

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ
УДК 616.379-008.64-07:616.115.1-008.931

МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВИРОВАННОЙ ФОРМЫ а АЛЬДОЗОРЕДУКТАЗЫ У БОЛЬНЫХ ИНСУЛИНЗАВИСИМЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ. ВОЗМОЖНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ПУТЕМ НАРУШЕНИЯ ТИОЛДИСУЛЬФИДНОГО ОБМЕНА

С.Э.РАБИНОВИЧ, Н.И.ШОНО, Л.В.ПЛАТОНОВА, Т.Г.ДЮЖЕВА,
Э.И.ГАЛЬПЕРИН

Московская медицинская академия им. И.М.Сеченова.
Большая Пироговская ул. 2/6, 119881 Москва, Россия

Инкубация формы b (Км 3,0-4,0 мМ, Vmax 4,38±0,6 мЕ/Д280) альдоредуктазы (АР; К.Ф.1.1.1.21.) из эритроцитов человека в системе, генерирующей радикалы кислорода (0,42М(NH₄)₂SO₄, 0,1 мМ FeSO₄, 0,3 мМ ЭДТА) или обработка избытком GSSG (10 мМ) приводит к увеличению ее удельной активности (Vmax 10,0 мЕ/Д280), снижению сродства к D-глюкозе (Км 25,4 мМ) и изменению хроматографических свойств при ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе. Модифицированная таким образом форма b АР по своим свойствам очень сходна с формой а фермента (Км 6,5-19,0 мМ, Vmax 16,7±3,2 мЕ/Д280), которая обнаружена у больных ИЗСД. Обработка такой модифицированной формы b, а также формы а GSH (10мМ) или ДТТ (10 мМ) приводит к появлению формы фермента по своим кинетическим и хроматографическим свойствам очень сходной с нативной формой b АР. На основании этих экспериментальных данных сделан вывод о решающей роли SH-групп фермента во взаимопревращениях а и b форм.

Предполагается, что одной из причин возникновения формы а в эритроцитах больных ИЗСД является усиление процессов перекисного окисления липидов, продукты которого способны окислять SH-группы белков или приводить к накоплению в клетках GSSG.

Обсуждается вопрос об изменении активности ряда ключевых ферментов обмена глюкозы в результате нарушения тиол/дисульфидного обмена при сахарном диабете.

Ключевые слова: инсулин-зависимый сахарный диабет, перекисное окисление липидов, альдозоредуктаза.

Введение. Ранее нами было показано наличие двух форм альдозоредуктазы (АР; К.Ф.1.1.1.21.) — а и b в эритроцитах больных инсулинзависимым сахарным диабетом (ИЗСД) в отличие от здоровых лиц, у которых обнаружена только форма b [1]. Форма а характеризовалась более высокой активностью и меньшим сродством к субстрату (глюкозе) по сравнению с формой b. На основании анализа полученных кинетических параметров (К_м и V_{max}) формы а, нами было высказано предположение, что ее наличие является причиной усиления функционирования сорбитолового пути утилизации глюкозы в инсулиннезависимых тканях у больных ИЗСД [2], т.к. АР является ключевым ферментом данного пути [3]. В этой связи механизм возникновения формы а представляется достаточно актуальным.

Целью данной работы является изучение возможного механизма образования формы а АР у больных ИЗСД.

Методика. В работе использовали эритроциты здоровых доноров и больных ИЗСД (n=5), (средний возраст — 42±4 г., длительность заболевания — 18±3 лет, доза получаемого инсулина — 0,48±0,02 ед/кг, заболевание сопровождалось микроангиопатиями различной локализации), которые получали из гепаринизированной крови, взятой натощак.

АР была выделена и частично очищена из эритроцитов путем ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе согласно методике, описанной нами ранее [1].

Активацию формы b АР проводили двумя способами: обработкой фермента системой, генерирующей радикалы кислорода [4] и избытком окисленного глутатина (GSSG). В первом случае форму b инкубировали в реакционной среде, генерирующей радикалы кислорода в течение 1 часа при 4°C. Состав реакционной среды: 0,42 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 мМ FeSO_4 ; 0,3 мМ ЭДТА (среда А) [4, 5]. Во втором случае форму b инкубировали с 10 мМ GSSG в течение 1 часа при 4°C. После активации фермента определяли его активность и кинетические параметры. Для последующей инактивации активированного двумя способами фермента проводили его повторную инкубацию с 50 мМ дитиотреитолом (ДТТ) в течение 1 часа при 4°C. В обоих случаях предварительно перед активацией препараты АР освобождали от β -меркаптоэтанола [1] гель-фильтрацией на сефадексе G-25 "fine" (размер колонки 0,8 x 45 см).

