

UDC 616.379-008.64-002:577.2

DOI: 10.22141/2224-0721.15.1.2019.158688

 L.K. Sokolova, V.M. Pushkarev, Yu.B. Belchina, V.V. Pushkarev, T.S. Vatsaba, N.D. Tronko  
 SI "V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of NAMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine

## Association of 5'AMP-activated protein kinase activity with disease duration and HbA1c content in leukocytes in diabetic patients

For cite: Mižnarodnij endokrinologičnij žurnal. 2019;15(1):23-26. doi: 10.22141/2224-0721.15.1.2019.158688

**Abstract. Background.** 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) is an enzyme that controls the cell energy balance. With energetic stress in the cell and an increase in the AMP concentration, ATP is replaced by AMP in the exchange centers, resulting in the allosteric activation of AMPK by phosphorylation of 172 threonine within alpha subunit of LKB1 complex in response to changes in cell energy or CAMKK $\beta$ , which activates intracellular Ca<sup>2+</sup>. The purpose was to study the activity of the main energy sensor of cells — AMPK in leukocytes in patients taking insulin preparations, metformin, and other hypoglycemic drugs in association with disease duration and glycated hemoglobin content. **Materials and methods.** The diabetic patients receiving single-drug or combined therapy with insulin and its analogues, metformin, dapagliflozin and sulfonylureas were randomized into 5 groups: the first group — with an HbA1c level close to the norm — 6.9–7.6 %; the second group — 7.6–9.0 %; the third group — > 9 %; the fourth group > 10 %; the fifth group — > 11 %. To determine the amount of phospho-AMPK (p-Thr172), ELISA kits were used. To get the calibration curve for the AMPK determination, a kidney cell culture HEK293T of the human embryonic kidney was used, which is recommended by manufacturer as a positive control. **Results.** It was shown that with increase of blood HbA1c, the level of AMPK activity in leukocytes gradually decreased. With increase of blood HbA1c, the level of AMPK activity in leukocytes gradually decreased. The activity of AMPK in leukocytes of patients with HbA1c > 11 % was more than 3.5-fold lower compared to the group with 6.9–7.6 % of HbA1c; AMPK activity in leukocytes in patients with disease duration of 20 years was 3-fold lower. Thus, the AMPK activity in leukocytes may be an indicator of diabetic compensation in diabetic patients. **Conclusions.** With increase of blood HbA1c, the level of p-AMPK in leukocytes gradually decreased. AMPK activity in leukocytes in diabetes patients with disease duration of 20 years was 3-fold lower than in patients with 10-year experience.

**Keywords:** diabetes mellitus; 5'AMP-activated protein kinase; glycated hemoglobin

### Introduction

5'AMP-activated protein kinase (AMPK) is an enzyme that controls the cell energy balance. With energetic stress in the cell and an increase in the AMP concentration, ATP is replaced by AMP in the exchange centers, resulting in the allosteric activation of AMPK by phosphorylation of 172 threonine within alpha subunit of LKB1 complex in response to changes in cell energy or CAMKK $\beta$ , which activates intracellular Ca<sup>2+</sup> [1–3].

By direct phosphorylation of metabolic enzymes and transcription factors, AMPK stimulates catabo-

lic processes — absorption of glucose, fatty acids and their conversion by mitochondrial oxidation and glycolysis. In addition, AMPK suppresses anabolic processes — the synthesis of glucose, glycogen and lipids in the liver [4].

With type 2 diabetes mellitus (DM) and obesity, its activity decreases, and the activity of protein kinases mTORC1/p70S6K increases, leading to phosphorylation of IRS and insulin resistance [5].

HbA1c, the major fraction of glycated hemoglobin, is formed by irreversible non-enzymatic glycation. It is the key parameter for monitoring the regulation of DM

and for assessing the risk of microvascular complications [6].

The purpose: taking into account the data obtained in clinical and experimental studies, we attempted to study the activity of the main energy sensor of cells — AMPK in leukocytes in patients taking insulin preparations, metformin, and other hypoglycemic drugs in association with disease duration and glycated hemoglobin content.

## Materials and methods

The study was conducted in the Diabetology Department of the V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of NAMS of Ukraine. All patients signed informed consent to conduct further diagnostic and research study. Immediately after collection, the blood was layered over a layer of Histopaque 1077 (Sigma, USA) and centrifuged at RT in 15 ml conical Falcon™ tubes.

