

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.06.096>

УДК 616.379-008.64-002:577.2

**Л.К. Соколова, В.М. Пушкарев,
Ю.Б. Бельчина, В.В. Пушкарев, Н.Д. Тронько**

ГУ “Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комисаренко НАМН Украины”, Киев

E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

Активность аденозинмонофосфатактивированной протеинкиназы в лимфоцитах при действии сахароснижающих препаратов

Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Н.Д. Тронько

Изучали активность аденозинмонофосфатактивируемой протеинкиназы (АМРК), контролирующей энергетический баланс клетки, при лечении больных диабетом сахароснижающими препаратами. Впервые показано, что метформин повышает активность АМРК в лимфоцитах. Дапаглифлозин — ингибитор натрийзависимого переносчика глюкозы, также повышает активность протеинкиназы в клетках крови и оказывает аддитивный эффект в отношении метформина. Обсуждаются механизмы воздействия сахароснижающих препаратов на уровень активности АМРК в клетках крови.

Ключевые слова: АМР-активируемая протеинкиназа, диабет, метформин, дапаглифлозин.

АМР-активируемая протеинкиназа (АМРК) — киназа, контролирующая энергетический баланс клетки. При диабете 2-го типа (СД2) и ожирении активность ее снижается, а активность протеинкиназ mTORC1/p70S6K возрастает, что ведет к фосфорилированию IRS и инсулинорезистентности [1]. Действие сахароснижающих препаратов, таких как метформин (МФ), связано с активацией АМРК, а дапаглифлозина — с ингибированием натрийзависимого переносчика глюкозы 2-го типа, ответственного за реабсорбцию глюкозы в проксимальных канальцах почки [2].

АМРК — гетеротример, состоящий из каталитической субъединицы (α) и двух регуляторных субъединиц (β и γ). γ -субъединица содержит четыре потенциальных сайта, связывающих адениновые нуклеотиды [3, 4]. При энергетическом стрессе в клетке и повышении концентрации АМР АТР замещается в обменяемых центрах на АМР, в результате чего происходит аллостерическая активация АМРК путем фосфорилирования 172 треонина α -субъединицы комплексом LKB1 в ответ на изменение энергетики клетки, или САМКК β , которая активируется внутриклеточным Ca^{2+} [5].

Непосредственным фосфорилированием метаболических ферментов и факторов транскрипции АМРК стимулирует катаболические процессы — поглощение глюкозы, жирных кис-

© Л.К. Соколова, В.М. Пушкарев, Ю.Б. Бельчина, В.В. Пушкарев, Н.Д. Тронько, 2017

лот и их превращение путем митохондриального окисления и гликолиза. Кроме того, АМРК подавляет анаболические процессы – синтез глюкозы, гликогена и липидов в печени [6].

МФ (гидрохлорид 1,1-диметилбигуанида) – основной пероральный препарат, который используется в клинике для лечения пациентов с СД2. МФ снижает гипергликемию в основном за счет подавления печеночного глюконеогенеза наряду с усилением трансдукции сигналов инсулина. Тем не менее механизм его действия остается недостаточно изученным, особенно в отношении участия АМРК в эффектах МФ [7].

Исследование проводилось на базе отдела диабетологии Института. Все пациенты подписывали информированное согласие на использование биоматериалов для проведения дальнейших научных исследований. Сразу же после забора кровь центрифугировали, используя Histopaque 1077 (“Sigma”, США), полученные лимфоциты промывали и замораживали при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до использования. Клетки лизировали в буфере для экстракции с ингибиторами протеаз и фосфатаз. Для определения количества фосфо-АМРК использовали наборы для иммуноферментного анализа ab154468 (“Abcam”, Великобритания). Исследования проводились в триплетах. Концентрацию белка в лизате определяли с помощью наборов (BCA protein assay kit) фирмы “Novagen” (США). Измерения проводили на микропланшетном ридере фирмы “Bio-tek Instruments” (США) при длине волны 600 нм.

Результаты экспериментов представляли как $M \pm m, n = 2-7$. Для сравнения двух групп данных использовали *t*-критерий Стьюдента.

