

ВЛИЯНИЕ ПЕРОРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ИНУЛИНА НА УРОВЕНЬ ФРУКТОЗО-2,6-БИСФОСФАТА В ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ

Д.А.ГУСЕВА, В.К.ГОРОДЕЦКИЙ*, С.А.КРАЕВОЙ, М.С.МАРКОВА*,
Т.Б.ЦЫГАНОВА

НИИ биомедицинской химии РАМН, Погодинская ул. 10, Москва 119832, Московский государственный заочный институт пищевой промышленности, Земляной вал, 73, Москва 1098033

На крысах со стрептозотоциновым диабетом исследовали содержание глюкозы и фруктозы в крови, содержание глюкозы и кетоновых тел в моче и содержание фруктозо-2,6-бисфосфата в печени, а также влияние на эти показатели перорального введения инулина. Было показано, что при кратковременном введении 0,5% раствора инулина в течение 5-6 дней содержание фруктозы в крови крыс увеличилось примерно в три раза по сравнению с контролем, уровень глюкозы в крови нормализовался, кетоновые тела и глюкоза в моче исчезли, концентрация фруктозо-2,6-бисфосфата в печени увеличилась до нормы. При более длительном введении инулина (12 дней) уровень фруктозы в крови увеличился примерно в 5 раз по сравнению с контролем (1,5 ммоль/л), глюкоза в крови увеличилась до уровня не леченного диабета (22 ммоль/л), в моче появилась глюкоза и кетоновые тела, содержание фруктозо-2,6-бисфосфата в печени снизилось до величин, наблюдавшихся при диабете. Сходную закономерность наблюдал Van den Berghe при инкубации выделенных гепатоцитов от сытых крыс с высокими концентрациями фруктозы, при этом содержание фруктозо-2,6-бисфосфата в клетках печени снижалось более чем на 90%. Автор пытался объяснить это явление несколькими причинами: снижением концентрации АТФ (субстрата фосфофруктокиназы 2), снижением концентрации неорганического фосфата (активатора фосфофруктокиназы 2) и накоплением α -глицерофосфата (стимулятора печеночной фруктозо-2,6-бисфосфатазы). С другой стороны, инкубация гепатоцитов от голодных крыс с низкими концентрациями фруктозы увеличивала содержание фруктозо-2,6-бисфосфата в печени, что, по-видимому, являлось результатом увеличения концентрации фруктозо-6-фосфата.

Ключевые слова: инулин, фруктозо-2,6-бисфосфат, стрептозотоциновый диабет.

Введение. Известно, что инулин — полисахарид, содержащийся в клубнях и корнях георгинов, артишоков и одуванчиков. При его гидролизе образуется фруктоза, следовательно он представляет собой фруктозан. Инулин, содержащийся в клубнях и корнях многих представителей сложноцветных, может быть экстрагирован водой и очищен перекристаллизацией, т.к. он легко растворим в горячей воде и выпадает в осадок при охлаждении. Метилирование инулина свидетельствует о том, что остатки D-фруктозы связаны между собой 2→1 связями и находятся в фуранозной форме. Степень полимеризации инулина, примерно, 35 моносахаридным остаткам [1].

Ферментативный гидролиз инулина катализируется β -фруктофуранозидазой (инвертазой дрожжей и некоторых плесневых грибов; КФ 3.2.1.26), а также специфической инулазой (инулиназой, КФ 3.2.1.7) из топинамбура и клубней других растений. Оптимум действия инулина находится при pH 3,5-3,7.

Известно, что инулин легко усваивается организмом человека (у человека не обнаружено инулаз: гидролиз инулина в желудочно-кишечном тракте осуществляется только соляной кислотой) и поэтому широко используется в лечебном питании больных сахарным диабетом [2].

