

**Normal ve T<sub>3</sub> Uygulanmış Sıçanlarda Karaciğer Glikojen  
Düzeyleri ve Fosforilaz Kinaz Aktivitesi**

The Liver Glycogen Levels and Phosphorilase Kinase Activity  
in Normal and T<sub>3</sub> Treated Rats

S. NEBİOĞLU \* D. NEBİOĞLU\*\* D. M. GIBSON\*\*\*

**GİRİŞ**

Fosforilaz kinaz enzimi glikojen metabolizmasında glikojenolizisi düzenleyen enzimlerdendir. Çeşitli hormonlar, cAMP ve Ca<sup>2+</sup> gibi hücrel regülatörler aracılığı ile enzimleri etkileyerek, metabolik fonksiyonları düzenler. Bu hormonlardan insülin, glukagon ve tiroksinin etküeri glikojen metabolizması üzerinde açıklanmıştır.

**MATERYAL VE YÖNTEM**

**I. MATERYAL**

Ditiyotritol (DTT), Sığır serum albumini (BSA), Sukroz, 1, 2, 4 - aminonaftosülfonik asit (ANSA),  $\beta$  - Gliserofosfat (1. derece), Amiloglukosidaz, Adenozin 5' - trifosfat (disodyum tuzu, kristal, 1. derece),  $\beta$  - nikotinamid adenin dinükleotid (III. derece), Glukoz - 6 - fosfat dehidrogenaz (Tip XXI), Hekzökinaz (Tip C - 300),  $\beta$  - merkaptöetanol ( $\beta$  - ME), Kafein, Glikojen (Tip III), Glukoz 1 - fosfat (III. derece), 3,3', 5 - triiyodo-L-tironin maddeleri Sigma firmasmdan temin edildi.

Sorval Superspeed RC 2 - B soğuk santrifüj, Beckman Model L ultrasantrifüj, Bioforma derin dondurucu (—70°C), Gilford UV-visible spektrofotometre, homojenizatörler, atılabilir tüp ve pipet uçları, otomatik Gilson mikropipet kullanıldı.

Materyal olarak 120 - 150 g ağırlıktaki Harlan Wistar sıçan karaciğerleri kullanıldı.

**a. Normal ve hipertiroidli deney hayvanlarında glikojen siklusu oluşturulması :**

120 - 150 g ağırlığındaki deney hayvanları günde üçer saat süre ile beslendiler. Saat 03.00 - 15.00 arası karanlıkta ve 15.00 - 03.00

Redaksiyona verildiği tarih : 8 Ocak 1982

\* Biyokimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi.

\*\* Farmasötik Kimya Kürüsü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi.

\*\*\* Department of Biochemistry, Medical School, Indiana University, USA.

S. NEBİOĞLU, D. NEBİOĞLU, D. M. GIBSON

arası aydınlıkta bırakılan deney hayvanları saat 7.00 - 10.00 arasında normal yem ile beslendiler. İçme suları kafeslerinde her zaman mevcuttu. Deney hayvanları bu tür beslenme şekline 1 hafta süre ile alıştırdılar. Bir hafta sonra saat 7.00, 10.00, 13.00 ve 16.00 da sıçanlar öldürülerek karaciğer örnekleri alındı. Karaciğer örneklerinin alındığı gün beslenme yine normal olarak 7.00 - 10.00 arasında yapıldı. Ayrıca bu guruba paralel olarak bir gurup deney hayvanına da birinci gün beslenmeden hemen sonra 1 µg/g. vüc. ağız dozunda enjeksiyon yapılarak hipertiroidi oluşturuldu. Enjeksiyonun yapıldığı gün ve ertesi gün yine aynı saatlerde deney hayvanları öldürülerek karaciğer örnekleri alındı.

**2. Karaciğer dokusunda glikojen düzeylerinin saptanması :**

1 — Glukoz üzerinden heksokinaz yöntemi ile karaciğerlerden alınan örneklerde glikojen düzeyleri saptandı (1).

2 — Elektron mikroskopisi ile glikojen dağılımının saptanması yapıldı. Deney hayvanlarından alınan karaciğer kesitleri PAS reaksiyonu ile boyanarak, kesitler elektron mikroskopisinde incelendi. Glikojen birikimi ve tüketimi bu şekilde incelenerek saptandı.