Для построения калибровочной кривой использовали культуру клеток почки эмбриона человека НЕК293Т, которые являются рекомендованным фирмой-изготовителем набора позитивным контролем для определения активности АМРК. Из рис. 1 видно небольшое расхождение расчетной и калибровочной кривых, начиная с ОП₆₀₀ – 0,2. Однако полученные нами значения ОП (0,02–0,08) расположены в области кривой, практически идеально совпадающей с теоретическими кривыми (кривая Больцмана), что свидетельствует об отсутствии разброса данных.

Активность АМРК определяется по количеству фосфорилированной по 172 треонину α -субъединицы белка. Из рис. 2 видно, что в контрольных образцах уровень активной АМРК составляет примерно 0,02 мкг/мг белка. Примерно такой же уровень наблюдается у больных СД1 с инсулинотерапией (2). Количество фосфорилированной АМРК у больных СД2 до лечения (7) – ниже контрольного. Согласно полученным результатам, оригинальный МФ и генерический МФ повышают активность АМРК в клетках крови более чем в 3 и 1,5 раза соответственно (3 и 5), что может свидетельствовать о преимуществах оригинального препарата.

Наиболее интересные данные получены при использовании дапаглифлозина – мощного (константа ингибирования 0,55 нМ), селективного, обратимого ингибитора натрий-глюкозного котранспортера 2-го типа. Дапаглифлозин сам по себе повышает активность АМРК (8) и, кроме того, оказывает аддитивный эффект при действии генерического МФ (6), чего не наблюдалось в отношении оригинального препарата МФ (4). Вероятно, значения 0,06–0,08 мкг/мг фосфорилированного белка являются насыщающей, предельной концентрацией и предельной степенью активации АМРК в мононуклеарах крови.

Сейчас известно, что действие МФ в основном связано с подавлением образования глюкозы в печени посредством активации пути ЛКВ-АМРК [8]. Поэтому данные о повышении активности фермента в клетках крови представляют существенный интерес. С одной сто-

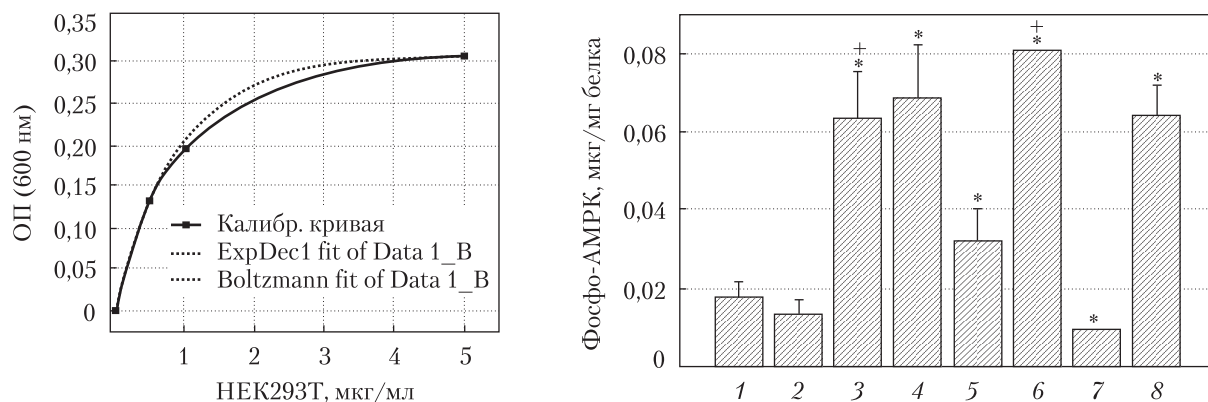


Рис. 1. Калибровочная кривая. По оси ординат – оптическая плотность при 600 нм; по оси абсцисс – содержание фосфо-АМРК (фосфо-треонин 172) в клетках НЕК293Т

