

АКТИВНОСТЬ АМР — АКТИВИРОВАННОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ В ЛИМФОЦИТАХ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ПРИ ДЕЙСТВИИ САХАРОСНИЖАЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ. ЭФФЕКТ МЕТФОРМИНА*

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

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комисаренко НАМН Украины», г. Киев
pushkarev.v.m@gmail.com

Высокая распространённость сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) в мире заставила говорить об «эпидемии ССЗ» во второй половине XX столетия, причём ситуация существенно не изменилась и в XXI веке. ССЗ, более чем две трети которых составляют ишемическая болезнь сердца (ИБС), инсульт и заболевания периферических артерий, связанные с атеросклерозом, остаются ведущей причиной смерти в мире, обуславливая почти треть общей смертности. Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), от ССЗ ежегодно умирает более 16 млн человек. Распространённость ССЗ увеличивается в связи со старением населения, изменением образа жизни. Такие случаи всё чаще регистрируют в развивающихся странах. Ожидают, что к 2020 г. от ССЗ в мире будет умирать приблизительно 25 млн человек в год, причём

в половине случаев — от ИБС. К сожалению, постсоветские страны занимают первые места по смертности от ССЗ. В западноевропейских странах, напротив, прослеживается четкая тенденция к снижению смертности от ССЗ благодаря внедрению стандартов лечения и проведению государственных программ по профилактике сердечно-сосудистой патологии.

В последние десятилетия цивилизации угрожает другой бич, принимающий все более «эпидемические» очертания — это сахарный диабет (СД). К числу наиболее распространенных заболеваний относится СД 2 типа, который характеризуется неуклонным ростом. Прогнозируемое количество больных к 2040 году будет составлять около 642 млн человек [1]. Высокий риск сосудистых осложнений на фоне СД дал основание Американской кардиологической ассо-

*Работа выполнена в соответствии с плановой НИР отдела диабетологии ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комисаренко НАМН Украины» «Вивчення основних шляхів прогресування судинної патології у хворих на цукровий діабет 1 та 2 типу з метою удосконалення сучасних методів профілактики та лікування».

Учреждением, финансирующим исследование, является НАМН Украины.

Авторы гарантируют ответственность за объективность представленной информации.

Авторы гарантируют отсутствие конфликта интересов и собственной финансовой заинтересованности.

Рукопись поступила в редакцию 21.09.2016.

циации причислить это заболевание к сердечно-сосудистым. Установлено, что 6–7 пациентов из 10 с СД погибают от сердечно-сосудистой патологии, что в 2–4 раза выше, чем в общей популяции.

Объединяющим фактором, способствующим прогрессированию «эволюционных» болезней, таких как ССЗ, диабет и рак, является низкоуровневое хроническое воспаление. Также известно, что в основе прогрессирования микро- и макрососудистых осложнений СД, в том числе и сердечно-сосудистой патологии, также лежит хронический воспалительный процесс низкой интенсивности. Воспаление играет ведущую роль на всех этапах атеросклеротического процесса, вызывая появление начальных изменений, сопровождая прогрессирование и способствуя развитию острых сердечно-сосудистых катастроф. При активации воспаления усиливается протеолитическая активность макрофагов, что приводит к коллагенолизу фиброзной покрышки атеросклеротической бляшки, защищающей кровь от высокотромбогенных субстанций липидного ядра. Нарушение целостности фиброзной покрышки — это самая частая причина развития острого коронарного синдрома (ОКС). Именно воспаление и является той неспецифической, но стереотипной и универсальной реакцией эндотелия на повреждение, вызываемое разнообразными повреждающими воздействиями — факторами риска.

Процесс воспаления. Острое воспаление является реакцией организма на инфекцию или повреждение тканей и требует как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа. Оно состоит из провоспалительной фазы, фазы адаптации и фазы завершения воспаления [2, 3]. Незавершенное, хроническое воспаление является основной причиной патогенеза таких заболеваний как СД и рак. В воспалительном процессе участвуют тучные клетки, моноциты/макрофаги, эозинофилы, нейтрофилы, дендритные клетки (DC), В- и Т-лимфоциты [3, 4]. Ключевым событием при воспалении является мобилизация нейтрофилов, миграция и активация которых направляется хемоаттрактантами. Макрофаги, тучные клетки и лейкоциты контроли-

руют активацию нейтрофилов с помощью секреции цитокинов, хемокинов и лейкотриена B_4 (LTB_4) [4]. Признаком тяжелого воспалительного процесса является инфильтрация макрофагов. Функция последних связана с секрецией провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-12, TNF), хемокинов, оксида азота (NO) и экспрессией iNOS, которые контролируются NF- κ B [5, 6]. Важным фактором в процессе воспаления является хемокин MCP-1/CCL2, который продуцируют фибробласты, клетки эндотелия и макрофаги. Этот белок участвует в мобилизации и активации Т-лимфоцитов, тучных клеток и базофилов. MCP-1 и другие хемокины, такие как RANTES/CCL5 и воспалительный белок макрофагов MIP-1 α /CCL3, играют центральную роль в процессах воспаления [7]. С воспалением связано и усиление экспрессии гена COX-2 [8, 9], которая обеспечивает синтез простагландина PGE2 — модулятора воспаления [8, 10]. Другими медиаторами воспаления являются лейкотриены, которые производятся 5-липоксигеназным комплексом [11]. Участие NF- κ B в транскрипции провоспалительных генов, таких как IL-1, IL-8, COX-2, iNOS, нескольких хемокинов и MCP-1, соответствует важной роли этого фактора в регулировании воспалительной реакции.

Для завершения воспалительного процесса существуют специальные механизмы, в которые часто вовлечены факторы, формирующие воспаление. Так, COX-2, которая выполняет провоспалительные функции, связанные с образованием простагландина PGE2, характеризуется и противовоспалительным действием из-за образования простагландина 15d-PGJ2 — лиганда ядерных рецепторов PPAR γ [12] и одного из важнейших противовоспалительных факторов. Макрофаги также способствуют свертыванию воспаления, вырабатывая ингибитор рецептора IL-1, ростовые факторы TGF β , VEGF, IGF-1, и секретируя противовоспалительные цитокины IL-10 и IL-4 [9]. Противовоспалительными медиаторами являются глюкокортикоиды, которые подавляют NF- κ B и индуцируют экспрессию аннексина-1 и липокортина-1, тормозящих

образование PGE₂, и липоксина, подавляющих хемотаксис нейтрофилов, эозинофилов и способствующих утилизации макрофагами мертвых клеток [2]. Участвует в торможении воспаления и NO, благодаря подавлению продукции цитокинов [4].

АМРК. Метавоспаление, среда хронического воспалительного процесса низкой интенсивности в метаболических тканях, является важным фактором, лежащим в основе развития резистентности к инсулину (ИР), СД2, кардиоваскулярной патологии. Макрофаги являются основным источником воспалительных эффекторов, способствующих ИР, предшествующей СД2 [13]. Окислительный метаболизм определяет воспалительный статус макрофагов и процессы, которые могут происходить перед ER-стрессом и образованием NLRP3-инфламмасом. *Adenosine monophosphate-activated protein kinase* — аденозин-монофосфат активная протеинкиназа (АМРК) находится на перекрестке метаболически-обусловленного воспаления макрофагов, контролирует метаболизм митохондрий и, следовательно, может определять воспалительный статус макрофагов. ER-стресс и активация инфламмасом вызываются aberrантной аккумуляцией внутриклеточных липидов и митохондриальных ROS. АМРК, с учетом ее центральной роли в контроле энергии клетки, имеет жизненно важное значение для регулирования митохондриального окислительного фосфорилирования [14]. Уменьшение энергетического заряда или увеличение концентрации кальция в клетке активируют АМРК, которая затем фосфорилирует многочисленные метаболические ферменты, способствующие генерации АТФ. В долгосрочной перспективе, активация АМРК усиливает эти эффекты с помощью фосфорилирования транскрипционных факторов и коактиваторов, которые регулируют экспрессию генов [14]. Учитывая ее важную роль в качестве поставщика энергии и варьирование энергетических потребностей макрофагов, неудивительно, что АМРК является существенным фактором управления воспалительным процессом [15]. Доказательства того, что АМРК может выступать в качестве ключевого регулятора метаболических

путей, контролирующих воспаление, быстро накапливаются в последнее десятилетие. Активность АМРК снижается при действии TNF α , эффект которого опосредуется усиленной экспрессией PP2C α — главной фосфатазы, подавляющей активность АМРК. Также активность АМРК в макрофагах снижают липополисахариды (LPS). Снижение активности АМРК является переключателем от метаболизма жирных кислот к аэробному гликолизу, индукция которого в макрофагах создает условия для биосинтеза пуринов, фосфолипидов мембран и продукции IL-1 β . О важной роли АМРК в регулировании воспаления свидетельствует тот факт, что макрофаги мышей с ожирением характеризуются пониженной активностью АМРК и более высокими уровнями воспаления [15]. Активность АМРК в подкожной и висцеральной жировой ткани людей с ожирением также заметно снижается. Эти исследования показывают взаимосвязь между активностью АМРК, воспалительными процессами в макрофагах и энергетическим метаболизмом. Следовательно, снижение активности АМРК связано с воспалением при метаболических заболеваниях, СД 2 типа, сердечно-сосудистой патологии, а активация АМРК, напротив, ассоциируется с противовоспалительными эффектами.

АМР-активированная протеинкиназа (АМРК) — протеинкиназа, контролирующая энергетический баланс клетки. При СД 2 типа и ожирении активность ее снижается, а активность протеинкиназ mTORC1/p70S6K возрастает, что ведет к фосфорилированию IRS и ИР [16]. АМРК — гетеротример, состоящий из каталитической субъединицы (α) и 2-х регуляторных субъединиц (β и γ). γ -субъединица содержит 4 потенциальных сайта связывающих адениновые нуклеотиды [17, 18]. При энергетическом стрессе в клетке и повышении концентрации АМР происходит замена АТФ на АМР в обмениваемых центрах, в результате чего происходит аллостерическая активация АМРК путем фосфорилирования 172 треонина α -субъединицы — комплексом LKB1 в ответ на изменение энергетики клетки, или SAMKK β , которая

активируется увеличением внутриклеточного Ca^{2+} [19].

Непосредственным фосфорилированием метаболических ферментов и факторов транскрипции, АМРК включает катаболические процессы — поглощение глюкозы и жирных кислот и их превращение путем митохондриального окисления и гликолиза. Кроме того, АМРК выключает анаболические процессы — синтез глюкозы, гликогена и липидов в печени [20].

Метформин (гидрохлорид 1,1-диметилбигуанида) — основной пероральный препарат, который используется в клинике для лечения пациентов с СД2 более 60 лет. Метформин 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 метформина [21].

Целью нашего исследования было изучить активность АМРК в лимфоцитах больных сахарным диабетом при действии различных сахароснижающих терапевтических препаратов. В данной статье представлены результаты, полученные при изучении влияния генерического препарата метформина — (Мефармил, таблетки покрытые пленочной оболочкой (производства ПАО «Киевмед-препарат», Корпорация (Артериум)).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе отдела диабетологии ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комисаренко НАМН Украины». Все пациенты подписывали информированное согласие на проведение дальнейших современных методов диагностики и исследования. Больные были разделены на 3 группы — пациенты, страдающие СД 1 типа, находящиеся на инсулинотерапии, пациенты с СД 2 типа до начала сахароснижающей терапии и пациенты с СД 2 типа, получающие в качестве сахароснижающей терапии мефармил в дозе 1000 мг 2 раза в день. Группу контроля составили лица, не болеющие СД, репрезентативные по возрасту. Сразу же после забора биообразцов кровь центрифугировали используя Histopaque 1077 (Sigma, США),

полученные лимфоциты промывали и замораживали при -80°C до использования. Клетки лизировали в буфере для экстракции с ингибиторами протеаз и фосфатаз. Для определения количества фосфо-АМРК (фосфо-треонин 172) использовали наборы для иммуно-ферментного анализа ab154468 фирмы 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 450 нм.

Результаты экспериментов представляли как $M \pm m$. Для сравнения двух групп данных использовали t -критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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 рас-

четных и калибровочных кривых, начиная с ОП600 — 0,2. Однако полученные нами значения ОП (0,09–0,2) расположены в области кривой практически идеально совпадающей с теоретическими кривыми (кривая Больцмана), что свидетельствует об отсутствии разброса данных.

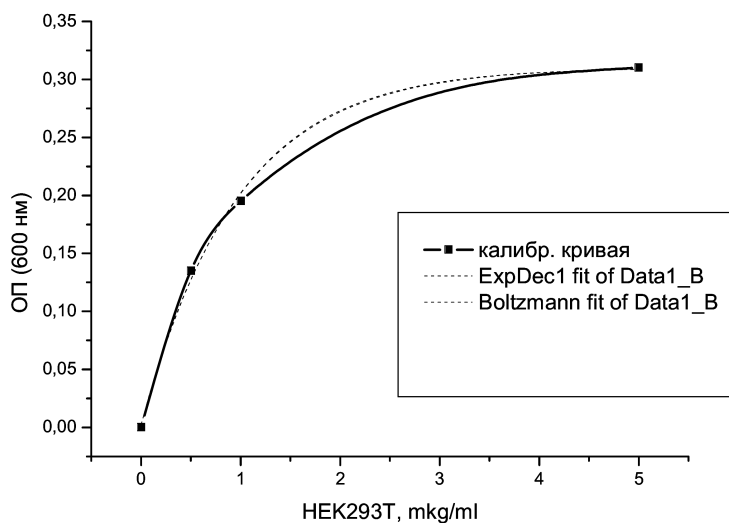


Рис. 1. Калибровочная кривая.

Ордината — оптическая плотность при 600 нм;
абсцисса — содержание фосфо-АМРК (Thr172) в клетках HEK293T.

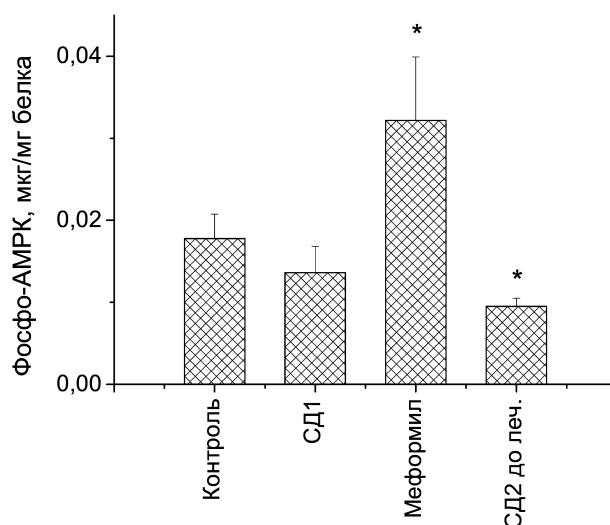


Рис. 2. Активность АМРК у больных сахарным диабетом 1 и 2 типов до лечения и после приёма Метфармила.

П р и м е ч а н и е. * — отличия от контроля достоверны, $p < 0,05$.

Активность АМРК определяется по количеству фосфорилированной по 172 треонину α -субъединицы белка. Из рис. 2 видно, что в контрольных образцах уровень активности АМРК составляет примерно до 0,02 мкг/мг белка. Примерно такой же уровень наблюдается у больных СД1, находящихся на инсулинотерапии. Обращает на себя внимание, что количество фосфорилированной АМРК у больных СД2 до лечения — ниже контрольного. Метформин достоверно повышает активность АМРК в клетках кро-

ви более чем в 1,5 раза, по сравнению с показателем активности АМРК в клетках крови у лиц контрольной группы, и более чем в 3 раза у больных СД, ранее не получавших метформин.

Сейчас известно, что действие метформина в основном связано с подавлением образования глюкозы в печени посредством активации пути ЛКВ-АМРК [22]. Поэтому данные о повышении активности фермента в клетках крови представляют существенный интерес. С одной стороны, это свиде-

тельствует 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 ИР. С другой — позволяет достаточно легко и быстро оценить лечебный эффект применяемых препаратов, что важно для прогностических целей.

В настоящее время метформин одобрен только для лечения СД 2 типа, однако результаты многочисленных исследований,

проведенных за последние годы, указывают на огромный терапевтический потенциал этого препарата при других заболеваниях. В статье приведен один из механизмов действия метформина, который может объяснять эти благоприятные эффекты; в то же время много вопросов остается нерешенными. Очевидно, что лучшее понимание молекулярных путей, задействованных в реализации эффектов метформина, расширит терапевтические возможности применения этого препарата.

ВЫВОДЫ

1. Повышение активности АМРК в клетках крови свидетельствует о возможном универсальном действии бигуанидов на все ткани организма.
2. Активность АМРК в клетках крови может служить показателем эффективности действия сахароснижающих препаратов.
3. Мы также можем предположить, что

повышение активности АМРК под действием метформина (Мефармил, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, производства ПАО «Киевмедпрепарат», Корпорация Артериум) может быть одним, возможно универсальным, объяснением положительных эффектов бигуанидов в клинической медицине.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. IDF. Atlas:7th Edition, 2016.
2. Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. *EMBO Mol Med* 2013; 5(5):661-674. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201202382>
3. Aprile-Garcia F, Antunica-Noguerol M, Budziński ML, et al. *Endocr Connect* 2014; 3:R1-R12. doi: <http://dx.doi.org/10.1530/EC-13-0079>
4. Ghosh S. Handbook of transcription factor NF-kappaB, *LLC Boca Raton*, 2007: 223 p.
5. Hayden MS, Ghosh S. *Genes Dev* 2012; 26:203-234. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.183434.111>
6. Blaylock RL. *Surg Neurol Int* 2015; 6(92):1-25.
7. Medzhitov R. *Nature* 2008; 454(7203):428-435. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07201>
8. Harris RE, Casto BC, Harris ZM. *World J Clin Oncol* 2014; 5(4):677-692. doi: <http://dx.doi.org/10.5306/wjco.v5.i4.677>
9. Koh TJ, DiPietro LA. *Expert Rev Mol Med* 2011; 13:e23. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/S1462399411001943>
10. Dennis EA, Norris PC. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(8):511-523. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3859>
11. Knab LM, Grippo PJ, Bentrem DJ. *World J Gastroenterol* 2014; 20(31):10729-10739. doi: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i31.10729>
12. Kapadia R, Yi JH, Vemuganti R. *Front Biosci* 2008; 13:1813-1826. doi: <http://dx.doi.org/10.2741/2802>
13. Steinberg GR, Schertzer JD. *Immunol Cell Biol* 2014; 92:340-345. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2014.11>
14. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. *Chem Biol* 2012; 19:1222-1236. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.08.019>
15. Galic S, Fullerton MD, Schertzer JD, et al. *J Clin Invest* 2011; 121:4903-4915. doi: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI58577>
16. Saha AK, Xu XJ, Balon TW, et al. *Cell Cycle* 2011; 10(20):3447-3451. doi: <http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.20.17886>
17. Ruderman NB, Carling D, Prentki M, Cacicedo JM. *J Clin Invest* 2013; 123(7): 2764-2772. doi: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI67227>
18. Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, et al. *Nature* 2011; 472(7342):230-233. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09932>

19. Racioppi L, Means AR. *J Biol Chem* 2012; 287(38):31658-31665. doi: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R112.356485>
20. Jeong KJ, Kim GW, Chung SH. *J Ginseng Res* 2014; 38:83-88. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgr.2013.11.014>
21. An H, He L. *J Endocrinol* 2016; 228(3):R97-R106. doi: <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-15-0447>
22. Meng S, Cao J, He Q, et al. *J Biol Chem* 2015; 290:3793-3802. doi: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.604421>

АКТИВНІСТЬ АМР — АКТИВОВАНОЇ ПРОТЕЇНКИНАЗИ У ЛИМФОЦИТАХ ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ ПІД ВПЛИВОМ ЦУКРОЗНИЖУЮЧИХ ПРЕПАРАТІВ. ЕФЕКТ МЕТФОРМИНУ

Пушкар'єв В. М., Соколова Л. К., Пушкар'єв В. В., Бельчіна Ю. Б., Тронько М. Д.

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України», м. Київ
pushkarev.vm@gmail.com

У статті аналізуються клітинні та молекулярні зв'язки між хронічним запаленням низької інтенсивності, цукровим діабетом 2 типу, серцево-судинними захворюваннями. Особливий акцент зроблений на участі АМРК у розвитку метаболічних хвороб. Детально проаналізовано біохімічні механізми дії основного препарату, що застосовується при лікуванні інсулінорезистентності і діабету 2 типу — метформіну. Надані результати вивчення активності АМРК у лимфоцитах хворих на цукровий діабет під впливом метформіну.

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, АМРК, хронічне неспецифічне запалення, метформін.

АКТИВНОСТЬ АМР — АКТИВИРОВАННОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ В ЛИМФОЦИТАХ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ПРИ ДЕЙСТВИИ САХАРОСНИЖАЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ. ЭФФЕКТ МЕТФОРМИНА

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

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комисаренко НАМН Украины», г. Киев
pushkarev.vm@gmail.com

В статье анализируются клеточные и молекулярные связи между хроническим воспалением низкой интенсивности, сахарным диабетом 2 типа, сердечно-сосудистыми заболеваниями. Акцент сделан на участии АМРК в развитии метаболических болезней. Детально проанализированы биохимические механизмы действия основного препарата, применяемого при лечении инсулинорезистентности и диабета 2 типа — метформина. Представлены результаты изучения активности АМРК в лимфоцитах больных сахарным диабетом при действии метформина.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, АМРК, хроническое неспецифическое воспаление низкой интенсивности, метформин.

AMRK ACTIVITY IN LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS UNDER THE INFLUENCE OF HYPOGLYCEMIC DRUGS. EFFECT OF METFORMIN

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

SI «V. Komisarenko Institute for Endocrinology and Metabolism», Kyiv
pushkarev.vm@gmail.com

This review was analyzed the cellular and molecular links between chronic inflammation of low intensity, type 2 diabetes and cardiovascular disease. Particular emphasis is placed on the participation of AMRK in the development of metabolic diseases. Detailed analysis of the biochemical mechanisms of the main drug used in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes — metformin. The results of the study of AMRK lymphocytes in patients with diabetes influenced by metformin.

Keywords: type 2 diabetes, AMRK, chronic nonspecific inflammation, metformin.