**c. Karaciğer ekstresinde Fosforilaz b kinaz aktivitesi:**

1 — Fosforilaz b kinaz aktivitesinin saptanması için karaciğer ekstreleri hazırlandı. Tampon olarak pH 7.4 deki 250 mM Sukroz, 10 mM  $P_4O_{10}$ , 0.5 mM DTT seçildi (2).

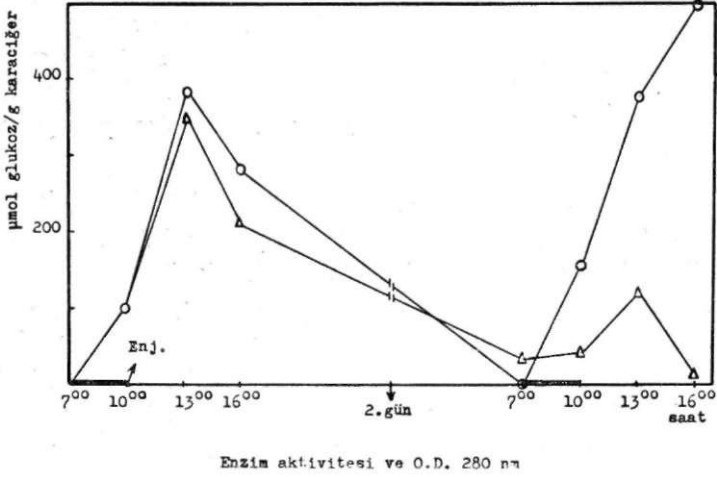
2 — Fosforilaz b kinaz aktivitesinin saptanması için VANDENHEEDE tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı (2). Inkübasyon ortamı 10 mM  $MgAc_2$ , 1 mM ATP, 50 mM NaF, 10 mM  $P_4O_{10}$ , 1 mM cAMP, 0.45 mM EGTA/0.3 mM  $CaCl_2$ , 10 mg/ml Ph b ve 20 µl örnek ekstre son hacim 200 µl olacak şekilde karıştırıldı. Reaksiyon, Ph b ilavesi ile başlatıldı ve 10 dakika 30°C de inkübe edildi. Reaksiyon, 20 µl lik örneklerin inkübasyon ortamından alınıp, buz içinde bekleyen pH 6.8 deki 10 mM β - gliserofosfat, 20 mM NaF, 45 mM β - merkapto etanol tampon karışımında 20 kez seyreltilmesi ile durduruldu. Bu dilüsyondan 100 µl lik örnekler alınarak bilinen fosforilaz'a tayini yöntemi uygulandı (3).

**BULGULAR**

Glikojenin enzimatik saptanmasında  $T_3$  uygulanmış deney hayvanlarında ikinci gün beslenme üe birlikte glikojen artışı olmakta, ancak bu düzey hiçbir zaman normal deney hayvanlarındaki gliko-

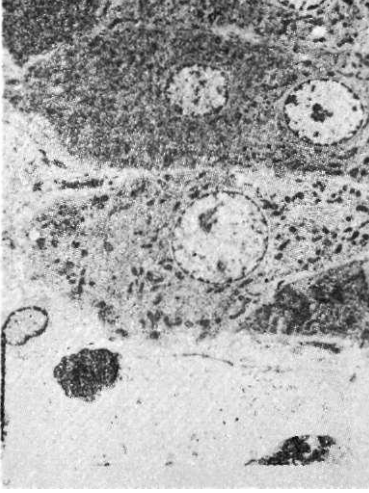
## Normal ve T Uygulanmış Sıçanlarda .....

jen düzeyine erişememektedir. Karaciğer doku kesitleri elektron mikroskopisi ile incelendiğinde glikojenin tüketimi aynı şekilde izlenebilmektedir.



