

УДК 616.853—07:616.831—008.931:577.152.24

РЕГУЛЯЦИЯ ГЛИКОЛИЗА В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС ЭСТРАДИОЛОМ-17 β И ПРОГЕСТЕРОНОМ

КОСТАНЫН А. А., КАЗАРЯН Б. А., НАЗАРЯН К. Б.
Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

Изучено влияние эстрадиола-17 β и прогестерона на активность восьми гликолитических ферментов головного мозга самок крыс. Обнаружена гормональная регуляция трех ключевых ферментов гликолиза—гексокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы и выявлены их гормончувствительные изоферменты. Актиномицин D полностью снимает повышение активности этих ферментов, что свидетельствует в пользу их синтеза *de novo*.

Как известно, головной мозг является тканью-мишенью для ряда гормонов, в том числе женских половых стероидных гормонов—эстрадиола и прогестерона, рецепторы которых локализованы в нервных клетках различных областей головного мозга [1]. Одним из доказательств этому служит большое количество клинических и экспериментальных данных о взаимосвязи между уровнем половых стероидных гормонов и высшей нервной деятельностью человека и животных. Так, например, достоверно установлено, что частота и длительность припадков у женщин-эпилептиков меняется в зависимости от циклических изменений соотношения эстрадиола и прогестерона [2]. С другой стороны, вспышкообразная электрическая активность нейронов в эпилептическом очаге сопряжена с большими энергетическими затратами, и, вероятно, при этом повышается активность ферментов, участвующих в энергетическом обмене. Такая активация была показана для регуляторных ферментов гликолиза при судорогах, вызванных биккуллином [3]. В то же время именно гликолитический путь является главным в регуляции энергетического обмена нейронов, так как через аэробный гликолиз метаболизируется более 90% основного источника энергии в ЦНС—глюкозы. Механизм подобной активации, которая может иметь место как при ферментативной индукции на уровне генома, так и при активации конститутивных ферментов, например, по типу аллостерической регуляции, пока не выяснен. Показано, что в различных регионах головного мозга крыс эстрадиол-17 β вызывает индукцию таких ферментов, как АХЭ, холинэтилтрансфераза, МАО, глюкоза-6-фосфат-дегидрогеназа, малатдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, креатинкиназа и др. [4—7], причем для некоторых из них изучены изменения и на уровне изоферментов. Отно-

сительно влияния эстрадиола и прогестерона на гликолитические ферменты головного мозга в литературе нам не удалось обнаружить каких-либо упоминаний о систематических исследованиях, посвященных этому вопросу. Существуют лишь отдельные работы Luin и соавт. и Кауе и соавт. [6, 8], в которых выявлена эстрадиоловая индукция лактатдегидрогеназы и показано отсутствие таковой для енолазы.

Целью настоящей работы являлось исследование гормональной регуляции гликолиза в головном мозгу самок крыс. Было изучено влияние эстрадиола-17 β и прогестерона на активность гексокиназы (КФ 2.7.1.1), фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11), альдолазы (КФ 4.1.2.13), глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (КФ 1.2.1.12), фосfogлицираткиназы (КФ 2.7.2.3), фосfogлициратмутазы (КФ 2.7.5.3), енолазы (КФ 4.2.1.11) и пируваткиназы (КФ 2.7.1.40), а также изменение изоферментного спектра индуцибельных ферментов при действии эстрадиола-17 β .

