

Г. М. Галяс, В. В. Снитинский, В. Г. Янович

Активность, изоферментный спектр гексокиназы и некоторые факторы их регуляции в печени и скелетных мышцах поросят в раннем возрасте

В опытах на 1- и 5-суточных поросятах изучали активность и изоферментный состав гексокиназы в тканях печени и скелетных мышц. Внутримышечное введение инсулина и кортизола (0,1 МЕ и 2,5 мг соответственно из расчета на 100 г массы) 1- и 5-суточным поросятам, а также 24-часовое их голодание, вызывают изменения активности и изоферментного спектра гексокиназы в исследуемых тканях поросят. Эти изменения зависят от возраста животных и характеризуются органо-тканевыми особенностями: у 1-суточных поросят они более выражены в скелетных мышцах, а у 5-суточных — в печени.

Введение

Потребность поросят в энергии в первые дни жизни обеспечивается главным образом за счет метаболизма глюкозы в их тканях [9, 13]. Это объясняется слабым развитием жировой ткани и недостаточным функционированием механизмов гормональной регуляции липолиза в адипоцитах поросят в первые дни после рождения и резким повышением активности ключевых ферментов гликолиза и пентозо-фосфатного пути в печени и скелетных мышцах. Вследствие этого, а также низкой активности ключевых ферментов глюконеогенеза и недостаточного субстратного обеспечения цикла β -окисления жирных кислот в печени поросят в первые дни жизни при действии неблагоприятных факторов внешней среды (содержании при пониженной температуре, голодании и недостаточном потреблении молозива), у них возникает гипогликемия со смертельным исходом [10]. В 5—10-суточном возрасте гипогликемия у поросят под действием указанных факторов выражена в значительно меньшей мере [6, 9, 13], что объясняется более эффективным функционированием в их тканях механизмов субстратной и гормональной регуляции энергетического обмена, в частности, усилением глюконеогенеза и β -окисления жирных кислот в ткани печени.

В связи с вышесказанным, научный и практический интерес представляют изучение изменений активности и изоферментного спектра гексокиназы (ГК) в тканях поросят в раннем возрасте, а также выяснение механизмов регуляции этих изменений. С целью изучения отдельных аспектов этого вопроса мы провели сравнительное исследование активности и изоферментного спектра ГК в тканях печени и скелетной мышцы поросят 1- и 5-суточного возраста, которые характеризуются разной чувствительностью к голоданию, а также к влиянию на них инсулина и кортизола. При этом мы исходили из важного значения гексокиназы в регуляции метаболизма углеводов при действии разных факторов и существенной роли инсулина и кортизола в регуляции активности этого фермента путем изменения его изоферментного спектра [3, 12].

Методика

Исследования проведены на поросятах крупной белой породы 1- и 5-суточного возраста четырех групп (по три головы в группе). Поросят 1-й группы выращивали под свиноматкой, они служили контролем. Животным 2-й и 3-й групп, которых также выращивали под свиномат-

© Г. М. ГАЛЯС, В. В. СНИТИНСКИЙ, В. Г. ЯНОВИЧ, 1991

кой, двухкратно интервалом в 12 ч внутримышечно вводили инсулин и кортизол (0,1 МЕ и 2,5 мг соответственно из расчета на 100 г массы). В исследованиях использовали смесь бычьего и свиного инсулина производства Львовского мясокомбината и кортизол (гидрокортизон ацетат) фирмы «Gedeon Richter» (Венгрия). Поросята 4-й группы голодали в течение суток в термокамере при температуре 30 °С. Для предупреждения дегидратации им 2 раза в сутки вводили 0,85 %-ный раствор NaCl (10 мл). Животных всех групп забивали декапитацией. Для биохимических исследований отбирали пробы тканей четырехглавой мышцы бедра и печени, в экстрактах которых спектрофотометрически определяли активность ГК [14] и ее изоферментный спектр методом электрофореза в 7,5 %-ном полиакриламидном геле с последующим выявлением молекулярных форм фермента с помощью высокочувствительного тетразолиевого метода [15]. Полученные результаты обрабатывали статистически.

Результаты и их обсуждение

Из результатов, приведенных в табл. 1, видно, что активность ГК в печени и исследуемой мышце 5-суточных поросят значительно выше, чем 1-суточных ($P < 0,05$; $P < 0,001$). Эти результаты согласуются с данными других авторов [8] об усилении фосфорилирования глюкозы в указанных тканях поросят в первые дни после рождения, что обеспечивает использование ее, с одной стороны, в гликолизе, а с другой, — в метаболизме по пентозофосфатному пути.