Обработку формы a АР больных ИЗСД проводили 10 мМ восстановленным глутатионом (GSH) или 10 мМ ДТТ в течение 1 часа при 4°C.

Активность АР определяли по скорости окисления NADPH при 340 нм при 25°C [6]. В качестве субстрата использовали D-глюкозу. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует окисление 1 мкмоль NADPH за 1 мин. Удельную активность выражали в единицах активности, отнесенных к величине оптической плотности при 280 нм.

Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по концентрации малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови [7].

Кинетические параметры K_m и V_{max} рассчитывали, используя координаты Лайнуивера-Бэрка.

Статистическую обработку проводили на калькуляторе МК-54 с использованием статистических программ [8].

В работе использовали ДЭАЭ-целлюлозу (ДЭ-52, "Whatman", Англия), сефадекс G-25 "fine" ("Pharmacia", Швеция), D-глюкозу, NADPH, ДТТ, GSH, GSSG ("Reanal", Венгрия), β -меркаптоэтанол ("Aldrich", США). Остальные реактивы отечественного производства.

Результаты и обсуждение. Обнаружение формы a АР в эритроцитах больных ИЗСД [1] побудило нас к поиску механизма возникновения этой формы фермента.

Из литературы известен факт активации нативной формы АР из хрусталика глаза быка при инкубации ее в среде, генерирующей радикалы кислорода [4, 5]. Добавление в данную среду восстановленного глутатиона (GSH) или дитиотреитола (ДТТ) предотвращало активацию исходной формы фермента, не изменяя его кинетические параметры.

Для изучения механизма активации АР в условиях *in vitro* с целью сопоставления его с механизмом образования активной формы a в эритроцитах больных ИЗСД нами был проведен аналогичный эксперимент. В результате инкубации формы b АР в среде А [4], произошло образование новой формы АР, отличающейся по своим кинетическим параметрам от исходной формы b. Как видно из таблицы 1, вновь образованная форма фермента обладала более высокой удельной активностью и меньшим сродством к субстрату (глюкоза) по сравнению с исходной, т.е. по своим кинетическим параметрам она приближалась к форме a, обнаруженной