The leukocytes collected were washed and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. The cells were lysed in the extraction buffer with inhibitors of proteases and phosphatases. To determine the amount of phospho-AMPK (phosphothreonine 172), enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA) kit ab154468 (Abcam, UK) was used. The studies were carried out in triplets. The protein concentration in the lysate was determined using Novagen (USA) BCA protein assay kit. The measurements were carried out on a microplate reader (Bio-tek Instruments, USA) at a wavelength of 600 nm.

To get the calibration curve for the AMPK determination, a kidney cell culture HEK293T of the human embryonic kidney was used, which is recommended by manufacturer as a positive control. The OD values of samples obtained (0.005–0.04) are located on the calibration curve region almost perfectly coinciding with exponential theoretical curves that indicates no scattering of the data [7].

The results of the study are presented as  $M \pm SD$  and  $M \pm m$ ,  $n = 31$  (3–6 per group). To compare the data groups, Student's *t*-test was used. Values of  $P \leq 0.05$  were considered as significant.

## Results

The patients received single-drug or combined therapy with insulin and its analogues, metformin, dapagliflozin and sulfonylureas. They were randomized into groups: the first group — with an HbA1c level close to the norm — 6.9–7.6 %; the second group — 7.6–9.0 %; the third group —  $> 9$  %; the fourth group —  $> 10$  %; the fifth group —  $> 11$  %. In addition, the mean value for all patients ( $n = 31$ ) was calculated.

AMPK activity was determined by the amount of phosphorylated Thr172 of  $\alpha$ -subunit of the protein. Fig. 1 shows that the highest level of phospho-AMPK is observed in leukocytes in patients with low level of HbA1c — 6.9–7.6 %, which is not much higher than the indices recommended for diabetic patients, and can be considered as a condition close to compensatory. With increase of blood HbA1c, the level of p-AMPK gradually decreased. The activity of AMPK in leukocytes in patients with HbA1c  $> 11$  % was more than 3.5-fold lower compared to group with HbA1c of 6.9–7.6 % (Fig. 1).

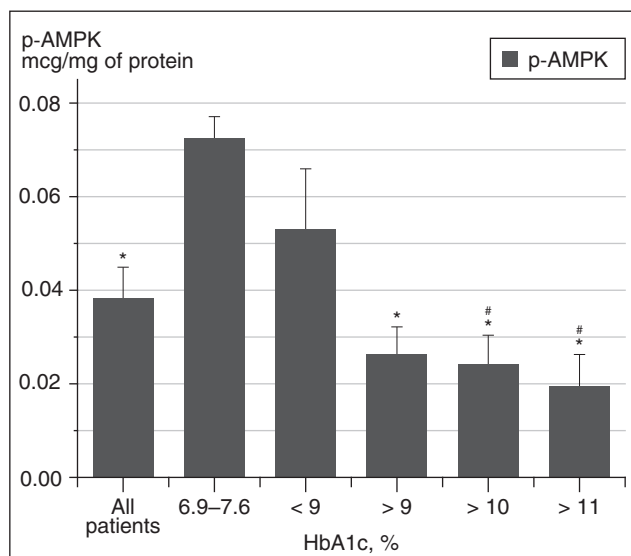
In the following, we calculated the AMPK activity in association with average duration of diabetes mellitus. Two groups of patients with DM duration of  $\sim 10$  and  $\sim 20$  years were selected.

The Table 1 demonstrates that AMPK activity in patients with disease duration  $\sim 20$  years 3-fold lower than in patients with 10-year experience.

## Discussion

Thus, regardless of the method of treatment AMPK activity may be related to the degree of diabetes mellitus compensation that reflects the level of glycated hemoglobin, with which kinase activity is linked by an inverse relationship.

It should be noted that leukocytes contain up to 11 % of monocytes/macrophages and up to 40 % of lymphocytes. Both types of cells and first of all macrophages are the main source of inflammatory effectors that promote diabetic atherosclerosis and myocardial infarction [8–10].



**Figure 1. AMPK activity in leukocytes in diabetic patients after treatment with hypoglycemic drugs depending on the HbA1c level**

**Notes:**  $M \pm SD$ ,  $n = 31$ ; \* — difference compared to the group with HbA1c 6.9–7.6 % is significant,  $P < 0.05$ ; # — difference compared to the group with HbA1c  $< 9$  % is significant,  $P < 0.05$ .

**Table 1. AMPK activity in diabetic patients depending on disease duration**

AMPK activity	DM duration, years
$0.0069 \pm 0.0013$ $n = 5$	20.25
$0.0215 \pm 0.0004$ $n = 3$	9.5

**Note:**  $M \pm m$ .

Oxidative metabolism determines the inflammatory status of macrophages and the processes that can occur before endoplasmic-reticulum stress and the formation of NLRP3-inflammasomes. AMPK is at the crossroads of the metabolic-mediated inflammation of macrophages, controls the metabolism of mitochondria and, consequently, can determine the inflammatory status of macrophages [11–14].

## Conclusions

1. With increase of blood HbA1c amount, the level of p-AMPK in leukocytes gradually decreased.
2. AMPK activity in leukocytes in diabetic patients with disease duration ~ 20 years 3-fold lower than in patients with 10-year experience.
3. The AMPK activity in leukocytes may be an indicator of diabetic compensation and disease duration in patients.

**Conflicts of interests.** Authors declare no conflicts of interests that might be construed to influence the results or interpretation of their manuscript.

## References

1. Ruderman NB, Carling D, Prentki M, Cacicedo JM. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2013 Jul;123(7):2764-72. doi: 10.1172/JCI67227.
2. Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature.* 2011 Apr 14;472(7342):230-3. doi: 10.1038/nature09932.
3. Racioppi L, Means AR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology. *J Biol Chem.* 2012 Sep 14;287(38):31658-65. doi: 10.1074/jbc.R112.356485.
4. Jeong KJ, Kim GW, Chung SH. AMP-activated protein kinase: An emerging target for ginseng. *J Ginseng Res.* 2014 Apr;38(2):83-8. doi: 10.1016/j.jgr.2013.11.014.
5. Saha AK, Xu XJ, Balon TW, Brandon A, Kraegen EW, Ruderman NB.

*Insulin resistance due to nutrient excess. Is it a consequence of AMPK downregulation? Cell Cycle.* 2011 Oct 15;10(20):3447-51. doi: 10.4161/cc.10.20.17886.

6. Kojić Damjanov S, Đerić M, Eremić Kojić N. Glycated hemoglobin A1c as a modern biochemical marker of glucose regulation. *Med Pregl.* 2014 Sep-Oct;67(9-10):339-44.

7. Sokolova LK, Pushkarev VM, Belchina YB, Pushkarev VV, Tronko MD. Effect of combined treatment with insulin and metformin on 5'AMP-activated protein kinase activity in lymphocytes of diabetic patients. *Dopov Nac akad nauk Ukr.* 2018;(5):100-104. doi: 10.15407/dopovidi2018.05.100.

8. Steinberg GR, Schertzer JD. AMPK promotes macrophage fatty acid oxidative metabolism to mitigate inflammation: implications for diabetes and cardiovascular disease. *Immunol Cell Biol.* 2014 Apr;92(4):340-5. doi: 10.1038/icb.2014.11.

9. Pushkarev VM, Sokolova LK, Pushkarev VV, Tronko MD. The role of AMPK and MTOR in the development of insulin resistance and type 2 diabetes. The mechanism of metformin action (literature review). *Problemi Endokrinnoi Patologii.* 2016;(3):77-90. (in Ukrainian).

10. Galic S, Fullerton MD, Schertzer JD, et al. Hematopoietic AMPK  $\beta 1$  reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity. *J Clin Invest.* 2011 Dec;121(12):4903-15. doi: 10.1172/JCI58577.

11. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern. *Chem Biol.* 2012 Oct 26;19(10):1222-36. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.08.019.

12. Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev.* 2007 Jan;8(1):21-34. doi: 10.1111/j.1467-789X.2006.00270.x.

13. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Mar 25;316(2):129-39. doi: 10.1016/j.mce.2009.08.018.

14. Kirchner H, Heppner KM, Tschöp MH. The role of ghrelin in the control of energy balance. *Handb Exp Pharmacol.* 2012;(209):161-84. doi: 10.1007/978-3-642-24716-3\_7.

Received 07.02.2019 ■

Соколова Л.К., Пушкарев В.М., Бельчина Ю.Б., Пушкарев В.В., Вацеба Т.С., Тронько Н.Д.  
 ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины», г. Киев, Украина

### Ассоциация активности 5'АМФ-активированной протеинкиназы с длительностью заболевания и содержанием HbA1c в лейкоцитах пациентов с сахарным диабетом

**Резюме. Актуальность.** 5'АМФ-активированная протеинкиназа (АМФК) — фермент, который управляет энергетическим балансом клетки. При энергетическом напряжении в клетке и увеличении концентрации АМФ АТФ меняется в обменных центрах АМФ, приводя к аллостерической активации АМФК фосфорилированием треонина-172  $\alpha$ -субъединицей LKB1-комплекса в ответ на изменения в клеточной энергии или САМКК $\beta$ , который активизирует внутриклеточный Са<sup>2+</sup>. **Цель исследования** — изучить деятельность главного сенсора энергии клеток — АМФК в лейкоцитах пациентов, получающих препараты инсулина, метформин и другие сахароснижающие лекарственные средства в зависимости от продолжительности болезни и концентрации гликированного гемоглобина (HbA1c). **Материалы и методы.** Пациенты с сахарным

диабетом, получавшие моно- или комбинированную терапию инсулином и его аналогами, метформин, дапаглифлозином и производными сульфонилмочевины, были разделены на 5 групп: первая — с уровнем HbA1c, близким к норме, 6,9–7,6 %; вторая — 7,6–9,0 %; третья — > 9 %; четвертая — > 10 %; пятая — > 11 %. Для определения количества фосфо-АМФК использовали ИФА-наборы. **Результаты.** Установлено, что с увеличением количества HbA1c в крови уровень активности АМФК в лейкоцитах постепенно снижается. Активность АМФК в лейкоцитах пациентов с длительностью заболевания ~ 20 лет была в три раза ниже, чем у больных с 10-летним стажем. Увеличение цитозолей в восстановленной форме играет центральную роль в управлении аденозинмонофосфат-активированной протеинкиназой. Высокие условия питания,

такі як діабетическа середина, збільшують відношення відновлених форм до окислених через каскади, включаючи поліольний шлях. Це змінення окислювально-відновлювального потенціалу зв'язано з резистентністю до інсуліну й розвитком діабетических ускладнень.

**Висновки.** Таким чином, активність АМФК у лейкоцитах може бути індикатором діабетическої компенсації у пацієнтів з цукровим діабетом.

**Ключові слова:** цукровий діабет; 5'АМФ-активована протеїнкіназа; глікований гемоглобін

Соколова Л.К., Пушкар'юв В.М., Бельчина Ю.Б., Пушкар'юв В.В., Вацеба Т.С., Тронько М.Д.  
ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», м. Київ, Україна

### Асоціація активності 5'АМФ-активованої протеїнкінази з тривалістю захворювання та вмістом HbA1c у лейкоцитах пацієнтів із цукровим діабетом

**Резюме. Актуальність.** 5'АМФ-активована протеїнкіназа (АМФК) — фермент, який керує енергетичним балансом клітини. При енергетичному напруженні в клітині й збільшенні концентрації АМФ АТФ замінюється в обмінних центрах АМФ, що призводить до алостеричної активації АМФК фосфорилуванням треоніну-172  $\alpha$ -субодиницею LKB1-комплексу у відповідь на зміни в клітинній енергії або САМКК $\beta$ , який активізує внутрішньоклітинний Ca<sup>2+</sup>. **Мета дослідження** — вивчити діяльність головного сенсора енергії клітини — АМФК у лейкоцитах пацієнтів, які отримують препарати інсуліну, метформін чи інші цукрознижувальні лікарські засоби залежно від тривалості хвороби й концентрації глікованого гемоглобіну (HbA1c). **Матеріали та методи.** Пацієнти з цукровим діабетом, які отримували моно- або комбіновану терапію інсуліном і його аналогами, метформіном, дапагліфлозином і похідними сульфонілсечовини, були розділені на 5 груп: перша — із рівнем HbA1c, близьким до норми, 6,9–7,6 %; друга — 7,6–9,0 %; третя — > 9 %;

четверта — > 10 %; п'ята — > 11 %. Для визначення кількості фосфо-АМФК використали ІФА-набори. **Результати.** Встановлено, що зі збільшенням вмісту HbA1c у крові рівень активності АМФК у лейкоцитах поступово знижується. Активність АМФК у лейкоцитах пацієнтів із тривалістю захворювання ~ 20 років була втричі нижчою, ніж у хворих із 10-річним стажем. Збільшення цитозолей у відновленій формі відіграє центральну роль в управлінні аденозинмонофосфат-активованою протеїнкіназою. Високі умови харчування, такі як діабетичне середовище, збільшують співвідношення відновлених форм до окислених через каскади, включаючи поліольний шлях. Ця зміна окислювально-відновлювального потенціалу пов'язана з резистентністю до інсуліну й розвитком діабетических ускладнень. **Висновки.** Таким чином, активність АМФК у лейкоцитах може бути індикатором діабетическої компенсації в пацієнтів із цукровим діабетом.

**Ключові слова:** цукровий діабет; 5'АМФ-активована протеїнкіназа; глікований гемоглобін