Образовавшаяся при гидролизе инулина D-фруктоза поступает в систему воротной вены и затем в печень. При этом следует заметить, что у некоторых видов живот-

ных (морские свинки, хомяки, собаки) значительное количество фруктозы, образующейся при расщеплении инулина, прежде чем поступить в систему воротной вены, превращается в глюкозу в клетках тонкого кишечника. У крыс и человека, у которых в клетках тонкого кишечника отсутствует глюкозо-6-фосфатаза, большая часть поступившей фруктозы попадает в систему воротной вены неизменной [3]. Всасывание моносахаридов, в том числе и фруктозы, осуществляется с помощью двух механизмов: активного транспорта против градиента концентрации и простой диффузией. Фруктоза всасывается медленнее, чем глюкоза и галактоза. Этот процесс, по-видимому, протекает путем диффузии по градиенту концентрации.

Фруктоза может быть фосфорилирована с образованием фруктозо-6-фосфата в реакции, катализируемой гексокиназой — ферментом, который катализирует также реакции фосфорилирования глюкозы в маннозу рис 1. Однако сродство данного фермента к фруктозе гораздо ниже, чем к глюкозе, поэтому маловероятно, что это превращение находится на главном пути усвоения фруктозы [4]. В печени имеется другой фермент, называемый фруктокиназой, который катализирует перенос фосфата от АТФ на фруктозу с образованием фруктозо-1-фосфата. Следует отметить, что фруктокиназа обнаружена также в почках и кишечнике. Этот фермент не катализирует фосфорилирование глюкозы, на его активность (в отличие от активности глюкокиназы) не влияют ни голодание, ни инсулин. Образование фруктозо-1-фосфата является главным путем фосфорилирования фруктозы. Образовавшийся фруктозо-1-фосфат расщепляется на D-глицеральдегид и дигидроксиацетонфосфат альдолазой В, которая присутствует в печени и способна также расщеплять фруктозо-1,6-бисфосфат (отсутствие этого фермента вызывает наследственную нетолерантность к фруктозе). D-глицеральдегид может включаться в гликолиз после фосфорилирования с образованием глицеральдегид-3-фосфата. Эта реакция катализируется другим ферментом печени — триокиназой.

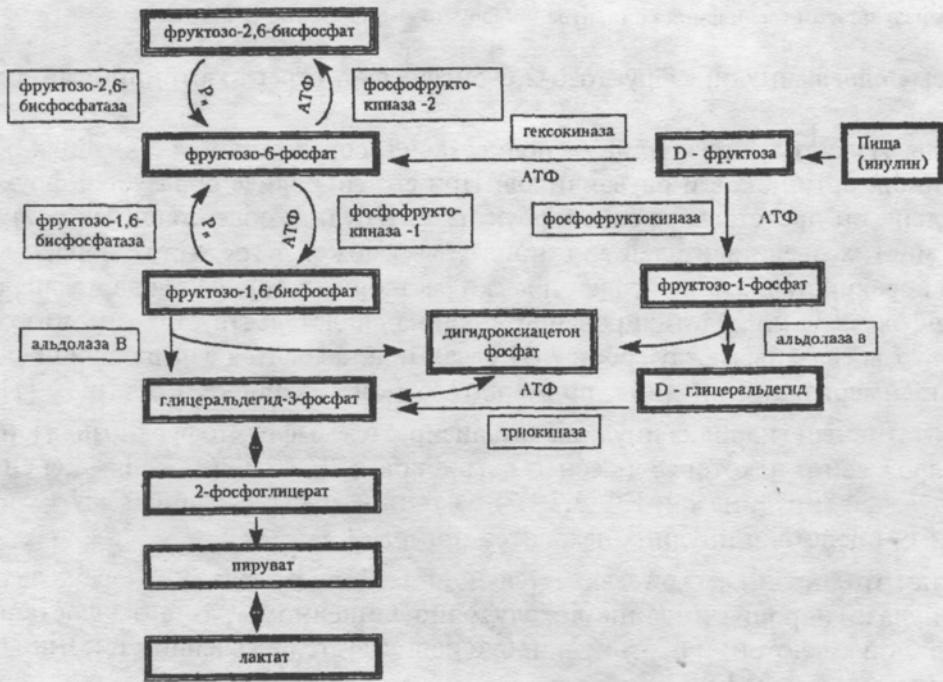
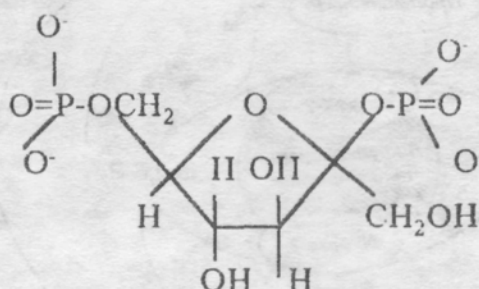