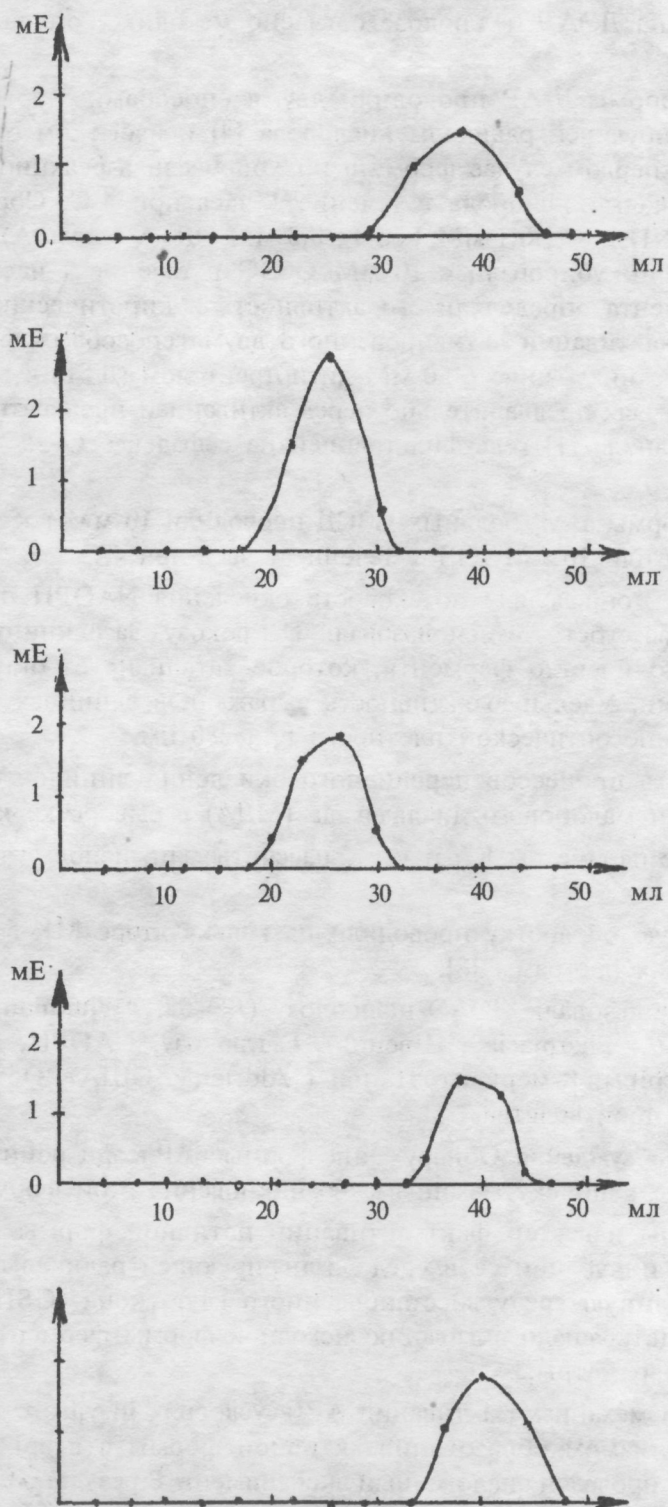


Рис. Профили элюции с ДЭАЭ-целлюлозы форм а и b АР из эритроцитов здоровых лиц и больных ИЗСД.

Формы а и b были предварительно инкубированы: а — форма b (без инкубации); б — форма b + GSSG (10 мМ); в — форма а (больной Т., без инкубации); г — форма а + GSH (10 мМ); д — форма b + глюкоза (30 мМ); По оси ординат — величина ферментативной активности (мЕ), по оси абсцисс — объем элюата (мл).

Таблица 1

Изменение свойств формы b AP в результате обработки реагентами, модифицирующими SH-группы

Обработка AP	Vmax, мЕ/Д ₂₇₀	Km, mM
форма b (без обработки)	3,85	3,33
форма b + среда A*	10,0	25,4
[форма b + среда A] + ДТТ, 50 мМ	3,2	3,5
форма b + GSSG, 10 мМ	32,7	3,5
[форма b + GSSG, 10 мМ] + ДТТ, 50 мМ	2,2	3,0
форма a (без обработки)	7,9	22,0

* среда A (0,42 М (NH₄)₂SO₄; 0,1 мМ FeSO₄; 0,3 мМ ЭДТА)

нами ранее у больных ИЗСД [1]. Обработка полученной формы фермента избытком ДТТ приводила к образованию формы AP, по своим кинетическим параметрам очень сходной с формой b.

Активация формы b AP системой, генерирующей радикалы кислорода, и ее инактивация под действием ДТТ позволили нам предположить участие в этом процессе SH-групп фермента. В таком случае, обработка формы b AP реагентами, модифицирующими SH-группы, должна приводить к ее активации. В качестве такого реагента может быть использован окисленный глутатион (GSSG), образующий дисульфидные связи со свободными SH-группами белков и ферментов [9]. Действительно, обработка формы b GSSF приводила к активации фермента; добавление к такому активированному ферменту ДТТ снижало его активность до величины, характерной для исходной формы фермента (табл. 1).

При сопоставлении профилей элюции с ДЭАЭ-целлюлозы нативной формы b AP (рис. 1а), формы b, обработанной GSSG (рис. 1б) и формы a больного ИЗСД (взятого в качестве примера; для остальных больных получали аналогичный результат) (рис. 1в) оказалось, что пик активности формы b, обработанной GSSG, не совпадает по месту выхода с колонки с таковыми для нативной формы b и идентичен пику активности формы a больного ИЗСД. Эти данные с достаточно большой убедительностью свидетельствуют об участии SH-групп фермента в обратимом процессе его активации-инактивации, т.е. взаимном переходе форм a=b, что вероятно может иметь место у больного ИЗСД.

Еще одним подтверждением участия SH-групп AP в процессе активации формы b может быть снижение активности формы a и приближение ее по кинетическим свойствам к форме b после обработки формы a больного ИЗСД SH-восстанавливающими реагентами (GSH или ДТТ). Действительно, после инкубации формы a больного ИЗСД с избытком GSH и проведенной ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе мы наблюдали смещение места выхода пика активности AP (рис. 1б) таким образом, что выходящий пик полностью совпадал с пиком активности формы b (рис. 1г). Полученная форма фермента в результате такой обработки GSH формы a по своим кинетическим параметрам также совпадала с формой b AP (таблица 2).

