

Л.А. Кузнецова, С.А. Плеснева, Т.С. Шарова, М.Н. Перцева

Исследование гормонореактивности аденилатциклазной сигнальной системы в эритроцитах больных диабетом 2-го типа

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, 194223, Россия, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44

Пептиды инсулинового семейства (инсулин, инсулиноподобный фактор роста 1, релаксин), эпидермальный фактор роста (ЭФР) и биогенные амины (изопротеренол, норадреналин, адреналин и серотонин) стимулировали активность аденилатциклазы (АЦ). В мембранах эритроцитов у контрольной группы пациентов эффект гормонов потенцировался в присутствии гуанилилимидодифосфата (ГИДФ). У пациентов с начальной, средней и тяжелой стадиями сахарного диабета (СД2) базальная активность АЦ была выше, чем в контроле. При средней тяжести заболевания стимулирующий эффект биогенных аминов на АЦ без ГИДФ был сходен с контролем, но в присутствии ГИДФ потенцирование отсутствовало. При начальной и тяжелой степени СД2 чувствительность АЦ к биогенным аминам была снижена вне зависимости ГИДФ. Пептиды инсулинового семейства и ЭФР, при СД2 средней степени тяжести, стимулировали аденилат-циклазную сигнальную систему (АЦСС) аналогично контролю. В начальной и тяжелой стадии СД2 чувствительность АЦ к пептидам снижалась. В мембранах эритроцитов при диабете с СД2 имеет место нарушение функций АЦСС на уровне каталитического компонента, а при действии изученных гормонов — на уровне G_s белка и его сопряжения с АЦ.

Ключевые слова: эритроциты, сахарный диабет 2-го типа, аденилатциклазная сигнальная система, инсулин, инсулиноподобный фактор роста 1, релаксин, эпидермальный фактор роста, биогенные амины

L.A. Kuznetsova, S.A. Plesneva, T.C. Sharova, M.N. Pertseva

Study of hormone responsiveness of the adenylyl cyclase signaling system in erythrocyte membranes of patients with type 2 diabetes mellitus

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, 44, Moris Thorez prosp., St.-Petersburg, 194223, Russia

Peptides of the insulin superfamily (insulin, insulin-like growth factor, relaxin), epidermal growth factor (EGF) and biogenic amines (isoproterenol, adrenalin, noradrenalin, serotonin) stimulate the adenylyl cyclase signaling system (ACSS). In erythrocyte membranes from a control group of patients, the hormone activating affect on ACSS was potentiated in the presence of guanylylimidinodiphosphate (G_{ppNHp}). In erythrocyte membranes from patients of various severity of type 2 diabetes mellitus (DM2, early, medium and severe), the basal activity of AC was higher than in the control group and its responsiveness to hormones was different. It was reduced in patients with early and severe forms of DM2 both in the presence and absence of G_{ppNHp} . In patients with the medium severity of the disease, the stimulating effect of biogenic amines was not changed but there was no potentiating effect of G_{ppNHp} . The insulin superfamily peptides and EGF stimulated AC in the erythrocyte membranes of patients with the medium severity of DM2 to the same extent as in the control while, at the early and severe stages of the disease, the AC sensitivity to these hormones was significantly reduced. These data suggest that DM2 results in disturbances of the hormone stimulating properties of ACSS by insulin superfamily peptides, EGF and biogenic amines. In erythrocyte membranes, DM2 disturbs ACSS functions at the level of the catalytic component and its responsiveness to hormone action at the level of interactions between G_s and AC.

Key words: erythrocytes, type 2 diabetes mellitus, adenylyl cyclase signaling system, insulin, insulin-like growth factor, relaxin, epidermal growth factor, biogenic amines

Молекулярной основой СД является нарушение функции целого ряда гормональных сигнальных систем. Нами высказана гипотеза о том, что молекулярные дефекты, возникающие в гормональных сигналь-

ных системах, являются ключевыми причинами этого эндокринного заболевания [3—5]. Эта идея находит убедительные подтверждения в работах авторов, отмечавших нарушение функции эндокринной системы при развитии СД (на уровне гипоталамуса, надпочечников, гонад), мышечной, жировой ткани и др. [4, 6]. Патогенез СД до конца не выяснен. При СД 2-го типа (СД2) страдает инсулиновая система, что