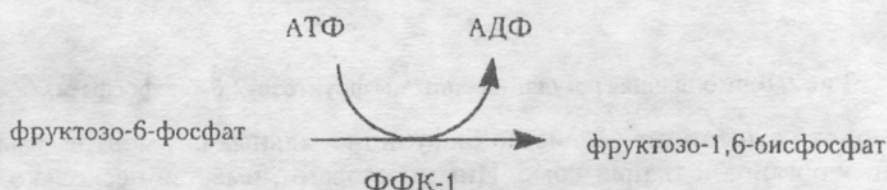
Рис 1. Пути метаболизма фруктозы в ткани печени

Два триозофосфата — дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат — могут либо трансформироваться далее по гликолитическому пути, либо конденсироваться под действием альдозы В с последующим превращением во фруктозо-1,6-бисфосфат и далее во фруктозо-6-фосфат рис 1. Заметим, что метаболизм фруктозы в печени по гликолитическому пути происходит гораздо быстрее, чем метаболизм глюкозы. Это объясняется тем, что фруктоза может миновать стадию, характерную для метаболизма глюкозы, катализируемую фосфофруктокиназой-1. Кроме того, это позволяет фруктозе интенсифицировать в печени процессы метаболизма, ведущие к синтезу жирных кислот [3]. Наконец, в печени (в гепатоцитах), как и в других тканях имеет место синтез фруктозо-2,6-бисфосфата (Ф-2,6-Р₂):

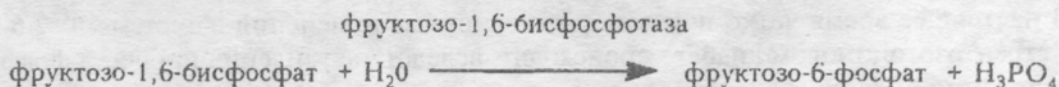


Фруктозо-2,6-бисфосфат (Ф-2,6-Р)

Ф-2,6-Р₂ был открыт в 1980 году [5]. Ф-2,6-Р₂ является самым мощным из известных в настоящее время активаторов фосфофруктокиназы-1 (ФФК-1) — (КФ 2.7.1.11) ключевого фермента гликолиза.



Одновременно Ф-2,6-Р₂ служит ингибитором фруктозо-1,6-бисфосфатазы (ФБФаза-1) (КФ 3.1.3.11.) — одного из ключевых ферментов глюконеогенеза [6]. Фруктозо-6-фосфат образуется из фруктозо-1,6-бисфосфата путем гидролиза фосфатного эфира при С-1:



Известно, что синтез и деградация фруктозо-2,6-бисфосфата осуществляется бифункциональным ферментом — фосфофруктокиназой-2 (КФ 2.7.1.105.) / фруктозо-2,6-бисфосфатазой (КФ 3.1.1.46.). Т.е. данный фермент обладает и киназной и бисфосфатазной активностями [7] (рис 2).

Показано также, что бифункциональный фермент печени в свою очередь регулируется путем цАМФ-зависимого фосфорилирования [8].

Фосфорилирование приводит к увеличению фосфатазной активности и к снижению фосфокиназной активности бифункционального фермента печени [8-11]. Этот механизм объясняет быстрое действие гормонов, в частности глюкагона, на уровень Ф-2,6-Р₂ в гепатоцитах.

