку наносили 5 мл растворимой фракции печени 7—8 животных. Фракции элюата собирали по 3—4 мл. Всего собирали до 220 мл элюата. Хроматографию проводили при 4—8 °С.

Активность ПК печени определяли в растворимой фракции и элюате по нарастанию количества пирувата (Тапака и др., 1967). Состав инкубационной смеси: 50 мкМ трис-НСI-буфера (рН 7,5), 2 мкМ фосфоэнолпирувата, 2 мкМ АДФ, 5 мкМ MgSO₄, 100 мкМ КСI и 0,1 мл исследуемой фракции. Инкубацию проводили при 30° в течение 3 мин, затем на водяной бане к пробе добавляли 0,5 мл 2,4-динитрофенил-гидразина, по истечении 10 мин — 10 мл 2,5%-ного раствора NaOH и через 10 мин выдерживания при комнатной температуре измеряли на спектрофотометре (при 510 нм). Контрольные пробы не содержали АДФ. Стандартные кривые получали при использовании в качестве стандарта раствора натрия пирувата.

Активность ПК печени выражали в микромолях пириновградной кислоты, образованной за 1 ч инкубации при 30° на 1 мг белка, а в элюате — на 1 мл фракции и на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури. Результаты подвергались вариационно-статистической обработке (*t*-тест Стьюдента).

Результаты и обсуждение

Результаты по изучению влияния гидрокортизона на активность ПК печени крыс показывают (табл. 1), что у взрослых крыс средняя активность ПК составляла $1,82 \pm 0,20$ мкмоль пирувата на 1 мг белка в час. При 7-дневном введении гидрокортизона наблюдалось снижение активности фермента в среднем на 25%.

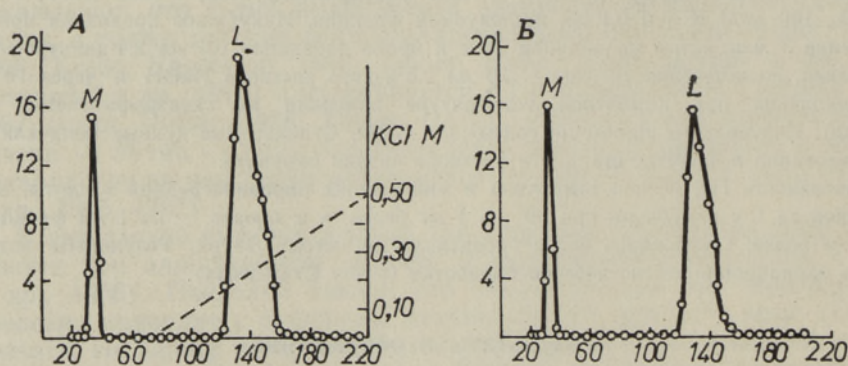
По данным литературы (Firth, Hales, 1968), гидрокортизон не оказывает на ферменты гликолиза, в том числе и на активность ПК, существенного влияния. Наши данные согласуются с результатами из литературы (Dakshinamurti, Ho Chong Hong, 1970), где при 6-дневном введении гидрокортизона в дозе 1,2 мг на 100 г веса тела было получено снижение активности ПК. Однако подавление активности фермента,

Таблица 1

Группа	Число опытов	Активность, (мкмоль/мг белка) · ч	P	Уменьшение активности, %
Контроль	7	1,82±0,20	—	—
Опыт (гидрокортизон)	8	1,36±0,12	<0,05	25,3

по их данным, было заметно сильнее (на 66%), чем в наших опытах. По-видимому, различия в степени ингибирующего влияния гормона на активность ПК объясняются метаболическими особенностями, вызванными применением различных доз препарата, а также тем, что в наших опытах животные были по возрасту старше, чем в опытах названных авторов.