Для корреспонденции: Плеснева Светлана Александровна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБУН ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН. E-mail: plesneva@mail.ru

связано с нарушением как функционирования рецепторов, так и систем внутриклеточной сигнализации. Одной из систем внутриклеточной регуляции действия ряда гормонов является аденилатциклазная сигнальная система (АЦСС), продуцирующая циклический АМФ (цАМФ), регулирующий многие процессы в клетке [2, 13]. При исследовании функционального состояния АЦСС при СД2, проведенные нами впервые показано, что при диабете возникают дефекты в АЦСС при действии гормонов как инсулиновой природы, так и биогенных аминов, что может свидетельствовать о полигормональном генезе СД2 [3—5]. В работе мы оценивали степень чувствительности АЦСС в мембранах эритроцитов человека к гормонам разной природы при СД2. Известно, что мембраны эритроцитов содержат аденилатциклазу (АЦ), которая стимулируется биогенными аминами и пептидами инсулинового семейства [1, 8]. Нами ранее установлено, что активирующее действие инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1) на АЦ реализуется с участием целого ряда внутриклеточных компонентов. Возможная сигнальная цепь реализации стимулирующих влияний этих пептидов следующая:

Рецептор-тирозинкиназа => $\beta\gamma$ -димер ингибирующего ГТФ-связывающего белка (G_i белок) => фосфатидилинозитол 3-киназа => протеинкиназа $C\zeta$ => стимулирующий ГТФ-связывающий белок (G_s белок) => АЦ [13]. Для биогенных аминов, эпидермального фактора роста (ЭФР) и релаксина сигнальная цепь иная: рецептор => G_s белок => АЦ. Действие пептидных гормонов инсулиновой природы и ЭФР на АЦСС вовлечено в регуляцию фундаментальных процессов в клетке (метаболизм, клеточный рост, апоптоз и т.п.) [2]. ИФР-1 участвует в рост-стимулирующем эффекте и регулирует гомеостаз

глюкозы, играя важную роль в лечении СД [15]. Релаксин по регуляторным функциям близок к инсулину и влияет на репродуктивную систему с участием АЦСС [16]. ЭФР стимулирует клеточную пролиферацию с участием АЦ и цАМФ-зависимого механизма [7]. АЦСС и ее гормональная регуляция пептидами инсулинового семейства и биогенными аминами в эритроцитах человека мало исследована [5, 8, 12, 13]. В данной работе изучали СД2 (инсулиннезависимый), как наиболее распространенный тип заболевания. Накоплены данные о нарушениях передачи гормонального сигнала при СД2 и развитии инсулинорезистентности периферических тканей [10, 15].

Цель и задачи работы: изучение регуляции АЦСС при действии пептидов инсулинового семейства, ЭФР и биогенных аминов, а также нарушений в функционировании гормоночувствительной АЦСС в мембранах эритроцитов при СД2 различной степени выраженности.

Методика

Исследованы следующие группы лиц: контроль (n=36) без выраженной патологии и группы пациентов с СД2 разной степени тяжести. Больные СД2 были разделены на 3 группы, согласно диагнозу, установленному на основании клинических проявлений болезни и комплексного лабораторного обследования (табл. 1): 1-я группа (n=14) — начальная стадия; 2-я группа (n=45) — среднетяжелая стадия (в 1-й и 2-й группах с длительностью заболевания от 0,5 года до 10 лет лечение проводилось без инсулиновой терапии) и 3-я группа (n=39) — тяжелая стадия с длительностью 5—15 лет (лечение проводилось с использованием инсулиновой терапии и в комплексе с липотропными препаратами, витаминами и др.).