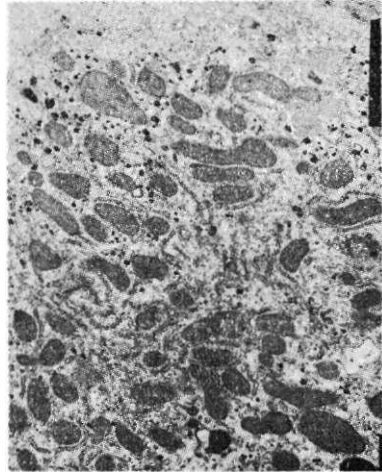
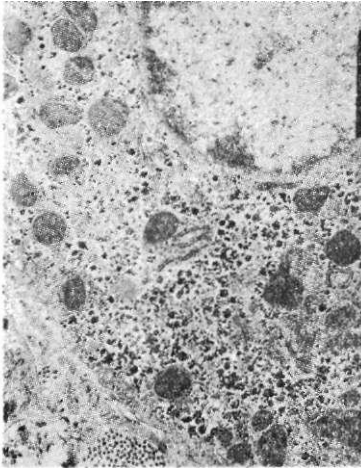
Şek. — 1 : Günde üç saat normal yemle beslenen deney hayvanlarında açlık, tokluk ve hipertiroid durumlarına bağlı olarak değişen karaciğer glikojen düzeyleri. (■—■) Beslenme zamanı : 7.00 - 10.00. Enjeksiyon : Deneyin birinci gününde saat 10.00 da 1 µg/g vüc. ağırlığı olarak. Kontrol gurubuna % 0.9 NaCl enjekte edilmiştir. (○—○) Kontrol gurubu, (△—△) Hipertiroidli grup. Her nokta için 2 deney hayvanı kullanılmıştır. Deney üç kez, ayrı grup hayvan kullanılarak tekrarlanmıştır.

Şekil 1 de görüldüğü gibi beslenme bittikten 3 saat sonra karaciğer glikojen tanecikleri normal deney hayvanlarında iyice yoğunlaşmış iken, T<sub>3</sub> enjekte edilmiş hayvanlarda daha az bir yoğunluk göstermektedir (Resim : 1 - 2). Beslenme bittikten 6 saat son-



**Resim : 1 - 2** Beslenme bittikten 3 saat sonra normal (1) ve T, enjekte edilmiş (2) deney hayvanında Glikojen tanecikleri. 7000 x.

ra ise normal deney hayvanlarının karaciğerlerindeki glikojen taneciklerinin sayısı en üst düzeye yükselmiş olmasına karşın, T<sub>s</sub> enjekte edilmiş hayvanlardaki glikojen tanecikleri hemen tamamen kaybolmuştur. (Resim : 3 - 4). Bu saatte normal karaciğerden alınan



**Resim : 3 - 4** Beslenme bittikten 6 saat sonra normal (3) ve T, enjekte edilmiş (4) deney hayvanlarında Glikojen tanecikleri. 27.700 x.

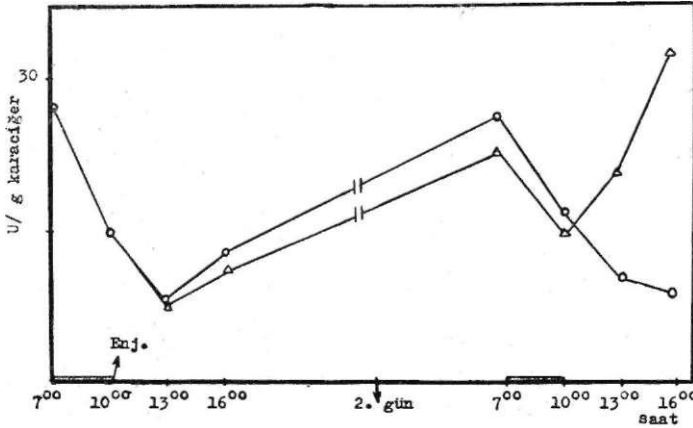
## Normal ve T Uygulanmış Sıçanlarda

kesitler diastaz ile muamele edildiğinde bütün glikojen taneciklerinin kaybolduğu açıklıkla görülmektedir (Resim : 5).



Resim : 5 Beslenme bittikten 6 saat sonra normal karaciğerden alınan kesitler diastaz ile muamele edilmişlerdir.

Elde edilen karaciğer ekstrelerinde fosforilaz kinaz aktivitesi glikojen profiline uygun bir gelişim göstermektedir. (Şekil : 2). Enzim aktivitesi glikojen tüketiminin arttığı saatlerde yükselmiş, enzim aktivitesinin düştüğü anda ise glikojen düzeyi yükselmiştir.



Şek. — 2 : Aynı deney hayvanlarında karaciğer fosforilaz kinaz aktivitesi. (O—O) Kontrol gurubu, (Δ—Δ) Hipertiroidli grup.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Karaciğerde glikojen pelletini glikojen metabolizması enzimleri oluşturmaktadır (4). Diastaz ile parçalanıp, boyanması önlenen taneciklerdeki fosforilaz b kinaz ve glikojen sentaz gibi, glikojene bağlı enzimler de ortadan kaybolmaktadır.