При хроматографическом фракционировании изоферментов ПК печени на ДЭАЭ-целлюлозе получены два пика (две фракции) активности. Первая фракция (M-тип) изофермента не адсорбировалась на ДЭАЭ-целлюлозе и элюировалась из колонки в исходном 0,01 M трис-HCl-буфере (рН 7,5), содержащем 0,25 M сахарозы и 0,001 M ЭДТА. Вторая фракция (L-тип) элюировалась при 0,15—0,20 M KCl (рисунок, А). Представленная хроматограмма изоферментов ПК аналогична хроматограммам, полученным другими авторами (Farina и др., 1974). По данным планиметрирования площади пиков и по соответствующим вычислениям большую активность ПК содержал второй пик — 88%, а первый пик — лишь 12% общей активности фермента печени. В литературе имеются сведения, что соотношение активности изоферментов ПК печени L- и M-типов различное у разных пород крыс. Так, у крыс Sprague-Dowley L-тип изофермента ПК печени составлял 67% общей активности, а M-тип — 33%, у крыс Вистар соответствующие показа-



Влияние гидрокортизона на изоферменты ПК печени крыс. А — хроматограмма изоферментов ПК печени, полученная на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой у контрольных крыс, Б — хроматограмма, полученная при введении гидрокортизона. L и M — типы изоферментов ПК печени; на абсциссе — активность ПК, (мкмоль/мл элюата) · ч, на ординате — количество элюата, мл (средние данные печени 7—8 животных).

тели были 95 и 5% (Middleton, Walker, 1972). Полученные в настоящей работе показатели очень близки к показателям из литературы (Farina и др., 1974), по которым у крыс Вистар L-тип изофермента составлял 90% и M-тип 10% общей активности ПК печени.

При введении гидрокортизона наблюдалось уменьшение фракции изофермента ПК *L*-типа, в то время как изофермент *M*-типа существенно не изменялся (рисунок, Б). По данным табл. 2 видно, что при введении гидрокортизона *L*-тип изофермента составлял 81% общей активности ПК. Удельный вес *M*-типа изофермента возрос за счет уменьшения фракции изофермента *L*-типа, составляя 19%, хотя его фракция под влиянием гидрокортизона существенно не изменялась.

Таким образом, наши результаты показывают, что при 7-дневном введении гидрокортизона крысам происходит снижение активности изофермента ПК печени *L*-типа, а активность изофермента *M*-типа существенно не изменяется.

Таблица 2

Распределение изоферментов ПК печени крыс при введении гидрокортизона

Группа	Число опытов	Активность, (мкмоль/мг белка) · ч			Процентное соотношение изоферментов	
		общая	<i>L</i> -тип	<i>M</i> -тип	<i>L</i> -тип	<i>M</i> -тип
Контроль	7	1,70	1,49	0,21	88	12
Опыт	8	1,27	1,03	0,24	81	19

Об ингибирующем влиянии глюкокортикоидов на активность ключевых ферментов гликолиза, в том числе и ПК, в литературе отсутствует единое мнение. Можно предположить, что введение гидрокортизона вызывает в организме избыточную концентрацию глюкокортикоидов; в результате чего изменяется гомеостатический баланс между глюкокортикоидами и инсулином в пользу первых, и следовательно, регулирующее влияние инсулина на метаболические процессы гликолиза является недостаточным. А инсулин, как уже отмечено (Тапака и др., 1967), оказывает на активность изофермента ПК *L*-типа стимулирующее влияние. Кроме того, понижение активности изофермента *L*-типа печени, а также коры почек при диабете и голодании, т. е. при избыточном содержании глюкокортикоидов и дефиците инсулина, отмечено и другими авторами (Middleton, Walker, 1972; Sandoval, Carbonell, 1973; Кожевникова, 1976).

Неоднократно показано, что глюкокортикоиды индуцируют ключевые ферменты глюконеогенеза, вероятно, усиливая синтез новых ферментных белков (Weber, Singhal, 1964; Weber и др., 1965), и вызывают увеличение глюконеогенеза. Известно также, что глюкокортикоиды вызывают мобилизацию предшественников углеводов, преимущественно аминокислот (аланин, глицин и др.), из периферической ткани для нужд глюконеогенеза в печени (Rosen, Nichol, 1963; Кендыш, 1972). В связи с этим следует отметить, что *l*-аланин как самая важная «гликогенная» аминокислота в условиях *in vitro* в физиологических концентрациях обладает способностью ингибировать ПК (Llorenti и др., 1970).