Таблица 1. Влияние исследуемых факторов на активность гексокиназы в тканях печени и скелетной мышцы поросят раннего возраста ($M \pm m$), мкмоль · мин⁻¹ · 100 мг⁻¹ белка

Группа животных	Односуточные поросята	Пятисуточные поросята	P
Печень			
1-я	1,05 ± 0,03	1,31 ± 0,09	<0,05
2-я	0,94 ± 0,04	0,59 ± 0,08	<0,02
3-я	0,75 ± 0,02	0,05 ± 0,01	<0,001
4-я	1,49 ± 0,03	1,76 ± 0,12	<0,1
Скелетная мышца			
1-я	0,69 ± 0,03	0,97 ± 0,03	<0,001
2-я	1,34 ± 0,04	0,69 ± 0,03	<0,001
3-я	0,77 ± 0,04	0,51 ± 0,01	<0,01
4-я	0,31 ± 0,01	0,83 ± 0,09	<0,01

Примечание. Здесь и далее в табл. 2 и 3 число животных составляет 3.

Из результатов, приведенных в табл. 2, видно, что ГК в ткани печени поросят обеих возрастных групп представлена четырьмя изоформами. Основная доля ГК в печени 1- и 5-суточных поросят приходится на ГК I, представленную двумя подфракциями (ГК Ia и ГК Ib), активность которых составляет 45,6 и 49,5 % соответственно общей активности фермента. Ранее ГК Ia была выявлена в печени крыс [11]. Это объясняется высокой разрешающей способностью используемого метода разделения фермента в полиакриламидном геле. В печени 5-суточных поросят по сравнению с 1-суточными повышается активность ГК II и ГК IV, т. е. специфический ГК (глюкокиназы), а активность ГК III — снижается ($P < 0,02-0,01$).

В отличие от ГК в печени ГК в исследуемой скелетной мышце поросят обеих возрастных групп (табл. 3) представлена двумя фракциями, из которых активность второй примерно в 2 раза выше, чем

Таблица 2. Изоферментный спектр и относительная активность (%) гексокиназы печени поросят раннего возраста ($M \pm m$)

Фракция фермента	ОЭП	Односуточные поросята	Пятисуточные поросята	P
Группа 1 (контроль)				
Ia	0,12	7,61 \pm 0,05	9,74 \pm 0,27	<0,001
Iб	0,14	38,04 \pm 0,49	33,77 \pm 1,44	<0,05
Ia и Iб	—	45,65 \pm 0,53	43,51 \pm 1,53	<0,5
II	0,29	23,91 \pm 0,61	27,92 \pm 0,55	<0,01
III	0,34	19,57 \pm 0,40	11,69 \pm 0,39	<0,001
IV	0,41	10,87 \pm 0,72	16,88 \pm 1,45	<0,02
Группа 2 (введен инсулин)				
Ia		<i>Не выявлено</i>		
Iб	0,14	25,71 \pm 0,87	22,67 \pm 0,86	<0,05
Ia и Iб	—	25,71 \pm 0,87	22,67 \pm 0,86	<0,05
II	0,29	34,38 \pm 1,26	38,33 \pm 1,59	<0,05
III	0,34	18,48 \pm 0,92	15,00 \pm 0,84	<0,05
IV	0,41	21,43 \pm 0,86	24,00 \pm 2,07	<0,05
Группа 3 (введен кортизол)				
Ia		<i>Не выявлено</i>		
Iб	0,14	55,43 \pm 2,18	57,37 \pm 1,21	<0,05
Ia и Iб	—	55,43 \pm 2,18	57,37 \pm 1,21	<0,05
II	0,29	16,30 \pm 0,36	9,03 \pm 1,18	<0,01
III	0,34	19,37 \pm 0,97	27,05 \pm 1,37	<0,01
IV	0,41	8,90 \pm 2,41	6,55 \pm 1,55	<0,5
Группа 4 (голодание)				
Ia	0,12	<i>Не выявлено</i>	16,48 \pm 0,59	—
Iб	0,14	36,76 \pm 0,52	28,57 \pm 0,34	<0,001
Ia и Iб	—	36,76 \pm 0,52	45,05 \pm 0,60	<0,001
II	0,29	39,53 \pm 0,78	23,74 \pm 0,36	<0,001
III	0,34	9,09 \pm 0,39	24,84 \pm 0,39	<0,001
IV	0,41	14,62 \pm 2,32	6,37 \pm 1,03	<0,05

первой. Различия активности ГК I и ГК II в скелетных мышцах 1- и 5-суточных поросят статистически недостоверны ($P < 0,2$).

