

## НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ ФРУКТОЗО-2,6-БИСФОСФАТА В ТКАНИ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ

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

НИИ биомедицинской химии РАМН, 119832, Москва, Погодинская ул., 10

Исследована активность фосфофруктокиназы-2, фруктозо-1,6-бисфосфатазы, глюкокиназы, а также содержание фруктозо-2,6-бисфосфата и гликогена в печени крыс в норме и при стрептозотоциновом диабете. Показано, что в печени диабетических крыс происходит снижение активности фосфофруктокиназы-2. Активность, определяемая при рН 6,6 (активная или нефосфорилированная форма фермента) уменьшалась в 3 раза, тогда как общая активность фермента, измеренная при рН 8,5, снижалась в 1,7 раза. Определение активности фосфофруктокиназы-2 при 2-х значения рН позволяет оценить степень фосфорилирования бифункционального фермента, которое значительно усиливается при диабете. Снижение киназной активности фермента сопровождается падением уровня фруктозо-2,6-бисфосфата, увеличением активности фруктозо-1,6-бисфосфатазы, что, в свою очередь способствует торможению гликолиза и усилению глюконеогенеза в ткани печени при диабете.

Новые представления, касающиеся регуляции метаболизма углеводов, появились после открытия в 1980 году фруктозо-2,6-бисфосфата [1]. Фруктозо-2,6-бисфосфат ( $\Phi$ -2, 6- $P_2$ ) является наиболее мощным из известных в настоящее время активаторов фосфофруктокиназы-1 (КФ 2.7.1.11) и ингибитором фруктозо-1,6-бисфосфатазы (КФ 3.1.3.11). Изменения в содержании  $\Phi$ -2,6- $P_2$  при ряде патологических состояний (диабет, опухолевый процесс, голодание, алкогольная интоксикация и т.д.) способны менять направленность потока углеводов либо в сторону глюконеогенеза, в случае уменьшения концентрации  $\Phi$ -2,6- $P_2$ , или, наоборот, в сторону реакций гликолиза при повышении концентрации  $\Phi$ -2,6- $P_2$ . В 1982 году был выделен из ткани печени фермент, осуществляющий биосинтез и деградацию данного соединения [2,3]. Как было показано позже, новый фермент обладает одновременно фосфокиназной активностью (фосфофруктокиназа-2/фруктозо-2,6-бисфосфатаза). Бифункциональный фермент, выделенный из ткани печени, имеет относительную молекулярную массу 110 кД, состоит из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 55 кД, каждая из которых имеет два различных каталитических центра (киназный и бисфосфатазный) [2,4]. При этом киназный домен расположен в N-конце, а бисфосфатазный — в C-конце каждой из полипептидных цепей.

Синтез  $\Phi$ -2,6- $P_2$  в клетке происходит из фруктозо-6-фосфата при участии АТФ и фермента, обладающего киназной активностью - фосфофруктокиназы-2 (ФФК-2) (КФ 2.7.1.105). Распад  $\Phi$ -2,6- $P_2$  до фруктозо-6-фосфата и неорганического фосфата катализируется ферментом, обладающим бисфосфатазной активностью - фруктозо-2,6-бисфосфатазой (ФБФаза-2) (КФ 3.1.3.46). Иными словами, было доказано, что один и тот же белок обладает как киназной, так и бисфосфатазной активностями.

Известно также, что бифункциональный фермент печени является субстратом для цАМФ-зависимой протеинкиназы. Под действием протеинкиназы А происходит фосфорилирование остатков серина в каждой из субъединиц бифункционального фермента, что приводит к снижению его киназной и повышению бисфосфатазной активности [4,5]. Результатом фосфорилирования является уменьшение содержания  $\Phi$ -2,6- $P_2$  в клетке, усиление реакций глюконеогенеза и торможение гликолиза. Таким образом,  $\Phi$ -2,6- $P_2$ , фосфофруктокиназа-1 (ФФК-1) и фруктозо-1,6-бисфосфатаза (ФБФаза-1), бифункциональный фермент составляют как бы определенную систему, которую можно назвать системой фруктозо-2,6-бисфосфата печени, находящуюся, под контролем цАМФ-зависимого фосфорилирования. Заметим, что в гепатоцитах диабетических крыс происходит резкое увеличение уровня цАМФ по сравнению с нормой [6].