На основе сказанного кажется вероятным, что влияние гидрокортизона на активность ПК печени (*L*-типа изофермента) реализуется с участием других гормональных факторов и метаболических процессов, в частности глюконеогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

- Кендыш И. Н., 1972. О роли глюкокортикоидов в регуляции углеводного обмена в печени. Успехи современной биологии 74 (3(6)) : 368—384.
- Кожевникова К. А., 1976. Влияние инсулина и гидрокортизона на изоферментный состав пируваткиназы в почках кролика. Вопр. мед. химии 22 (6) : 773—778.
- Bailey, E., Stirpe, F., Taylor, C. B., 1968. Regulation of rat liver pyruvate kinase. The effect of preincubation, pH, copper ions, fructose-1,6-diphosphate and dietary changes on enzyme activity. Biochem. J. 108 (3) : 427—436.
- Berkel van, Th. J. C., Koster, J. F., Kruyt, J. K., Hülsmann, W. C., 1974. On the regulation and allosteric model of L-type pyruvate kinase from rat liver. Biochim. Biophys. Acta 370 : 450—458.
- Bigley, R. H., Stenzel, R., Johnes, R. T., Campos, J. O., Koler, R. D., 1968. Tissue distribution of human pyruvate kinase isozymes. Enzymol. biol. Clin. 9 : 10—20.
- Dakshinamurti, K., Ho Chong Hong, 1970. Regulation of key hepatic glycolytic enzymes. Enzymol. biol. Clin. 11 (5) : 423—428.
- Farina, F. A., Shatton, J. B., Morris, H. P., Weinhouse, S., 1974. Isoenzymes of pyruvate kinase in liver and hepatomas of the rat. Cancer Res. 34 (6) : 1439—1446.
- Fellenberg von, R., Richerich, R., Aebi, H., 1963. Elektrophoretisch verschiedene wandernde Pyruvat-Kinasen aus einigen Organen des Ratte. Enzymol. biol. Clin. 3 : 240—250.
- Firth, C. M., Hales, C. N., 1968. The relationship of some rat liver glycolytic enzyme activities to plasma insulin concentration. Biochim. Biophys. Acta 156 (2) : 411—413.
- Kahn, A., Marie, J., Boivin, P., 1976. Pyruvate kinase isoenzymes in man. II. L-type and erythrocyte-type isoenzymes. Electrofocusing and immunologic studies. Human Genet. 33 (1) : 36—46.
- Krebs, H. A., Eggleston, L. V., 1965. The role of pyruvate kinase in the regulation of glyconeogenesis. Biochem. J. 94 : 291—292.
- Llorenti, P., Marco, R., Sols, A., 1970. Regulation the liver pyruvate kinase and the phosphoenolpyruvate crossroads. Europ. J. Biochem. 13 (1) : 45—54.
- Middleton, M. C., Walker, D. C., 1972. Comparison of the properties of two forms of pyruvate kinase in rat liver and determination of their separate activities during development. Biochem. J. 127 : 721—731.
- Rosen, S., Nichol, C. A., 1963. Changes in alanine transaminase activity related to corticosteroid treatment or capacity for growth. Adv. Enzyme Regul. 1 : 341—361.
- Rozengurt, E., Jimenez de, A. L., Carminatti, H., 1973. Stabilization of different conformational states of liver pyruvate kinase type L by the allosteric activators. FEBS Letters 37 (2) : 225—227.
- Sandoval, I. V., Carbonell, J., 1973. Adaptability of pyruvate kinase L in the rat kidney and reticulocytes without accompanied changes in the A isoenzyme. Biochem. Biophys. Acta 315 (2) : 343—346.
- Seubert, W., Schoner, W., 1971. The regulation of pyruvate kinase. Curr. Topics Cellular Regul. 3 : 237—267.
- Susor, W. A., Rutter, W. A., 1968. Some distinctive properties of pyruvate kinase purified from rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30 : 14—20.
- Tanaka, T., Harano, Y., Morimura, H., Mori, R., 1965. Evidence for the presence of two types of pyruvate kinase in rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 21 : 55—60.
- Tanaka, T., Harano, Y., Sue, F., Morimura, H., 1967. Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinase isolated from rat tissues. J. Biochem. 62 : 71—91.
- Taylor, C. B., Bailey, E., 1967. Activation of liver pyruvate kinase by fructose-1,6-diphosphate. Biochem. J. 102 : 32c—33c.
- Weber, G., 1969. Regulation of pyruvate kinase. Adv. Enzyme Regul. 7 : 15—40.
- Weber, G., Lea, M. A., Fisher, E. A., Stamm, N. B., 1966. Regulatory pattern of liver carbohydrate metabolizing enzymes. Insulin as inductor of key glycolytic enzymes. Enzymol. biol. Clin. 7 : 11—24.
- Weber, G., Singhal, R. L., 1964. Actinomycin, puromycin and ethionine inhibition of synthesis of gluconeogenic enzymes in acute diabetes. Metabolism 13 : 8—11.