Введение 5-суточным поросьям инсулина (см. табл. 1) приводит к снижению общей активности ГК в печени ($P < 0,001$) и не оказывает существенного влияния на активность фермента в этом органе 1-суточных поросят ($P < 0,1$). В то же время активность глюкокиназы в печени поросят обеих возрастных групп (см. табл. 2) под действием инсулина существенно повышается ($P < 0,001$; $P < 0,01$), что свидетельствует об усилении метаболизма глюкозы под действием гормона вследствие повышения скорости ее фосфорилирования. Кроме того, после введения инсулина в печени поросят обеих возрастных групп не выявляется ГК Ia, снижается активность ГК Iб ($P < 0,05$) и повышается активность ГК II ($P < 0,001$). Эти результаты свидетельствуют о том, что под действием инсулина в печени поросят в раннем возрасте индуцируется активность ГК II и ГК IV, что согласуется с данными, полученными в исследованиях на крысах [2, 12], которые указывают на избирательное действие инсулина на синтез и расщепление отдельных изоформ ГК в печени поросят. Стимуляция синтеза глюкокиназы в печени 1- и 5-суточных поросят под действием инсулина, инкреция которого зависит от потребления углеводов с кормом, свидетельствует о важном значении этого гормона в метаболизме глюкозы в нормальных физиологических условиях, т. е. при достаточном потреблении молока. Поскольку метаболизм глюкозы в ткани печени 5-суточных поросят после введения инсулина усиливается в значительно большей мере, чем в ткани печени 1-суточных [4], то можно заключить, что метаболизм глюкозы в этом органе зависит не только

Таблица 3. Изменение изоферментного спектра и относительной активности (%) гексокиназы скелетной мышцы поросят разных групп в зависимости от возраста ($M \pm m$)

Фракция фермента	ОЭП	Односуточные поросята	Пятисуточные поросята	P
Группа 1 (контроль)				
I	0,12	34,00±2,51	29,05±2,46	<0,2
II	0,29	66,00±2,25	70,45±2,48	<0,2
Группа 2 (введен инсулин)				
I	0,12	23,08±1,45	17,95±1,44	<0,05
II	0,29	27,92±2,48	82,05±3,54	<0,2
Группа 3 (введен кортизол)				
I	0,12	39,63±2,36	34,26±2,58	<0,2
II	0,29	60,37±3,23	65,75±2,97	<0,2
Группа 4 (голодание)				
I	0,12	36,40±0,46	39,54±0,52	<0,01
II	0,29	63,60±1,83	60,46±0,85	<0,2

от активности ГК, но и от активности других лимитирующих ферментов углеводного обмена.

Экзогенный инсулин (см. табл. 1) почти в 2 раза повышает скорость фосфорилирования глюкозы в исследуемой скелетной мышце 1-суточных поросят ($P < 0,001$), тогда как у 5-суточных интенсивность этого процесса в указанной ткани под действием гормона снижается почти в 1,5 раза ($P < 0,001$). Объяснение стимулирующего действия инсулина на активность ГК в скелетных мышцах 1-суточных поросят в отличие от 5-суточных, по-видимому, следует искать в недостаточном функционировании в них биохимических механизмов, обеспечивающих использование в энергетических процессах других энергетических субстратов (жирных кислот). В 5-суточном возрасте в отличие от 1-суточного в скелетных мышцах поросят метаболизм глюкозы ослабляется, а окисление жирных кислот усиливается [4]. Тем не менее, так же, как в печени, стимулирующее действие инсулина на метаболизм глюкозы в скелетной мышце 5-суточных поросят выражено в значительно большей мере, чем 1-суточных.

Из результатов, приведенных в табл. 1 и 2, видно, что кортизол, являющийся ингибитором гликолиза в тканях млекопитающих [1], резко снижает активность ГК и глюкокиназы в печени поросят обеих возрастных групп, особенно у 5-суточных ($P < 0,001$). С учетом полученных результатов можно предположить, что уже в первые часы после рождения в печени поросят существуют условия для регуляции глюконеогенеза гормональными факторами.