Сегодня четко установлено, что существует несколько изоформ бифункционального фермента. Показано, что бифункциональные ферменты Н-типа (сердце) и L-типа (печень) различаются по кинетическим и иммунологическим свойствам. Киназная активность бифункционального фермента Н-типа во много раз превышает фосфатаз-

ную, в то время как киназная активность бифункционального фермента, присутствующего в скелетных мышцах крысы и голубя, в несколько раз ниже бисфосфатазной активности, и таким образом этот изофермент напоминает фосфорилированную форму изофермента L-типа. Следовательно, мышечный бифункциональный фермент (M-тип) отличается по своим свойствам от изоферментов L и H-типов и, возможно, является третьим изоферментом [7]. В последние годы показано, что бифункциональный фермент мозговой ткани (B-тип) также имеет свои характерные особенности [8]. Итак, в тканях животных бифункциональный фермент представлен, по крайней мере четырьмя основными изоформами - печеночный, сердечный, мышечный и мозговой, имеющими различные физико-химические свойства [9,10].

Существует также мнение, что в разных тканях присутствует соответствующий ей набор изоформ бифункционального фермента, но с количественным преобладанием какой-либо одной изоформы [11]. Показано, что добавление каталитической субъединицы цАМФ-зависимой протеинкиназы к частично очищенной фракции, содержащей бифункциональный фермент, выделенной из ткани печени, сопровождается 4-х кратным уменьшением активности ФФК-2 (с 4 ед/мг белка до 0,98 ед/мг белка) [7]. Установлено, что цитрат обладает большей ингибирующей способностью по отношению к ФФК-2 мозга и сердца по сравнению с ферментом, выделенным из печени и скелетных мышц. Глицерол-3-фосфат приводил к 60% ингибированию ферментной активности печеночной ФФК-2, тогда как ФФК-2 сердца, мозга и мышц не были подвержены ингибирующему влиянию глицерол-3-фосфата [7]. Как видно из приведенных данных, изофермент ФФК-2 печени в значительной степени отличается по своим свойствам от других изоформ. Особое значение это может иметь при сахарном диабете. Гормональные перестройки при сахарном диабете - уменьшение содержания инсулина, увеличение концентрации глюкагона (или изменение соотношения инсулин/глюкагон) приводят к активации процесса цАМФ-зависимого фосфорилирования бифункционального фермента, что сопровождается уменьшением содержания Ф-2,6-Р<sub>2</sub>, снижением скорости гликолиза и увеличением процесса глюконеогенеза в ткани печени [5].

В задачу нашего исследования входило определение состояния системы Ф-2,6-Р<sub>2</sub>, а также ряда других показателей метаболизма углеводов (активности глюкокиназы, содержание гликогена и т.д.) в печени крыс со стрептозотоциновым диабетом с целью последующего изучения молекулярных механизмов гипогликемического эффекта новых пероральных антидиабетических препаратов.

**Методика.** Опыты проводили на крысах-самцах линии Wistar массой 250-300 г. Экспериментальный диабет вызывали единичной внутрибрюшинной инъекцией стрептозотоцина (60 мг/кг веса). За ходом развития диабета следили по появлению в моче глюкозы и кетоновых тел, по повышению уровня глюкозы в крови, по увеличению потребления воды и диуреза, по снижению веса тела. Как правило, через 3-4 дня у экспериментальных животных развивался стойкий диабет. В опыт брали крыс с уровнем гликемии выше 19 ммоль/л. Контролем служили интактные животные.

