

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФРУКТОЗО-2,6-БИСФОСФАТА В ЛИМФОЦИТАХ

ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Б. Ф. КОРОВКИН, Н. Ф. БЕЛЯЕВА, С. А. КРАЕВОЙ, М. А. ГОЛУБЕВ, В. К.
ГОРОДЕЦКИЙ, М. С. МАРКОВА, О. Л. КОЛЬЧЕНКО.

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии РАМН.

119832, Москва, ул. Погодинская, д. 10; факс (095) 245-08-57

Исследовано изменение содержания фруктозо-2,6-бисфосфата (Ф-2,6-Р₂) в лимфоцитах периферической крови больных сахарным диабетом II типа. Установлено, что у не леченных больных с начальной стадией сахарного диабета наблюдается повышение уровня Ф-2,6-Р₂ почти в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой. У больных с компенсированной в результате лечения пероральными антидиабетическими препаратами формой диабета уровень Ф-2,6-Р₂ нормализуется. В тоже время у больных с тяжелой (декомпенсированной) формой сахарного диабета концентрация Ф-2,6-Р₂ снижается. Обсуждаются возможные механизмы регуляции концентрации Ф-2,6-Р₂ в лимфоцитах в норме и при сахарном диабете.

Ключевые слова: фруктозо-2,6-бисфосфат, лимфоциты, сахарный диабет, протеинкиназа С.

ВВЕДЕНИЕ. Сахарный диабет характеризуется расстройством всех видов обмена веществ и, в первую очередь, углеводного. При этом в печени уменьшается интенсивность гликолиза и синтеза гликогена и усиливается глюконеогенез. В то же время в клетках иммунной системы (спленоциты, макрофаги) при диабете отмечено увеличение поглощения глюкозы и продукции лактата [1,2].

В настоящее время установлено, что важнейшая роль в регуляции метаболизма углеводов в клетке принадлежит фруктозо-2,6-бисфосфату (Ф-2, 6-Р₂). Ф-2, 6-Р₂ является самым мощным из известных в настоящее время активатором фосфофруктокиназы-1 (ФФК-1; КФ 2.7.1.11) - ключевого фермента гликолиза и ингибитором фруктозо-1,6-бисфосфатазы (ФБФаза; КФ 3.1.3.11) - одного из ключевых ферментов глюконеогенеза [3]. Биосинтез Ф-2, 6-Р₂ из фруктозо-6-фосфата (Ф-6-Р) и АТР и его деградация до Ф-6-Ф и Р_i осуществляется бифункциональным ферментом - фосфофруктокиназа-2/фруктозо-2,6-бисфосфатаза (ФФК-2/ФБФаза-2; КФ 2.7.1.105/3.1.3.46). В тканях животных бифункциональный фермент представлен четырьмя основными изоферментами: изофермент L-типа (печеночный), Н-типа (сердечный), М-типа (мышечный) и Т-типа (тестикулярный). Основные изоферменты ФФК-2/ФБФазы-2 различаются по соотношению киназной и бисфосфатазной активностей, по способности фосфорилироваться различными протеинкиназами и по ингибированию глицерол-3-фосфатом. Бифункциональный фермент печени является прекрасным субстратом для цАМР-зависимой протеинкиназы (протеинкиназы А; ПК А) и фосфорилирование его под действием глюкагона приводит к снижению киназной и увеличению бисфосфатазной активности, в результате чего происходит падение уровня Ф-2,6-Р₂ [3,4]. Изменение

соотношения инсулин/глюкагон при сахарном диабете обуславливает активацию процесса цАМР-зависимого фосфорилирования, что сопровождается уменьшением содержания Ф-2,6-Р₂ в печени, снижением скорости гликолиза и усилением глюконеогенеза [3,5,6]. Изофермент М-типа не фосфорилируется ни ПК А, ни протеинкиназой С (ПК С), в то время как Н- и Т-изоферменты фосфорилируются ПК С. Бифункциональный фермент Н-типа модифицируется также и при участии ПК А, при этом активность ФФК-2 возрастает при фосфорилировании как ПК А, так и ПК С. Исследования последних лет показали [7], что Н-изофермент может активироваться и при фосфорилировании протеинкиназами, участвующими в передаче сигнала от рецептора инсулина, в частности, протеинкиназой В новой серин/треониновой киназой, которая активируется фосфоинозитол-3-киназой.