Weber, G., Srivastava, S. K., Singhal, R. L., 1965. Role of hormones in homeostasis. VII. Early effects of corticosteroid hormones on hepatic glyconeogenic enzymes, ribonucleic acid metabolism and amino acid level. *J. Biol. Chem.* 240 (2) : 750—756.

Институт экспериментальной и
клинической медицины
Министерства здравоохранения ЭССР

Поступила в редакцию
4/II 1977

Linda KILDEMA

HÜDROKORTISOONI TOIME ROTI MAKSA PÜRUAATKINAASI ISOFERMENTIDELE

Resüme

Uuriti hüdrokortisooni toimet Wistar-rottide maksa püruvaatkinaasi (PK) aktiivsusele ja isofermentidele. Hüdrokortisooni manustati musklisisi 7 päeva jooksul, esimesel päeval 2,5 mg 100 g kehakaalu kohta 1 kord, kuuel järgneval sama annus 2 korda päevas. Kokku said katseloomad 32,5 mg hüdrokortisooni 100 g kehakaalu kohta.

Selgus, et hüdrokortisooni toimel vähenes PK aktiivsus maksas keskmiselt 25% võrra. PK isofermentide kromatograafilisel eraldamisel DEAE-tsellulooskolonnis saadi kaks isofermenti fraktsiooni — L- ja M-tüüpi isoferment. Üldaktiivsusest moodustas L-tüüpi isofermenti aktiivsus keskmiselt 88%, M-tüüpi isofermenti aktiivsus 12%. Hüdrokortisooni toime PK isofermentidele avaldus L-tüüpi isofermenti aktiivsuse pidurdumises, kuna M-tüüpi isofermenti aktiivsus oluliselt ei muutunud.

ENSV Tervishoiu Ministeeriumi
Ekspimentaalse ja Kliinilise
Meditsiini Instituut

Toimetusse saabunud
4. II 1977

Linda KILDEMA

EFFECT OF HYDROCORTISONE ON THE PYRUVATE KINASE IN THE RAT LIVER

Summary

The effect of hydrocortisone on the pyruvate kinase (PK) activity and upon its isoenzymes in the liver of Wistar rats was studied. Hydrocortisone was administered to rats by intramuscular injections during 7 days, once on the first day by the dose of 2.5 mg per 100 g of body weight, and twice on the following 6 days. The total dose of hydrocortisone administered to the animals was about 32.5 mg per 100 g body weight.

It has been ascertained that the administration of hydrocortisone caused a decrease in the liver PK activity by as much as 25 per cent. By chromatographic elution in the DEAE-cellulose column, two fractions of PK isoenzymes, the L- and M-type, were obtained. About 88 per cent belonged to the L-type, and about 12 per cent to the M-type of the common PK activity. The administration of hydrocortisone caused a decrease in the L-type isoenzyme activity, while the activity of the M-type PK isoenzyme was not altered.

Ministry of Health of the Estonian SSR,
Institute of Experimental and Clinical Medicine

Received
Feb. 4, 1977