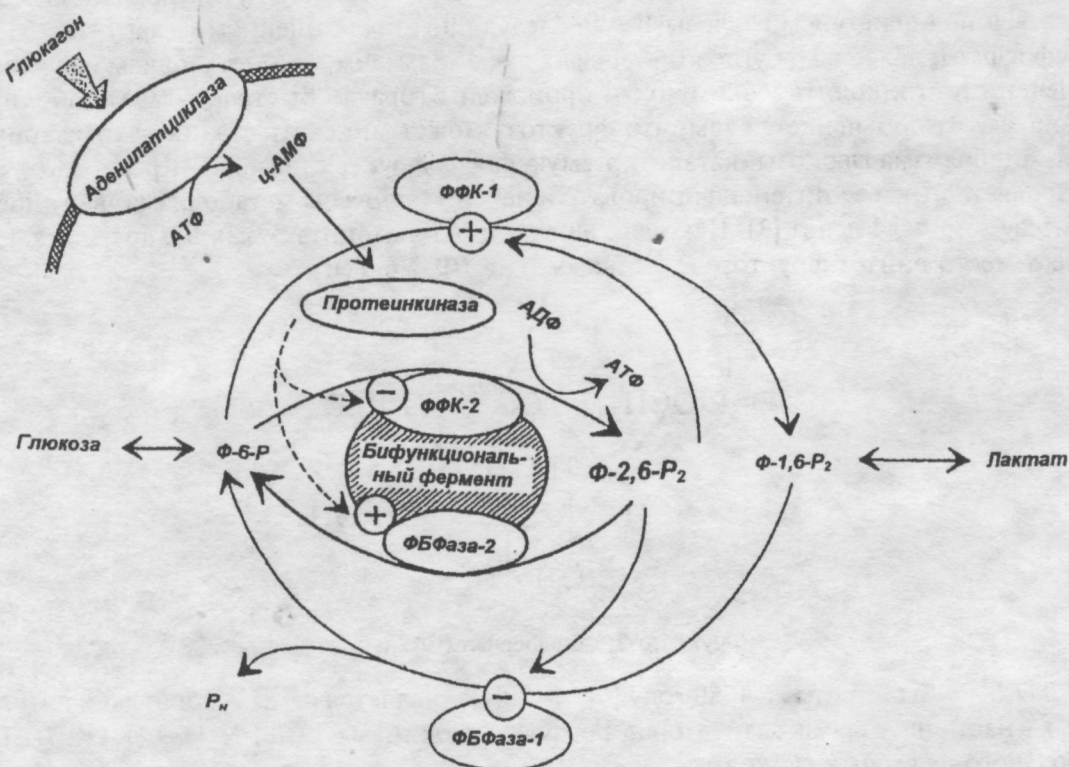


Рис 2. Гормональная регуляция системы фруктозо-2,6-бисфосфата.

Известно, что существует семейство бифункциональных ферментов, выделенных из различных органов и тканей крыс. Иными словами, имеется несколько изоформ бифункционального фермента: для печени характерна L-форма, скелетной мускулатуры — М-форма, сердца — Н-форма, мозговой ткани — В-форма. Существование изоформ бифункционального фермента, которые отличны по кинетическим свойствам и своим ответам на фосфорилирование протеинкиназами, определяет специфичность метаболизма углеводов в тех или иных тканях.

В настоящее время четко показано, что основные изменения в системе F-2,6-P_2 при стрептозотоциновом диабете происходят вследствие усиления процесса фосфорилирования бифункционального фермента с помощью цАМФ-зависимой протеинкиназы, что приводит к снижению его киназной активности и уменьшению содержания F-2,6-P_2 в ткани печени [12-17].

Кроме того, при стрептозотоциновом диабете увеличивается активность печеночной фруктозо-1,6-бисфосфатазы и уменьшается ее чувствительность к ингибирующему действию F-2,6-P_2 , в результате чего снижается скорость гликолиза и усиливается глюконсогенез.