Присутствие Ф-2,6-Р₂ в лимфоцитах периферической крови человека впервые установлено в 1987 году [8]. Его содержание составляет $(1,1 \pm 0,5) \cdot 10^6$ клеток. При этом концентрация Ф-2,6-Р₂ в В-лимфоцитах в 2,5 раза выше, чем в Т-лимфоцитах. Показано, что как и в других клетках, Ф-2,6-Р₂ в лимфоцитах является активатором ФФК-1 и, таким образом, гликолиза. ФФК-1, по-видимому, является единственной мишенью в действии Ф-2,6-Р₂ в лимфоцитах, поскольку ФБФаза в этих клетках отсутствует о чем свидетельствуют данные японских исследователей, обнаруживших кДНК, кодирующую ФБФазу, в моноцитах, но не в лимфоцитах человека [9]. Ранее полученные данные об обнаружении активности ФБФазы в лимфоцитах человека объясняются тем, что фракция лимфоцитов, выделенная с использованием фиколл-изопака, обычно содержит от 5 до 30% моноцитов. В то же время, лимфоциты, не содержащие примесей моноцитов, не обладают ФБФазной активностью. Отсутствие глюконеогенеза в лимфоцитах позволяет сделать заключение о том, что основная функция Ф-2,6-Р₂ в этих клетках сводится к стимуляции гликолиза. Известно, что активированные лимфоциты потребляют в несколько раз больше глюкозы, чем клетки, находящиеся в состоянии покоя [10]. Таким образом, усиление метаболизма глюкозы является необходимым фактором для обеспечения активации и пролиферации лимфоцитов.

В опытах с частично очищенными препаратами ФФК-2 из лимфоцитов селезенки были обнаружены существенные различия этого фермента от изофермента печени. Так, активность ФФК-2 лимфоцитов не изменяется в присутствии каталитической субъединицы ПК А и не ингибируется глицерол-3-фосфатом [11]. Отсутствие в настоящее время сведений о структуре ФФК-2 лимфоцитов оставляет открытым вопрос о принадлежности этого фермента к одному из уже известных типов бифункционального фермента. Нечувствительность ФФК-2 лимфоцитов к ингибированию глицерол-3-фосфатом сближает этот фермент с ФФК-2, обнаруженной в фибробластах эмбриона цыпленка [12] и в клетках аденокарциномы человека [13].

Хорошо известно, что при диабете в печени снижается скорость гликолиза и содержание Ф-2,6-Р₂. В то же время в почках уровень Ф-2,6-Р₂ при диабете повышается, а в скелетных мышцах не изменяется или же несколько увеличивается в зависимости от типа мышц [14,15]. Имеются данные о том, что при стрептозотоциновом диабете лимфоциты тимуса крыс накапливают в два раза больше Ф-2,6-Р₂ при инкубации с глюкозой, чем нормальные клетки. Кроме того обнаружено повышение активности ФФК-1, ФФК-2, продукции лактата и включения С₁₄-глюкозы в гликоген в тимоцитах крыс при диабете по сравнению с нормальными клетками [16]. Таким образом, стрептозотоциновый диабет у крыс приводит к усилению гликолиза в тимоцитах путем активации системы Ф-2,6-Р₂. Механизмы такой активации, а также роль инсулина в этом процессе остаются пока не ясными.

Сведений о содержании Ф-2,6-Р₂ в лимфоцитах больных сахарным диабетом в литературе мы не обнаружили.

В задачу настоящего исследования входило определение уровня Ф-2,6-Р₂ в лимфоцитах периферической крови больных инсулиннезависимым сахарным диабетом (II тип) различной тяжести.