Glikolitik enzimlerden fosforilaz b kinaz glikojen metabolizmasını çeşitli hormonlara bağlı olarak düzenlemektedir. Açlıkla birlikte salgılanmaya başlayan glukagon, adenil siklazı aktive etmekte ve dolayısı ile hücre cAMP düzeyi yükselmektedir (5). cAMP bir dizi reaksiyonla fosforilaz kinazı aktive etmekte ve glikojenolizis meydana gelmektedir (6, 7). Beslenme yeniden başladığında kandaki glukoz düzeyi yükselip,  $Ca^{2+}$  un hücrelere iletimi artar (8) ve bununla birlikte protein kinazların aktivasyonu ile (9, 10) insülin salınımı artar, cAMP düzeyi düşerek protein kinazın fosforilaz kinazı aktive etmesi önlenir (11, 12). Ayrıca glukozun hücre içine girerek fosforlanması sağlanır. Tiroksin hormonu glikojen tüketimi şeklindeki etkisini fosforilaz kinaz enzimi üzerinde gösterdiği düzenleyici etki ile sağlar.

ÖZET

Normal ve hipertiroidli sıçanların karaciğer kesitlerinde glikojen düzeyleri, elektron mikroskopisi ile incelendi. Karaciğer ekstrelerinde fosforilaz kinaz aktivitesi glikojen birikim ve tüketimine uyumlu olarak değişmektedir.

SUMMARY

The Glycogen levels have been investigated by electron microscopy in liver slices of normal and hyperthyroid rats. The activity of phosphorilase kinase in liver extracts alters concerted to Glycogen accumulation and depletion.

LİTERATÜR

1. Bergmeyer H. U. : *Methods of Enzymatic Analysis*, Acad, Press, s. 59, (1965).
2. Vendenheede J. R., Kenpens S., De Wulf H. : *Inactivation and Reactivation of Liver Phosphorilase Kinase*. *Biochem. Biophys. Acta.* 481, 463 (1977).
3. Stalmans W., De Wulf H., Hue L., Hers H. G. : *The Sequential Inactivation of Glycogen Phosphorilase and Activation of Glycogen Synthase in Liver after Administration of Glucose to Mice and Rats. The Mechanism of Hepatic Treshold to Glucose*. *Eur. J. Biochem.* 41, 127 (1974).

Normal ve T Uygulanmış Sıçanlarda .....

4. Harper J. F., Cheung W. Y., Wallace R. W., Huang H. L., Levine S. N., Steiner A. L., : Localisation of Calmodulin in Rat Tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 1,366 (1980).
5. Shimazu T., Amakawa A. : Regulation of Glycogen Metabolism in Liver by the Autonomic Nervous System VI. Possible Mechanism of Phosphorilase Activation by the Splanchnic Nerve. *Biochem. Biophys. Acta.* 385, 242 (1975).
6. Cohen P, : The Role of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase in the Regulation of Glycogen metabolism in Mammalian Skeletal Muscle *Curr. Top. CeU. Beg.* 14, 117 (1978).
7. Van De Werve G., Hue L., Hers H. G. : Hormonal and Ionic Control of the Glycogenolytic Cascade in Rat Liver. *Biochem. J.* 162, 135 (1977).
8. Dean P. M., Matthews E. K. : Glucose Induced Electrical Activity in Pancreatic Islet Cells. *J. Physiol (London).* 210, 225 (1970).
9. Malaise W. J.: Insulin Secretion : Multifactoral Regulation for a Single Process of Release. *Diabetologia* 9, 167 (1973).
10. Schubart U. K., Erlichman J., Eischer N. : The Role of Calmodulin in the Regulation of Protein Phosphorilation and Insulin Release in Hamster Insulinoma Cells. *J. Biol. Chem.* 255, 4120 (1980).
11. Curnow R. T., Rayfield E. J., George D. T., Zenser T. V., De Rubertis F. : Control of Hepatic Glycogen Metabolism in the Rhesus Monkey : Effect of Glucose, Insulin and Glucagon Administration. *Am. J. Physiol.* 228, 80 (1975).
12. Miller T. B. J., Larner J. : Mechanism of Control of Hepatic Glycogenesis by Insulin. *J. Biol. Chem.* 248, 3483 (1973).