На 6-е сутки после начала эксперимента животных декапитировали, собирали кровь и брали печень для дальнейших исследований. В сыворотке крови крыс определяли содержание глюкозы. Обработку печени проводили по методу [12]. Содержание Ф-2,6-Р<sub>2</sub> определяли в ткани печени по методу [12] с использованием пирофосфат-зависимой фосфофруктокиназы, выделенной из клубней картофеля. Определение активности ФФК-2 проводили по методу [13]. Определение активности фруктозо-1,6-бисфосфатазы проводили как описано нами ранее [14]. Активность глюкокиназы исследовалась по методу [15]. Содержание гликогена в печени определяли по методу [16]. Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** После внутрибрюшинного введения стрептозотоцина у крыс в моче обнаруживалось резкое увеличение содержания глюкозы (с 0,1 до 2 и более процентов), кетоновых тел (свыше 10 мМ), наблюдалось снижение веса тела (на 20-25%) по сравнению с контрольными животными.

Потребление воды возрастало в 8-10 раз, увеличивался диурез. Содержание глюкозы в сыворотке крови увеличивалось в 4 раза (с 6,1±0,4 ммоль/л до 22,6±1,8 ммоль/л).

В таблице 1 представлены результаты по изменению активности ФФК-2 печени при стрептозотоциновом диабете. Необходимо отметить, что метод определения киназной активности бифункционального фермента предусматривает определение так называемого

мой “активной” формы фермента (нефосфорилированной), исследуемой при рН 6,6 и ненасыщающей концентрации субстрата, и “общей” активности фермента, измеряемой при рН 8,5 и насыщающей концентрации субстрата. Метод основан на изменении кинетических свойств двух форм фермента при изменении рН среды [13].

Таблица 1  
Активность ФФК-2, выделенной из ткани печени контрольных и диабетических крыс

| Группы животных | активность ФФ -2 (пмоль/мин на мг белка) |                     |                                       |
|-----------------|--|---------------------|---------------------------------------|
|                 | *активная* форма рН6,6                   | *общая* форма рН8,5 | отношение активностей (рН 6,6/рН 8,5) |
| Контроль        | 2,60±0,12                                | 5,50±0,13           | 0,47±0,01                             |
| Диабет          | 0,78±0,01                                | 3,25±0,15*          | 0,24±0,01                             |

Примечание: \* - различия достоверны по сравнению с контрольными животными (p<0,05)

Установлено, что в печени диабетических крыс происходит резкое снижение активности ФФК-2, особенно измеренной при рН 6,6. При этом активность фермента измеренная при рН 6,6 была в 3 раза ниже по сравнению с контролем, уменьшение же общей активности фермента было лишь в 1,7 раза ниже по сравнению с контрольными значениями. Это в свою очередь приводило к изменению соотношения двух форм активности фермента (“активная”/”общая”) с 0,43 в контроле до 0,24 при стрептозотоциновом диабете.

Наряду со снижением активности ФФК-2, уменьшением соотношения активности двух его форм, в печени диабетических крыс происходит значительное падение содержания Ф-2,6-Р<sub>2</sub> (табл.2). Уменьшение содержания Ф-2,6-Р<sub>2</sub> в ткани печени может быть, прежде всего, объяснено уменьшением киназной активности бифункционального фермента.

Таблица 2  
Содержание фруктозо-2,6-бисфосфата, гликогена и активность глюкокиназы и фруктозо-1,6-бисфосфатазы в ткани печени крыс в норме и при экспериментальном стрептозотоциновом диабете

| Показатели  | Контроль | Диабет    |
|---|----------|-----------|
| Фруктозо-2,6-бисфосфат нмоль/г ткани                | 4,0±0,3  | 0,6±0,04* |
| Гликоген мг/г ткани                                 | 25,1±2,5 | 1,2±0,3*  |
| Глюкокиназа (мкмоль/мин на 1 г ткани)               | 3,4±0,1  | 0,3±0,01* |
| Фруктозо-1,6-бисфосфатаза (мкмоль/мин на 1 г ткани) | 9,2±0,7  | 15,5±1,4* |

Примечание: \* — различия достоверны по сравнению с контрольными животными (p<0,05). В каждой группе было 8-10 крыс.