МЕТОДИКА. Исследование содержания Ф-2,6-Р₂ в лимфоцитах венозной крови было проведено у 27 больных сахарным диабетом II типа (15 мужчин и 12 женщин в возрасте от 37 до 72 лет), а также 14 здоровых лиц (контрольная группа). По клинической картине заболевания больные были разделены на 3 группы. В первую группу (7 мужчин и 4 женщины в возрасте от 37 до 47 лет) входили больные с впервые выявленным (не леченным) сахарным диабетом легкой формы (уровень сахара в крови составлял $7,5 \pm 2,4$ мМ). Во вторую группу вошло 5 мужчин и 3 женщины в возрасте от 41 до 50 лет с компенсированным в результате лечения пероральными антидиабетическими средствами диабетом (концентрация глюкозы в крови составляла $5,5 \pm 1,7$ мМ). Третью группу (3 мужчины и 5 женщин в возрасте от 41 до 72 лет) составили больные с тяжелой формой сахарного диабета, который не удалось компенсировать проводимой терапией преимущественно пероральными препаратами (уровень сахара в крови был равен $12,7 \pm 3,5$ мМ).

Получение лимфоцитов. Лимфоциты периферической крови выделяли в градиенте фиколл-пак как это описано ранее [17].

Определение содержания Ф-2,6-Р₂ проводили используя микрометод, адаптированный нами к измерению Ф-2,6-Р₂ в лимфоцитах крови человека в клинике [17]. Метод основан на способности Ф-2,6-Р₂ активировать пирофосфат-зависимую ФФК (РР₁-ФФК) из клубней картофеля. Активность РР₁-ФФК определяли спектрофотометрически по скорости окисления NADH в системе, сопряженной с альдолазой, триозофосфатизомеразой и глицерол-трифосфатдегидрогеназой. Реакционная смесь содержала в общем объеме 0,6 мл следующие компоненты: 30 мМ трис-ацетатный буфер, рН 8,0; 2 мМ MgCl₂; 1 мМ фруктозо-6-фосфата; 1,7 мМ глюкозо-6-фосфата; 0,25 мМ NADH, приготовленный на трис-ацетатном буфере (рН 8,0); 0,01 ед. РР₁-ФФК; 0,5 ед. альдолазы; 5 ед. триозофосфатизомеразы; 1 ед. глицерол-3-фосфатдегидрогеназы и 100 мкл исследуемого образца. Реакцию начинали добавлением пирофосфата натрия (в конечной концентрации 1 мМ) и проводили в течении 10 мин при 30°С. Концентрацию Ф-2,6-Р₂ рассчитывали по калибровочной кривой, которая строилась одновременно с исследуемыми образцами. Содержание Ф-2,6-Р₂ в лимфоцитах рассчитывали либо на число клеток (10⁶), либо на 1 мг белка. Белок определяли по методу Брэдфорд [18].

Ниже приводится схема определения содержания Ф-2,6-Р₂ в лимфоцитах:

1. Выделение лимфоцитов в градиенте фиколл-пак.
2. Двухкратное промывание лимфоцитов сбалансированным солевым раствором.
3. Подсчет количества клеток (лимфоцитов).
4. Разрушение клеток 0,1 N NaOH.
5. Определение белка.
6. Денатурация белка нагреванием при 80°С.
7. Нейтрализация проб 0,1 N уксусной кислотой.
8. Осаждение денатурированных белков центрифугированием.
9. Построение калибровочной кривой и определение содержания Ф-2,6-Р₂ в супернатанте.
10. Пересчет содержания Ф-2,6-Р₂ на количество клеток или белка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты проведенных нами исследований представлены в таблице. Как следует из этой таблицы у не леченных больных с начальной стадией сахарного диабета (I группа) наблюдается увеличение содержания Ф-2,6-Р₂ в лимфоцитах почти в 2,5 раза. У больных с компенсированной в результате лечения формой диабета (II группа) уровень Ф-2,6-Р₂ в лимфоцитах нормализуется. В то же время у больных с тяжелой (декомпенсированной) формой

сахарного диабета (III группа) концентрация Ф-2,6-Р₂ снижается почти в 2,5 раза по сравнению с нормой.

Объяснение полученных нами результатов представляется весьма сложным, так как сведения о регуляции активности ФФК-2 (а, следовательно, и уровня Ф-2,6-Р₂) в лимфоцитах ограничены лишь несколькими работами. Так в экспериментах с лимфоцитами селезенки мышей было установлено, что инкубация клеток в присутствии форболовых эфиров, митогенных лектинов (специфичных для Т-клеток), интерлейкина 4 (специфичного для В-клеток фактора роста) или липополисахаридов (митогенов, специфичных для В-клеток) приводит к увеличению концентрации Ф-2,6-Р₂ и продукции лактата в 2-3 раза в течение часа. В клетках, инкубированных с форболовым эфиром или лектинами (конканавалин А, фитогемагглютинин), концентрация гексозофосфатов (Гл-6-Ф + Ф-6-Ф) увеличивалась вдвое, в то время как активность ФФК-2 не изменялась [11]. Известно, что форболовые эфиры (промоторы опухолевой трансформации) оказывают прямое активирующее действие на фосфолипид/Са²⁺-зависимую протеинкиназу (ПК С). При взаимодействии лимфоцитов со специфическими митогенами происходит транслокация ПК С из растворимой фракции в мембранную. Таким образом, полученные результаты указывают на участие ПК С в активации гликолиза в лимфоцитах. Однако, молекулярные механизмы такой активации остаются не известными. По мнению авторов, возрастание уровня Ф-2,6-Р₂ в лимфоцитах под действием форболовых эфиров и митогенов не может быть объяснено изменением кинетических свойств ФФК-2 в результате фосфорилирования при участии ПК С, а является следствием активации ФФК-2 субстратом (Ф-6-Р). В свою очередь, наблюдаемое увеличение концентрации гексозофосфатов может быть результатом усиления транспорта глюкозы. С нашей точки зрения, в объяснении полученных данных нельзя исключить изменений в активности ФБФазы-2 под действием указанных выше агентов. Отметим, что активность ФБФазы-2 до настоящего времени в лимфоцитах не определялась.

Таблица. Содержание фруктозо-2,6-бисфосфата в лимфоцитах крови у практически здоровых лиц и больных сахарным диабетом

Содержание Ф-2,6-Р ₂	Здоровые лица (норма) (n=14)	Не леченный впервые выявленный сахарный диабет (n=9)	Леченный компенсированный сахарный диабет (n=12)	Декомпенсированный сахарный диабет (n=7)
пМ/10 ⁶ клеток	0,8 ± 0,2	1,92 ± 0,48*	0,72 ± 0,2	0,32 ± 0,07*
пМ/мг белка	6,7 ± 1,1	16,1 ± 3,5*	6,1 ± 2,1	2,68 ± 0,45*

*-р (достоверность различий по отношению к контролю) < 0,01; n - число обследованных.

Другой группе авторов [19] удалось обнаружить возрастание активности ФФК-2 (и уровня Ф-2,6-Р₂) в В-лимфоцитах больных хронической лейкемией после инкубации клеток в течение 6 часов с форболовым эфиром. При стимуляции лимфоцитов наблюдалась также транслокация ПК С из растворимой фракции в мембранную. Вероятно, что в данном случае увеличение активности ФФК-2 является следствием биосинтеза этого фермента *de novo*. Так известно, что в фибробластах увеличение активности ФФК-2 под действием форболовых эфиров блокируется ингибиторами биосинтеза белка [20].

Ранее повышение содержания Ф-2,6-Р₂ и скорости гликолиза наблюдали в тимоцитах и макрофагах крыс со стрептозотоциновым диабетом [16,21]. В макрофагах крыс со стрептозотоциновым диабетом обнаружено также усиление транспорта глюкозы и синтеза гликогена. Эти данные могут указывать на то, что в клетках иммунной системы в усилении транспорта глюкозы и ее метаболизма могут участвовать механизмы, не связанные с инсулиновыми рецепторами [21]. Следует отметить, что мононуклеарные клетки периферической крови больных инсулиннезависимым сахарным диабетом (II тип)

проявляют сниженную способность к стимуляции инсулином превращения глюкозы в лактат, а также к связыванию этого гормона [22].

Возрастание активности ФФК-2, обнаруженное в тимоцитах крыс при стрептозотоциновом диабете [16] может быть следствием либо активации ПК С, и стимуляцией в результате этого биосинтеза ФФК-2, либо активацией других протеинкиназ, которые способны увеличить активность ФФК-2 путем фосфорилирования этого фермента или же через усиление его биосинтеза.

Увеличение активности ПК С при сахарном диабете обнаружено во многих органах и тканях, включая печень, сердце, аорту, почечные клубочки, сетчатку. Активацию ПК С при диабете связывают с повышением уровня диацилглицерола - физиологического активатора этого фермента, что, как предполагается, является следствием гипергликемии [23]. Весьма важным с нашей точки зрения является факт обнаружения в лимфоцитах крови больных сахарным диабетом II типа повышенного внутриклеточного уровня Ca^{2+} [24], что, как было показано ранее для лимфоцитов селезенки мышей, может привести к увеличению концентрации Ф-2,6-Р₂ [11]. Нормализация уровня сахара в крови в результате приема гипогликемических препаратов приводила к снижению уровня Ca^{2+} в В-лимфоцитах больных сахарным диабетом [24]. Можно предположить, что именно Ca^{2+} играет ключевую роль в активации ПК С и в повышении уровня Ф-2, 6-Р₂ (а также в его нормализации после приема пероральных антидиабетических средств), которые мы наблюдали у больных сахарным диабетом.

В последнее десятилетие четко установлено, что гипогликемический эффект большинства пероральных антидиабетических препаратов (производные сульфонилмочевины, бигуаниды, а также препараты, входящие в группу тиазолидиндионов) опосредован их влиянием на систему Ф-2,6-Р₂ в печени, и в частности, (как это установлено для толбутамида) на процесс фосфорилирования бифункционального фермента [6,25]. Полученные в настоящей работе данные указывают на то, что и в клетках иммунной системы больных сахарным диабетом при нормализации концентрации глюкозы в крови в результате приема гипогликемических средств происходит снижение повышенного уровня Ф-2,6-Р₂ до нормы.

В исследованиях, проводимых в последние годы, установлено, что при многих аутоиммунных заболеваниях, включая диабет, при активации Т-лимфоцитов происходят нарушения на пути передачи сигнала от рецептора, затрагивающие ПК С [26]. Можно предположить, что именно этот факт играет роль в снижении концентрации Ф-2,6-Р₂ в лимфоцитах больных тяжелой формой сахарного диабета II типа, которую уже не удается компенсировать приемом пероральных антидиабетических препаратов. Возможно, что появление зависимости от инсулина у таких больных свидетельствует о развитии латентного аутоиммунного диабета.

Поскольку гликолиз является основным путем образования энергии в лимфоцитах, уменьшение концентрации Ф-2,6-Р₂ мощного регулятора этого процесса, свидетельствует о снижении скорости гликолиза в этих клетках, что приводит к недостатку энергии и делает невозможным нормальное функционирование лимфоцитов и иммунной системы в целом при тяжелой (декомпенсированной) форме сахарного диабета. Известно, что нарушения иммунного статуса у больных с инсулиннезависимым сахарным диабетом усиливаются при развитии этого заболевания и приобретении зависимости от инсулина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Field C.J., Chayoth R., Montambault M., Marliss E.B. (1991) J. Biol. Chem., 266, 3675-3681.
2. Wu G.Y., Field C.J., Marliss E.B. (1991) Biochim. Biophys. Acta, 1115, 166-173.
3. Van Schaftingen E. (1987) Adv. Enzymol., 259, 316-395.