Рис. 2. Активность АМРК у больных сахарным диабетом до лечения и после приёма сахароснижающих препаратов. Группы: 1 – контрольная, лица, не болеющие СД, репрезентативные по возрасту; 2 – пациенты с СД 1-го типа, находящиеся на инсулинотерапии; 3 – пациенты с СД 2-го типа, получающие в качестве монотерапии оригинальный метформин в дозе 1000 мг 2 раза в день; 4 – пациенты с СД2, находящиеся на комбинированной терапии (оригинальный метформин и дапаглифлозин); 5 – пациенты с СД2, получающие в качестве сахароснижающей терапии генерический метформин в дозе 1000 мг два раза в день; 6 – пациенты с СД2, находящиеся на комбинированной терапии (генерический метформин и дапаглифлозин); 7 – пациенты с СД2 до начала сахароснижающей терапии; 8 – пациенты с СД2, получающие в качестве монотерапии дапаглифлозин в суточной дозе 10 мг. $M \pm m$, $n = 2-7$; * – отличия от контроля (1) достоверны, $P < 0,05$; + – отличия от действия генерического метформина (5) достоверны, $P < 0,05$

роны, это свидетельствует о возможном универсальном действии бигуанидов на все ткани организма, в том числе и на макрофаги, воспалительный процесс в которых, вследствие ожирения, играет важную роль в усилении инсулинорезистентности. С другой – позволяет достаточно легко и быстро оценить лечебный эффект применяемых препаратов, что важно для прогностических целей.

Поскольку дапаглифлозин применяется относительно недавно, молекулярные механизмы его действия на ткани организма, помимо почек, изучены недостаточно. В эпителии почек он ингибирует экспрессию проапоптотического белка Вах, ингибируя таким образом апоптоз, и усиливает экспрессию фактора гипоксии HIF1 [9]. *In vitro* дапаглифлозин дозозависимо увеличивал экспрессию HIF1, АМРК и ERK и повышал выживаемость клеток линии НК2 (human kidney-2) – иммортализованных гипоксических эпителиальных клеток проксимальных канальцев почки взрослого человека [9]. Увеличение экспрессии HIF1, АМРК, потребления АТФ и подавление апоптоза в эпителиальных клетках может свидетельствовать о дополнительных положительных эффектах дапаглифлозина при сердечно-сосудистых болезнях [10].

На основании результатов исследования можно сделать следующие выводы. Повышение активности АМРК в клетках крови свидетельствует о возможном универсальном действии бигуанидов на все ткани организма. Дапаглифлозин повышает активность АМРК в мононуклеарах. Дапаглифлозин усиливает эффект метформина в отношении активности АМРК в клетках крови. Активность АМРК в клетках крови может служить одним из показателей эффективности действия сахароснижающих препаратов.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Saha A.K., Xu X.J., Balon T.W. et al. Insulin resistance due to nutrient excess. Is it a consequence of AMPK downregulation? *Cell Cycle*. 2011. **10**, № 20. P. 3447–3451.
2. Filippatos T.D., Liberopoulos E.N., Elisaf M.S. Dapagliflozin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* 2015. **6**, № 1. P. 29–41.
3. Ruderman N.B., Carling D., Prentki M., Cacicedo J.M. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 2013. **123**, № 7. P. 2764–2772.
4. Xiao B., Sanders M.J., Underwood E. et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*. 2011. **472**, № 7342. P. 230–233.
5. Racioppi L., Means A.R. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology. *J. Biol. Chem.* 2012. **287**, № 38. P. 31658–31665.
6. Jeong K.J., Kim G.W., Chung S.H. AMP-activated protein kinase: An emerging target for ginseng. *J. Ginseng Res.* 2014. **38**. P. 83–88.
7. An H., He L. Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes. *J. Endocrinol.* 2016. **228**, № 3. P. R97–R106.
8. Meng S., Cao J., He Q. et al. Metformin activates AMP-activated protein kinase by promoting formation of the $\alpha\beta\gamma$ heterotrimeric complex. *J. Biol. Chem.* 2015. **290**. P. 3793–3802.
9. Chang Y.K., Choi H., Jeong J.Y. et al. Dapagliflozin, SGLT2 inhibitor, attenuates renal ischemia-reperfusion injury. *PLoS One*. 2016. **11**, № 7. e0158810.
10. Zinman B., Wanner C., Lachin J.M. et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *New Engl. J. Med.* 2015. **373**, № 22. P. 2117–2128.