Уровень морфофункционального развития мышечных волокон у поросят в неонатальный период, по-видимому, ниже, чем гепатоцитов. В пользу такого предположения свидетельствует ингибирующее действие кортизола на активность ГК скелетных мышц только 5-суточных поросят ($P < 0,001$). Вместе с тем, следует отметить выявленное нами большее перераспределение изозимного спектра ГК в печени исследуемых поросят под действием гормона в 5-суточном возрасте (см. табл. 2), чем в 1-суточном. Так же, как и после введения инсулина, в печени поросят обеих возрастных групп после введения кортизола не выявляется ГК Ia, а доля ГК Ib при этом значительно увеличивается ($P < 0,001$). При этом в печени исследуемых поросят, особенно 5-суточных, резко уменьшается доля ГК II и ГК IV ($P < 0,001$), т. е. изозимов ГК, доля которых резко увеличивается в печени поросят после введения инсулина.

Введение кортизола не оказывает существенного влияния на содержание отдельных изоформ ГК исследуемой скелетной мышцы поросят обеих возрастных групп ($P < 0,2$).

Голодание 1- и 5-суточных поросят в течение 24 ч сопровождается повышением активности ГК в печени ($P < 0,001$; $P < 0,05$). Наряду с повышением активности ГК в печени 1-суточных поросят при голодании в 2,9 раза повышается активность глюкокиназы ($P < 0,001$), тогда как в печени 5-суточных поросят активность указанного фермента резко снижается ($P < 0,001$). Эти результаты свидетельствуют об активном фосфорилировании глюкозы в печени 1-суточных поросят при голодании и важном значении углеводов в энергетических процессах организма поросят в первые дни жизни, когда в печени слабо окисляются жирные кислоты [4]. В то же время в скелетных мышцах 1-суточных поросят при голодании активность ГК значительно снижается ($P < 0,001$; см. табл. 1), а 5-суточных — изменяется незначительно ($P < 0,2$).

Полученные результаты представляют существенный интерес, хотя объяснение их встречает ряд трудностей. Прежде всего трудно объяснить сравнительно высокую активность ГК, в том числе глюкокиназы, в печени 1-суточных поросят при голодании, поскольку при этом снижается концентрация инсулина в крови, который является индуктором синтеза глюкокиназы. Можно предположить, что синтез глюкокиназы в печени голодающих поросят регулируется не субстратными, а генетическими факторами, поскольку этот изозим выявляется в гепатоцитах плодов свиней [5], тогда как у крыс его обнаруживают после рождения при переходе на смешанную диету [1]. Об этом также свидетельствуют существенные различия изоферментного спектра ГК в печени 1- и 5-суточных поросят при голодании. Так, в печени 1-суточных поросят после 24-часового голодания значительно увеличивается содержание изозима ГК II ($P < 0,001$) и ГК IV ($P < 0,05$), тогда как содержание ГК III при этом уменьшается ($P < 0,001$). В отличие от 1-суточных поросят в печени 5-суточных при голодании выявляется катодная подфракция ГК — ГК Ia. Вследствие этого преобладающим изозимом ГК в их печени является изоформа ГК I. Вместе с тем, в печени 5-суточных поросят при голодании по сравнению с 1-суточными увеличивается содержание изоформы ГК III ($P < 0,001$) и в 2,5 раза уменьшается количество изофермента ГК IV ($P < 0,001$) и ГК II ($P < 0,02$), синтез которых контролируется инсулином.

Голодание не оказывает существенного влияния на изоферментный спектр ГК скелетной мышцы 1-суточных поросят ($P < 0,2$), тогда как в изозимном спектре указанной ткани 5-суточных поросят при этом наблюдаются значительные изменения. В частности, в скелетной мышце 5-суточных поросят при голодании увеличивается содержание ГК I и уменьшается содержание ГК II ($P < 0,02$). Эти результаты также свидетельствуют о возрастных особенностях в регуляции синтеза ГК в тканях поросят при голодании, которые, по-видимому, носят адаптивный характер.

Таким образом, из полученных нами результатов следует, что адаптация поросят к действию факторов внешней среды в первые дни после рождения сопровождается изменениями активности лимитирующих ферментов углеводного обмена, в частности гексокиназы, в печени и скелетных мышцах. В основе этих изменений лежит перераспределение активности отдельных изозимов фермента, синтез и расщепление которых индуцируется гормонами. Влияние инсулина и кортизола на активность и изоферментный спектр гексокиназы в печени и скелетных мышцах 5-суточных поросят выражено в большей мере, чем 1-суточных. По-видимому, это обусловлено различным морфофункциональным развитием гепатоцитов [7] и миоцитов у животных в 5-суточном возрасте, что оказывает влияние на число рецепторов к указанным гормонам.