В задачу настоящего исследования входило установление корреляционной зависимости между содержанием F-2,6-P_2 в ткани печени и уровнем глюкозы в крови диабетических крыс при пероральном введении инулина.

Методика. Опыты проводили на крысах-самцах линии Wistar, массой 190-220 г. В первой серии опытов участвовали контрольные (здоровые) и диабетические крысы. Экспериментальный диабет вызывали однократной внутрибрюшинной инъекцией стрептозотоцина (60 мг/кг массы тела). 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 массы тела.

Начиная со 2-х суток после внутрибрюшинного введения стрептозотоцина, содержание глюкозы в моче подопытных животных определяли с помощью тест-полосок "Глюкодиагностик", уровень кетоновых тел в моче с помощью наборов "Medi-Test Keton" (Германия), содержание глюкозы в крови подопытных животных исследовали глюкозооксидазным методом с помощью тест-полосок "Глюкохром Д". На 4-5-е сутки после инъекции стрептозотоцина у экспериментальных животных развивался стойкий диабет. На 5-6-е сутки после начала эксперимента животных декапитировали, собирали кровь и брали печень для дальнейших исследований (в данном случае определение уровня Φ -2,6- P_2 в ткани печени).

Во второй серии опытов участвовали животные, у которых был ярко выражен стрептозотоциновый диабет. Все животные были разделены на три группы: первая группа — диабетические крысы, которые получали питьевую воду без всяких добавок; вторая группа — диабетические крысы, которым вместо питьевой воды давали 0,5% раствор инулина в течение 5-6 дней; третья группа — диабетические крысы, которые пили 0,5% раствор инулина в течении 11-12 дней. В каждой группе было по 5-6 животных. Все диабетические животные выпивали в сутки по 90-100 мл жидкости. В качестве добавки был использован кристаллический препарат инулина, выделенный из артишока (Sigma, США).

Начиная со вторых суток эксперимента и затем через день, у всех животных до конца эксперимента определяли в крови глюкозу и фруктозу, в моче глюкозу и кетоновые тела. В конце эксперимента животных декапитировали, собирали кровь (определяли глюкозу и фруктозу) и брали печень с целью определения содержания Φ -2,6- P_2 .

Определение содержания фруктозо-2,6-бисфосфата проводили по методу [18]. Метод основан на способности фруктозо-2,6-бисфосфата активировать пирофосфатзависимую фосфофруктокиназу (РР-ФФК), выделенную из клубней картофеля. Определение содержания Φ -2,6- P_2 осуществляли путем сравнения степени активации РР-ФФК в присутствии известной концентрации Φ -2,6- P_2 (строилась калибровочная кривая) и Φ -2,6- P_2 , содержащемся в известном образце (в данном случае в ткани печени). Непосредственно активность РР-ФФК определяли спектрофотометрически (при длине волны 340 нм) по скорости окисления НАДН в системе, сопряженной с альдолазой, триозофосфатизомеразой и глицерол-3-фосфатдегидрогеназой.

Содержание белка определяли по методу [19]. Определение фруктозы в крови проводили по образованию фурфуролов, конденсации их с тиобарбитуровой кислотой и измерений экстинкции образованного комплекса при длине волны 432,5 нм.

Результаты и обсуждение. Результаты первой серии экспериментов представлены в табл 1 и на рис 3. На пятые-шестые сутки после внутрибрюшинного введения стрептозотоцина у диабетических крыс в моче обнаружилось резкое увеличение содержания глюкозы (до 2 и более процентов), кетоновых тел (свыше 10 ммоль/литр), наблюдалось снижение веса тела (на 15-20%), потребление воды возрастало. Содержание глюкозы в крови увеличивалось примерно в четыре раза табл 1. Определение

содержания Ф-2,6-Р в печени крыс показало, что у диабетических (стрептозотоциновых) крыс содержание Ф-2,6-Р значительно снижено по сравнению с контролем (здоровыми) животными рис 3 и составляет $5,0,2$ нмоль/г ткани у контрольных крыс и $1,0,1$ нмоль/г ткани при диабете.

Таблица 1

Изменение ряда биохимических показателей крови и мочи у диабетических крыс, по сравнению с контрольными (здоровыми животными) (1-я серия эксперимента)

группа животных	Исследуемые показатели				
	n	глюкоза крови (ммоль/л)	глюкоза мочи (%)	кетонотелы мочи (ммоль/л)	вес тела
контрольные (здоровые крысы)	5	$6 \pm 0,5$	$0,08 \pm 0,02$	0	236 ± 23
диабетические (стрептозотоциновые) крысы на 5-6-е сутки после введения стрептозоцина	5	20 ± 1	$2,2 \pm 0,2$	$9 \pm 1,6$	208 ± 13

Как уже отмечалось, во второй серии опытов учатывало три группы диабетических крыс. Одна из них была контрольной (диабетические крысы без дачи инулина), второй группе диабетических крыс давали вместо питьевой воды 0,5% раствор инулина в течение 5-6 дней, а третья группа животных пила 0,5% раствор инулина в течение 12-13 дней. В каждой группе было по 5-6 крыс; исследовали уровень глюкозы в крови и моче, фруктозы в крови и уровень Ф-2,6-Р₂ в ткани печени рис 3 табл 2.

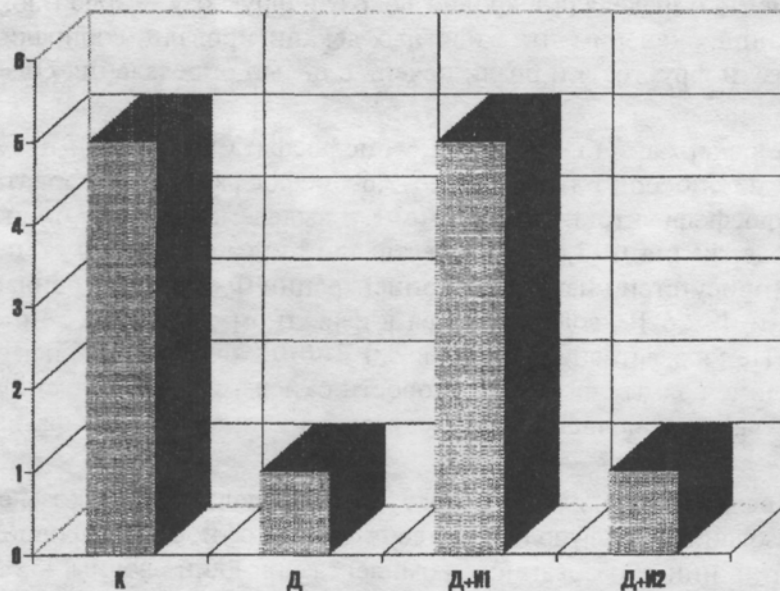


Рис 3. Содержание фруктозо-2,6-бисфосфата в ткани печени крыс (в условиях эксперимента).

К — контрольные (здоровые крысы); Д — диабетические крысы; Д+И₁ — диабетические крысы, которые в течение 5-6 дней вместо питьевой воды получали 0,5% раствор инулина; Д+И₂ — диабетические крысы, которые получали в течение 12-13 дней эксперимента вместо питьевой воды 0,5% раствор инулина. По оси ординат содержание Ф-2,6-Р₂ в нмоль/г ткани.