Поступило в редакцию 17.01.2017

REFERENCES

1. Saha, A.K., Xu, X.J., Balon, T.W. et al. (2011). Insulin resistance due to nutrient excess. Is it a consequence of AMPK downregulation? *Cell Cycle*, **10**, No. 20, pp. 3447-3451.
2. Filippatos, T.D., Liberopoulos, E.N. & Elisaf, M.S. (2015). Dapagliflozin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.*, **6**, No. 1, pp. 29-41.
3. Ruderman, N.B., Carling, D., Prentki, M. & Cacicedo, J.M. (2013). AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.*, **123**, No. 7, pp. 2764-2772.
4. Xiao, B., Sanders, M.J., Underwood, E. et al. (2011). Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*, **472**, No. 7342, pp. 230-233.
5. Racioppi, L. & Means, A.R. (2012). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology. *J. Biol. Chem.*, **287**, No. 38, pp. 31658-31665.
6. Jeong, K.J., Kim, G.W. & Chung, S.H. (2014). AMP-activated protein kinase: An emerging target for ginseng. *J. Ginseng Res.*, **38**, pp. 83-88.
7. An, H. & He, L. (2016). Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes. *J. Endocrinol.*, **228**, No. 3, pp. R97-R106.
8. Meng, S., Cao, J., He, Q. et al. (2015). Metformin activates AMP-activated protein kinase by promoting formation of the $\alpha\beta\gamma$ heterotrimeric complex. *J. Biol. Chem.*, **290**, pp. 3793-3802.
9. Chang, Y.K., Choi, H., Jeong, J.Y. et al. (2016). Dapagliflozin, SGLT2 inhibitor, attenuates renal ischemia-reperfusion injury. *PLoS One*, **11**, No. 7, e0158810.
10. Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J.M. et al. (2015). Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *New Engl. J. Med.*, **373**, No. 22, pp. 2117-2128.

Received 17.01.2017

Л.К. Соколова, В.М. Пушкарьов, Ю.Б. Бєльчина, В.В. Пушкарьов, М.Д. Тронько

ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України”, Київ

E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

АКТИВНІСТЬ

АДЕНОЗИНМОНОФОСФАТАКТИВОВАНОЇ ПРОТЕЇНКІНАЗИ

В ЛІМФОЦИТАХ ПІД ДІЄЮ ЦУКРОЗНИЖУВАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ

Вивчали активність аденозинмонофосфатактивованої протеїнкінази (АМПК), що контролює енергетичний баланс клітини, під час лікування хворих на діабет цукрознижувальними препаратами. Вперше показано, що метформін підвищує активність АМПК в лімфоцитах. Дапагліфлозин – інгібітор натрієзалежного переносника глюкози, також підвищує активність протеїнкінази в клітинах крові і виявляє адитивний ефект щодо метформіну. Обговорюються механізми впливу цукрознижувальних препаратів на рівень активності АМПК.

Ключові слова: АМР-активована протеїнкіназа, діабет, метформін, дапагліфлозин.

L.K. Sokolova, V.M. Pushkarev, Yu.B. Belchina, V.V. Pushkarev, N.D. Tronko

V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the NAMS of Ukraine, Kiev

E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

THE ACTIVITY OF ADENOSINE MONOPHOSPHATE-ACTIVATED

PROTEIN KINASE IN LYMPHOCYTES UNDER

THE ACTION OF HYPOGLYCEMIC DRUGS

We have studied the activity of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), which controls the energy balance in a cell, after the treatment of patients with diabetes with hypoglycemic agents. It is shown for the first time that metformin increases the AMPK activity in lymphocytes. Dapagliflozin, an inhibitor of sodium-dependent glucose transporter, also increases the protein kinase activity in blood cells and exerts an additive effect to metformin. The mechanisms of impact of the antidiabetic drugs on the level of AMPK activity are discussed.

Keywords: AMPK, diabetes, metformin, dapagliflozin.