Таблица 1

Характеристика контрольной группы и пациентов с диабетом 2-го типа

Показатели	Норма	Начальная стадия	Среднетяжелая стадия	Тяжелая стадия
Женщины	n=22	n=14	n=24	n=23
Возраст (лет)	63,4±3,5	62,3±4,2	62,5±5,9	64,5±5,7
Вес (кг)	62,8±6,8	69,8±7,0	69,5±8,2	80,0±8,5
Рост (см)	162,0±7,1	153,8±2,5	159,3±4,7	158,3±1,4
Индекс массы тела (кг/м ²)	23,7±2,6	29,5±2,4	27,3±3,0	32,5±3,9
Гликемия (ммоль/л)	4,7±0,4	7,1±1,1	5,8±1,1	6,3±0,5
Мужчины	n=12	—	n=21	n=16
Возраст (лет)	70,1±2,2	—	70,2±4,9	70,5±8,1
Вес (кг)	72,2±7,2	—	69,3±7,4	81,1±10,5
Рост (см)	170,0±10,1	—	177,2±7,1	168,5±3,6
Индекс массы тела (кг/м ²)	24,8±0,6	—	22,2±2,5	32,2±3,9
Гликемия (ммоль/л)	4,8±0,1	—	8,8±1,7	8,4±2,2

Влияние *in vitro* негормональных агентов на активность АЦ в мембранах эритроцитов контрольной и диабетических группах

Добавки, 10 мин	Активность АЦ (пкмоль цАМФ/мг белка/мин)			
	Контрольная группа, n=34	Начальная стадия СД2, n=14	Среднетяжелая стадия, n=45	Тяжелая стадия, n=39
Базальная АЦ	12,90±1,44	18,51±1,55	31,62±1,62	21,54±2,98
Форсколин, 10 ⁻⁵ М	27,42±2,11* (+112)	25,61±1,90 (+38)	40,72±3,17* (+29)	26,81±0,97 (+25)
NaF, 10 ⁻³ М	43,90±1,78* (+240)	32,53±2,32 (+76)	43,34±1,65* (+37)	32,11±2,68 (+49)
ГИДФ, 10 ⁻⁶ М	25,52±1,46* (+98)	24,70±1,85 (+34)	42,51±2,33 (+34)	27,93±1,95 (+30)

Примечание. Цифры в скобках — стимулирующий АЦ эффект негормональных агентов (% изменение базальной активности в контроле и при СД2); * — достоверный стимулирующий эффект агентов (p<0,05).

Эритроциты выделяли методом центрифугирования (20 мин при 4°C, 4500 об./мин) в одноступенчатом градиенте (фиколл-урографин). Осадок эритроцитов промывали (3—7 раз), гомогенизировали и центрифугировали (20 000 g 10 мин) для получения мембранной фракции, которую использовали для определения активности АЦ.

Для выявления функций отдельных компонентов АЦСС (рецептор, G белок, АЦ) изучали *in vitro* влияние негормональных и гормональных агентов. Для оценки каталитической функции АЦ использовали активатор форсколин. Для оценки функционирования G белков: гуанилилмидодифосфат (ГИДФ) и фторид натрия (NaF). Для характеристики рецепторной функции гормонрегулируемой АЦСС использо-

вали пептиды (10⁻⁸ М): инсулин, ИФР-1, релаксин, ЭФР и биогенные амины (10⁻⁶ М): изопротеренол, норадреналин, адреналин и серотонин.

Определяли активность аденилатциклазы согласно методу [12]. Состав реакционной смеси была следующего состава (конечный объем 50 мкл, мМ): 25 трис-НСl (рН 7.5), 5 MgCl₂, 0,1 АТФ, 1 цАМФ, 20 креатинфосфата, 1 мкКи [α-³²P]АТФ, 0,2 мкг/мл креатинфосфокиназы, и 15—20 мкг мембранного белка. Инкубацию проводили при 37С в течение 3 мин для пептидов или 10 мин для биогенных аминов. Активность фермента оценивали по количеству образовавшегося цАМФ и выражали в пикомолях цАМФ/мг белка/мин. Каждый эксперимент выполнен 2 раза в 4 параллельных пробах.