Материалы и методы

Эксперименты проводили на самках белых беспородных крыс массой 150—200 г, которым внутривенно вводили эстрадиол-17 β («Sigma», США) в концентрации 0,3 мг/кг массы и прогестерон (Ростовское химическое производственное объединение) в концентрации 30 мг/кг массы. Актинормин Д («Serva», ФРГ) в концентрации 0,3 мг/кг массы вводили за 1 ч до инъекции эстрадиола-17 β . Животных декапитировали через 4 ч после введения гормонов. Ткани головного мозга гомогенизировали в соотношении 1:10 в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8,0 для фосфофруктокиназы и в трис-HCl, pH 7,5 для остальных ферментов. Затем гомогенат центрифугировали при 17000 g в течение 30 мин и надосадочную жидкость использовали в качестве источника ферментов. Цитозольную и мембраносвязанную фракции гексокиназы получали по методу Kellag и соавт. [9]. Белок определяли по Bradford [10]. Определение активности гексокиназы, фосфофруктокиназы, пируваткиназы и фосfogлициратмутазы проводили по методам, описанным Костянян, Манукян [11] и Назаряном и соавт. [12], енолазы—по методу Baranowski, Wolna [13], а фосfogлицираткиназы, альдолазы и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы—по методам, предложенным Bergmeyer [14]. Активность ферментов выражали в мкмоль/мг белка·мин. Аналитическое ИЭФ в 5%-ном ПААГ с амфолинами диапазона 3,5—10 («LKB», Швеция) проводили по методу Winter и соавт. [15]. Гель разрезали на полосы шириной 5 мм и инкубировали в буфере для определения активности каждого фермента при измерении ферментативной активности и в бидистиллированной воде при определении pH элюатов.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, через 4 ч после введения эстрадиола-17 β достоверно повышается активность гексокиназы, фосфофруктокиназы

и пируваткиназы, в то время как активность альдолазы, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы, фосфоглицераткиназы, фосфоглицератмутазы и енолазы остается неизменной (табл. 2). Причем, максимальные изменения претерпевает активность фосфофруктокиназы, и относительно небольшие сдвиги в активности наблюдаются в мембраносвязанной фракции гексокиназы. Известно, что гексокиназа ин-

Таблица 1

Активность гексокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы в головном мозгу крыс через 4 ч после введения гормонов

Серии опыта	Гексокиназа		Фосфофруктокиназа	Пируваткиназа
	цитозольная	мембраносвязанная		
Контроль	$0,954 \pm 0,003$	$0,174 \pm 0,002$	$1,32 \pm 0,02$	$1,85 \pm 0,07$
Эстрадиол-17 β	$0,064 \pm 0,005^*$	$0,191 \pm 0,006^*$	$2,45 \pm 0,09^*$	$3,10 \pm 0,28^*$
Актиномицин D				
Эстрадиол-17 β	$0,053 \pm 0,007$	$0,174 \pm 0,001$	$1,31 \pm 0,05$	$1,96 \pm 0,24$
Прогестерон	$0,046 \pm 0,007^*$	$0,121 \pm 0,005^*$	$0,79 \pm 0,03^*$	$1,51 \pm 0,19^*$

Примечание. Активность ферментов выражена в мкмоль/мг белка·мин. Статистическая обработка по Стьюденту, * $p < 0,05$.

Таблица 2

Активность альдолазы, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы, фосфоглицераткиназы, фосфоглицератмутазы и енолазы в головном мозгу крыс через 4 ч после введения гормонов

Серии опыта	Альдолаза	Глицеральдегид 3-фосфат-дегидрогеназа	Фосфоглицераткиназа	Фосфоглицератмутаза	Енолаза
Контроль	$0,73 \pm 0,02$	$0,139 \pm 0,04$	$0,72 \pm 0,03$	$1,86 \pm 0,07$	$1,01 \pm 0,03$
Эстрадиол-17 β	$0,75 \pm 0,02$	$0,146 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,09$	$1,88 \pm 0,07$	$1,03 \pm 0,01$
Прогестерон	$0,70 \pm 0,05$	$0,130 \pm 0,03$	$0,71 \pm 0,07$	$1,85 \pm 0,07$	$1,02 \pm 0,02$