Несмотря на достаточную убедительность полученных результатов об участии SH-групп AP в процессах ее активации-инактивации, мы рассмотрели и другие, имеющиеся в литературе данные о роли некоторых соединений в активации AP при сахарном диабете, в частности, глюкозы [10, 11]. Так, авторами данной работы было показано, что в результате инкубации эритроцитов здорового донора с глюкозой происходит трехкратное увеличение активности AP [10]. Проведенная

нами инкубация эритроцитов здоровых лиц (содержащих только форму b) в условиях, описанных авторами вышеуказанной работы [10] (30 mM D-глюкоза, 3 часа при 37°C) не приводила к изменению как активности фермента, так и его профиля элюции с ДЭАЭ-целлюлозы (рис. 1д). Следует отметить, что авторы указанной работы также не отмечали изменение профиля элюции AP с ДЭАЭ-целлюлозы после инкубации эритроцитов с глюкозой; пики активности AP в обоих случаях полностью совпадали друг с другом [10]. Причиной наблюдаемого трехкратного увеличения активности AP без изменения профиля элюции с ионообменника, т.е. отсутствие формы a, представляется нам не совсем понятной. Возможно, это связано с наличием примеси субстрата в препарате фермента после инкубации с глюкозой [7].

Таблица 2

Изменение свойств формы a AP в результате обработки реагентами, восстанавливающими SH-группы

Обработка AP	Vmax, мЕ/Д ₅₀₀	Km, mM
форма a (без обработки)	7,9	22,2
форма a + FSH, 10 mM	2,0	5,3
форма a + ДТГ, 10 mM	2,41	8,3
форма b (без обработки)	3,85	3,3

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об участии SH-групп цистеиновых остатков AP в процессе ее активации.

Обнаружение форм a-AP у больных ИЗСД ставит вопрос о причинах ее возникновения при данном заболевании. Наиболее вероятной причиной, по нашему мнению, может быть накопление в клетках соединений, способных окислять SH-группы белков и ферментов (возможно, за счет образования дисульфидных связей), одним из которых, как наиболее распространенным, является GSSG [9]. Так, в частности, было показано снижение концентрации GSH в хрусталике глаза при экспериментальном диабете у крыс [12], увеличение концентрации GSSG и снижение соотношения GSH/GSSG в эритроцитах [13] и числа свободных SH-групп белков мембран эритроцитов [14] у больных сахарным диабетом.

Одним из факторов, способствующих этим процессам, может являться усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ), характерное для ИЗСД [15]. Продукты ПОЛ, в частности, малоновый диальдегид (МДА), способны окислять SH-группы белков, а усиление ПОЛ приводит к накоплению в клетках GSSG [16, 17].

Проведенный нами анализ процесса ПОЛ в сыворотке крови также показал его усиленное протекание у больных ИЗСД по сравнению со здоровыми лицами. Так, содержание МДА (интенсивность ПОЛ оценивали по концентрации данного соединения) в сыворотке крови у больных ИЗСД составляло 4,11-0,2 нмоль/мл по сравнению с 3,09-0,14 нмоль/мл ($p < 0,05$) у здоровых лиц.

Таким образом, можно предположить, что увеличение концентрации в клетках GSSG [16] и усиление процессов ПОЛ у больных ИЗСД, приводящее к накоплению соединений, способных окислять SH-группы белков и ферментов [17], будет вызывать изменение их нативных свойств. В частности, одним из таких ферментов является форма b AP, модификация SH-групп которой приводит к образованию формы a данного фермента и, как результат этого, активация сорбитолового пути утилизации глюкозы.

Таблица 3

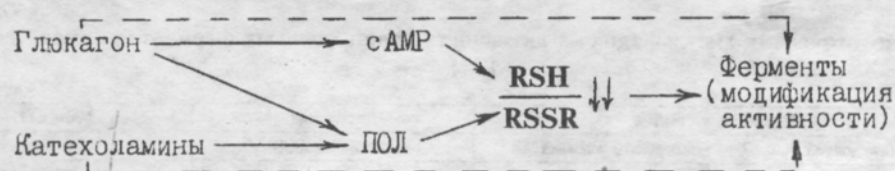
Действие биологических дисульфидов на активность ряда ключевых ферментов обмена глюкозы [24]

№	Ферменты, источники	Дисульфид	Эффект
1	Гексокиназа (К.Ф.2.7.1.1.), эритроциты человека	Гистамин, GSSG	Ингибирование
2	Гликогенсинтаза (К.Ф.2.4.1.11), печень крысы	GSSG	Ингибирование
3	Пироваткиназа (К.Ф.2.7.1.40), печень крысы	GSSG	Ингибирование
4	Фосфофруктокиназа (К.Ф.2.7.1.11), мышцы кролика	GSSG, CoASSG	Ингибирование
5	Фруктозо-1,6-бисфосфатаза (К.Ф.3.1.3.11), печень крысы	GSSG, CoASSG	Активирование
6	Глюкозо-6-фосфатаза (3.1.3.9), печень кролика	GSSG	Активирование

Исходя из полученных нами результатов и данных литературы о значении SH-восстанавливающих (RSH) и SH-окисляющих (RSSR) соединений можно предположить, что их соотношение может играть существенную роль при сахарном диабете. Ранее Gilbert было высказано предположение о роли соотношения RSH/RSSR как “третьего мессенджера” в регуляции метаболизма глюкозы в клетке [18]. Основой этой гипотезы послужили результаты работ, показавшие, что глюкагон, стимулируя накопление цАМФ в клетке, значительно снижает соотношение RSH/RSSR [19, 20], в результате чего изменяется активность ряда ключевых ферментов обмена глюкозы (таблица 3). Как видно из таблицы 3, такие важнейшие ферменты углеводного обмена как гексокиназа, фосфофруктокиназа, пироваткиназа и гликогенсинтаза подвергаются ингибирующему действию биологических дисульфидов, в основном GSSG. В то же время ключевой фермент глюконеогенеза — фруктозо-1,6-бисфосфатаза и фермент, во многом непосредственно определяющий уровень свободной глюкозы в крови — глюкозо-6-фосфатаза [21], активируется биологическими дисульфидами.

Изменение активности вышеуказанных ферментов под действием биологических дисульфидов (GSSG) может приводить с одной стороны к снижению скоростей процессов утилизации глюкозы (ингибирование гексокиназы, фосфофруктокиназы, гликогенсинтазы), а с другой — усиливать процессы продукции глюкозы (активация фруктозо-1,6-бисфосфатазы, глюкозо-6-фосфатазы), что имеет место при сахарном диабете [22]. Следовательно, можно предположить, что снижение соотношения RSH/RSSR при диабете будет вносить определенный вклад в изменение активности ключевых ферментов процессов утилизации и продукции глюкозы.

Одной из причин снижения соотношения RSH/RSSR при диабете может являться гиперглюкемия [23] и усиление процессов ПОЛ [15]. В свою очередь, усиление процессов ПОЛ при сахарном диабете приписывают действию избытка катехоламинов, стимулирующих липолиз [23], в результате чего образуется повышенное количество свободных жирных кислот — основных субстратов ПОЛ. Аналогичный эффект может вызывать и глюкагон [23]. Таким образом, действие избытка контринсулярных гормонов — глюкагона и катехоламинов при диабете может приводить к нарушению в клетке процессов тиол-дисульфидного обмена и накоплению RSSR-соединений. Объединяя представления о роли глюкагона (гипотеза Gilbert) и продуктов ПОЛ в снижении RSH/RSSR-соотношения [24], мы предлагаем схему нарушения регуляции активности ферментов обмена глюкозы при сахарном диабете:



Приведенная схема может представлять один из возможных механизмов регуляции активности ключевых ферментов обмена глюкозы при сахарном диабете, не противоречащий таким хорошо известным механизмам регуляции метаболизма глюкозы под действием глюкагона и катехоламинов, как фосфорилирование, а также индукция или репрессии их биосинтеза [25], а только дополняя их. Предполагается, что соотношение RSH/RSSR будет вносить определенный вклад в изменение активности ключевых ферментов утилизации и продукции глюкозы при сахарном диабете. Как показали экспериментальные данные, одним из таких ферментов будет являться AP — ключевой фермент сорбитолового пути утилизации глюкозы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шоно Н.И., Рабинович С.Э., Платонова Л.В., Дюжева Т.Г. // *Вопр. мед. химии.* — 1994. — Т. 40. — N 5. — С. 45-48.
2. Gabbay K.H. // *Annu. Rev. Med.* — 1975. — V. 26. — P. 521-526.
3. Kador P.F. // *Med. Res. Rev.* — 1988. — B. 8. — N 3. — P. 325-352.
4. Del Corso A., Camici M., Mura U. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1987. — V. 148. — P. 369-375.
5. Del Corso A., Barsacchi D., Camici M., et al. // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1989. — V. 270. — N 2. — P. 604-610.
6. Das B., Srivastava S.K. // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1985. — V. 238. — N 2. — P. 670-679.
7. Коробейникова Э.Н. // *Лаб. дело.* — 1989. — N 7. — С. 8-10.
8. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. // Иванов Ю.И., Погорелок О.Н. — М. — Медицина. — 1990.
9. Kosower N.S., Kosower E.M. // *International Review of Cytology.* — 1978. — V. 54. — Academic Press, Int. — P. 109-157.
10. Srivastava S.K., Hair G.A., Das B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1985. — V. 82. — P. 7222-7226.
11. Srivastava S.K., Ansari N.H., Hair G.A. // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1986. — V. 870. — P. 302-311.
12. Gonzalez R.G., Barnett P., Aguayo J. // *Diabetes.* — 1984. — V. 33. — P. 196-199.
13. Murakami K., Kondo T., Ohtsuka Y. // *Metabolism.* — 1989. — V. 38. — N 8. — P. 753-758.
14. Bono A., Caimi G., Catania A. et al. // *Horm. Metab. Res.* — 1987. — V. 19. — P. 264-266.
15. Старосельцева Л.К., Косилова Е.С., Смурова Т.Ф. // *Пробл. эндокринол.* — 1986. — N 1. — С. 19-22.
16. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. // Биленко М.В. — М. — Наука. — 1972.
17. Владимиров Ю.А., Арчаков А.М. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М. — Наука. — 1972.
18. Gilbert H.F. // *J. Biol. Chem.* — 1982. — V. 257. — N 20. — P. 12086-12091.
19. Issacs J., Binkley F. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1977. — V. 497. — P. 192-204.
20. Issacs J., Binkley F. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1977. — V. 498. — P. 29-38.
21. Nelson K.L., Sukalski K.A., Norblie R.C. // *Proc. N. D. Acad. Sci.* — 1989. — V. 43. — P. 66.
22. Bergman R.N., Finegood D.T., Ader M. // *Endocr. Rev.* — 1988. — V. 6. — P. 45-66.
23. Taylor R., Aglus L. // *Biochem. J.* — 1988. — V. 250. — N 3. — P. 625-640.

24. *Ondarza R.N.* // Bioscience Reports. — 1989. V.9 — N. 5. — P. 593-604.
25. *Ленинджер А.* // Основы биохимии. — М. — Мир. — 1985.

THE MECHANISM OF THE FORM A OF ALDOSE REDUCTASE FORMATION IN
DIABETES MELLITUS. THE PROBABLE REGULATION OF THE ENZYME
ACTIVITIES IN THE RESULT OF THE IMPAIRMENTS OF THE THIOL/DISULFIDE
EXCHANGE IN DIABETES MELLITUS

S.E.Rabinovich, N.I.Shono, L.V.Platonova, T.G.Diuzeva, E.I.Galperin

Sechenov Moscow Medical Academy
119881, Russia, Moscow, 2/6 Bolshaya Pirogovskaya Street

Incubation of form b (K_m 3,0-4,0 mM; V_{max} 4,38±0,6 mE/D) of aldose reductase (AR; E.C.1.1.1.21.) from the human red cells in the oxygen radical generating systems or treatment by the abundance of the concentrations of GSSG (10 mM) caused the increase of specific activity (V_{max} 10,0 mE/D), decrease of the affinity for D-glucose (K_m 25,4 mM) and alterations of the chromatographic properties of the enzyme. The modified form b of AR has very similar properties with form a of this enzyme (K_m 6,5-19,0 mM; V_{max} 16,7±3,2 mE/D), that had been found in red cell of the diabetes mellitus. The treatment of the modified form b or form a by GSH (10 mM) caused the appearance of the AR that has very similar properties with form b. On the bases of these results the main role of SH-groups of AR in the interconversion of the form b and a is concluded.

It is suggested that the increase of the lipid peroxidation may be one of the reasons of the formation of the form aAR, because the product of the lipid peroxidation can oxidize the SH-groups of the protein and enzymes or cause the increase of GSSG in the cell.

Alteration of the properties of the carbohydrate metabolism's enzymes in the result of the impairment of the thiol/disulfide exchange in diabetes mellitus is discussed.

Key words: diabetes mellitus, lipid peroxidation, aldose reductase.