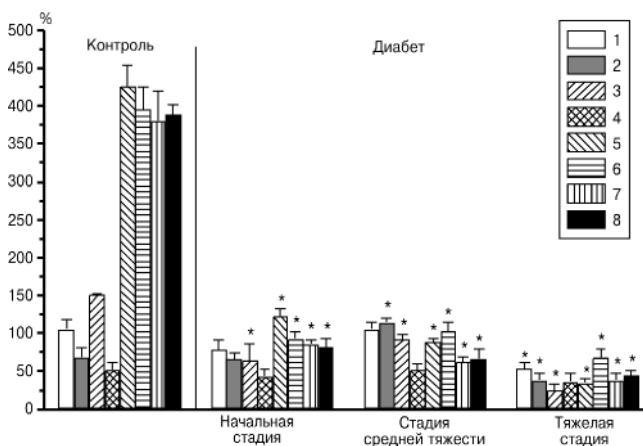


Рис. 1. Влияние *in vitro* биогенных аминов без ГИДФ и в его присутствии на активность аденилатциклазы в мембранах эритроцитов контрольной и диабетических групп: по вертикали: стимулирующий эффект биогенных аминов на активность АЦ в контроле и при СД2 (%); по горизонтали: биогенные амины (10⁻⁶ М) и ГИДФ (10⁻⁶ М): 1 — изопротеренол; 2 — серотонин; 3 — норадреналин; 4 — адреналин; 5 — изопротеренол + ГИДФ; 6 — серотонин + ГИДФ; 7 — норадреналин + ГИДФ; 8 — адреналин + ГИДФ; * — достоверное отличие (p<0,05) активности аденилатциклазы при СД2 от контрольных величин.

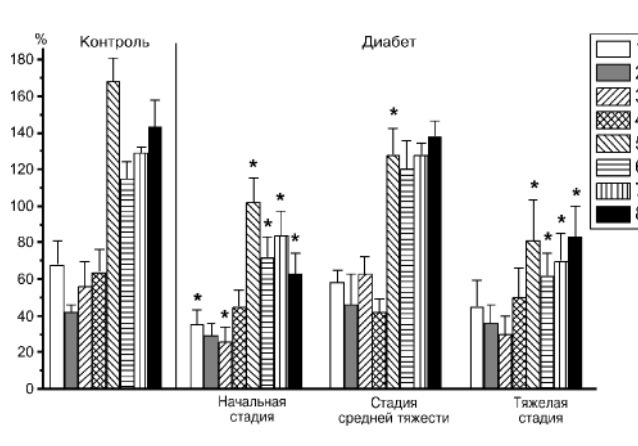


Рис. 2. Влияние *in vitro* пептидов инсулинового семейства и эпидермального фактора роста в отсутствии и в присутствии ГИДФ на активность аденилатциклазы в мембранах эритроцитов контрольной и диабетических групп: по вертикали: Стимулирующий эффект пептидов на активность АЦ в контроле и при СД2 (%). По горизонтали: пептиды (10⁻⁸ М) и ГИДФ (10⁻⁶ М): 1 — инсулин; 2 — ИФР-1; 3 — релаксин; 4 — ЭФР; 5 — инсулин + ГИДФ; 6 — ИФР-1+ГИДФ; 7 — релаксин + ГИДФ; 8 — ЭФР + ГИДФ; * — достоверное отличие активности аденилатциклазы при СД2 от контрольных величин (p<0,05).

В работе использованы: креатинфосфат, креатинфосфокиназа (3500 Ед/мг белка), ГИДФ, форсколин, трис-НСI, имидазол, окись алюминия, АТФ, цАМФ, НАДФ, изопротеренол, норадреналин, адреналин, серотонин, кристаллический инсулин человека (24 IU), ИФР-1 и ЭФР («Sigma», США), [α - 32 P]АТФ (4 Ки/ммоль) («ООО Изотоп», Россия). Кристаллический релаксин человека 2 любезно предоставлен доктором Д. Вайдом (Австралия). Содержание белка определяли методом Лоури. Все данные статистически обработаны (программа ANOVA) и считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследование АЦСС мембран эритроцитов контрольной группы показало, что негормональные агенты — форсколин, NaF и ГИДФ (табл. 2), а также биогенные амины и пептиды — инсулин, ИФР-1, релаксин и ЭФР (рис. 1, 2) оказывали стимулирующее влияние на активность АЦ. В присутствии ГИДФ при действии гормонов стимуляция АЦ и АЦСС усиливалась, что свидетельствует о полноценном взаимодействии всех компонентов АЦСС — рецепторного, ГТФ-связывающего, каталитического. Представленные данные сходны с результатами, полученными ранее нами и другими авторами [5, 8, 12, 13].