гибируется глюкозо-6-фосфатом и в головном мозгу она преимущественно находится в ингибированном состоянии. При этом K_i для мембраносвязанной гексокиназы на порядок выше, чем для ее цитоплазматической формы. Поэтому повышение уровня мембраносвязанной гексокиназы даже на несколько процентов достаточно для значительного увеличения скорости фосфорилирования глюкозы [16]. Учитывая тот факт, что основные контрольные механизмы гликолиза осуществляются на трех стадиях, катализируемых гексокиназой, фосфофруктокиназой и пируваткиназой, можно предположить, что повышение активности этих ферментов при воздействии эстрадиола приводит к активации гликолиза в целом. Для механизма действия стероидных гормонов в тканях-мишенях на уровне генома существует классическая модель, по которой на 4-м ч действия эстрадиола наблюдается максимальное усиление тотального биосинтеза белков [17, 8]. Как видно из рис. 1, активность регуляторных ферментов гликолиза достигает максимального повышения именно к 4-му ч после взе-

дения эстрадиола-17 β . К тому же ингибитор белкового синтеза на уровне транскрипции—актиномицин Д полностью снимает это повышение активности гексокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы, что свидетельствует в пользу их синтеза *de novo* (табл. 1).

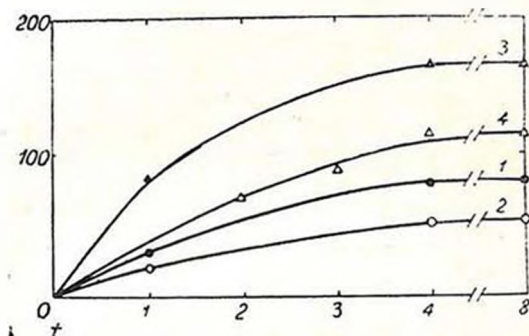


Рис. 1. Активность ключевых ферментов гликолиза головного мозга крыс в зависимости от времени после введения эстрадиола-17 β : 1—цитозольная фракция гексокиназы, 2—мембраносвязанная фракция гексокиназы, 3—фосфофруктокиназа, 4—пируваткиназа. По оси абсцисс—время после введения эстрадиола; по оси ординат—активность ферментов выражена в %. За 100% принимали активность ферментов в контроле

Прогестерон оказывает противоположное эстрадиолу действие—вызывает подавление активности индуцибельных ферментов (табл. 1) и не оказывает влияния на активность остальных ферментов (табл. 2). При этом прогестерон и здесь выступает в роли антагониста эстрадиола, как это имеет место в механизмах обратной связи между эндокринной системой и ЦНС, и, в частности, при модифицирующем действии этих гормонов на эпилептическую активность клеток головного мозга. Однако в рамках вышеупомянутой модели механизма действия стероидов трудно интерпретировать полученные данные.

На рис. 2, а показано, что при помощи ИЭФ в 5%-ном ПААГ с амфолинами диапазона 3,5—10 для цитозольной фракции гексокиназы получено 2 пика активности с ИЭТ при pH 4,9 (1) и 6,1 (2). Поскольку известно, что в головном мозгу содержится ГК I и ГК II в соотношении 10:1 и ИЭТ для ГК I находится при pH 6,2 [18], то полученные пики 1 и 2 можно идентифицировать, как ГК II и ГК I соответственно. Причем гормончувствительным является изофермент ГК II (пик 1 на рис. 2, б), который более резко реагирует и на гипогликемию, вызванную введением инсулина [19]. При этом неудивительно, что не обнаружено никаких различий изоферментных спектров в цитозольной и мембраносвязанной фракциях гексокиназы как в контроле, так и при введении эстрадиола-17 β (рис. 2, а—г), так как в последнее время ряд авторов склоняется в пользу идентичности фермента в этих фракциях [20].

Для фосфофруктокиназы обнаружено 3 пика активности с ИЭТ

при pH 4,5 (1), 5,7 (2) и 8,9 (3) (рис. 3, а). Вероятно, изоэлектрическое разделение изоферментов дает возможность получать только гомотетрамерные формы, хотя вероятность образования гибридных гетеротетрамеров в экстракте тканей головного мозга очень велика. Можно предположить, что пики 1, 2 и 3 соответствуют изоферментам M_4 , B_4 и L_4 фосфофруктокиназы в головном мозгу [21]. Интересно, что чувствительным к действию эстрадиола-17 β оказался именно изофермент B_4 (пик 2 на рис. 3, б), преобладающий в головном мозгу и являющийся наиболее чувствительным к действию ингибиторов и активаторов [22]. По всей видимости, в головном мозгу регуляция фосфофруктокиназы как аллостерическая, так и на уровне генома осуществляется через мозговой изофермент B_4 .