4. *Belyaeva N.F., Korovkin B.F.* (1993) in Pathobiochemical aspects of extreme states. Mir Publishers, Moscow, 46-67.
5. *Маркова М.С., Голубев М.А., Городецкий В.К. и др.* (1996) *Вопр. мед. химии*, **42** 223-227.
6. *Aoki M.K, Kaku H., Inoue A., Kaneko M.* (1992) *Diabetes.*, **41**, 334-338.
7. *Deprez J., Vortommen D., Alessi D.R., et al.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 17269-17275.
8. *Colomer D., Vives Corrons J.L., Pujades A. and Bartrons R.* (1987) *Cancer Res.*, **47** 1859-1862.
9. *Kikawa Y., Inuzuka M., Takano T., et al.* (1994) *Biochim. Biophys. Res. Com.* **194**, 687-693.
10. *Ardawi M.S. M and Newsholme E.A.* (1985) *Essays Biochem.*, **21**, 1-44.
11. *Bosca L., Mojena M., Diaz Cuerra M. J. and Narquez C.* (1988) *Eur.J.Biochem.*, **176**, 317-323.
12. *Bosca L., Roussean Q. and Hue L.H.* (1985) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **282**, 6440-6444.
13. *Denis Pouxvied, Gauthier T., Daviaud D. and Murat J.C.* (1990) *Biochem. J.* **268**, 465-471.
14. *Soehor M., Gonzalez A.M., Mclean P.* (1984) *Diabetes.*, **33**, 786-787.
15. *Carreras M., Bassols A.M., Carreras J. and Climent F.* (1988) *Biochem. Int.*, **17**, 359-366.
16. *Morenoar V.R., Moutano R., Condee M. et al.* (1996) *Life Sci.*, **58**, 477-484.
17. *Беляева Н.Ф., Голубев М.А., Маркова М.С. и др.* (1996) *Бюлл. эксперим. биол. и медицины*, **122**, 341-344.
18. *Bradford M.A.* (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
19. *Colomer D., Corrons J. L., Bartrons R.* (1991) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1097**, 270-274.
20. *Dalman M., Bartrons R., Gie G.* (1994) *Exper. Cell Res.*, **212**, 93-96.
21. *Bustos R., Moreno-Aurioles V.R., Conde M., Sobrino F.* (1993) *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **50**, 254-264.
22. *Marita R.A., Sawant N., Sawant N.N., et al.* (1997) *Med. Science Res.*, **25**, 123-126
23. *Ishii H., Koya D., King G. L.* (1998) *J. Mol. Med.*, **76**, 21-31.
24. *Alexiewicz JM., Kumar D., Smogorzewski M., Massry SG.* (1997) *Am. J. Kidney Dis.* **30**, 98-104.
25. *Murano K., Inoue Y., Emoto M., et al.* (1994) *Eur. J. Pharmacol.*, **254**, 257-262.
26. *De Maria R., Todaro M., Stassi G., et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.*, **24**, 999-1002.

Поступила 21.04.99.

VARIATION OF FRUCTOSE 2,6-BISPHOSPHATE CONTENT IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS

B.F.KOROVKIN, N.F.BELAYEVA, C.A.KRAEVOY, M.A.GOLUBEV,
V.K.GORODETSKY, M.S.MARKOVA, O.L.KOLCHENKO

Russian Academy of Medical Sciences Institute of Biomedical Chemistry RAMN, Pogodinskaya 10.
Moscow, 119832; fax (095) 245-08-57

Variation of fructose 2,6-bisphosphate (F-2,6-P₂) content in the peripheral blood lymphocytes of patients with diabetes mellitus (type II) was investigated. The 2.5-fold increase of F-2,6-P₂ level compared with to the control group was observed in untreated patients with early stage of the disease. In patients using of peroral antidiabetic drugs that corrected diabetes F-2,6-P₂ level was approach ed to the normal one. At the same time F-2,6-P₂ content decreases in patients with severe (noncorrected) diabetes mellitus. The possible mechanisms of regulation of lymphocyte F-2,6-P₂ concentration in normal conditions and diabetes mellitus are discussed.

Key Words: fructose 2,6-bisphosphate, lymphocytes, diabetes mellitus, protein kinase C.