Таблица 2

Изменение некоторых биохимических показателей в крови и моче у диабетических крыс, принимавших с питьевой водой инулин

группа животных	дни исследования	исследуемые показатели			
		глюкоза крови (ммоль/л)	глюкоза мочи (%)	кетоновые тела (ммоль/л)	фруктоза крови (ммоль/л)
Диабетические крысы, которым в течении 5-6 дней вместо питьевой воды давали 0,5% р-р инулина	3-й день	14±0,2	0,5±0,1	3,2±0,6	
	5-й день	7±0,7	0,1±0,02	0	0,9±0,1
Диабетические крысы, которым в течении 12-13 дней вместо питьевой воды давали 0,5% р-р инулина	7-й день	7±0,6	0,1±0,03	0	
	12-13-й день	22,6±1	2,1±0,1	8,5±1	1,5±0,3
Диабетические крысы, которые пили обычную питьевую воду (контрольная группа)	11-13-й день	22,6±1,8	2	8-10	0,3±0,1

Наши исследования показали табл 2, что у диабетических крыс, которым давали вместо питьевой воды 0,5% раствор инулина, на 5-6-й день эксперимента уровень глюкозы в крови практически нормализовался, исчезали кетоновые тела в моче. У тех же крыс, которые продолжали пить 0,5% раствор инулина, содержание глюкозы в крови и моче вновь повысился и на 12-13-й день достигли значений, характерных для диабетических крыс, которые в данной серии опытов служили контролем (т.е. пили обычную воду).

Исследования содержания Φ -2,6- P_2 в ткани печени крыс позволили выявить следующий факт рис 3. У диабетических крыс, которые пили 0,5% раствор инулина, на 5-6-й день эксперимента содержание Φ -2,6- P_2 в ткани печени повышалось и достигало значений, которые мы обычно определяли у здоровых (нормальных) крыс. Если же продолжать давать диабетическим крысам 0,5% раствор инулина, то на 12-13-й день у них уровень Φ -2,6- P_2 в ткани печени вновь снижался (почти в пять раз), т.е. был примерно тем же, что и у диабетических крыс, которые пили только обычную питьевую воду.

Итак, существует определенная закономерность: при повышении содержания Φ -2,6- P_2 в ткани печени уровень глюкозы в крови и моче постепенно снижается, приобретая нормальные значения (на 5-6-й день эксперимента). Если же продолжить эксперимент (прием вместо питьевой воды 0,5% раствор инулина), то уровень глюкозы в крови и моче животных повышается, а содержание Φ -2,6- P_2 в печени резко снижается.

Четко объяснить причины изменения уровня Φ -2,6- P_2 в ткани печени диабетических крыс в ходе нашего эксперимента пока довольно сложно, потребуются дополнительные исследования. При даче диабетическим (стрептозотоциновым) крысам 0,5% раствора инулина содержание фруктозы в крови и ткани печени повышается. В первые дни эксперимента в печени усиленно идет синтез фруктозо-6-фосфата, который вместе с АТФ являются субстратами фосфофруктокиназы-2, т.е. в этом случае имеет место субстратная активация фермента (повышается киназная активность бифункционально фермента). Уровень Φ -2,6- P_2 в печени растет, а следовательно,