При СД2 базальная активность АЦ возрастала во всех изученных группах больных (табл. 2 и рис. 1, 2), что может быть связано как с развитием гипергликемии, так и с возможным изменением набора изоформ АЦ при диабете. Это может приводить к повышению каталитической способности фермента, что показали и другие авторы [9, 14]. Активность АЦ в присутствии ГИДФ не изменялась при СД2 средней тяжести и снижалась при других формах патологии (табл. 2). Стимулирующие эффекты NaF и форсколина ослаблялись при СД2 (табл. 2). При СД2 средней тяжести биогенные амины стимулировали активность АЦ сходно с контрольными величинами, ГИДФ не потенцировал влияние биогенных аминов. В начальной стадии болезни чувствительность к норадреналину снижалась, в то же время стимуляция АЦСС другими биогенными аминами не изменялась. При тяжелой стадии СД2 обнаруживалось выраженное снижение чувствительности АЦ к биогенным аминам как без ГИДФ, так и в его присутствии (рис. 1). Отчетливое снижение стимуляции АЦ, по сравнению с контрольной группой, выявленное при действии биогенных аминов у исследованных больных может свидетельствовать о нарушении сопряжения компонентов АЦ системы (рис. 1).

При СД2 средней тяжести пептиды инсулинового семейства и ЭФР стимулировали АЦСС также, как в контроле. В начальной и тяжелой стадии СД2 чувствительность к пептидам имела тенденцию к снижению

(рис. 2). Достоверное уменьшение стимуляции АЦСС при действии пептидов в присутствии ГИДФ свидетельствует об ослаблении сопряжения компонентов системы, вероятно, при взаимодействии G_s белка с АЦ. Эти предположения подкрепляют данные о снижении стимулирующего влияния NaF и ГИДФ на активность АЦ. Представленные данные свидетельствуют о снижении чувствительности АЦСС к пептидами инсулинового ряда и биогенным аминам при СД2 в начальной и тяжелой стадиях болезни. Лечение больных СД2 инсулином, не вызывало существенного улучшения чувствительности АЦ к гормонам. При среднетяжелой стадии СД2 АЦ-стимулирующее влияние пептидов было сходно с величинами, обнаруженными в контроле, в то же время при действии биогенных аминов в присутствии ГИДФ — ослаблялось. Сделан вывод о том, что СД2 ведет к ряду нарушений в функционировании АЦСС как на уровне каталитического компонента, так и при действии изученных гормонов на уровне G_s белка и его сопряжения с АЦ. Изменения функций АЦСС при диабете обнаружены и другими авторами [11]. В исследованиях с использованием генетических моделей СД2 были выявлены нарушения функций рецепторов инсулина и ИФР-1, обеспечивающих в нормальных условиях стимуляцию поглощения глюкозы мышцами [15]. Дефекты в этих рецепторных системах и, как следствие, сопряженных с ними сигнальных путях, сопровождалась развитием резистентности к инсулину при СД2 [15]. Данные о снижении тирозинкиназной активности рецептора инсулина играют существенную роль в возникновении резистентности к инсулину [10]. Однако возможны нарушения регуляции гормонами АЦСС на пострецепторных этапах передачи гормональных сигналов. Так, обнаружено ослабление стимулирующего действия инсулина на фосфатидилинозитол(3) киназу и протеинкиназу $C\zeta$ у крыс со стрептозотоциновым СД2 и у человека с СД2 [6, 10]. При СД2, были выявлены нарушения функций как стимулирующих, так и ингибирующих G-белков, взаимодействующих с АЦ [5]. Полученные в настоящей работе данные выявили молекулярные нарушения в АЦСС действия пептидов инсулиновой природы и биогенных аминов при СД2 в эритроцитах человека, а также их восстановление с помощью лечения средне-тяжелой стадии заболевания СД2.

Авторы благодарят врача-эндокринолога Клинической больницы РАН канд. мед. наук Манову Е.А., за подбор больных и помощь в получении экспериментального материала, а также сотрудников лаборатории Чистякову О.В. и Шпакова А.О. за помощь в эксперименте и её оформлении работы.

Работа поддержана РФФИ (10-04-01052) и Программой президиума РАН «Фундаментальные науки — медицина», 2011 г.