Снижение содержания Ф-2,6-Р<sub>2</sub> в свою очередь приводит к смещению реакций гликолиза в сторону реакций глюконеогенеза. Нами показано, что при диабете происходит активация ключевого фермента глюконеогенеза -фруктозо-1,6-бисфосфатазы. Обнаружено почти 2-х кратное увеличение активности фермента с 9,2 мкмоль/мин на г ткани в контроле до 15,5 мкмоль/мин на грамм ткани при диабете (табл. 2). Механизм увеличения активности ФБФазы-1 может быть объяснен падением содержания Ф-2,6-Р<sub>2</sub> в печени диабетических крыс. Снятие ингибирующего действия Ф-2,6-Р<sub>2</sub> на фермент сопровождается повышением его активности. Кроме того, возрастание активности ФБФазы-1, возможно, вызвано увеличением содержания мРНК ФБФазы-1 в ткани печени диабетических крыс [17].

Показано, в том числе и нами (табл. 2), что при стрептозотоциновом диабете в печени крыс происходит резкое снижение активности глюкокиназы, несмотря на высокое содержание в сыворотке крови глюкозы -субстрата для данного фермента. Есть основания считать, что изменение активности глюкокиназы, играющей основную роль в поддержании гомеостаза глюкозы, возникает в результате изменения количества данного фермента. На культуре гепатоцитов в опытах *in vitro* установлено, что у крыс при диабете происходит снижение содержания мРНК глюкокиназы, причем обнаружена четкая корреляция между падением активности фермента и уровнем мРНК глюкоки-

назы. Введение инсулина диабетическим животным приводило к увеличению содержания мРНК глюкокиназы и нормализовало активность данного фермента [18,19].

У диабетических крыс наблюдалось также низкое содержание гликогена в печени (табл.2). Решающее значение в этом процессе может играть как снижение утилизации глюкозы печенью, так и уменьшение активности гликогенсинтазы [20].

Исходя из полученных данных, прежде всего, можно сделать следующие выводы. При стрептозотоциновом диабете наблюдается активация процессов цАМФ-зависимого фосфорилирования бифункционального фермента, что сопровождается снижением его киназной и повышением бисфосфатазной активности. Уровень Ф-2,6-Р<sub>2</sub> в ткани печени резко снижается. В результате при диабете усиливается глюконеогенез и тормозится гликолиз в гепатоцитах. Однако, по мнению Miralpeix M (1992) [21], при экспериментальном стрептозотоциновом диабете нельзя исключить и уменьшение содержания мРНК фосфофруктокиназы-2 в ткани печени, как это имеет место для мРНК глюкокиназы и пируваткиназы. В последние годы изучение системы фруктозо-2,6-бисфосфата при диабете приобретает все большее значение.