ACTIVITY AND ISOENZYME HEXOKINASE SPECTRUM IN THE LIVER AND SKELETAL MUSCLES OF PIGLETS IN THE EARLY AGE AND CERTAIN FACTORS OF THEIR REGULATION

Hexokinase in the liver of 1- and 5-day-old piglets is presented by four isoforms and in the skeletal muscles — by two ones. The enzyme activity in the liver and skeletal muscles of 5-day-old piglets is much higher than in 1-day-old ones. The increased hexokinase activity in the tissues of piglets during the first days of life appears to be due to the changes in their isoenzyme spectrum. The hexokinase activity and isoenzyme spectrum in the investigated tissue were affected by insulin, cortisol and 24 hours long starvation. These changes depended upon the age of the animals and differed in various organs and tissues: in 1-day-old piglets they were more pronounced in the skeletal muscles, while in 5-day-old animals — in the liver.

Ukrainian Research Institute of Physiology
Biochemistry of Farm Animals, Lviv

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кендыш И. Н. Регуляция углеводного обмена.— М.: Медицина, 1985.— 272 с.
2. Минченко А. Г. Молекулярные механизмы действия инсулина // Укр. биохим. журн.— 1988.— 60, № 3.— С. 107—118.
3. Плесков В. М. Чувствительность изоферментов гексокиназы кролика к гормональным воздействиям // Биохимия.— 1973.— 38, № 2.— С. 283—286.
4. Снитинский В. В., Вовк С. И., Янович В. Г. Влияние инсулина и кортизола на окисление $[1-^{14}C]$ глюкозы, $[6-^{14}C]$ глюкозы, $[1-^{14}C]$ пальмитата и $[1-^{14}C]$ лейцина в тканях поросят в неонатальный период // Укр. биохим. журн.— 1984.— 560, № 2.— С. 162—166.
5. Снитинский В. В. Обмен веществ и его регуляция у свиней в период неонатальной адаптации // Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.— Киев, 1989.— 36 с.
6. Снитинский В. В. Обмен углеводов и механизмы регуляции нормогликемии у свиней на ранних стадиях развития // С.-х. биология.— 1988.— № 4.— С. 15—21.
7. Снитинский В. В., Янович В. Г., Гойсалюк С. В., Кулачковский О. Р. Изменения ультраструктуры и интенсивности синтеза липидов в адипоцитах жировой ткани поросят после рождения // Цитология.— 1985.— 17, № 1.— С. 46—50.
8. Снитинский В. В., Янович В. Г. Изменение активности некоторых ферментов углеводного обмена в печени и скелетных мышцах свиней в онтогенезе // Укр. биохим. журн.— 1981.— 53, № 6.— С. 45—49.
9. Снитинский В. В., Янович В. Г. Физиолого-биохимические аспекты повышения сохранности новорожденных поросят // С.-х. биология.— 1984.— № 10.— С. 100—106.
10. Тарасов И. И. Гипогликемия поросят // С.-х. за рубеж.— 1978.— № 6.— С. 52—53.
11. Шурда Г. Г., Панич Л. Е. Об определении изоферментов гексокиназы в различных тканях // Вопр. мед. химии.— 1978.— 24, № 2.— С. 282—285.
12. Bessman S. P., Gerger P. J. Compartmentation of hexokinase and creatine phosphokinase, cellular regulation and insulin action // Curr. Top. Regul.— 1980.— 16, N 1.— P. 55—86.
13. Mersmann H. J. Metabolic patterns in the neonatal swine // J. Anim. Sci.— 1974.— 38, N 5.— P. 1022—1030.
14. Sharma C., Manjeshwar R., Weinhouse S. Effects of diet and insulin on glucoseadenosine triphosphate phosphotransferases of rat liver // J. Biol. Chem.— 1963.— 238, N 12.— P. 3840—3845.
15. Shaw C. R., Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzyme-A compilation of recipes // Biochem. Genetics.— 1970.— 4, N 2.— P. 297—320.

Укр. науч.-исслед. ин-т физиологии
и биохимии с.-х. животных Украинской академии
аграрных наук, Львов

Материал поступил
в редакцию 24.03.90