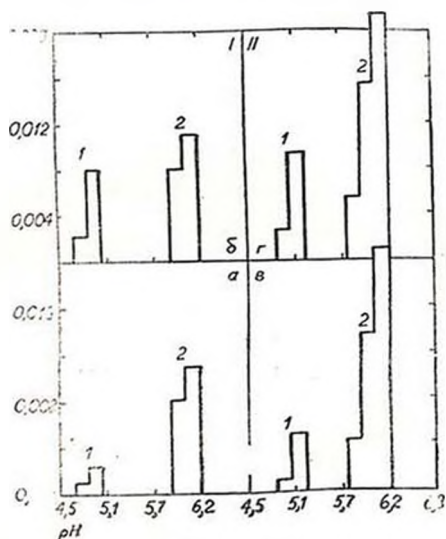


Рис. 2. Активность цитозольной (I) и мембраносвязанной (II) фракций гексокиназы головного мозга крыс после ИЭФ в ПААГ с амфолитами диапазона pH 3,5—10 в контроле (а, в) и при действии эстрадиола-17 β (б, г). Здесь и на рис. 3 по оси ординат—активность фермента выражали в мкмоль·мин

Пируваткиназная активность представлена двумя пиками активности и ИЭТ при pH 5,7 (1) и 6,5 (2) (рис. 3, в). Для идентификации полученных данных был использован очищенный препарат пируваткиназы из мышц кролика («Reanal», Венгрия). Сравнив наши результаты с литературными данными [23], можно сделать вывод о соответствии полученных пиков 1 и 2 с изоферментами пируваткиназы M_4 и K_4 . Как видно из рис. 3, г гормончувствительным является только изофермент K_4 (пик 2), что совпадает с данными литературы об эстрадиоловой индукции этого изофермента в матке [24]. До недавнего времени считалось, что чувствительным к гормональному воздей-

вию может быть только печеночный L-изофермент пируваткиназы, причем для него показана индукция на уровне генома [25]. Полученные нами данные подтверждают возможность эстрадиоловой индукции изофермента K_4 и в других тканях животных.

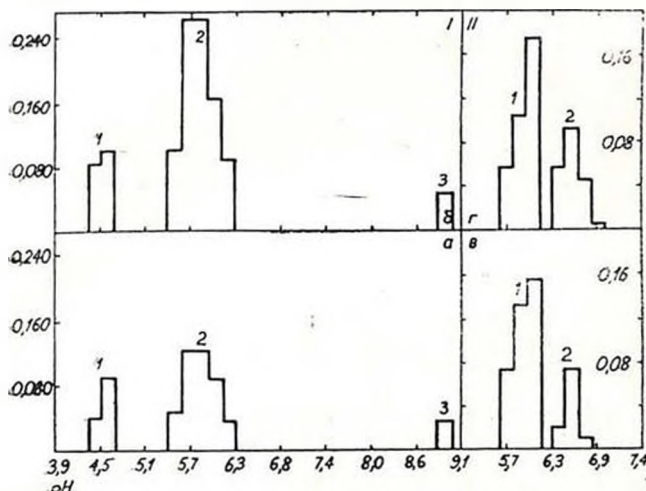


Рис. 3. Активность фосфофруктокиназы (I) и пируваткиназы (II) головного мозга крыс после ИЭФ в ПААГ с амфолинами диапазона pH 3,5—10 в контроле (а, б) и при действии эстрадиола-17 β (б, в).

Таким образом, нами была обнаружена регуляция трех ключевых ферментов гликолиза, а значит и всего гликолиза в целом, которая, по всей видимости, осуществляется через геном нервных клеток. Причем она затрагивает лишь определенные изоферменты индуцибельных ферментов. Очевидно, в нервной ткани целесообразнее существование отдельных изоферментов, чувствительных к действию различного рода регуляторов, в том числе и гормонов. Вполне вероятно, что подобная гормональная регуляция энергетического обмена и служит одним из механизмов модифицирующего действия половых стероидных гормонов на эпилептическую активность клеток головного мозга.

