Utjecaj različitih koncentracija glukoze na aktivnost piruvat kinaze u HepG2 stanicama

Vuljanić, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:062594

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Dora Vuljanić

Utjecaj različitih koncentracija glukoze na aktivnost piruvat kinaze u HepG2 stanicama

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Opća klinička biokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Roberte Petlevski.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Roberti Petlevski koja mi je omogućila izradu diplomskog rada u području koje me zanima. Zahvaljujem se na pokazanom strpljenju i pomoći tijekom izrade mog rada.

Zahvaljujem se svojim prijateljima, koji su mi studentske dane učinili nezaboravnim. Hvala im na podršci, pomoći, zajedničkim kasnonoćnim učenjima i prekrasnom vremenu koje smo proveli zajedno. Hvala mojoj Katarini na predivnom zajedničkom životu u našoj studentskoj sobi jer je svojom radošću i smijehom učinila moje studiranje lakšim i manje stresnim.

Najviše se zahvaljujem mami Sanji i Danku jer bez njih ništa od ovog ne bi bilo moguće. Hvala im na svoj ljubavi, strpljenju, podršci i razumijevanju koje mi pružaju sve ove godine.

Sadržaj

1. UVOD 1
   1.1 Šećerna bolest 1
      1.1.1 Tip 1 šećerne bolesti 1
      1.1.2 Tip 2 šećerne bolesti 2
      1.1.3 Metabolizam glukoze u organizmu 2
   1.2 Glikoliza 3
      1.2.1 Glikolitički put 3
      1.2.2 Glikoliza u šećernoj bolesti 5
   1.3 Regulacija glikolitičkog puta 6
      1.3.1 Regulacija glikolize u jetrenim stanicama 7
   1.4 Piruvat kinaza 8
      1.4.1 Izoenzimi piruvat kinaze 9
      1.4.2 Struktura enzima 9
      1.4.3 Vezanje iona i kiselost medija 10
   1.5 Regulacija katalitičke aktivnosti piruvat kinaze 11
      1.5.1 Inaktivacija fosforilacijom 11
      1.5.2 Alosterička regulacija enzima 12
      1.5.3 Hormonska regulacija 12
      1.5.4 Kinetičke značajke piruvat kinaze 12
2. OBRAZLOŽENJE TEME 15
3. MATERIJALI I METODE 16
   3.1 HepG2 stanična linija 16
      3.1.1 Kultiviranje HepG2 stanica 17
      3.1.2 Postupak tripsinizacije i presađivanje stanica 17
      3.1.3 Brojanje stanica 18
   3.2 Tretiranje stanica glukozom 19
   3.3 Određivanje katalitičke aktivnosti piruvat kinaze u lizatu HepG2 stanica 21
      3.3.1 Izračunavanje aktivnosti enzima 24
   3.4 Statistička analiza podataka 25
4. REZULTATI I RASPRAVA 26
   4.1 Rezultati 26

4.2 Rasprava 29
5. ZAKLJUČCI 32
6. LITERATURA 33
7. SAŽETAK / SUMMARY 35
8. PRILOZI 37
8.1 Kratice 37
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1 Šećerna bolest

Šećerna bolest (*diabetes mellitus*) je metabolički poremećaj višestruke etiologije kojeg obilježava stanje kronične hiperglikemije i poremećeni metabolizam ugljikohidrata, masti i proteina zbog oštećene sekrecije inzulina i/ili poremećaja u njegovu djelovanju. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) broj oboljelih od šećerne bolesti diljem svijeta porastao je na 422 milijuna (do 2014.godine) što znači da oko 8,5% odraslih u svijetu pokazuje simptome bolesti. Prema kriterijima ESC-a (engl. *The European Society of Cardiology*) preporuka za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti temeljena je na kombinaciji mjerenja HbA1c i razine glukoze u krvi natašte ili, u slučaju dvojbe dodati OGTT (test opterećenja sa 75 grama glukoze otopljene u 2 dL vode).

Oštećena tolerancija glukoze (engl. *Impaired glucose tolerance* - IGT) i oštećen metabolizam glukoze natašte (engl. *Impaired fasting glucose* – IFG) obuhvaćeni su zajedničkim imenom kao predijabetes te predstavljaju čimbenike rizika ne samo za šećernu bolest već i za kardiovaskularne bolesti. U fazi predijabetesa je 79 milijuna ljudi u svijetu. Vrlo je važno otkriti osobu u ranoj fazi bolesti jer su često u trenutku postavljanja dijagnoze već uočene brojne komplikacije. Hiperglikemija ukazuje na česti problem nekontrolirane šećerne bolesti koji s vremenom uzrokuje ozbiljnije komplikacije raznih organskih sustava, zatajenje bubrega, oštećenje krvnih žila, srčanih i moždanih udara, sljepoću itd.

1.1.1 Tip 1 šećerne bolesti

Ovaj tip bolesti karakteriziran je apsolutnim deficitom inzulina koji se javlja kao posljedica autoimunosnog razaranja β-stanica Langerhansovih otočića. Pojavljuje se s učestalošću od oko 10% od svih oboljelih, najčešće u djetinjstvu, a manifestira se poliurijom, polidipsijom, gubitkom tjelesne mase i sklonosti razvijanju dijabetičke ketoacidoze. Bolest se može razviti i u starijoj dobi, tzv. latentni autoimuni dijabetes (LADA), razvija se progresivno i bolesnici već nakon nekoliko godina postaju ovisni o inzulinu. Karakteristična je pojava protutijela na β-stanice Langerhansovih otočića, posebice protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (GADA – *glutamic acid decarboxylase autoantibodies*), inzulin (IAA – *insuline autoantibodies*), tirozinsku fosfatazu (IA-2 i IA-2β), inzulinski transporter itd. Osobe kod kojih se antitijela ne mogu dokazati svrstavaju se u idiopatski tip 1 šećerne bolesti (Štraus

i Petlevski, 2009). Nastanak tipa 1 šećerne bolesti uglavnom je iznenadan i dramatičan te se smatra da su uzroci kombinacija genetske predispozicije (genski sustav ljudskih leukocitnih antigena, HLA) i okolišnih čimbenika (virusi, kemikalije, proteini kravljeg mlijeka). Tip 1 šećerne bolesti naziva se još i inzulin-ovisna šećerna bolest jer je nužan terapijski unos inzulina kako bi se spriječile mnogobrojne komplikacije i smrt.

1.1.2 Tip 2 šećerne bolesti

Tip 2 najčešće se pojavljuje u odrasloj dobi te je odgovoran za 90% slučajeva oboljelih od šećerne bolesti. Bolest je karakterizirana nedovoljnim lučenjem inzulina iz gušterače i/ili njegove nemogućnosti da pravilno djeluje na ulazak glukoze u periferna tkiva, što se definira pojmom inzulinska rezistencija (Štraus i Petlevski, 2009). Osnovni molekularni poremećaj rezultat je genetičkih i okolišnih čimbenika od kojih ključnu ulogu imaju prekomjerna tjelesna masa i smanjena tjelesna aktivnost. Za razliku od tipa 1, bolest ovog tipa razvija se polagano, dugo ostaje neprepoznata jer se simptomi pojavljuju tek kod uznapredovale bolesti. Najčešće se otkriva slučajno, sistematskim pregledom i nalazom povećane koncentracije glukoze u krvi i u mokraći. Kod osoba oboljelih od ovog tipa bolesti postoji relativni manjak inzulina, ali ga ima dovoljno da spriječi nastanak akutnih komplikacija bolesti. Ipak, povećani je rizik pojave mikrovaskularnih (retinopatije, nefropatije i neuropatije) i makrovaskularnih komplikacija (moždani udar, ishemijske srčane bolesti). Kardiovaskularne komplikacije su vodeći uzrok smrti povezane sa šećernom bolesti. S obzirom da deficit inzulina nije apsolutan, tj. postoji sekrecija inzulina iz gušterače u nekoj mjeri, ovaj tip bolesti nije ovisan o liječenju inzulinom. Tip 2 šećerne bolesti u početku se liječi i prevenira zdravijim načinom života, dijetom i povećanom fizičkom aktivnosti. U uznapredovaloj bolesti potrebna je terapija oralnim hipoglikemicima i inzulinom.

1.1.3 Metabolizam glukoze u organizmu

Glukoza nastaje iz ugljikohidrata unesenih hranom i važan je izvor energije za većinu organizama. Ključni je izvor energije za sisavce, jedini izvor energije koji mogu upotrebljavati mozak (osim pri gladovanju) i eritrociti. U održavanju odgovarajuće koncentracije glukoze u krvi ključnu ulogu ima jetra. Ovisno o potrebama metabolizma izmijenjuju se dva procesa, glikoliza i glukoneogeneza. Kako bi se koncentracija glukoze održala unutar referentnog intervala bitna je regulacija ključnih enzima oba procesa. Male

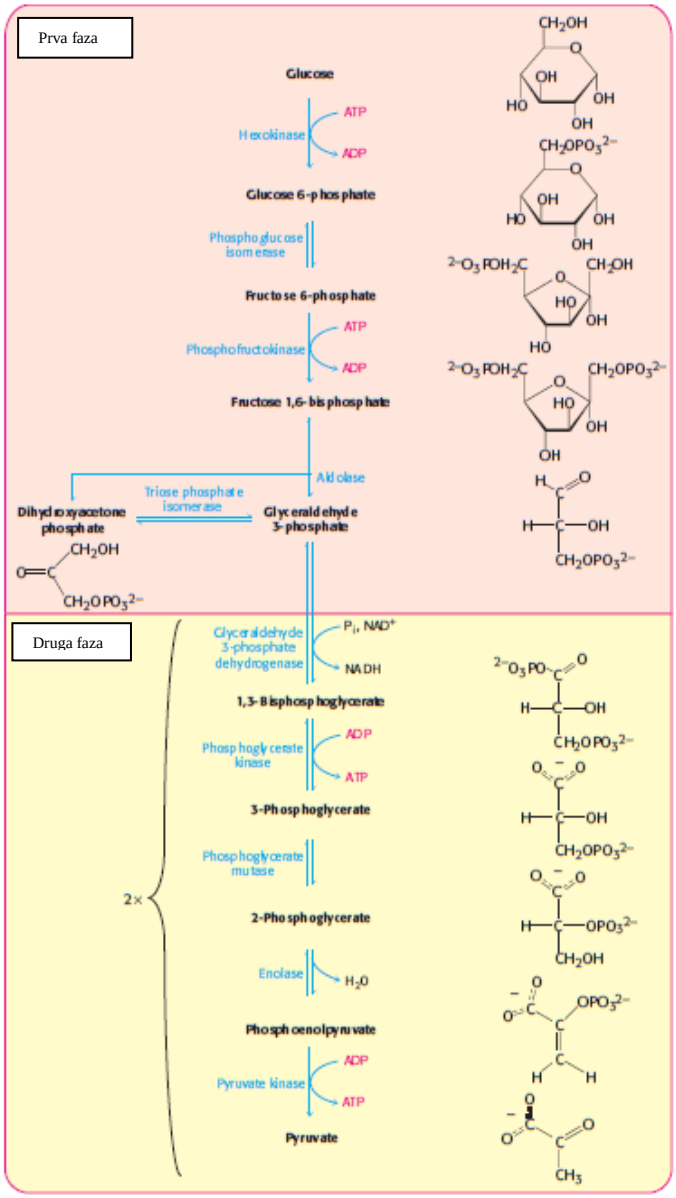
promjene u koncentraciji specifičnih efektora (alosteričkih aktivatora i inhibitora) značajno utječu na katalitičke aktivnosti pojedinih enzima.

1.2 Glikoliza

Glikoliza je metabolički put kojeg čini niz reakcija u kojima se jedna molekula glukoze metabolizira do dvije molekule piruvata uz istodobnu proizvodnju dviju molekula ATP-a. Proces je anaeroban, ne zahtijeva kisik, što objašnjava njegovu evolucijsku starost. Nastali piruvat se dalje može konvertirati u laktat (mliječno-kiselo vrenje) ili etanol (alkoholno vrenje) također u anaerobnim uvjetima. U aerobnim uvjetima, piruvat potpuno oksidira do CO_2 i H_2O te dolazi do proizvodnje više molekula ATP-a. Metabolički produkti kao što su laktat i piruvat mogu se koristiti za sintezu glukoze u procesu glukoneogeneze. Iako su glikoliza i glukoneogeneza katalizirane nekim zajedničkim enzimima, ne možemo reći da su jedan drugome obrat. Tu činjenicu objašnjavaju ireverzibilni koraci u glikolizi koji se ne događaju u glukoneogenezi. Glikoliza i glukoneogeneza recipročno su regulirane i ne događaju se istodnobno u istoj stanici (Berg i sur., 2013).

1.2.1 Glikolitički put

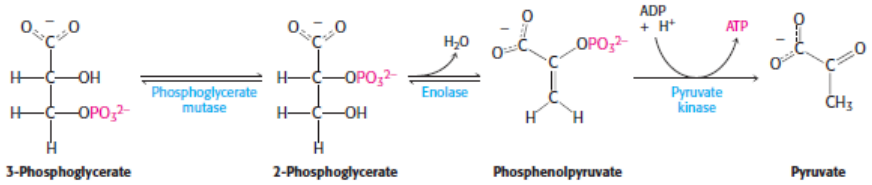
Glikoliza je zajednički proces eukariotima i prokariotima. Glikolitički put se odvija u citoplazmi eukariota te se sastoji od tri faze. U prvoj fazi, glukoza se prevodi u fruktoza-1,6-bisfosfat te se događaju fosforilacija, izomerizacija i druga fosforilacija. Svrha ovih koraka je da se glukoza zarobi u stanici i da nastane spoj koji se može podijeliti na dvije fosforilirane jedinice od po tri ugljikova atoma (Berg i sur., 2013). U drugoj fazi glikolize, fruktoza-1,6-bisfosfat razlaže se u dva fragmenta od po tri ugljikova atoma, gliceraldehid-3-fosfat (GAP) i dihidroksiaceton-fosfat (DHAP). Ova izrazito reverzibilna reakcija katalizirana je enzimom aldolazom. U izravnom putu glikolize koristi se gliceraldehid-3-fosfat (aldoza) dok se dihidroksiaceton-fosfat (ketoza) izomerizira u GAP te se na taj način sprječava gubitak spoja od tri ugljikova atoma koji nije neposredno u glikolitičkom putu. Ova reakcija je također reverzibilna i teče lako od DHAP-a prema GAP-u jer se taj produkt odstranjuje daljnjim reakcijama glikolize. U ovoj fazi glikolize utrošene su dvije molekule ATP-a, a još nije dobivena energija.



Slika 1. Faze glikolize (preuzeto iz literaturnog navoda Berg i sur., 2013)

Dolazimo do posljednje faze u kojoj se nizom reakcija oksidacije fragmenata od tri ugljikova atoma konačno dobiva ATP. Prva reakcija u seriji jest prevođenje gliceraldehid-3-fosfata u 1,3-bisfosfoglicerat. Nastali 1,3-bisfosfoglicerat je molekula s višim potencijalom za prijenos fosforila od ATP-a, stoga može fosforilirati molekulu ADP u ATP. Ovakav nastanak ATP-a naziva se fosforilacijom na razini supstrata. Produkti ove reakcije su 3-fosfoglicerat i ATP. Slijedi reakcija pregrađivanja 3-fosfoglicerara u 2-fosfoglicerat katalizirana fosfoglicerat-mutazom preko intermedijera 2,3-bisfosfoglicerata. U sljedećoj reakciji dehidracije 2-fosfoglicerata, uvodi se dvostruka veza i nastaje enol fosfoenolpiruvat (PEP).

Dehidratiranjem dolazi do povećanja potencijala za prijenos fosforilne skupne, stoga je taj potencijal puno veći kod fosfoenolpiruvata nego kod fosfatnih estera običnih alkohola kao što je 2-fosfoglicerat. Fosforilna skupina održava molekulu u njenom nestabilnom enolnom obliku. Kad se fosforilna skupina prebaci na ATP, enolni oblik prelazi u ketonski, mnogo stabilniji oblik piruvata. Ova posljednja reakcija u seriji je gotovo ireverzibilna i katalizirana je piruvat-kinazom, enzimom kojeg smo promatrali i čiju smo katalitičku aktivnost mjerili u eksperimentalnom dijelu ovog rada. Konačna reakcija glikolize, prevođenje fosfoenolpiruvata u piruvat, rezultira nastankom dviju molekula ATP-a.



Slika 2. Niz reakcija prevođenja 3-fosfoglicerata do piruvata (preuzeto iz literaturnog navoda Berg i sur., 2013)

1.2.2 Glikoliza u šećernoj bolesti

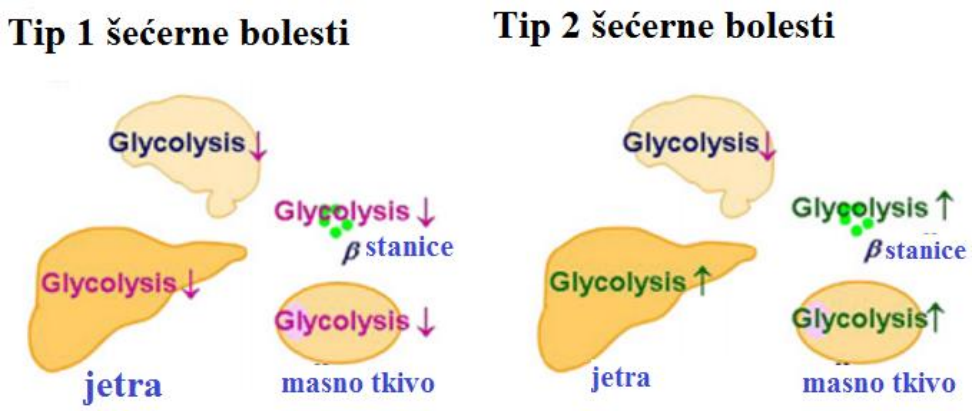
Iako je glikoliza jednostavan i dobro poznati metabolički put, ključno je spoznati njegovu važnost u različitim fiziološkim stanjima. Glikoliza je usko povezana s proizvodnjom glukoze, sekrecijom inzulina, sintezom glikogena u jetri i mišićima te posredno stimulira lipogenezu u adipoznom tkivu zbog proizvodnje glicerol-fosfata. U hipotalamusu glikoliza ima ulogu senzora za dovoljnu količinu glukoze koja označava prestanak hranjenja.

U šećernoj bolesti, zbog pojačane anaerobne glikolize, stvaraju se veće količine laktata koji kao krajnji produkt glikolize ne inducira inzulinsku rezistenciju. Dakle, anaerobna glikoliza ima ograničenu ulogu u patogenezi šećerne bolesti. Ishemija kao komplikacija dijabetesa, potiče anaerobnu glikolizu zbog stvaranja hipoksija-inducibilnog faktora 1 (HIF1). Važnost glikolize u nereguliranoj jetrenoj proizvodnji glukoze izražena je preko genetičkih mutacija u genu za glukokinazu zbog kojih se razvija poseban podtip šećerne bolesti MODY (engl. *Maturity onset diabetes of the young*). Uz genetičke defekte u metaboličkim enzimima dodatni čimbenik je i visceralna pretilost koja uzrokuje inzulinsku rezisteniciju čime je onemogućeno djelovanje inzulina na periferna tkiva ali i na samu aktivnost glukokinaze. Smanjena fosforilacija glukoze u prvom koraku glikolize doprinosi povećanoj proizvodnji glukoze u jetri što posljedično vodi do hiperglikemije. S druge strane, smanjena glikoliza u β-stanicama Langerhansovih otočića gušterače dovodi do hipoinzulinemije. Kombinacijom ovih stanja u jetri i gušterači dolazi do značajnog smanjenja glikolize u organizmu, nastaje hiperglikemija koja uzrokuje MODY. Ukoliko je smanjenje glikolize u hepatocitima jače od smanjenja glikolize u β-stanicama gušterače, uz pojačanu glukoneogenezu i glikogenolizu, nastaje hiperglikemija koja uzrokuje tip 2 šećerne bolesti (Guoa i sur., 2012).

U šećernoj bolesti dolazi do povećane proizvodnje glukoze u stanicama jetre, relativnog smanjenja aktivnosti enzima glikolize i glikogeneze uz povećanje aktivnosti enzima glikogenolize i glukoneogeneze. Istraživanje na miševima s induciranim tipom 1 šećerne bolesti pokazalo je drastično smanjenje aktivnosti jetrene glukokinaze i smanjenu proizvodnju fruktoze-2,6-bisfosfata, ali i do značajno povećane aktivnosti glukoza-6-

fosfataze. U suprotnosti s tim istraživanjem, glikoliza može ostati nepromijenjena ili čak malo povećana ako dođe do hiperinzulinemije kao posljedice inzulinske rezistencije. Ipak, blago povećanje glikolize u tom slučaju ne može nadvladati glikogenolizu i glukoneogenezu koje su poprilično povećane u šećernoj bolesti (Guoa i sur., 2012).

Slika 3. prikazuje smanjenja i povećanja glikolize u glavnim tkivima u stanjima šećerne bolesti tipa 1 i 2. U šećernoj bolesti tipa 1, apsolutni nedostatak inzulina uzrokuje smanjenje glikolize u svim tkivima uključenim u metabolizam glukoze u organizmu. Nasuprot tome, u šećernoj bolesti tipa 2, inzulinska rezistencija uzrokuje hiperinzulinemiju koja se kompenzira povećanjem glikolize u jetri, adipoznom tkivu i β-stanicama gušterače. Za razliku od drugih tkiva, u mozgu ne dolazi do kompenzacije i glikoliza ostaje smanjena.



Slika 3. Stupanj glikolize različitih tkiva u šećernoj bolesti (preuzeto iz članka Guoa i sur., 2012)

U zadnjih nekoliko desetljeća koriste se lijekovi koji djeluju na redukciju jetrene proizvodnje glukoze. Također, povećanje sekrecije inzulina iz β-stanica Langerhansovih otočića jedan je od načina postizanja euglikemije.

1.3 Regulacija glikolitičkog puta

Glikolizom se razgrađuje glukoza da bi se proizveo ATP te se stvaraju preteče za biosintetske reakcije, npr. za sintezu masnih kiselina. Potencijalna mjesta regulacije glikolize su enzimi heksokinaza, fosfofruktokinaza i piruvat-kinaza, koji kataliziraju gotovo irevezibilne reakcije. Na aktivnost enzima utječu alosterički efektori (aktivatori i inhibitori) i kovalentne modifikacije (fosforilacija) dok se sama količina enzima mijenja regulacijom transkripcije ovisno o potrebama metabolizma (Berg i sur., 2013).

1.3.1 Regulacija glikolize u jetrenim stanicama

Jetra ima važnu funkciju u održavanju koncentracije glukoze u krvi. Metabolizam glukoze u jetri reguliraju hormoni koji utječu na enzimsku aktivnost (npr. na fosforilaciju/defosforilaciju piruvat kinaze) ili sintezu samog enzima (mRNA). U jetrenim stanicama, višak glukoze pohranjuje se u obliku glikogena, a kad je koncentracija glukoze u krvi niska, pokreće se proces glikogenolize, razgradnje glikogena i otpuštanje glukoze u krv. Tijekom gladovanja ili nisko ugljikohidratne dijete potreban je endogeni izvor glukoze (nastao razgradnjom glikogena). U tim stanjima, u krvi je povišena razina glukagona, glukokortikoida i katekolamina što posljedično uzrokuje povećanu aktivnost enzima glukoneogeneze (PEPCK, F-1,6-Paze, G-6-Paze), a smanjenu aktivnost glikolitičkih enzima (PK, 6-PFK, GK). U stanjima sitosti, povišena koncentracija glukoze dovodi do povišenja inzulina čime se potiče glikoliza i sinteza glikogena. Kratkoročni efekti glukagona, inzulina i kateholamina izraženi su u promjenama koncentracija cAMP-a, promjenama u alosteričkim efektorima i fosforilaciji pojedinih supstrata u ciklusu (Berg i sur., 2013).

1.3.1.1 Fosfofruktokinaza

Regulacija glikolize na razini fosfofruktokinaze jednaka je u mišićima i u jetri. U jetri, fosfofruktokinazu inhibira citrat pojačavajući pritom inhibicijski učinak ATP-a. Citrat je rani međuprodukt citratnog ciklusa te njegove povećane razine u citoplazmi znače da biosintetskih preteča ima dovoljno i nije potrebna dodatna razgradnja glukoze. Fosfofruktokinaza je regulirana, tj. aktivirana i signalnom molekulom fruktoza-2,6-bisfosfatom (F-2,6-BP). Kad je koncentracija glukoze u krvi visoka, u jetri poraste koncentracija fruktoza-6-fosfata što posljedično povećava sintezu aktivatoske molekule F-2,6-BP. Vezanje F-2,6-BP povećava afinitet fosfofruktokinaze prema F-6-P i smanjuje inhibicijski učinak ATP-a. Dakle, glikoliza je pojačana kada glukoze ima mnogo, takav proces se naziva dalekometna stimulacija (Berg i sur., 2013).

1.3.1.2 Heksokinaza

Jetra ima posebni izoenzim heksokinaze, tzv. glukokinazu. Glukokinaza fosforilira glukozu samo kad je koncentracija glukoze visoka jer, za razliku od heksokinaze, ima 50 puta niži afinitet za glukozu. Glukokinaza nije inhibirana glukoza-6-fosfatom, njena uloga je da

pojačano proizvodi G-6-P za sintezu glikogena i za nastanak slobodnih masnih kiselina. Mali afinitet glukokinaze za glukozu u jetri prepušta mišićima i mozgu da koriste glukozu kada su njene količine u krvi manje te osigurava da se glukoza ne rasipa kada je ima dovoljno.

1.4 Piruvat kinaza

Piruvat kinaza ima ključnu ulogu u zadnjem koraku glikolize, prevođenju fosfoenolpiruvata u piruvat. Ovaj enzim podložan je alosteričkoj regulaciji i fosforilaciji. Regulacija sinteze jetrenog izoenzima na razini mRNA vrlo je kompleksna. Sinteza mRNA i aktivnost piruvat kinaze sniženi su tijekom gladovanja i šećerne bolesti (kad je koncentracija glukoze u krvi niska), ali povećavaju se uzimanjem ugljikohidrata i inzulina. Glukagon, preko cAMP-a, inhibira transkripciju gena za jetreni izoenzim L te istovremeno potiče degradaciju mRNA. Inzulin i glukagon utječu na transkripciju mRNA na način da inzulin potiče sintezu mRNA glikolitičkih enzima, a inhibira sintezu enzima glukoneogeneze, dok glukagon ima suprotni efekt. Za razliku od inzulina i glukagona koji reguliraju sintezu svih enzima u metabolizmu glukoze, glukokortikoidi djeluju samo na pojedine enzime (PEPCK, PK). Glukoza je ključna regulatorna molekula koja je potrebna da bi inzulin imao utjecaj na piruvat kinazu (potrebni su i glukoza i inzulin istodobno). Utjecaj inzulina na enzime glukoneogeneze neovisan je o glukozi.



Slika 4. ATP-pyruvate 2-O-phosphotransferase, EC 2.7.1.40 (preuzeto s Protein Data Bank: http://www.rcsb.org)

1.4.1 Izoenzimi piruvat kinaze

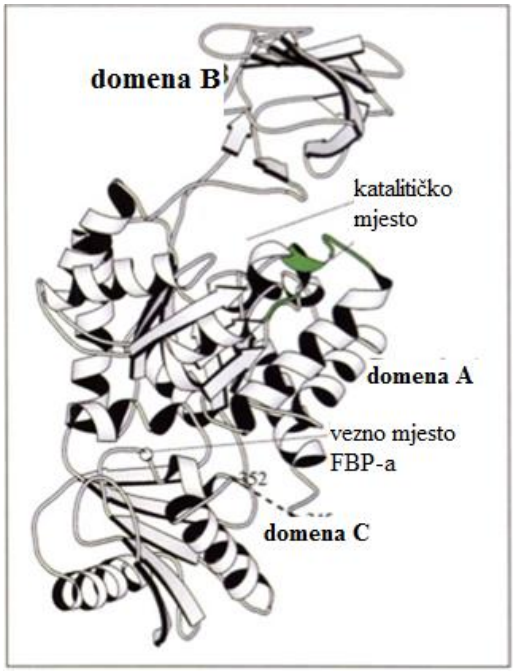
Postoji nekoliko izoenzima piruvat kinaze, M1 je pretežito zastupljen u mišićima, srcu i mozgu, M2 u bubrezima, masnom tkivu i plućima, L tip postoji samo u jetri dok se R izoenzim nalazi samo u eritrocitima. Izoenzimi imaju sličnu alosteričku regulaciju u jetri i mišićima no bitno se razlikuju u podložnosti kovalentnim modifikacijama. Različitosti izoenzima vidljive su i u njihovim kinetičkim karakteristikama. M1-PK prati Michaelis-Menten kinetiku i pokazuje hiperboličnu krivulju za oba supstrata te se ne može alosterički regulirati. M2, R i L izoenzimi imaju sigmoidalnu krivulju za PEP te su podložni alosteričkoj regulaciji. M1 i M2 su kodirani istim genom ali se sintetiziraju iz različitih mRNA što uzrokuje razlike u C domeni samog proteina. R i L izoenzimi također su kodirani istim genom ali imaju različite promotore. R je veći od L izoenzima te ima dodatni peptidni dio na N-kraju proteina. Jetreni izoenzim je jedini tip piruvat kinaze čija aktivnost se može regulirati fosforilacijom na N-kraju.

Postoje dva tipa jetrenog izoenzima (L' i L) te su oni kodirani istim genom. Gen sadrži alternativne početne eksone za sintezu L' i L primarnih transkripata dok su ostalih deset eksona prisutni u oba transkripta. Aktivnost jetrenih izoenzima regulira se alosteričkim efektorima i fosforilacijom serina na N-kraju samog proteina. Nesmotani protein je u inaktivnom T-stanju, a aktivira se vezanjem supstrata (PEP) ili alosteričkog efektora (FBP).

1.4.2 Struktura enzima

Piruvat kinaza je tetramer sastavljen od podjedinica od 57 kDa. Jedna podjedinica se može podijeliti na tri veće domene (A, B i C) od kojih je domena A najveća i sastoji se od 8 paralelnih β-nabranih ploča. Na C-kraju proteina nalaze se dodatna 3 α-heliksa (A6', Aa7', Aoa8') koji su ključni dio katalitičkog mjesta te su bitni za alosteričku regulaciju. Aktivno mjesto svake podjedinice nalazi se u pukotini između A i B domene. Struktura piruvat kinaze istražena je prema modelu enzima u E. coli (tip 2 piruvat kinaze) koji je homotetramer. Mjesto gdje se vežu alosterički faktori nalazi se na površini enzima između domena A i C, udaljeno od aktivnog mjesta (između A i B). Aktivno i alosteričko mjesto čine bočni ogranci aminokiselina jedne podjedinice tetramera. Između domena nalaze se polipeptidni segmenti koji čine fleksibilne poveznice. Dugačka petlja (6) na osmoj β-nabranoj ploči ima ulogu vezanja supstrata. U inaktivnom stanju enzima (T-stanje), dolazi do konformacijske promjene na petlji čime se mijenja aktivno mjesto. Ovakva promjena katalitičkog centra

objašnjava mali afinitet enzima za vezanje supstrata. Istovremeno dolazi i do rotacije ostalih podjedinica, čim jedna podjedinica prijeđe u T-stanje više nije kompatibilna s ostalim podjedinicama u R-stanju, stoga dolazi do lančane deaktivacije ostalih podjedinica.



Slika 5. Struktura piruvat kinaze (preuzeto iz članka Mattevi i sur., 1995)

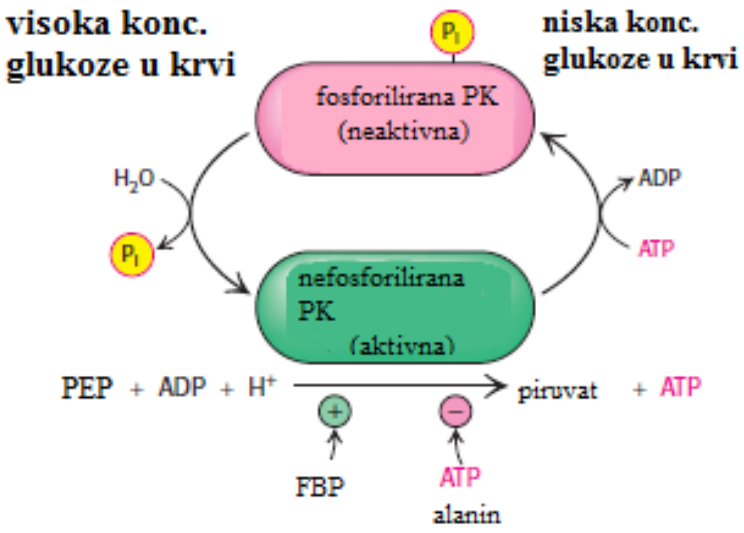
1.4.3 Vezanje iona i kiselost medija

Za stabilizaciju i aktivaciju piruvat kinaze potrebno je vezanje monovalentnih i dvovalentnih kationa. Najčešće se vežu Mg^{2+} i K^{+} ali se također mogu vezati i Mn^{2+}, Co^{2+}, NH_4^{+}, Na^{+}. Uloga magnezija je koordinacija oba supstrata (PEP i ADP) u aktivnom mjestu piruvat kinaze dok kalij usmjerava karboksilnu skupinu PEP-a te povećava v_{max} i afinitet enzima za supstrate. Vezanje kalija je izričito važno jer omogućava neovisno vezanje supstrata u aktivnom mjestu. Kad nema kalija ADP se ne može vezati ako se prethodno nije vezao PEP. Zbog svojstva vezanja kationa, enzim je najaktivniji kod pH 6,2. Promjenom pH uvjeta reakcije mijenjaju se i svojstva enzima, u kiselom mediju enzim je pretežito u R-stanju (aktivan) dok zaluživanjem prelazi u T-stanje (neaktivan).

1.5 Regulacija katalitičke aktivnosti piruvat kinaze

1.5.1 Inaktivacija fosforilacijom

Istraživanja na jetri štakora pokazala su kako piruvat kinaza može biti fosforilirana in vitro pomoću cAMP-ovisne protein kinaze, tj. protein kinaze A. Fosforilirani enzim ima veći afinitet za vezanje inhibitora ATP-a i alanina dok mu se afinitet prema PEP-u i F-1,6-P smanjuje. Fosforilacija povećava Km enzima za PEP, ali nema nikakvog efekta na aktivnost enzima zasićenog supstratom ili F-1,6-P. Alosterički efektori piruvat kinaze mogu i posredno utjecati na njenu aktivnost modulirajući pritom fosforilaciju preko cAMP-ovisne protein kinaze (F-1,6-P i PEP inhibiraju fosforilaciju piruvat kinaze cAMP-om). Piruvat kinaza u T-stanju je bolji supstrat za fosforilaciju od aktivnog oblika enzima u R-stanju. Jetreni izoenzim se može fosforilirati in vitro i preko Ca^{2+} -kalmodulina. Protein kinaza A fosforilira enzim na serinu (Ser12) dok Ca^{2+} -kalmodulin fosforilira na dva bočna ogranka, serinu i treoninu, što udvostručava učinak takve fosforilacije. Ca^{2+}-kalmodulin fosforilira piruvat kinazu pod utjecajem adrenergičnih agonista. Inzulin sprječava takvu fosforilaciju neovisno o reguliranju razina cAMP-a, mogući mehanizam je da potiče defosforilaciju enzima piruvat kinaze.



Slika 6. Kontrola katalitičke aktivnosti piruvat-kinaze (preuzeto iz literaturnog navoda Berg i sur., 2013)

1.5.2 Alosterička regulacija enzima

Alosterička aktivacija enzima podrazumijeva konformacijske promjene koje prevode enzim iz inaktivnog T-stanja u aktivno R-stanje. Pritom dolazi do rotacija domena B i C piruvat kinaze što uzrokuje rotaciju i aktivaciju podjedinica tetramera. Vezanjem efektorskih molekula na jednoj strani molekule (alosteričko mjesto) utječe na vezanje supstrata na drugom kraju enzima (aktivno mjesto). Piruvat kinaza alosterički se aktivira fruktozom-1,6-bisfosfatom, dok su za inhibiciju enzima zaslužni alanin i ATP. U fiziološkim koncentracijama alanina, ATP-a i PEP-a, enzim je u potpunosti inhibiran osim ako se u međuvremenu ne aktivira pomoću F-1,6-BP.

1.5.3 Hormonska regulacija

Izrazito je kompleksna dugoročna regulacija aktivnosti jetrene piruvat kinaze hormonima i prehranom. Utjecaj inzulina zahtjeva stalnu sintezu proteina što upućuje na ključnu važnost povišene razine glukoze u krvi (ni inzulin ni glukoza ne mogu djelovati samostalno). Glukagon (preko cAMP-a) inhibira sintezu piruvat kinaze smanjujuću transkripciju gena i pojačavajući degradaciju mRNA piruvat kinaze. Nakon 24h gladovanja, povećavaju se razine jetrenog cAMP-a i potaknuta je glukoneogeneza dok istovremeno dolazi do smanjenja količine F-2,6-BP za 10%. Kratkoročna regulacija ciklusa glukagonom i katekolaminima ima slab utjecaj na glukoneogenezu jer su enzimi prije podložni fosforilacijskim mehanizmima nego utjecaju hormona. Tijekom produljenog gladovanja i u dijabetesu, glukoneogeneza će se pojačavati kako rastu količine supstrata.

1.5.4 Kinetičke značajke piruvat kinaze

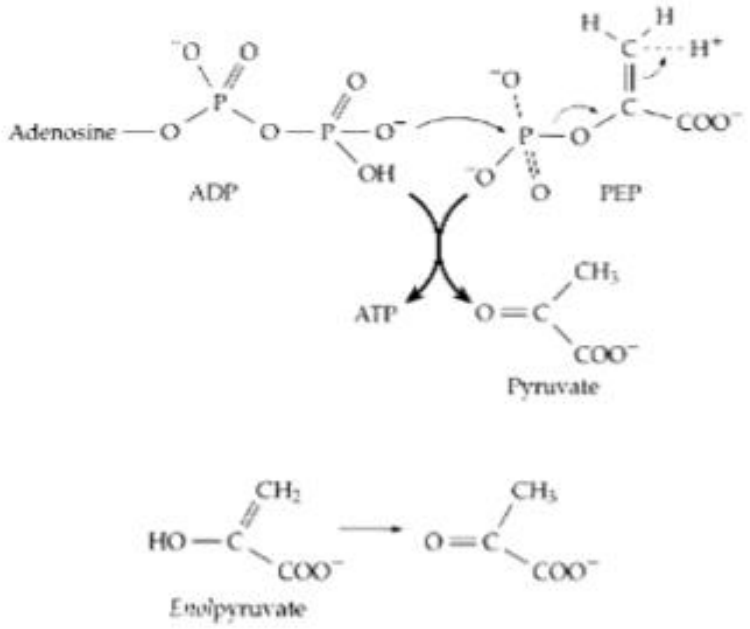
1.5.4.1 Kooperativno vezanje supstrata

Fina regulacija aktivnosti piruvat kinaze postiže se kooperativnim vezanjem jednog od supstrata - fosfoenolpiruvata. Kad se supstrat veže za jednu enzimatsku podjedinicu, dolazi do stimulacije i aktivacije ostalih podjedinica. Kooperativnost vezanja ovisi o fosforilaciji enzima. Nefosforilirani enzim ne pokazuje kooperativnost prema PEP-u u istoj mjeri kao prema ADP-u. Fosforilacijom piruvat kinaze smanjuje se afinitet prema PEP-u ali se pojačava

kooperativnost. Enzim ima podjednaki afinitet za vezanje prve dvije molekule PEP-a dok se afinitet za druge dvije molekule pojačava zbog kooperativnosti.

1.5.4.2 Reakcija prijenosa fosfatne skupine

Reakcija katalizirana piruvat kinazom se sastoji od dva koraka. Prvo dolazi do prijenosa fosfatne skupine sa fosfoenolpiruvata na Mg-ADP, a zatim do brze konverzije enolnog oblika piruvata u keto oblik (Slika 7.). Reakcija pokazuje kooperativnost samo prema fosfoenolpiruvatu (sigmoidalna krivulja) dok interakcija s ADP-om prati Michaelis Menten kinetiku. Ovakav bisupstratni kinetički model objašnjava da vezanje ADP-a ne utječe na interakciju piruvat kinaze sa fosfoenolpiruvatom i obrnuto. Zbog kooperativnosti, već u niskim koncentracijama PEP-a dolazi do porasta brzine reakcije i pojačane aktivnosti piruvat kinaze.



Slika 7. Reakcija prijenosa fosfatne skupine (preuzeto iz članka Faustova I. Thesis for Master Degree, 2006)

1.5.4.3 Aktivatori i inhibitori

Adenozin difosfat (ADP) sudjeluje u reakciji kao kofaktor koji prihvaća fosfatnu skupinu i nastaje adenozin trifosfat (ATP). Ako u reakcijsku smjesu dodamo ATP dolazi do nagomilavanja produkta i ravnoteža se pomiče na stranu reaktanata, smanjuje se brzina reakcije, tj. aktivnost enzima piruvat kinaze. Ovaj tip inhibicije naziva se miješana inhibicija. Moguće je da inhibicijski efekt ATP-a proizlazi iz njegovog kompleksa s magnezijem. Istraživanja pokazuju da u prisutnosti niskih koncentracija magnezija, ATP ima jači inhibicijski učinak.

Prijašnja istraživanja su pokazala da dodatak rastućih koncentracija NADH u reakcijsku smjesu uzrokuje progresivnu inhibiciju jetrene piruvat kinaze. Povećane koncentracije NADH uzrokuju nagomilavanje koenzima na regulatornoj strani receptora piruvat kinaze. Učinak NADH je nekompetitivna inhibicija. Slobodne masne kiseline, kao što su oktanoat i oleinska kiselina, djeluju na piruvat kinazu na način da sami supstrat (fosfoenolpiruvat) postane inhibitor. Inhibicijski efekti NADH i masnih kiselina dva su najčešća mehanizma koji blokiraju ovaj enzim tijekom glukoneogeneze.

Već navedeni aktivator enzima, fruktoza-1,6-bisfosfat, regulira piruvat kinazu ovisno o njenom afinitetu prema supstratu. Dokazano je da fruktoza-1,6-bisfosfat ima najveći učinak na enzim kod malih koncentracija fosfoenolpiruvata. Dodatak ovog aktivatora u reakcijsku smjesu potiče maksimalnu aktivnost enzima piruvat kinaze već pri nižim koncentracijama supstrata. S obzirom da se fruktoza-1,6-bisfosfat sintetizira i tijekom glukoneogeneze, treba pojasniti kada ona djeluje aktivatorski na piruvat kinazu. Tijekom glukoneogeneze, povećano je stvaranje slobodnih masnih kiselina koje inhibiraju jetrenu piruvat kinazu i F-1,6-P neće imati aktivatorski učinak. U niskim koncentracijama slobodnih masnih kiselina, F-1,6-P aktivirat će piruvat kinazu i pojačati će proces glikolize. Dakle, prisutnost slobodnih masnih kiselina utječe na odluku o aktivatorskom učinku fruktoze-1,6- fosfata ovisno o tome radi li se o glukoneogenezi ili glikolizi.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U šećernoj bolesti dolazi do povećane proizvodnje glukoze u stanicama jetre, relativnog smanjenja aktivnosti enzima glikolize i glikogeneze uz povećanje aktivnosti enzima glikogenolize i glukoneogeneze (Guoa i sur., 2012).

Ovim istraživanjem ispitali smo stupanj glikolize u HepG2 stanicama tretiranim glukozom, dakle u hiperglikemijskim uvjetima. HepG2 stanice tretirali smo s četiri otopine različitih koncentracija glukoze (5 mM, 20 mM, 30 mM i 50 mM) te su tako tretirane stanice predstavljale model stanica hepatocita osoba sa šećernom bolesti. Kao stupanj glikolize određivali smo katalitičku aktivnost enzima piruvat kinaze. Piruvat kinaza ima ključnu ulogu u zadnjem koraku glikolize tj. prevođenju fosfoenolpiruvata u piruvat. U znanstvenoj literaturi nije razjašnjen učinak različitih koncentracija glukoze na aktivnost glikolitičkog enzima piruvat kinaze pa je upravo zbog toga postala predmetom ovog istraživanja.

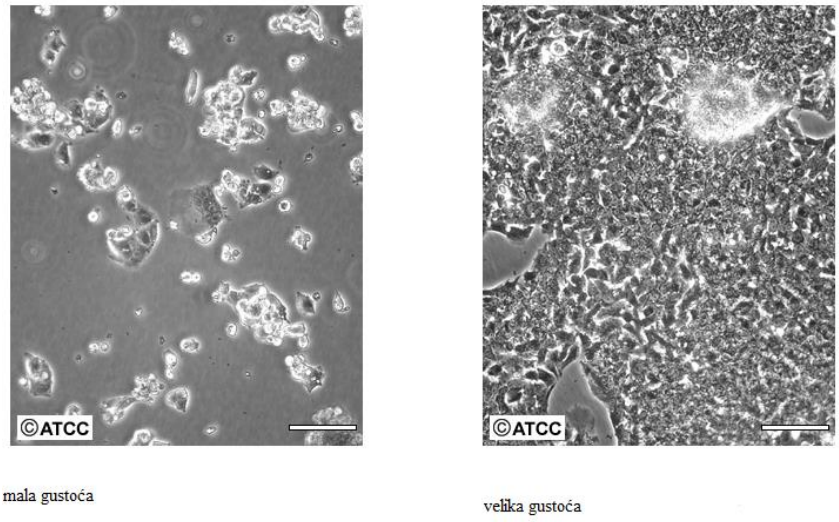
Cilj našeg *in vitro* istraživanja je odabrati onu koncentraciju glukoze kojom bismo postigli uvjete najsličnije uvjetima *in vivo*. Pratili smo u kojoj skupini tretiranih stanica tj. u kojoj koncentraciji glukoze je aktivnost enzima piruvat kinaze bila najniža. Odabirom optimalne koncentracije glukoze postavili smo pogodne uvjete za ispitivanje učinka aktivnih substanci na aktivnost piruvat kinaze. Razne aktivne substance mogu djelovati na povećanje aktivnosti piruvat kinaze tj. na povećanje glikolize te se kao takve smatraju potencijalnim lijekovima u šećernoj bolesti.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 HepG2 stanična linija

HepG2 stanična linija predstavlja *in vitro* model humanog hepatocelulanog karcinoma. Kada se pravilno kultivira postiže visoki stupanj diferencijacije, formira apikalne i bazolateralne membrane te vjerodostojno predstavlja strukture stanica jetre. Stanice eksprimiraju mnoge gene koje eksprimiraju i normalni hepatociti, a to su npr. geni za albumin, transferin, haptoglobin itd. S obzirom na dobru diferencijaciju stanica, ova stanična linija pogodna je za istraživanja intracelularnog transporta molekula te disfunkcija stanica koje mogu uzrokovati različite jetrene bolesti. HepG2 je trajna kultura stanica što je dodatno čini pogodnom za istraživanja jetrenog metabolizma, utjecaja toksičnih tvari na jetru te jetrenu funkciju detoksifikacije. Također, vrlo je česta njihova kultivacija i upotreba u istraživanjima karcinogeneze jetre.

Kultura stanica izolirana je iz petnaestogodišnjeg dječaka s diferenciranim hepatocelularnim karcinomom. To su adherentne stanice koje rastu prihvaćene za podlogu sve dok ne postignu 100%-tnu konfluentnost ili dok ne potroše hranjivi medij u kojem rastu. Kultura stanica HepG2 korištena u ovom radu kultivirana je u kompletnom hranjivom MEM mediju (engl. *Minimum Essential Medium*, MEM) bez dodatka antibiotika ili antimikotika, ali uz dodatak dimetil sulfoksida (DMSO) u tekućem dušiku na -96°C. Mediju smo dodali fetalni goveđi serum (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS) 10%-tne koncentracije, u inkubatoru na 37°C u struji zraka s 5%-tnim CO_2 i relativnom vlažnosti od 95%.



Slika 8. Prikaz HepG2 kulture stanica pod mikroskopom (preuzeto s American Type Culture Collection, ATCC, web stranica: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx?geo_country=hr#characteristics)

3.1.1 Kultiviranje HepG2 stanica

Na samom početku stanice smo odmrznuli tzv. „brzom metodom odmrzavanja“ u kupelji na 37°C. Odmrznutu ampulu sa stanicama obrisali smo 70%-tnim etanolom te započeli kultiviranje u kabinetu u sterilnim uvjetima. Flask (BD Falcon) od 25 cm^2 označili smo tako da smo na njega napisali tip stanica, broj pasaža, datum i ime. U flask smo stavili 10 mL kompletnog MEM medija te ga spremili u inkubator da se zagrije na 37°C. Zagrijani flask izvadili smo iz inkubatora i u njega pipetom prenijeli stanice. Nakon prenošenja stanica, flask smo ponovno pohranili u inkubator na 37°C u struji zraka s 5%-tnim CO_2 i relativnom vlažnosti od 95%.



Slika 9. Prikaz flaska ispunjenog medijem i stanicama (preuzeto s web stranice: https://www.shutterstock.com/image-photo/handling-cell-cultures-biomedical-laboratory-cancer-89768431?src=5Z4xZkb4k3HFslkbPRkgLg-1-53)

3.1.2 Postupak tripsinizacije i presađivanje stanica

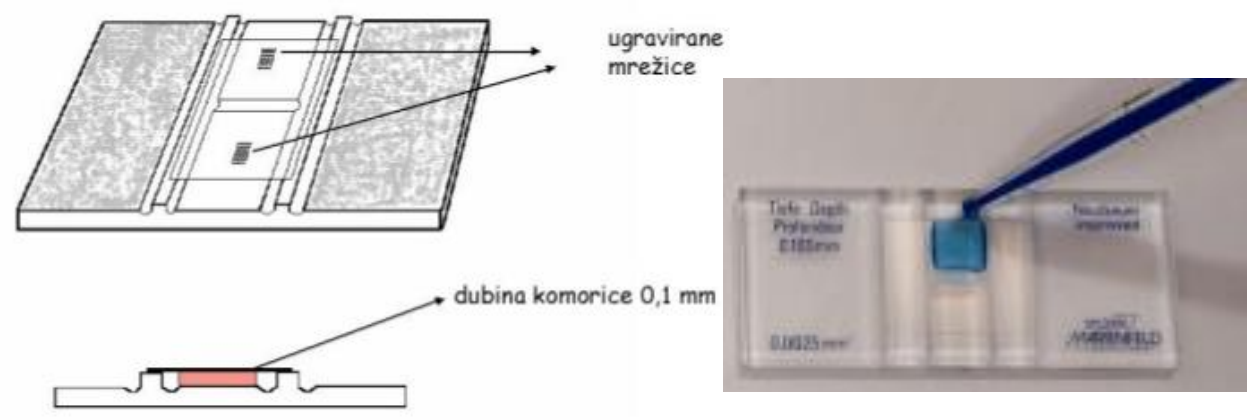
Stanice smo čuvali u inkubatoru u pogodnim uvjetima sve dok nisu postigle odgovarajuću konfluentnost veću od 80%. Konfluentnost je svojstvo normalnih adherentnih stanica da se prestanu dijeliti i gibati kada prekriju cijelu površinu flaska u jednom sloju. Pratili smo konfluentnost stanica nekoliko dana i zatim odsisali medij vakuum sisaljkom. Isprali smo stanice s 5 mL fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffer saline*, PBS) koji smo uklonili na isti način kao i medij. Nakon ispiranja s PBS-om, stanice smo isprali s 5 mL EDTA-fiziološke otopine te je uklonili. Zbog svojstva adherencije stanice se neće odvojiti od podloge tijekom ispiranja i odsisavanja medija. Kako bismo presadili stanice u drugi flask, izveli smo postupak tripsinizacije. Na stanice smo dodali 1 mL 0.5%-tnog tripsina koji će pokidati proteinske veze i omogućiti odvajanje stanica s podloge. Flask sa stanicama i tripsinom pospremili smo u inkubator na 5 minuta, a nakon toga smo dodali još 5 mL kompletnog MEM medija kojim smo razrijedili tripsin. Pipetom smo resuspendirali stanice i

prenijeli ih u epruvete (BD Falcon) od 15 mL. Nakon prenošenja, epruvete sa stanicama u mediju i tripsinu smo centrifugirali 10 minuta na 1200 rpm. Supernatant smo dekantirali, a talog stanica resuspendirali u 5 mL medija. Stanice smo prenijeli u novi flask od 75 cm^2 koji smo propisno označili te u njega prethodno dodali 25 mL kompletnog MEM medija. Flask smo pohranili u inkubator na 37°C u struji zraka s 5%-tnim CO_2 i relativnom vlažnosti od 95%.

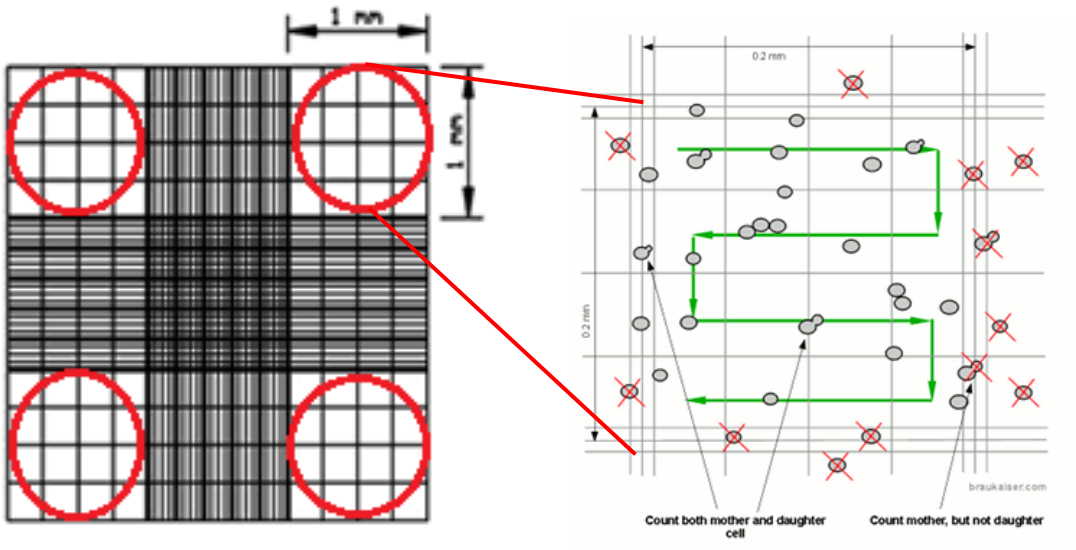
Nakon nekoliko dana inkubacije, kada su stanice postigle odgovarajuću konfluentnost u većem flasku (75 cm^2), ponovno smo ih presadili. Postupak je jednak opisanom, dakle uključuje odsisavanje medija, ispiranje PBS-om i EDTA-fiziološkom otopinom, tripsinizaciju i centrifugiranje. Nakon centrifugiranja, dekantirali smo supernatant, a zaostali talog stanica resuspendirali u mediju. Zatim je uslijedilo brojanje stanica kako bismo procijenili je li ih potrebno još uzgajati i presađivati ili ih imamo dovoljno za tretiranje glukozom.

3.1.3 Brojanje stanica

Kako bismo odredili broj i vijabilnost stanica, stanice smo prethodno obojili bojom triptan plavo (engl. *Triptan Blue*). Boja se akumulira u mrtvim stanicama dok žive stanice ostaju neobojane jer pomoću membranskih pumpi aktivno izbacuju boju iz citoplazme. Za brojanje stanica u eppendorf epruvetici smo pomiješali 50 µl suspenzije stanica i 50 µl 0,04%-tne otopine boje triptan plavo te ostavili da stoji 10 minuta na sobnoj temperaturi. Stanice smo brojali u Bürker-Türkovoj komorici pod svjetlosnim mikroskopom. Vijabilnost izražavamo kao postotak živih stanica u ukupnom broju stanica.



Slika 10. Shematski prikaz Bürker-Türkove komorice i nanošenje suspenzije obojanih stanica (preuzeto s web stranice: https://pt.slideshare.net/AnaAnticevic/brojenje-eritrocita1?nomobile=true)



Slika 11. Princip brojanja stanica

Stanice se broje u 4 kvadranta površine 1 mm^2 pazeći pritom da su uključene stanice koje se nalaze na lijevom i gornjem rubu dok isključujemo stanice koje se nalaze na desnom i donjem rubu. Broj stanica računa se prema formuli:

$$\frac{\text{ukupan broj stanica u 4 velika kvadranta}}{4} \times 10\,000 \times 2 = \text{broj stanica / mL}$$

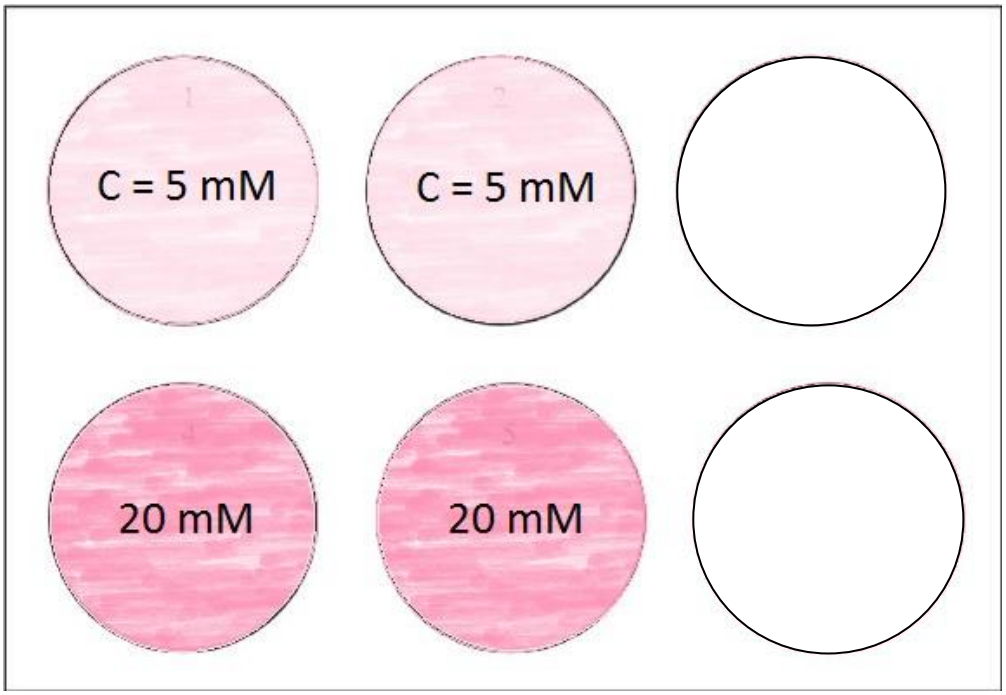
3.2 Tretiranje stanica glukozom

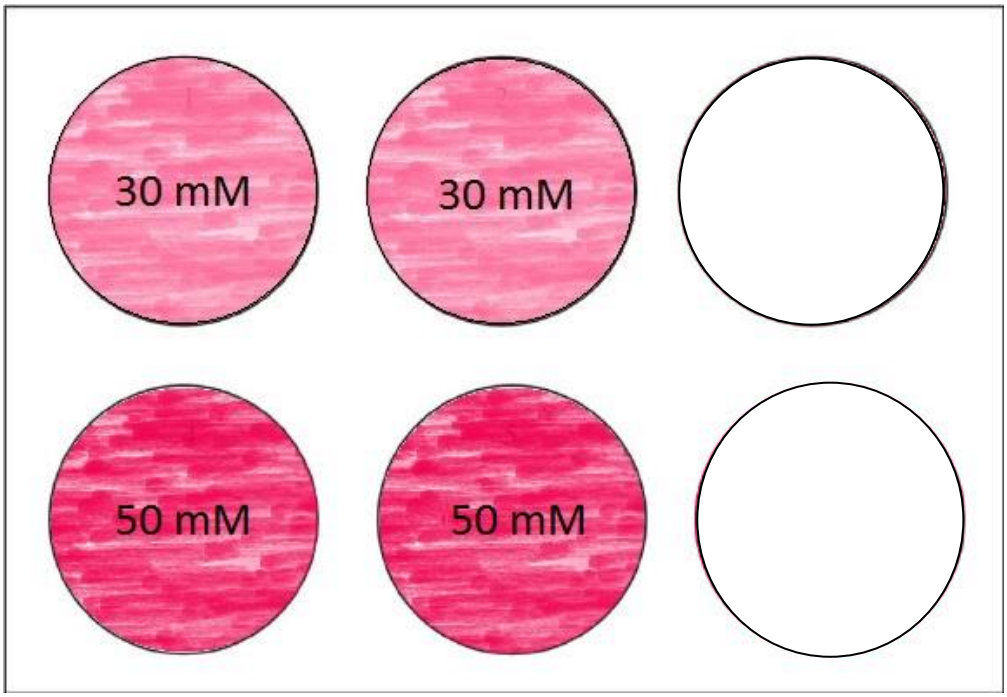
Stanice koje smo uzgojili tretirali smo glukozom kako bismo postigli hiperglikemijske uvjete i tako prikazali stanje hepatocita kod osoba sa šećernom bolesti. Promatrali smo utjecaj rastuće koncentracije glukoze na piruvat kinazu. Glukozu smo odvagali i otopili u 10 mL MEM medija te tako pripremili četiri koncentracije kojima smo tretirali stanice: 5 mM, 20 mM, 30 mM i 50 mM otopina glukoze. Otopine smo pripremili u nesterilnim uvjetima te smo ih, prije tretiranja stanica, profiltrirali kroz sterilni filter u sterilne epruvete.

HepG2 stanice nasadili smo na pločice sa 6 bunarića, svaki bunarić sadržavao je oko 1 500 000 stanica. Pločice sa stanicama inkubirali smo 24 sata na 37°C u struji zraka s 5% CO_2 i relativnom vlažnosti od 95%. Nakon inkubacije odsisali smo medij vakuum sisaljkom, isprali stanice PBS-om te potom odsisali i PBS.

Stanice smo tretirali na sljedeći način:

1) C = kontrola – HepG2 stanice tretirane 5 mM otopinom glukoze u MEM mediju
2) HepG2 stanice tretirane 20 mM otopinom glukoze u MEM mediju
3) HepG2 stanice tretirane 30 mM otopinom glukoze u MEM mediju
4) HepG2 stanice tretirane 50 mM otopinom glukoze u MEM mediju





3.3 Određivanje katalitičke aktivnosti piruvat kinaze u lizatu HepG2 stanica

Određivanje katalitičke akivnosti piruvat kinaze služi za procjenu stupnja glikolize u HepG2 stanicama kojima smo omogućili hiperglikemijske uvjete, tj. tretirali ih da postanu dijabetičke. Piruvat kinaza jedan je od glavnih enzima glikolize koja se odvija u citosolu, stoga smo i naša određivanja katalitičke aktivnosti vršili u citosolu HepG2 stanica.

Nakon inkubacije na 37°C, odsisavanja medija i ispiranja PBS-om, na stanice u bunarićima smo dodali pufer za liziranje (PBS + Tween). Stanice smo zatim fizički sastrugali „scraperom“ i prenijeli u „eppendorf“ epruvetice koje smo čuvali na ledu. Prije samog određivanja pripravili smo 5%-tni homogenat u mediju za homogeniziranje te sonicirali 15 sekundi na ledu (+4°C) na podešenoj jačini ultrazvučnog homogenizatora 9 W. Uzorke smo sonicirali kako bi se razorile membrane stanica. Nakon soniciranja, uzorke smo centrifugirali 20 minuta na 14 000 rpm i +4°C (Biofuge stratos, Heraeus). Supernatant se odvoji i premjesti u nove epruvetice za određivanje katalitičke aktivnosti piruvat kinaze u staničnom lizatu.

Metoda se temelji na sljedećoj reakciji :

$$\text{PEP} + \text{ADP} \xrightarrow[\text{PK}]{Mg^{2+},K^{+}} \text{pyruvate} + \text{ATP}.$$

Katalitička aktivnost enzima piruvat kinaze određuje se kinetičkom metodom kontinuiranog mjerenja jer se mjerenje provodi kontinuirano kroz prvih 90 sekundi djelovanja enzima. Mjerenje se vrši spektrofotometrijski na poluautomatskom biokemijskom analizatoru Trace 300 (Trace Scientific Ltd, Australija) na valnoj duljini 340 nm.



Slika 12. Analizator Trace 300 (Dora Vuljanić)

Optimalni uvjeti u kojima se odvija enzimska reakcija su temperatura od 25° C i pH 7,4 koji postižemo dodatkom TRIS pufera koncentracije 50 mM. Reakcija započinje u trenutku dodavanja uzorka u reakcijsku smjesu. Redni brojevi na lijevoj strani tablice protokola označavaju redoslijed dodavanja reagenasa u reakcijsku smjesu, dakle uzorak se dodaje posljednji. Kao slijepu probu koristili smo destiliranu vodu. Mjerenja uzoraka vršena su u duplikatu.

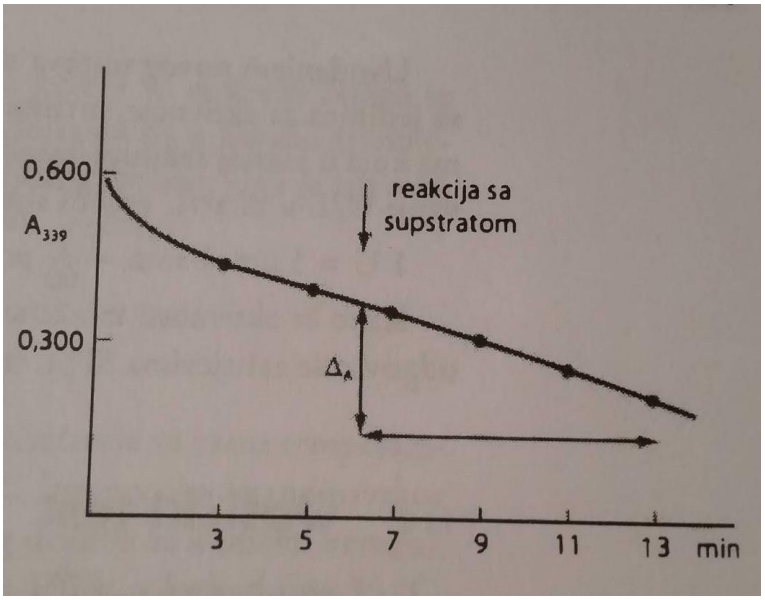
PROTOKOL ZA PRIPREMU REAKCIJSKE SMJESE:

	REAGENSI	**VOLUMEN / µL**	**KONAČNA KONCENTRACIJA**
1.	TRIS pufer pH 7,4	1000	50 mM
2.	KCl	100	40 mM
3.	$MgSO_4$	100	5 mM
4.	LDH	1	10 U/L
5.	H_20	1350	/
6.	NADH	50	0,2 mM
7.	PEP	200	1 mM
8.	ADP	100	1 mM
9.	uzorak	100	/

Spektrofotometrijsko mjerenje na analizatoru Trace 300 temelji se na optičkom testu. Optički test koristi apsorpcijska svojstva reduciranih oblika koenzima $NAD^+/NADH_2$ i $NADP^+/NADPH_2$. Reducirani koenzimi ($NADH_2$ i $NADPH_2$) apsorbiraju svjetlost na valnoj duljini 340 nm dok njihovi oksidirani oblici ne apsorbiraju svjetlost na toj valnoj duljini. S obzirom da u navedenoj reakciji kataliziranoj piruvat kinazom ne sudjeluju koenzimi, potrebno je uvesti tzv. indikatorsku reakciju kataliziranu oksidoreduktazom. Primjer takve reakcije je redukcija piruvata u laktat katalizirana enzimom laktat dehidrogenazom gdje istovremeno dolazi do oksidacije koenzima NADH u NAD^+.



Nastali produkt NAD^+ ne apsorbira svjetlost na 340 nm stoga ćemo vidjeti pad apsorbancije kao što je prikazano na sljedećem grafu:



Slika 13. Tijek reakcije katalizirane laktat dehidrogenazom (preuzeto iz literaturnog navoda Štraus i sur., 2009)

3.3.1 Izračunavanje aktivnosti enzima

Apsorbancija se očitava nakon 30, 60 i 90 sekundi na 340 nm, odredi se razlika apsorbancija A_{90} i A_{30} ($\Delta A/min$) te se pomoću molarnog apsorpcijskog koeficijenta reduciranog koenzima izračuna katalitička aktivnost enzima.

RAČUN:

$$U/L = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d \times t} \times \frac{TV}{PV} \times 10^{\wedge}6$$

ε-molarni koeficijent apsorbancije $NADH_2$ ($6{,}30 \times 10^3$ L mol^{-1} cm^{-1})

d-debljina kivete (1 cm)

t – vrijeme (1 min)

ΔA – razlika apsorbancija A_{90} i A_{30}

TV-ukupni volumen reakcijske smjese (3 ml)

PV-volumen ispitivanog uzorka (0,1 ml)

10^6-faktor koji prevodi odgovor u μmol/min/L (IU/L)

3.4 Statistička analiza podataka

Iz dobivenih rezultata izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije za ΔA/min tj. aktivnosti piruvat kinaze u hiperglikemijskim uvjetima (četiri različite koncentracije glukoze: kontrolna 5 mM, 20 mM, 30 mM i 50 mM). Podaci su statistički obrađeni u komercijalnom statističkom programu GraphPad Prism 6.01 i Microsoft Office Excel 2016.

Tražila se statistički značajna razlika između kontrolne skupine C = 5 mM i ostalih skupina 20 mM, 30 mM i 50 mM. Za to je primijenjen one-way ANOVA test. Za sva ispitivanja vrijednost $p < 0.05$ smatra se statistički značajnom jer se tada sa 95% sigurnošću može tvrditi da je razlika u rezultatima između dvije skupine signifikantna. Kako bi se odredilo između kojih skupina postoji statistički značajna razlika korišten je Sidakov test.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Rezultati

Sva mjerenja vršena su u duplikatu. Kontinuiranom metodom mjerili smo promjenu apsorbancije reduciranog koenzima unutar jedne minute te smo to izrazili kao ΔA/min. ΔA izračunali kao se razliku apsorbancija A_{90} i $A_{30.}$ Iz dobivenih rezultata izračunali smo srednju vrijednost i standardnu devijaciju. Podaci su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Rezultati mjerenja apsorbancije reduciranog koenzima $NADH_2$ na 340 nm te izračunate srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD)

koncentracija glukoze	A_{30}	A_{60}	A_{90}	$\Delta A=A_{90}-A_{30}$	*srednja vrijednost*	SD
C = 5 mM	0,963	0,907	0,839	0,124	0,1245	0,0007
C = 5 mM	0,925	0,863	0,800	0,125		
20 mM	1,058	1,032	1,006	0,052	0,0550	0,0042
20 mM	1,236	1,208	1,178	0,058		
30 mM	0,934	0,952	0,915	0,019	0,0420	0,0325
30 mM	0,952	0,92	0,887	0,065		
50 mM	1,027	0,99	0,953	0,074	0,0755	0,0021
50 mM	0,941	0,903	0,864	0,077		

SD – standardna devijacija

C = kontrola – HepG2 stanice tretirane 5 mM otopinom glukoze u MEM mediju

20 mM - HepG2 stanice tretirane 20 mM otopinom glukoze u MEM mediju

30 mM - HepG2 stanice tretirane 30 mM otopinom glukoze u MEM mediju

50 mM - HepG2 stanice tretirane 50 mM otopinom glukoze u MEM mediju

A_{30} - *vrijednost apsorbancije reduciranog koenzima 30 sekundi nakon početka reakcije*

A_{60} - *vrijednost apsorbancije reduciranog koenzima 60 sekundi nakon početka reakcije*

A_{90} - *vrijednost apsorbancije reduciranog koenzima 90 sekundi nakon početka reakcije*

Kako bismo usporedili srednje vrijednosti pojedinih skupina i odredili postoji li među njima statistički značajna razlika koristili smo *one-way ANOVA test*. Kao rezultat tog testa dobivena je ukupna p-vrijednost 0,0262 < 0,05 koja ukazuje da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrijednosti skupina. Da bismo odredili između kojih skupina postoji statistički značajna razlika primijenili smo post-hoc *Sidakov test*. Dobivene p – vrijednosti prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Rezultati Sidakovog testa (α = 0,05)

Skupine uzoraka različitih konc. glukoze	*p - vrijednosti u usporedbi s kontrolom C*
20 mM	0,0396
30 mM	0,0220
50 mM	0,1172

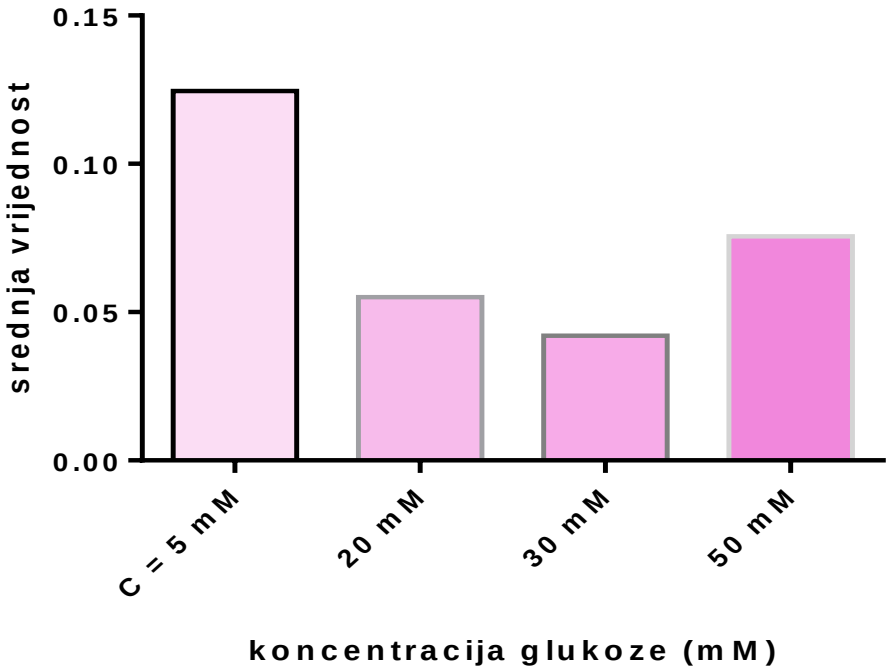
Za ispitivanja gdje je α = 0,05 vrijednost p < 0.05 smatra se statistički značajnom jer se tada sa 95% sigurnošću može tvrditi da je razlika u rezultatima između dvije skupine signifikantna. Dakle postoji statistički značajna razlika između kontrole i skupina 20 mM, odnosno 30 mM. Nasuprot tome, nije dobivena statistički značajna razlika između kontrole i skupine s 50 mM glukozom (p = 0,1172 > 0,05).

Tablica 3. Prikaz katalitičke aktivnosti piruvat kinaze (PK) u različitim skupinama uzoraka

Skupine uzoraka različitih konc. glukoze	*srednja vrijednost ΔA*	*katalitička aktivnost PK (U/L)*
C = 5 mM	0,125	592,86
20 mM	0,055	261,90
30 mM	0,042	200,00
50 mM	0,076	359,52

U tablici 3. prikazani su rezultati katalitičke aktivnosti enzima piruvat kinaze u uzorcima stanica tretiranih različitim koncentracijama glukoze. Katalitičke aktivnosti enzima izračunate su iz srednjih vrijednosti razlika apsorbancija ΔA/min i molarnog koeficijenta apsorbancije $NADH_2$. Grafičkim prikazom 1. prikazana je raspodjela srednjih vrijednosti razlika apsorbancija ΔA/min za svaku skupinu uzoraka.

Grafički prikaz 1. Raspodjela srednjih vrijednosti ΔA/min u ovisnosti o koncentraciji glukoze



4.2 Rasprava

Stupanj glikolize može se odrediti na temelju mjerenja katalitičke aktivnosti heksokinaze (u jetri izoenzim glukokinaza), fosfofruktokinaze i piruvat kinaze. Ova tri enzima karakteristična su samo za glikolizu, kataliziraju jednosmjerne ireverzibilne reakcije te nemaju nikakvu ulogu u procesu glukoneogeneze. Navedeni enzimi pripadaju istoj skupini enzima, tzv. kinazama koje kataliziraju prijenos fosfatne skupine s molekula s visokom energijom prijenosa fosfata na molekule s niskom energijom prijenosa fosfata. S obzirom na slične reakcije koje kataliziraju, može se pretpostaviti da su ovi enzimi regulirani na sličan način pod utjecajem hormona te da im je slična podložnost kovalentnim modifikacijama. Katalitička aktivnost ovih kinaza povećava se ili smanjuje u istim uvjetima ali u različitim omjerima (Weber i sur., 1966).

Prema podacima iz literature dokazano je da aktivnost navedenih ključnih glikolitičkih enzima pada kod osoba sa šećernom bolesti te se također vraća u normalu 24h nakon terapije inzulinom. Do smanjenja aktivnosti glikolitičkih enzima dolazi i tijekom duljeg gladovanja. U šećernoj bolesti značajni problem predstavlja i inzulinska rezistencija. Periferna tkiva nisu osjetljiva na inzulin što se manifestira u smanjenom transportu glukoze, fosforilaciji i sintezi glikogena. Inzulinsku rezistenciju i promjene u sintezi inzulina također treba uzeti u obzir jer je inzulin jedan od vodećih aktivatora glikolize i pripadajućih enzima (Iori i sur., 2008). Osobe koje boluju od šećerne bolesti tipa 2 (90% osoba s tom bolešću) ipak raspolažu s manjim koncentracijama inzulina u krvi što dovodi do zaključka da glikolitički enzimi nisu u potpunosti inhibirani, njihova aktivnost je smanjena ali dovoljna da katalizira reakcije potrebne za metabolizam manjih količina glukoze koje su uspjele ući u stanicu (Weber i sur.,1966). Jetreni izoenzim piruvat kinaze (L-piruvat kinaza) vrlo je podložan utjecaju različitih hormona (inzulin, glukagon, adrenalin itd.) u *in vivo* i *in vitro* uvjetima.

Da bismo razumjeli rezultate ovog istraživanja potrebno je dobro poznavati kinetičke značajke enzima. Piruvat kinaza katalizira reakciju u posljednjem koraku glikolize, pretvorbu fosfoenolpiruvata i ADP-a u piruvat i ATP. Dakle, radi se o „bi –supstranom modelu“ reakcije u kojem se svaki od supstrata ponaša kinetički zasebno. Piruvat kinaza kooperativno veže samo jedan od supstrata (fosfoenolpiruvat) pritom pokazujući značajke saturacijske kinetike (sigmoidalna krivulja). Drugi supstrat (ADP) ne veže se kooperativno za enzim te prati Michaelis-Menten kinetiku (Faustova i sur., 2006).

Ovim istraživanjem ispitali smo utjecaj rastućih koncentracija glukoze na katalitičku aktivnost piruvat kinaze u HepG2 stanicama. HepG2 stanice tretirane glukozom predstavljaju vjerodostojni model hepatocita u osoba sa šećernom bolesti. Katalitička aktivnost piruvat kinaze, u stanicama tretiranim različitim koncentracijama glukoze, predstavlja stupanj glikolize u osoba s različitim stadijem šećerne bolesti. Koncentracija glukoze kojom su tretirane pojedine skupine stanica stehiometrijski odgovara koncentraciji fosfoenolpiruvata koji je produkt predzadnje reakcije razgradnje glukoze. Tijekom istraživanja, u svakoj skupini stanica koristili smo jednake koncentracije supstrata ADP-a (1 mM) kako bismo mogli pratiti promjene aktivnosti enzima koje ovise samo o promjenama koncentracije drugog supstrata, fosfoenolpiruvata. Rezultati istraživanja pokazuju statistički značajan pad katalitičke aktivnosti piruvat kinaze kako se povećavala koncentracija glukoze u stanicama. Ipak, treba zamijetiti da je katalitička aktivnost enzima najniža u uvjetima 30 mM glukoze, dok kod koncentracije 50 mM glukoze ne pokazuje statistički značajan pad u odnosu na kontrolu (5 mM glukoza). Rezultati potvrđuju prethodne hipoteze da je stupanj glikolize manji kod osoba s uznapredovalim stadijem šećerne bolesti kod kojih je prisutna veća koncentracija glukoze u krvi (20 mM i 30 mM). Pritom, fenomen koji se događa kod koncentracije glukoze od 50 mM možemo objasniti saturacijom enzima pri vrlo visokoj koncentraciji fosfoenolpiruvata. Pri niskim koncentracijama fosfoenolpiruvata, afinitet enzima za supstrat je najveći, brzina reakcije naglo poraste čemu pridonosi i činjenica da se fosfoenolpiruvat veže kooperativno. Pri određenoj koncentraciji supstrata postiže se maksimalna brzina reakcije (v_{max}), dolazi do zasićenja svih aktivnih mjesta na enzimu te on ne može vezati više molekula supstrata čak ni ako se koncentracija supstrata i dalje povećava.

Asimetrična kooperativnost piruvat kinaze prema samo jednom od supstrata je poseban oblik kooperativnosti. Piruvat kinaza je tetramer, a s obzirom da svaka podjedinica enzima može vezati po jednu molekulu fosfoenolpiruvata, ukupno se za enzim vežu četiri molekule fosfoenolpiruvata ali u dva koraka. Piruvat kinaza ima jednaki afinitet prema prve dvije molekule fosfoenolpiruvata koje se vežu istovremeno. Nakon vezanja prvih dviju molekula, potaknuta je konformacijska promjena enzima čime se aktivno mjesto promijeni i poveća se afinitet enzima za preostale dvije molekule fosfoenolpiruvata. U svezi s tim, mogu se definirati najviše četiri različita afiniteta piruvat kinaze za fosfoenolpiruvat te četiri moguća načina saturacije aktivnih mjesta na enzimu. Za pojednostavljenje ovakvog modela kooperativnosti, često se uzima postojanje samo dva različita afiniteta PK za fosfoenolpiruvat. Ne smijemo zanemariti činjenicu da se ovdje radi o posebnom „bi-supstratnom modelu“ reakcije gdje je nužna prisutnost i drugog supstrata, ADP-a. Enzim mora biti zasićen ADP-om

kako bi Km za fosfoenolpiruvat u potpunosti i kvantitativno odgovarao afinitetu enzima za PEP (Faustova i sur., 2006). Koristeći ADP koncentracije 1 mM, koja se i inače rutinski koristi u ispitivanjima kinetike reakcija ovoga tipa, većina veznih mjesta na piruvat kinazi (otprilike 90%) u kompleksu je s ADP-om. Dakle uvjet za proučavanje afiniteta enzima za PEP je zadovoljen. Iako se PEP veže kooperativno te pritom brzina reakcije i aktivnost enzima naglo rastu već pri niskim koncentracijama PEP-a, enzim ima puno veći afinitet za ADP nego za PEP. Zbog saturacije enzima, nužno je održavati koncentraciju PEP-a relativno niskom kako bi se postigla maksimalna katalitička aktivnost piruvat kinaze.

Iako se kinetički model piruvat kinaze, tj. kooperativna regulacija bi-supstratne reakcije katalizirane ovim tetramerom pručavala nekoliko desetljeća, afinitet PK za supstrate i njihova međusobna interakcija nisu u potpunosti razjašnjeni. Prema literaturnim podacima nisu u potpunosti jasni ni uzroci promjena aktivnosti piruvat kinaze u šećernoj bolesti. Pokazalo se da su i katalitička aktivnost glikolitičkih enzima i ekspresija mRNA smanjene u stanicama jetre, adipoznog tkiva i gušterače osoba sa šećernom bolesti. Također, postoje podaci o nepromijenjenoj ili tek blago povećanoj aktivnosti piruvat kinaze koji za sada ostaju nerazjašnjeni (Iori i sur., 2008).

5. ZAKLJUČCI

- U ovome radu ispitan je stupanj glikolize, odnosno aktivnost glikolitičkog enzima piruvat kinaze u citosolu HepG2 stanica tretiranih otopinama 5 mM, 20 mM, 30 mM i 50 mM glukoze. HepG2 stanice u hiperglikemijskim uvjetima predstavljaju model hepatocita osoba koje boluju od šećerne bolesti.

- Stupanj glikolize je manji kod osoba s uznapredovalim stadijem šećerne bolesti kod kojih je prisutna veća koncentracija glukoze u krvi (20 mM i 30 mM). U tim uvjetima vidljiv je statistički značajan pad aktivnosti piruvat kinaze u odnosu na kontrolu. Zaključujemo da su 20 mM i 30 mM otopine glukoze pogodne za tretiranje tumorskih HepG2 kako bi se postigli hiperglikemijski uvjeti kao u osoba sa šećernom bolesti. U tako optimiranim hiperglikemijskim uvjetima, stupanj glikolize u stanicama hepatocita je nizak što ukazuje da su tretirane stanice dobar i vjerodostojan model hepatocita osoba sa šećernom bolesti.

- Kod vrlo visoke koncentracije glukoze u krvi (50 mM) dolazi do zasićenja aktivnih mjesta na enzimu. U tim uvjetima nije vidljiv statistički značajan pad aktivnosti piruvat kinaze u odnosu na kontrolu. 50 mM otopina glukoze nije pogodna za tretman HepG2 stanica jer stupanj glikolize nije puno manji nego u kontrolnim stanicama. Dakle, tako tretirane stanice nisu dobar *in vitro* model za istraživanje.

6. LITERATURA

1. Berg MJ, Tymoczko LJ, Stryer L. Biokemija. Zagreb, Školska knjiga, 2013, str. 433-469.
2. Berger M, Hagg SA, Goodman MN, Ruderman NB. Glucose Metabolism in Perfused Skeletal Muscle : Effects od starvation, diabetes, fatty acids, acetoacetate, insulin and exercise on glucose uptake and disposition. *Biochem J,* 1976, 158, 191-202.
3. Bergman Marković B. Šećerna bolest u obiteljskoj medicini. Zagreb, Alfa, 2014, str. 1-5.
4. Diabetes, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/, pristupljeno 15.3.2017.
5. Faustova I. Thesis for Master Degree: Some Structural and Kinetic Aspects of L-Type Pyruvate Kinase Cooperativity. Tartu, Faculty of Physics and Chemistry, 2006.
6. Faustova I, Järv J. Kinetic analysis of cooperativity of phosphorylated L-type pyruvate kinase. *Proc Estonian Acad Sci Chem*, 2006, 55, 179–189
7. Granner D, Pilkis S. The Genes of Hepatic Glucose Metabolism. *J Biol Chem,* 1990, 265, 10173-10176.
8. Guoa X, Lia H, Xua H, Wooa S, Dongb H, Lub F, Langec AJ, Wua C. Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis. *Acta Pharm Sin B,* 2012, 2, 358–367.
9. Iori E, Millioni R, Puricelli L, Arrigoni G, Lenzini L, Trevisan R, James P, Rossi PG, Pinna AL, Tessari P. Glycolytic enzyme expression and pyruvate kinase activity in cultured fibroblasts from type 1 diabetic patients with and without nephropathy. *Biochem Biophys Acta*, 2008, 1782, 627 –633.
10. Lieberman M, Marks A, Peet A. Marks' basic medical biochemistry : a clinical approach. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, str. 477-559.
11. Jurica MS, Mesecar A, Heath PJ, Shi W, Nowak T, Stoddard BL. The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6 bisphosphate. *Struct,* 1998, 6, 195-210.
12. Mattevi A, Valentini G, Rizzi M, Speranza ML, Bolognesi M, Coda A. Crystal structure of Escherichia coli pyruvate kinase type I: molecular basis of the allosteric transition. *Struct,* 1995, 3, 729-741.
13. Miyanaga O, Negano M, Cottam GL. Effect of Insulin on Liver Pyruvate Kinase in Vivo and in vitro. *J Biol Chem,* 1982, 257, 10617-10623.
14. Nordlie RC, Foster JD, Lange AJ. Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr,* 1999, 19, 379–406.

15. Pilkis SJ, Granner DK. Molecular Physiology of the Regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol*, 1992, 54, 885-909.
16. Rose IA. Chemistry of Proton Abstraction by Glycolytic Enzymes (Aldolase, Isomerases and Pyruvate Kinase). *Phil Trans R Soc Lond*, 1981, 293, 131-143.
17. Rozengurt E, Jimenez de Asua L, Carminatti H. Some Kinetic Properties of Liver Pyruvate Kinase (Type L). *J Biol Chem*, 1969, 244, 3142-3147.
18. Schirmer H, Stromberg A, Sudzhaeva S, Tamargo JL, Viigimaa M, Vlachopoulos C, Xuereb RG. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *Eur Heart J*, 2013, 34, 3035–3087.
19. Scrutton MC, Utter MF. The regulation of glycolysis and gluconeogenesis in animal tissues. *Annu Rev Biochem*, 1968, 37, 249-302.
20. Štraus B, Petlevski R. Ugljikohidrati. U: Štrausova Medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 99-123.
21. Valentini G, Chiarelli L, Fortin R, Speranza ML, Galizzi A, Mattevi A, The Allosteric Regulation of Pyruvate Kinase. *J Biol Chem*, 2000, 275, 18145–18152.
22. Weber G. Regulation of Pyruvate Kinase. *Adv Enzyme Regul*, 1969, 7, 15-39.
23. Weber G, Lea MA, Convery HJH, Stamm NB. Regulation of Gluconeogenesis and Glycolysis : Studies of mechanisms controlling Enzyme Activity. *Adv Enzyme Regul*, 1969, 7, 257-295.
24. Weber G, Singhal RL, Stamm NB, Lea MA, Fisher EA. Synchronous behavior pattern of key glycolytic enymes: glucokinase, phosphofructokinase, and pyruvate kinase. *Adv Enzyme Regul*, 1966, 4, 59-81.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Šećerna bolest je metabolički poremećaj kojeg karakterizira stanje kronične hiperglikemije i poremećeni metabolizam ugljikohidrata, masti i proteina zbog oštećene sekrecije inzulina i/ili poremećaja u signalnim putevima. U održavanju odgovarajuće koncentracije glukoze u krvi ključnu ulogu ima jetra. Metabolizam glukoze u jetri reguliraju hormoni koji utječu na enzimsku aktivnost ili sintezu samog enzima. Ovisno o potrebama metabolizma izmijenjuju se dva procesa, glikoliza i glukoneogeneza. Kako bi se koncentracija glukoze održala unutar referentnog intervala bitna je regulacija ključnih enzima oba procesa. U šećernoj bolesti dolazi do povećane glukoneogeneze i glikogenolize u stanicama jetre. S druge strane smanjene su aktivnosti enzima glikolize i glikogeneze. Cilj ovog istraživanja je ispitati stupanj glikolize u tumorskim HepG2 stanicama u hiperglikemijskim uvjetima. HepG2 stanice tretirali smo s četiri otopine različitih koncentracija glukoze (5 mM, 20 mM, 30 mM i 50 mM) te su tako tretirane stanice predstavljale model hepatocita u šećernoj bolesti. Stupanj glikolize odredili smo na temelju mjerenja katalitičke aktivnosti glikolitičkog enzima piruvat kinaze. Piruvat kinaza ima ključnu ulogu u zadnjem koraku glikolize, prevođenju fosfoenolpiruvata u piruvat. Aktivnost jetrenog izoenzima regulirana je alosteričkim efektorima i fosforilacijom.

Katalitičku aktivnost piruvat kinaze (PK) izračunali smo iz spektrofotometrijskog mjerenja apsorbancije reduciranog koenzima. Podaci su statistički obrađeni u komercijalnom statističkom programu GraphPad Prism 6.01 i Microsoft Office Excel 2016. Za obradu rezultata korišteni su one-way ANOVA i Sidakov test. Rezultati istraživanja pokazuju statistički značajan pad aktivnosti piruvat kinaze kako se povećavala koncentracija glukoze u stanicama. Katalitička aktivnost enzima bila je najniža u uvjetima 30 mM glukoze. Kod koncentracije 50 mM glukoze nije vidljiv statistički značajni pad u odnosu na kontrolu jer je došlo do zasićenja aktivnih mjesta na enzimu. Rezultati potvrđuju prethodne hipoteze da je stupanj glikolize manji kod osoba s uznapredovalim stadijem šećerne bolesti kod kojih je prisutna veća koncentracija glukoze u krvi (20 mM i 30 mM).

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia and disturbed metabolism of carbohydrates, fats and proteins that occurs due damaged insulin secretion or disorder in insulin signal pathways. Liver has the essential role in maintenance adequate glucose concentration in blood. Glucose metabolism in liver is regulated by hormones which effect enzyme activity or enzyme synthesis. Depending on the metabolic needs, glycolysis and gluconeogenesis are exchanged. Regulating the essential enzymes of these processes is important to maintain glucose concentration within reference range. In diabetes mellitus, gluconeogenesis and glycogenolysis in liver cells are increased. On the other hand, activity of glycolytic and glycogenesis enzymes is decreased. The aim of this study was to examine the rate of glycolysis in tumor HepG2 cells in hyperglycemic conditions. HepG2 cells were treated with four different glucose concentrations (5 mM, 20 mM, 30 mM and 50 mM) and such treated cells represented a model of hepatocytes in diabetes mellitus. The rate of glycolysis was determined by measurements of pyruvate kinase catalytic activity. Pyruvate kinase has the essential part in the last step in glycolysis, conversion phosphoenolpyruvate in pyruvate. Liver isoenzyme activity is regulated by allosteric effectors and phosphorylation.

We calculated the pyruvate kinase activity (PK) from the spectrophotometric measurements of reduced coenzyme. The results were statistically analyzed in the statistical program GraphPad Prism 6.01 and Microsoft Office Excel 2016. For result analysis, we used one-way ANOVA and Sidak test. Research results show statistically significant drop of pyruvate kinase activity due to increased glucose concentration in cells. Catalytic enzyme activity was the lowest in 30 mM glucose conditions. In 50 mM glucose concentration, there was no statistically significant drop regards to control because saturation od active sites on the enzyme was occurred. Results confirm previous hypothesis that the rate of glycolysis is lower in people with advanced stage of diabetes mellitus with higher blood glucose concentrations (20 mM and 30 mM).

8. PRILOZI

8.1 Kratice

ATP = adenozin trifosfat

cAMP = ciklički adenozin monofosfat

DHAP = dihidroksiaceton-fosfat

DMSO = dimetil sulfoksid

EDTA = etilendiamintetraoctena kiselina

ESC = The European Society of Cardiology

F-1,6-BP = fruktoza-1,6-bisfosfat

F-1,6-Paza = fruktoza-1,6-fosfataza

F-2,6-BP (FBP) = fruktoza-2,6-bisfosfat

FBS = fetalni goveđi serum (engl. *Fetal Bovine Serum*)

G-6-P = glukoza-6-fosfat

G-6-Paza = glukoza-6-fosfataza

GADA = protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (engl. *glutamic acid decarboxylase autoantibodies*)

GAP = gliceraldehid-3-fosfat

GK = glukokinaza

HIF 1 = hipoksija-inducibilni faktor 1

HLA = genski sustav ljudskih leukocitnih antigena

IA-2 / IA-2β = protutijela na tirozinsku fosfatazu

IAA = protutijela na inzulin (engl. *insuline autoantibodies*)

IFG = oštećen metabolizam glukoze natašte (engl. *Impaired fasting glucose)*

IGT = oštećena tolerancija glukoze (engl. *Impaired glucose tolerance)*

LADA = latentni autoimuni dijabetes

MEM = kompletni hranjivi medij (engl. *Minimum Essential Medium*)

MODY = poseban podtip šećerne bolesti (engl. *Maturity onset diabetes of the young*)

$NAD^+/NADH_2$ = nikotinamid adenin dinukleotid

$NADP^+/NADPH_2$ = nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

PBS = fosfatni pufer (engl. *phosphate buffer saline*)

PEP = fosfoenolpiruvat

PEPCK = fosfoenolpiruvat karboksikinaza

PFK = fosfofruktokinaza

PK = piruvat kinaza

WHO = Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Utjecaj različitih koncentracija glukoze na aktivnost piruvat kinaze u HepG2 stanicama

Dora Vuljanić

SAŽETAK

Šećerna bolest je metabolički poremećaj kojeg karakterizira stanje kronične hiperglikemije i poremećeni metabolizam ugljikohidrata, masti i proteina zbog oštećene sekrecije inzulina i/ili poremećaja u signalnim putevima. U održavanju odgovarajuće koncentracije glukoze u krvi ključnu ulogu ima jetra. Metabolizam glukoze u jetri reguliraju hormoni koji utječu na enzimsku aktivnost ili sintezu samog enzima. Ovisno o potrebama metabolizma izmijenjuju se dva procesa, glikoliza i glukoneogeneza. Kako bi se koncentracija glukoze održala unutar referentnog intervala bitna je regulacija ključnih enzima oba procesa. U šećernoj bolesti dolazi do povećane glukoneogeneze i glikogenolize u stanicama jetre. S druge strane smanjene su aktivnosti enzima glikolize i glikogeneze. Cilj ovog istraživanja je ispitati stupanj glikolize u tumorskim HepG2 stanicama u hiperglikemijskim uvjetima. HepG2 stanice tretirali smo s četiri otopine različitih koncentracija glukoze (5 mM, 20 mM, 30 mM i 50 mM) te su tako tretirane stanice predstavljale model hepatocita u šećernoj bolesti. Stupanj glikolize odredili smo na temelju mjerenja katalitičke aktivnosti glikolitičkog enzima piruvat kinaze. Piruvat kinaza ima ključnu ulogu u zadnjem koraku glikolize, prevođenju fosfoenolpiruvata u piruvat. Aktivnost jetrenog izoenzima regulirana je alosteričkim efektorima i fosforilacijom.

Katalitičku aktivnost piruvat kinaze (PK) izračunali smo iz spektrofotometrijskog mjerenja apsorbancije reduciranog koenzima. Podaci su statistički obrađeni u komercijalnom statističkom programu GraphPad Prism 6.01 i Microsoft Office Excel 2016. Za obradu rezultata korišteni su one-way ANOVA i Sidakov test. Rezultati istraživanja pokazuju statistički značajan pad aktivnosti piruvat kinaze kako se povećavala koncentracija glukoze u stanicama. Katalitička aktivnost enzima bila je najniža u uvjetima 30 mM glukoze. Kod koncentracije 50 mM glukoze nije vidljiv statistički značajni pad u odnosu na kontrolu jer je došlo do zasićenja aktivnih mjesta na enzimu. Rezultati potvrđuju prethodne hipoteze da je stupanj glikolize manji kod osoba s uznapredovalim stadijem šećerne bolesti kod kojih je prisutna veća koncentracija glukoze u krvi (20 mM i 30 mM).

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 38 stranica, 13 grafičkih prikaza, 3 tablice i 24 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Šećerna bolest, glikoliza, glukoza, piruvat kinaza, HepG2, katalitička aktivnost, enzimska kinetika

Mentor: **Dr. sc. Roberta Petlevski**, *izvanredni profesor* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Roberta Petlevski**, *izvanredni profesor* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Dubravka Vitali-Čepo, *izvanredni profesor* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Marija Grdić Rajković, *docent* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: svibanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of medical biochemistry and hematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Effect of different glucose concentrations on pyruvate kinase activity in HepG2 cells

Dora Vuljanić

SUMMARY

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia and disturbed metabolism of carbohydrates, fats and proteins that occurs due damaged insulin secretion or disorder in insulin signal pathways. Liver has the essential role in maintenance adequate glucose concentration in blood. Glucose metabolism in liver is regulated by hormones which effect enzyme activity or enzyme synthesis. Depending on the metabolic needs, glycolysis and gluconeogenesis are exchanged. Regulating the essential enzymes of these processes is important to maintain glucose concentration within reference range. In diabetes mellitus, gluconeogenesis and glycogenolysis in liver cells are increased. On the other hand, activity of glycolytic and glycogenesis enzymes is decreased. The aim of this study was to examine the rate of glycolysis in tumor HepG2 cells in hyperglycemic conditions. HepG2 cells were treated with four different glucose concentrations (5 mM, 20 mM, 30 mM and 50 mM) and such treated cells represented a model of hepatocytes in diabetes mellitus. The rate of glycolysis was determined by measurements of pyruvate kinase catalytic activity. Pyruvate kinase has the essential part in the last step in glycolysis, conversion phosphoenolpyruvate in pyruvate. Liver isoenzyme activity is regulated by allosteric effectors and phosphorylation.

We calculated the pyruvate kinase activity (PK) from the spectrophotometric measurements of reduced coenzyme. The results were statistically analyzed in the statistical program GraphPad Prism 6.01 and Microsoft Office Excel 2016. For result analysis, we used one-way ANOVA and Sidak test. Research results show statistically significant drop of pyruvate kinase activity due to increased glucose concentration in cells. Catalytic enzyme activity was the lowest in 30 mM glucose conditions. In 50 mM glucose concentration, there was no statistically significant drop regards to control because saturation od active sites on the enzyme was occurred. Results confirm previous hypothesis that the rate of glycolysis is lower in people with advanced stage of diabetes mellitus with higher blood glucose concentrations (20 mM and 30 mM).

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 38 pages, 13 figures, 3 tables and 24 references. Original is in Croatian language.
Keywords: Diabetes mellitus, glycolysis, glucose, pyruvate kinase, HepG2, catalytic activity, enzyme kinetics

Mentor: **Roberta Petlevski**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Roberta Petlevski**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dubravka Vitali-Čepo, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marija Grdić Rajković, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2017.