Так группой японских исследователей [22] установлено, что гипогликемический эффект целого ряда пероральных антидиабетических препаратов связан с ингибирующим влиянием их на процессы цАМФ зависимого фосфорилирования бифункционального фермента.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Van Schaftingen E., Hue L., Hers H.G. // Biochem. J. -1980. - Vol. 192. - P. 897-901.
- 2 EI-Maghraby M.R., Claus T.H., Pilkis J. et al. // J. Biol. Chem. -1982-. Vol. 257. - P. 7603-7607.
- 3 Pilkis S.J., Ehrisman T Burgess B. et al. // Adv. Enz. Regul. - 1983.- Vol. 21. - P. 147-173.
- 4 Furuya T., Yokoyama M., Uyeda K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1982. -Vol. 79. - P. 325-329.
- 5 Claus T.H., EI-Maghraby M.R., Ryen D.M. et al. // Curr. Top. Cell. Reg. - 1984. - Vol. 23 - P. 57-86.
- 6 Canera E.T., Lambias E.B.C., Grinstein M. // Biochem. and Cell. Biol. - 1989. - Vol. 67. - P. 751-758.
- 7 Ventura F., Rosa J.L., Ambrosio S, et al. // Biochem. J. -1991.- Vol. 276. - P. 445-460.
- 8 Yamamoto M., Hamasaki N., Maruta Y., Tomonaga M. // J. Neurochem. - 1990. - Vol.54. - P.592-597.
- 9 Abe J., Minami J., Li J. et al. // Biochemistry. - 1995.-vol.237.- P. 57-86.
- 10 Hue L. and Rider M.H. // Biochem. J. - 1987. - Vol. 245. - P. 313-324.
- 11 Kurland I.J., Lin Li., Lange A.J., Correia J.J. et al. // J. Biol. Chem. -1993.- Vol. 268. - P. 14056-14064.
- 12 Van Schaftingen E., Lederer B., Bartrons R. and Hers H.G. // Eur. J. Biochem. - 1982. - Vol. 129. - P. 191-195.
- 13 Bartrons R., Van Schaftingen E., Hers H.J. // Biochem.J. -1983. - Vol. 214. - P. 829-837.
- 14 Беляева Н.Ф., Никулин И.П., Коровкин Б.Ф. // Биохимия. -1989. - Т. 57. - 0.1514-1519.
- 15 Davidson A.L., Arion W.J. // Arch. Biochem. Biophys. - 1987. -Vol. 253. - P. 156-167.
- 16 Попова И.Ф., Чибисов И.В. // В кн. "Современные методы в биохимии". Москва, "Медицина", 1977, вып. 3, с.136-146.
17. Pilkis S.J., Claus T.H. and EI-Maghrabi M.R. // Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res. - 1988. - Vol. 22. - P. 175-191.
18. Spense J.T. // J. Biol. Chem. - 1983. - Vol.258. - P.9143-9146.
19. Tledge M. and Lenzen S. // Biochem. J. - 1995.- Vol. 308. -P. 139-144.
20. Tamura S., Brown T.A., Dubler R.E., Larner J. //Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1983.- Vol. 113. - P. 80-86.
21. Miralpeix M., Carballo E., Bartrons R. et al. // Diabetologia. -1992. - Vol. 35. - P. 243-248.
22. Aoki M.K., Kaku H., Inoue A. et al. // Diabetes. - 1992. - Vol 41. - P. 334-337.

#### SOME PECULIARITIES OF THE LIVER TISSUE FRUCTOSE 2,6-BISPHOSPHATE SYSTEM IN EXPERIMENTAL STREPTOZOTOCIN DIABETES

M.S.Markova, M.D.Golubev, V.K.Gorodetsky, N.F.Belyaeva, L.N.Viktorova, B.F.Korovkin

Research Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Moscow, 119832, Pogodinskaya st.10

The activity of phosphofruktokinase-2, fructose 1,6-bisphosphatase, glucokinase, and also the level of fructose 2,6bisphosphate and glycogen were examined in the liver of normal. and streptozotocin-diabetic rats. It was shown that the activity of phosphofruktokinase-2 was decreased in the liver of diabetic rats. Besides that the activity determined at pH 6.6 (the "active" or unphosphorylated enzyme form) was 3-fold reduced whereas the "total" enzyme activity as measured at pH 8.5 was lowered 1,7-fold. The phosphofruktokinase-2 activity assay at two pH values allows to estimate a degree of phosphorylation of bifunctional enzyme which is markedly enhanced in diabetes. The fall of the bifunctional enzyme k inase activity is accompanied by the lowered fructose 2,6-bisphosphate level, increased fructose 1,6-bisphosphatase activity that in turn favours the liver tissue glycolysis inhibition and gluconeogenesis enhanced in diabetes.