CONTROL OF GLYCOLYSIS BY ESTRADIOL—17 β AND PROGESTERONE IN RAT BRAIN

KOSTANYAN A. A., KAZARYAN B. A., NAZARYAN K. B.

Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenian Republic, Yerevan

The effect of estradiol—17-beta and progesterone on brain glycolytic enzymes of female rats has been studied. The hormonal regulation of three key glycolytic enzymes (hexokinase, phosphofructokinase and

pyruvate kinase) and differences in their sensitivity to studied hormones have been discovered. Actinomycin D had the inhibitory action. This suggests that the regulation of energy metabolism is accomplished by steroid hormones at the genome level of nerve cells.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. McEwen B. S. Biol. Regul. Develop., v. 3A, p. 203—216, 1982.
2. Naggi A., Perez J. Life Sci., v. 37, № 10, p. 893—906, 1985.
3. Siesjö B. K.—In: Brain Energy Metabolism, (ed. J. Wiley), p. 345—377. Clitchester—N.-Y., Brisbane-Toronto, 1978.
4. Moudgil V. K., Kanungo M. S. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 52, № 3, p. 725—730, 1973.
5. Luine M. N., Khylchevskaya R. I., McEwen B. S. Brain Res., v. 86, p. 293—306, 1975.
6. Luine M. N., Khylchevskaya R. I., McEwen B. S. Brain Res., v. 86, p. 283—292, 1975.
7. Kaye A. M. J. Steroid Biochem., v. 19, № 1, p. 33—40, 1983.
8. Kaye A. M., Reiss N.—In: Steroid Induced Uterine Proteins N.-Y., 1980.
9. Kellog E. W., Knutt H. R., Wilson J. E. J. Neurochem., v. 22, № 3, p. 461—463, 1974.
10. Bradford M. E. Anal. Biochem., v. 72, p. 248—254, 1976.
11. Костяная А. А., Манукиан К. Л. Журн. эксперим. и клин. мед., т. 28, № 1, с. 41—45, 1988.
12. Назарян К. Б., Егорян Р. У., Казарян Б. А. Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 566—573, 1988.
13. Barancowski T., Wolna E.—In: Methods in Enzymology, v. 42, p. 335—338, N.-Y., Acad. Press, 1975.
14. Bergmeyer H. U.—In: Methods Enzyme Analysis (eds. H. U. Bergmeyer), 2nd Engl. Edition, v. 1, p. 134—140, 1974.
15. Winter A., Ek K., Anderson U.—In Application Note 250, LKB Producter AB, Sweden, 1977.
16. Lowry O. H.—В кн.: Нейрохимия (под ред. М. И. Прохоровой), с. 42, Л., АГУ, 1979.
17. Розен В. Б. Основы эндокринологии, М., Высшая школа, 1980.
18. Needels L., Wilson J. E. J. Neurochem., v. 40, № 4, p. 1104—1113, 1983.
19. Magnani M., Serafini G., Stochi V., Dacha M., Farnaini G. The Ital. J. Biochem., v. 33, № 6, p. 392—401, 1984.
20. Kaur G., Singh R., Baquer N. Z. J. Neurochem., v. 41, № 2, p. 594—596, 1983.
21. Foe L. G., Kemp R. G. ABB, v. 228, № 2, p. 503—511, 1984.
22. Vora S., Os Kam R., Staat E. I. Biochem J., v. 229, № 2, p. 333—341, 1985.
23. Tolle S. W., Dyson R. D., Newburgh R. W. J. Neurochem., v. 27, p. 1355—1360, 1976.
24. Strandholm J. J., Dyson R. D., Cardenas J. A. ABB, v. 173, p. 125—131, 1976.
25. Inoue H., Ioguchi T., Tanaka T. J. Biochem. (Tokyo), v. 96, p. 1457—1462, 1984.

Поступила 26. VI. 1990