усиливается гликолиз и тормозится глюконеогенез. В результате содержание глюкозы в крови и моче экспериментальных животных снижается. При более длительном приеме крысами 0,5% раствора инулина (фактически фруктозы), наступает усиленный расход АТФ, его уже как бы не хватает для образования фруктозо-6-фосфата и Ф-2,6-Р₂ (сходные данные были получены [3] в опытах на суспензии гепатоцитов, выделенных из печени сытых крыс). В этот период, по-видимому, усиленно идет распад фруктозы по гликолитическому пути, накапливается лактат, что изменяет рН среды. Кроме того, в этих условиях возможно повышение в гепатоцитах концентрации глицерол-3-фосфата, последний же является активатором фруктозо-2,6-бисфосфата, что может приводить к снижению Ф-2,6-Р₂ в ткани печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетков Н.К., Бочков А.Ф., Дмитриев Б.А., Усов А.Н., Чижов О.С., Шибает В.Н.//Химия углеводов. -М., 1967.
2. Городецкий В.К.//Инулин, БМЭ, т.9, 1978
3. Van den Berghe G.//Progr.In Bioch.Pharm. -1986.-V.21. -P.1-32
4. Марри Р., Греннер Д., Мейес П.И., Родуэлл В.//Биохимия человека. Изд. Мир, -М.1993
5. Van Schaftingen E., Hue L., Hers H.J.//Biochem.J. -1980. -V.192. -P.897-901
6. Claus T.H., El-Maghraby M.R., Ryen D.M. et al.//Curr.Fop.Cell.Reg. -1984. -V.2. -P.57-86
7. Rossen J.H., Hue L.//Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology -1993. -V.45. -P.99-127
8. Richards C.S., Yokoyama M., Furuya E., Uyeda K.//Biochem. Biophys. Res. Commun. -1982. -V.104. -P.1073-1079
9. El-Maghraby M.R., Claus T.H., Pilkis J., Fox E., Pilkis S.J.//Biol. Chem. -1982. -V.257. -P.7603-7607
10. Pilkis J., Claus T.H., El-Maghraby//Adv. Secjnd Messenger Phosphoprotein Res. -1988. -V.22. -P.175-191
11. Pilkis J., El-Maghraby, Claus T.H.//Diabetes Care. -1990. -V.13. -P.589-599
12. Беляева Н.Ф., Голубев М.А., Маркова М.С., Стволинская Н.С., Коровкин Б.Ф.//4-й научный съезд специалистов по клинической лабораторной диагностике респ. Беларусь. Тез. докл., Гродно — 1992. -с. 206-209
13. Голубев М.А., Маркова М.С.//Клин. лаб. диагностика. -1993. - N 1. -стр. 27-29
14. Голубев М.А., Маркова М.С., Стволинская Н.С.//Клин. лаб. диагностика. -1993. - N 6. - с. 13-15
15. Golubev M.A., Stvolinskaya N.S., Markova M.S., Beltaeva N.F., Balabolkin M.J., Korovkin B.F.//in: Pathobiochemical aspekts of extreme states. Mir Publisher, M. -1994. -P.68-77
16. Коровкин Б.Ф., Беляева Н.Ф., Голубев М.А., Викторова Л.Н., Городецкий В.К., Маркова М.С., Саянин А.В., Стволинская Н.С.//Клин. лаб. диагностика. -1994. -N 2. -стр. 21-23
17. Маркова М.С., Голубев М.А., Городецкий В.К., Беляева Н.Ф., Викторова Л.Н., Коровкин Б.Ф.//Вопросы мед. Химии. -1996. -N 3. -стр. 223-227
18. Van Schaftingen E., Lederer B., Bartrons R., Hers H.J.//Eur.J.Biochem. -1982. -V.129. -P.191-195
19. Bradford M.M.//Anal.Biochem. -1976. -V.72. -P.248-254
20. Городецкий В.К., Михайлов В.И.//Соврем. методы в биохимии. М. -1977. -с. 120-126

THE INFLUENCE OF ORAL INULIN ADMINISTRATION ON FRUCTOSE-2,6-DIPHOSPHATE LEVEL IN LIVER OF RATS WITH STREPTOZOTOCIN DIABETES

D.A. Guseva, V.K. Gorodetsky, S.A. Kraevoi, M.S. Markova*, T.B. Tsyganova*

*Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya str.,
10, fax: (095)245-0857
Moscow State Institute of Food Industry

The influence of oral inulin administration on glucose and fructose content in blood, glucose and ketone bodies in urine, and fructose-2,6-diphosphate content in liver was investigated in rats with streptozotocin diabetes. Short-term administration (during 5-6 days) of 0,5% inulin solution caused three-fold increase of blood fructose compared with control, normalisation of blood glucose and disappearance of glucose- and ketoneuria. The level of fructose-2,6-di-phosphate in liver increased to the control level. Inulin administration during 12 days caused five-fold increase of blood fructose compares with control, glucose level increased up to the level of uncured diabetes (22 mmol/l), glucose- and ketoneuria appeared. The content of fructose-2,6-diphosphate in the liver decreased to diabetic level.

Key words: inulin, fructoso-2,6-bisphosphat, streptozotocin diabetes.