Список литературы

1. **Кузнецова Л.А.** Регуляторные свойства изоформ аденилатциклаз // Журн. эвол. биохим. физиол. — 2002. — 38. — С. 289-304.
2. **Перцева М.Н.** Гипотеза о ключевой координирующей роли аденилатциклазного сигнального механизма и цАМФ в регуляторном действии пептидов инсулинового суперсемейства на фундаментальные клеточные процессы: клеточный рост, апоптоз, метаболизм // Журн. эвол. биохим. физиол. — 2000. — 36. — С. 494-503.
3. **Перцева М.Н., Шпаков А.О.** Концепция молекулярных дефектов в гормональных сигнальных системах как причин эндокринных заболеваний // Рос. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. — 2004. — 90:8. — С. 446.
4. **Перцева М.Н., Шпаков А.О.** Гипотеза эволюционного происхождения ряда болезней человека и животных // Журн. эвол. биохим. физиол. — 2010. — 46:3. — С. 261-267.
5. **Шпаков А.О., Кузнецова Л.А., Плеснева С.А.** и др. Идентификация нарушений в гормоночувствительной аденилатциклазной сигнальной системе в тканях крыс с диабетом 2 типа, используя функциональные тесты и синтетические нанопептиды // Техн. живых систем. — 2007. — 4. — С. 96-108.
6. **Bouzakri K., Roques M., Gual P.** et al. Reduced activation of phosphatidylinositol-3kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle from patients with type 2 diabetes // Diabetes. — 2003. — 52(6). — P. 1319-1325.
7. **Chaturvedi D., Edwin F., Sun H., Patel T.B.** Analysis of EGF receptor interactions with alpha subunit of the stimulatory GTP binding protein of adenyl cyclase // Gs. Methods Mol. Biol. — 2006. — 327. — P. 49-59.
8. **Horga J.F., Gisbert J., De Agustin J.C.** et al. A beta-2-adrenergic receptor activates adenylate cyclase in human erythrocyte membranes at physiological calcium plasma concentrations // Blood Cells Mol. Dis. — 2000. — 26:3. — P. 223-228.
9. **Kawabe J., Aizawa Y., Takehara N.** et al. Glucose modifies the cross-talk between insulin and the beta-adrenergic signaling system in vascular smooth muscle cells // J. Hypertens. — 2000. — 18. — P. 1457-1464.
10. **Le Roith D., Accili D.** Mechanisms of disease: using genetically altered mice to study concepts of type 2 diabetes // Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. — 2008. — 4:3. — P. 164-172.
11. **Matsumoto T., Wakabayashi K., Kobayashi T., Kamata K.** Functional changes in adenyl cyclases and associated decreases in relaxation responses in mesenteric arteries from diabetic rats // Am. J. Physiol. — 2005. — 289:5. — H2234-43.
12. **Pertseva M.N., Plesneva S.A., Shpakov A.O.** et al. Involvement of adenyl cyclase signalling system in the action of insulin and mollusc insulin-like peptide // Comp. Biochem. Physiol. — 1995. — 112. — P. 689-695.
13. **Pertseva M.N., Shpakov A.O., Plesneva S.A., Kuznetsova L.A.** A novel view on the mechanism of action of insulin and other insulin superfamily peptides: involvement of adenyl cyclase signaling system // Comp. Biochem. Physiol. — 2003. — 134. — P. 11-34.
14. **Portela-Gomez G.M., Grimelius L., Johansson H.** et al. Increased expression of adenyl cyclase isoforms in the adrenal gland of diabetic Goto-Kakizaki rat // Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. — 2002. — 10:4. — P. 387-392.
15. **Ranke M.B.** Insulin-like growth factor-I treatment of growth disorders, diabetes mellitus and insulin resistance // Trends Endocrinol Metab. — 2005. — 16:4. — P. 190-197.
16. **Sherwood O.D.** Relaxin's physiological roles and other diverse actions // Endocrine Reviews. — 2004. — 25:2. — P. 205-234.

Поступила 21.09.11

Сведения об авторах:

Кузнецова Людмила Александровна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБУН ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН
Шарова Татьяна Сергеевна, мл. науч. сотр., ФГБУН ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН
Перцева Марианна Николаевна, д-р биол. наук, проф., гл. науч. сотр., ФГБУН ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН