

Министерство Здравоохранения Российской Федерации

САНКТ — ПЕТЕРБУРГСКАЯ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ ХИМИКО-
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ

На правах рукописи

 РБФ ОА

НИКОЛАЕВ  4 ДЕК 2000

Сергей Леонидович

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ИНСУЛИНА В
ЭРИТРОЦИТАХ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ**

Специальность 03.00.04 - Биохимия

Автореферат диссертации на
соискание ученой степени кандидата
биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2000

Работа выполнена на кафедре биологической химии
Санкт-Петербургской Государственной Химико-Фармацевтической
Академии

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Комов В. П.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор,

заслуженный деятель наук РФ Михайлов С.С.

доктор медицинских наук, профессор Пучкова Л.В.

Ведущая организация: Санкт-Петербургский Государственный Медицинский
Университет им. И.П.Павлова.

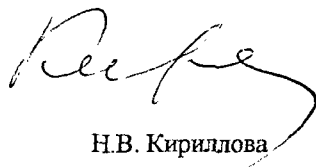
Защита состоится " 25 " декабря 2000 г. в 12 часов
на заседании диссертационного Совета К 084.63.01 при Санкт-
Петербургской Государственной Химико-Фармацевтической Академии по
адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке академии.

Автореферат диссертации разослан "24" ноября 2000 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета,

кандидат биологических наук



Н.В. Кириллова

Р415.160.23-3, 0

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность исследований.

Сахарный диабет является одной из важных медико-социальных проблем здравоохранения практически всех стран мира.

Большая социальная значимость сахарного диабета состоит в том, что он приводит к ранней инвалидизации и летальности, которая обусловлена наличием поздних сосудистых осложнений диабета: микроангиопатии (ретинопатия и нефропатия), макроангиопатии (инфаркт миокарда, инсульт, гангрена нижних конечностей), нейропатии. Сахарный диабет является частой причиной слепоты, смерти от уремии. У больных диабетом наиболее велик риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. Более 40% всех, не обусловленных травмой ампутаций нижних конечностей, проводится в связи с синдромом диабетической стопы и гангреной нижних конечностей (Дедов И.И. и др. 1997).

Уменьшить текущие расходы на оказание медицинской помощи больным диабетом, снизить заболеваемость сахарным диабетом, частоту поздних осложнений диабета и повысить качество жизни больных возможно при осуществлении ранней диагностики сахарного диабета.

На протяжении последних лет на кафедре биохимии СПХФА проводятся целенаправленные исследования обмена инсулина в различных тканях экспериментальных животных. Показано, в частности, что инсулин стимулировал синтез таких ферментов, как альдолаза и супероксиддисмутазы (Комов et al., 1981). Доказано образование 7 радиоактивных фрагментов инсулина после ограниченного протеолиза посредством специфической протеиназы. Раскрыты молекулярные механизмы влияния фрагментов инсулина на синтез белка (Комов et al., 1987). Доказан факт интернализации гормон рецепторного комплекса в цитоплазматическом мембраны (Carpentier et al., 1985). Имеются данные о

наличии инсулин расщепляющих протеиназ в цитоплазме и о возможной биологической активности образующихся фрагментов гормона (Duckworth et al. , 1979; Steiner , 1976). Доказательство наличия радио иммунного инсулина в эритроцитах человека и тот факт, что концентрация инсулина в эритроцитах в несколько раз выше, чем в плазме крови (Agardh C.D. et al., 1986; Snehalatha C. et al.,1990), повлекло за собой исследования метаболизма этого гормона в клетках, которые до недавнего времени считались узкоспециализированными переносчиками кислорода. В 1981 г. обнаружена способность лизата эритроцитов деградировать ^{125}I -инсулин до фрагментов, растворимых в трихлоруксусной кислоте (Nerurkar.S.G. et al., 1981). Как и большинство клеток, наделенных ядрами, эритроциты кроме мембранных инсулиновых рецепторов обладают внутриклеточной инсулиновой активностью (Gambhir K.K. et al.,1988). Было предположено, что параметры связывания и деградации инсулина эритроцитами зависят от концентрации этого гормона в плазме крови. На основании этого нами поставлена задача исследовать регуляторные механизмы связывания и деградации инсулина эритроцитами крыс и человека.

Цель и задачи работы.

Представленное исследование проведено с целью изучения инсулин деградирующего комплекса эритроцитов млекопитающих при экспериментальном аллоксановом диабете для сравнения с изменениями в активности такого комплекса человеческих эритроцитов. Исследование молекулярных механизмов метаболизма инсулина проведено для оценки вклада компонентов инсулин деградирующего комплекса эритроцитов в этот процесс. Кроме того, целью данного исследования являлось обнаружение изменений параметров связывания инсулина эритроцитами при диабете. В связи с этим, необходимо было решить следующие задачи:

1. Разработать схему выделения и очистки инсулиназы, а также инсулиназного ингибитора из лизата эритроцитов.

2. Определить количество и аффинность инсулиновых рецепторов мембраны эритроцитов крыс в норме и на разных стадиях развития экспериментального диабета.

3. Изучить активность компонентов инсулин деградирующего комплекса эритроцитов крыс в норме и на разных стадиях развития экспериментального диабета.

4. Изучить активность инсулин деградирующего комплекса эритроцитов человека, количество и аффинность инсулиновых рецепторов мембраны эритроцитов человека в норме и при инсулин зависимом диабете.

5. Сопоставить результаты экспериментальных и клинических исследований инсулин деградирующего комплекса и инсулиновых рецепторов эритроцитов. Оценить возможность использования этих данных для ранней диагностики инсулин зависимого диабета у человека.

Научная новизна.

Впервые охарактеризованы свойства высоко- и низко-аффинных инсулиновых рецепторов мембраны эритроцитов при аллоксановом диабете у крыс и инсулин зависимом диабете у человека. Обнаружен и охарактеризован эндогенный, низко-молекулярный ингибитор эритроцитарной инсулиназы. Изучено влияние этого ингибитора на инсулиназу и изменение его активности в плазме крови и в эритроцитах при экспериментальном диабете у крыс и инсулин зависимом диабете у

человека. Из гепатоцитов крыс выделен высоко-молекулярный ингибитор инсулиназы и охарактеризована его активность при экспериментальном диабете. Установлено, что механизмы компенсации инсулинопении у крыс осуществляются при эритропозе, путем уменьшения синтеза инсулиновых рецепторов и цитозольной инсулиназы эритроцитов. Основной причиной уменьшения деградации инсулина в гепатоцитах крыс является снижение синтеза инсулиназы гепатоцитами при экспериментальном диабете. Выявлено, что при беременности, происходит увеличение связывания инсулина рецепторами эритроцитов и увеличение деградации инсулина в эритроцитах. При диабете у беременных и не беременных женщин происходит уменьшение, как связывания, так и деградации инсулина эритроцитами.

Теоретическое и практическое значение.

В результате выполнения работы оптимизированы методы выделения и очистки компонентов инсулин деградирующего комплекса эритроцитов. Это позволило получить инсулиназу лизата эритроцитов и инсулиназный ингибитор из лизата эритроцитов с достаточно высокой степенью очистки. Полученные результаты показывают зависимость инсулин деградирующей активности эритроцитов от содержания инсулина в крови. В результате исследований связывания инсулина рецепторами мембраны эритроцитов установлено наличие двух типов инсулиновых рецепторов. Установлено, что количество и сродство этих рецепторов на мембране эритроцитов зависит от концентрации инсулина в крови. Изучение инсулиназного ингибитора из лизата эритроцитов позволило установить зависимость его активности от инсулинопении. Исследование обмена инсулиназы в гепатоцитах и зависимость ее активности от стадий экспериментального диабета показали, что активность этого фермента формируется на уровне его синтеза. Изменения активности компонентов инсулин деградирующего

комплекса эритроцитов могут служить критериями диагностики инсулин зависимого диабета у человека.

Положения, представляемые на защиту.

1. Активность компонентов инсулин деградирующего комплекса эритроцитов и гепатоцитов, а также связывание инсулина эритроцитами зависят от концентрации его в крови.

2. Существует корреляция между параметрами деградации и связывания инсулина эритроцитами животных при экспериментальном аллоксановом диабете и человека при инсулин зависимом диабете.

3. Связывание и деградация инсулина эритроцитами женщин изменяются при беременности и инсулин зависимом диабете. Изменения параметров как связывания, так и деградации инсулина эритроцитами могут учитываться при диагностике инсулин зависимого диабета.

Апробация работы.

Материалы диссертационной работы были представлены на "Юбилейной Конференции Молодых Ученых", посвященной 200 летию Военно-Медицинской Академии в Санкт-Петербурге в 1998 г. и на Международной конференции "Фармация в 21 веке: инновации и традиции" в Санкт-Петербурге в 1999 г.

Объем работы.

Текст диссертации изложен на 181 странице и иллюстрирован 17 таблицами, 14 диаграммами и 22 рисунками. Диссертация включает в себя "введение", "обзор литературы", "материалы и методы исследования", "результаты исследований" и их обсуждение, "выводы", "список

литературы", содержащий 180 наименований работ отечественных и зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Модель диабета создавалась на белых беспородных крысах самцах весом 160-180 гр. внутрибрюшинным введением раствора аллоксана в 0,9% растворе NaCl из расчета 150 мг/кг веса. Стадии экспериментального диабета устанавливали в зависимости от изменения концентрации глюкозы в крови. В норме содержание глюкозы составляло 80 мг%. Первая стадия соответствовала максимальному повышению концентрации глюкозы в крови крыс до - 500 мг%, что наблюдалось на 3-й день после инъекции аллоксана. Вторая стадия соответствовала снижению концентрации глюкозы в крови до нормального уровня на 7-й день после введения аллоксана. Третья стадия соответствовала 21-м суткам со дня введения аллоксана, и характеризовалась нормальным содержанием глюкозы в крови.

Для изучения инсулиновых рецепторов и для характеристики инсулин деградирующего комплекса использовали эритроциты из венозной крови человека. Исследования проводились в четырех группах: 1) небеременных женщин в норме, 2) небеременных женщин, больных диабетом первого типа, 3) беременных женщин в норме, 4) беременных женщин, больных диабетом первого типа.

Эритроциты получали фракционированием крови в градиенте плотностей верографина и фикколла. Инсулиназу выделяли при помощи ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе с последующим использованием аффинной хроматографии. Молекулярную массу инсулиназы и ее эндогенного ингибитора определяли методом диск-электрофореза в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) с 1% ДС-натрия

(Weber и Osborn, 1969). Препарат ^{125}I -меченого инсулина был получен йодированием рекомбинантного инсулина по хлорамин-Т методу. Средняя специфическая радиоактивность препарата составляла 80 мкКю/мкг. ^{125}I -меченый инсулин более чем на 95% осаждался в 5% трихлоруксусной кислоте. Инсулин деградирующую активность определяли измерением прироста ТХУ растворимых фрагментов инсулина в супернатанте до, и после инкубации проб. Для этого использовали радиохимический метод с использованием ^{125}I -инсулина и метода Мура Штейна. Термо-кислотоустойчивый низкомолекулярный ингибитор инсулиназы (ТКУИ) получали из сыворотки крови и гемолизата. Определение наличия гликозидной и липидной частей в составе ингибитора инсулиназы проводили при помощи качественных реакций с α -нафтолом и фосфо-молибденовой кислотой соответственно. Процент ингибирования определяли по формуле: $C = \frac{(V_0 - V_i)}{V_0} \times 100$ C – процент ингибирования. V_0 - скорость реакции в пробе без ингибитора. V_i - скорость реакции в пробе с ингибитором.

Связывание инсулина с рецепторами эритроцитов определяли с использованием ^{125}I -инсулина. Процент специфически связанного инсулина при разных концентрациях не меченого инсулина определяли вычитанием процента связанного ^{125}I -меченого инсулина при концентрации $1 \cdot 10^5$ нг/мл не меченого инсулина в инкубационной среде из общего процента ^{125}I -меченого инсулина, связанного при каждой концентрации не меченого инсулина. Количество каждого типа инсулиновых рецепторов на эритроцит было вычислено при помощи анализа по методу Скэггарда. Среднее количество инсулиновых рецепторов эритроцитов крыс определяли по формуле: $K = \frac{M}{C} \times 6,03 \times 10^{23}$, где K - количество мест связывания. M - количество связанного инсулина (моль/л). C - концентрация клеток на литр.

Антисыворотку к протеиназе получали, иммунизируя кроликов гомогенным препаратом инсулиназы из гепатоцитов крыс. Специфичность антител оценивали методом иммунодиффузии в 1% агаре Дифко (Оухтерлони, 1950). Константы скорости синтеза, распада и время функционирования фермента определяли по методу Шимке и соавт. (1975). При изучении кругооборота протеиназы меченный H^3 -лейцин вводили крысам веса 150 г из расчета 600 мкКи/мл (удельная радиоактивность 2,9 ГБК). Оценку скорости синтеза и распада фермента проводили в интервале от 15 минут до 48 часов после инъекции H^3 -лейцина. После введения

H^3 -лейцина осуществляли иммунопреципитацию протеиназы специфической антисывороткой. Полученные осадки анализировали радионуклидным методом. Радиоактивность проб измеряли на спинтиляционном счетчике "Mark III" (США). Из экспериментальных кривых, характеризующих скорости спонтанной деградации цитозольной протеиназы, были рассчитаны константы деградации (K_d), синтеза (K_c) и концентрация фермента в цитозольной фракции гепатоцитов (E).

Электрофорез проводили по методу Девиса. Все данные были обработаны методом вариационной статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Экспериментальные исследования.

При анализе специфического связывания инсулина рецепторами эритроцитов крыс видно, что на первой стадии экспериментального диабета процент специфического связывания достоверно не отличается от этого показателя в норме (Рис. 1). Специфическое связывание инсулина на второй стадии экспериментального диабета повышается на 78%. Это позволяет говорить о стимулирующем влиянии инсулинопения на формирование

инсулин связывающего аппарата эритроцитов с 3-х по 7-е сутки со дня введения аллоксана. Уменьшение процента специфического связывания на третьей стадии экспериментального диабета показывает возникновение компенсаторной реакции эритроцитов на инсулинопению. При этом, снижение связывания инсулина эритроцитами ведет к уменьшению его метаболизма этими клетками в условиях дефицита инсулина в крови. Эти результаты говорят о том, что механизмы компенсации инсулинопении на уровне связывания инсулина эритроцитами формируются с 7-х по 21-е сутки со дня введения аллоксана.

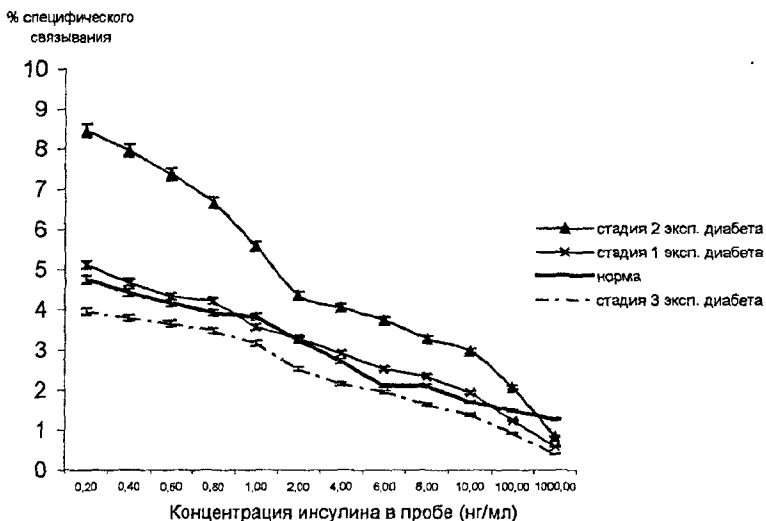


Рисунок 1. Процент специфического связывания инсулина рецепторами эритроцитов крыс в норме и на разных стадиях экспериментального диабета.

Как известно, связывание инсулина с рецепторами определяется количеством мест связывания на клетку и сродством рецепторов к инсулину. Обратная зависимость сродства инсулиновых рецепторов к инсулину от концентрации его в инкубационной среде, позволяет говорить о двух функциональных типах рецепторов: обладающих высоким

сродством к субстрату при малых концентрациях субстрата и низким сродством к субстрату при высоких концентрациях субстрата в инкубационной среде (Herzberg V. et al., 1980; Kaplan S.A., 1984). Литературные данные по связыванию инсулина с рецепторами мембран эритроцитов посвящены описанию средних параметров связывания без дифференцировки на высоко- и низко-аффинные рецепторы (Gambhir K.K. et al. 1991). Тем не менее, представляется целесообразным описание свойств отдельно высоко-аффинных и низко-аффинных инсулиновых рецепторов в норме при остром диабете и при адаптации. Вероятно, изменение сродства рецепторов к инсулину происходит вследствие изменения положения рецептора в мембране эритроцита, а точнее его погруженности в мембрану. На первой стадии экспериментального диабета сродство низко-аффинных рецепторов уменьшается с $13,8 \pm 0,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ в норме до $4,8 \pm 0,1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, т.е. почти в 3 раза. Количество этого типа рецепторов также уменьшается с $194 \pm 4,5$ в норме до $162 \pm 4,0$, т.е. на ~20%. Что касается высоко-аффинных рецепторов, то сродство их к инсулину также снижалось с $18,2 \pm 0,3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ в норме до $14,6 \pm 0,1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, т.е. на ~27%, тогда как количество этого типа рецепторов повышалось с $632 \pm 7,1$ в норме до $745 \pm 7,9$ т.е. на ~18%. Отсутствие достоверных изменений специфического связывания инсулина эритроцитами крыс на первой стадии экспериментального диабета связано с тем, что уменьшение сродства к инсулину высоко- и низко- аффинных инсулиновых рецепторов и уменьшение количества низко-аффинных рецепторов компенсируется увеличением количества высоко-аффинных рецепторов.

На второй стадии экспериментального диабета происходит повышение сродства низко-аффинных рецепторов к инсулину до $20,8 \pm 0,13 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, т.е. на ~51% по отношению к норме и повышением количества рецепторов до $291 \pm 5,3$ на эритроцит, т.е. на ~50%. Сродство высоко-аффинных рецепторов на второй стадии экспериментального

диабета повышается до $27,1 \pm 0,17 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, т.е. на $\sim 50\%$ относительно нормы. Количество этих рецепторов не значительно понижается до $713 \pm 6,9$, но, тем не менее, остается выше нормы на $\sim 13\%$. Очевидно, что повышение уровня сродства и количества обоих типов инсулиновых рецепторов объясняет повышение специфического связывания инсулина эритроцитами на второй стадии экспериментального диабета.

На третьей стадии экспериментального диабета сродство низко-аффинных рецепторов понижено в 2,6 раза относительно нормы и составляет $5,4 \pm 0,1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$. Количество низко-аффинных рецепторов на третьей стадии экспериментального диабета понижено до $161 \pm 6,2$ или на 20% по отношению к норме. Сродство высоко-аффинных рецепторов к инсулину на третьей стадии снижается до $11,5 \pm 0,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, что на 58% ниже нормального уровня. Количество этих рецепторов на третьей стадии уменьшается до $591 \pm 7,0$ на эритроцит, что ниже нормального количества на 7%. Приведенные выше данные свидетельствуют о компенсаторном снижении, как сродства, так и количества обоих типов инсулиновых рецепторов, что ведет к уменьшению связывания и последующей деградации инсулина эритроцитами в условиях его дефицита.

Результаты исследования инсулиназы, представленные в работе характеризуют изменение активности и кинетических параметров ее на стадиях экспериментального диабета. В нашей работе инсулиназа из лизата эритроцитов крыс очищена в 2580 раз, выход составил 12,2%. Полученный препарат инсулиназы являлся гомогенным. Молекулярная масса инсулиназы составила 78000 Да. Результаты исследований показали, что максимальная активность инсулиназы эритроцитов крыс наблюдается при pH 7,8, тогда как при pH ниже 7,0 и выше 8,5 она резко понижается. Характер ингибирования, а также активация сульфгидрильными агентами позволяет отнести выделенный фермент к тиоловым протеиназам. Кроме

того, обнаружена зависимость активности инсулиназы от таких металлов, как Ca^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} .

Активность инсулиназы находится под двойным генетическим контролем, обусловленным синтезом собственно фермента и синтезом его эндогенных ингибиторов. В связи с этим, в представленной работе исследован эндогенный ингибитор инсулиназы из эритроцитов и плазмы крови крыс. Разработан метод выделения и очистки ингибитора, позволивший очистить его в 2500 раз. Молекулярная масса ингибитора составила 2400 Да. По природе он представлял собой глико-липо протеид и являлся специфическим ингибитором инсулиназы. Для этого ингибитора установлен неконкурентный тип ингибирования инсулиназы. Установлено, что в плазме крови и в лизате эритроцитов присутствует одинаковый по природе и свойствам ингибитор эритроцитарной инсулиназы.

Изучение инсулин деградирующего комплекса эритроцитов крыс на первой стадии экспериментального диабета показало, отсутствие достоверного изменения активности термо-кислотоустойчивого ингибитора инсулиназы, выделенного из лизата эритроцитов (Таб. 1). При этом активность инсулиназы лизата эритроцитов значительно уменьшалась (Таб. 2).

Таблица 1.

Активность ингибиторов инсулиназы из лизата эритроцитов и плазмы крови крыс на разных стадиях экспериментального диабета.

Источник ингибитора	Активность термо-кислотоустойчивого ингибитора (%)			
	норма	Стадии экспериментального диабета		
		Стадия-1	Стадия-2	Стадия-3
лизат эритроцитов	21,4±1	21,8±1*	13±1,1	28,4±1
плазма крови	27,7±1	26,3±1,2*	40,4±1,3	34,2±1,2

Применчание: * $p > 0,05$

Объяснением этого уменьшения может быть трансмембранный переход внутри эритроцитарной инсулиназы в плазму крови. Это предположение подкрепляется тем, что на первой стадии экспериментального диабета в пуле эритроцитов не происходит изменения за счет выхода в кровь эритроцитов, созревающих в условиях инсулинопении.

На второй стадии экспериментального диабета, инсулиназная активность лизата эритроцитов повышается до $116,4 \pm 1,5\%$. Это повышение активности сопровождается уменьшением активности эритроцитарного ингибитора инсулиназы на 64% относительно нормального уровня (Таб. 1). Увеличение ингибирующей инсулиназу активности плазмы крови на этой стадии диабета объясняется трансмембранным переходом ингибитора из эритроцитов в плазму крови. На основании представленных данных можно сделать предположение о преимущественном влиянии эндогенного ингибитора на инсулиназную активность эритроцитов на второй стадии экспериментального аллюксанового диабета.

На третьей стадии происходит уменьшение как средства инсулиназы к инсулину, так и максимальной скорости реакция. Что касается активности эритроцитарного ингибитора инсулиназы, то его активность на этой стадии выше нормы на 32%. Эти данные являются объяснением снижения инсулин деградирующей способности эритроцитов до $74,5 \pm 1,5\%$ относительно нормы (Таб.2).

Активность плазменного и внутри эритроцитарного ингибитора при остром экспериментальном диабете достоверно не изменяется (Таб.1.). Увеличение активности ингибитора в плазме крови на второй стадии экспериментального диабета сопровождалось уменьшением активности внутри-эритроцитарного ингибитора. Возможно, это связано с изменением проницаемости мембраны и перемещением ингибитора из эритроцитов в плазму крови. Повышение ингибиторной активности плазмы крови и лизата

эритроцитов на третьей стадии экспериментального диабета может быть объяснено увеличением синтеза этого компонента инсулин деградирующего комплекса.

Результаты проведенных исследований показали, что при остром экспериментальном аллоксановом диабете инсулин деградирующая активность лизата эритроцитов понижается на $23 \pm 1,3\%$ по отношению к норме принятой за $100 \pm 1,3\%$. На второй стадии эксперимента, инсулиновая активность лизата эритроцитов повышается до $112,1 \pm 1,5\%$, а на третьей стадии экспериментального диабета происходит уменьшение этого показателя до $71,4 \pm 1,3\%$ относительно нормы (Рис. 2).

Инсулиновая
активность (%)

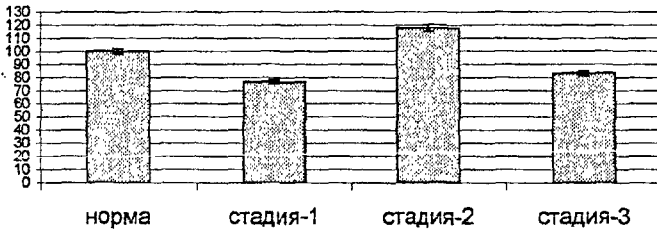


Рисунок 2. Инсулиновая активность лизата эритроцитов крыс в норме и при экспериментальном диабете.

Изучение свойств мембрано-связанной инсулиназы эритроцитов показало, что этот фермент и растворимая инсулиназа эритроцитов обладают практически идентичными свойствами. Для определения вклада мембранной инсулиназы в деградацию инсулина был сопоставлен уровень инсулин деградирующей активности растворимой и мембрано-связанной инсулиназ эритроцитов (Таб. 2).

Таблица 2.

Сопоставление уровня инсулиновой активности лизата и мембраны эритроцитов крыс.

	Стадии экспериментального диабета			
	норма (%)	Стадия-1 (%)	Стадия-2 (%)	Стадия-3 (%)
Отношение инсулиновой активности эритроцита при патологии к инсулиновой активности эритроцита здоровой крысы	100±1,3	77,5±1,3	116,4±1,5	74,5±1,5
Отношение активности растворимой инсулиназы эритроцита к инсулиновой активности эритроцита здоровой крысы	95,4±1,3	73±1,3	112,1±1,5	71,35±1,3
Отношение активности мембранной инсулиназы эритроцита к инсулиновой активности эритроцита здоровой крысы	4,6±0,3	4,5±0,3	4,3±0,5	4,4±0,5

$p < 0,05$

Экспериментальные данные показывают, что инсулин деградирующая активность эритроцитов определяется растворимой эритроцитарной инсулиназой на ~ 95,5%, а мембрано-связанной инсулиназой на ~ 4,5% в норме. При этом активность мембрано-связанной инсулиназы, в отличие от растворимой эритроцитарной, остается без изменений при экспериментальном диабете, что, вероятно, говорит о ее большей стабильности.

При исследовании активности инсулин деградирующего комплекса в эритроцитах - клетках, не обладающих белок-синтезирующей системой, получены данные, которые интересно сравнить со свойствами инсулин деградирующего комплекса белок-синтезирующих клеток - гепатоцитов.

Использование высаливания сульфатом аммония, ионообменной, гель- и аффинной хроматографии, позволило получить протеиназу из цитозольной фракции гепатоцитов крыс со степенью очистки в 170 раз и выходом 10,2%. Молекулярная масса этой протеиназы идентична молекулярной массе инсулиназы из эритроцита. Результаты определения кинетических параметров протеиназы цитозоля гепатоцитов в норме показали, что она обладает несколько большим сродством к инсулину, чем инсулиназа из лизата эритроцитов. Характер зависимости активности протеиназы гепатоцитов от металлов, сульфгидрильных агентов, и ингибирование фермента п-хлораминомеркурийбензоатом дает основание отнести выделенную инсулиназу к металлозависимым тиоловым протеиназам. Анализ активности и кинетических констант протеиназы, выделенной из гепатоцитов, в отношении ряда синтетических и белковых субстратов показывает, что наилучшим субстратом для нее является инсулин, т.е. она является истинной инсулиназой. Уменьшение инсулиназной активности цитозоля гепатоцитов при остром экспериментальном аллоксановом диабете в 5 раз по сравнению с нормой отражает прямую зависимость активности фермента от концентрации инсулина в крови.

Таблица 3.

Кинетические параметры инсулиназы цитозоля гепатоцитов крыс в норме и при остром экспериментальном диабете.

	В норме	При диабете
K_m инсулиназы гепатоцитов (M)	$1,1 \pm 0,2 \cdot 10^{-8}$	$0,5 \pm 0,6 \cdot 10^{-8}$
V_{max} инсулиназы гепатоцитов (M)	$93,5 \pm 11,1 \cdot 10^{-8}$	$14,1 \pm 1,2 \cdot 10^{-8}$

Увеличение сродства к инсулину при понижении V_{max} инсулиназы цитозоля гепатоцитов при остром экспериментальном диабете

сопровожаются увеличением активности эндогенного ингибитора инсулиназы, полученного из цитозоля гепатоцитов (Таб. 3,4).

Таблица 4.

Активность термо-кислотоустойчивого ингибитора из цитозоля гепатоцитов крыс в норме и при экспериментальном диабете по отношению к контролю.

Источник ингибитора	Ингибирующая активность в норме (%)	Ингибирующая активность при остром эксп. диабете (%)
Ингибитор из цитозоля гепатоцитов крыс	100±1,1	257,5±1,2

Однако, увеличение активности ингибитора не полностью объясняет уменьшение инсулин деградирующей способности гепатоцита. Ответ на возникающий вопрос дает изучение обмена цитозольной протеиназы гепатоцитов крыс в норме и при экспериментальном диабете.

Таблица 5.

Обмен цитозольной инсулиназы гепатоцитов крыс в норме и при экспериментальном диабете.

Параметры	Kd, час ⁻¹	t½, час	Ks Мкг/г, час	E Мкг/г
норма	0,049±0,005	14,3±1,5	10±0,3	204,0±12,0
диабет	0,127±0,03	5,5±0,9	5,6±0,5	44,0±5

Из таблицы 5 следует, что время “полужизни” цитозольной протеиназы составляло 14 часов и за 1 час синтезируется 10 мкг фермента. Стабильность фермента характеризуется константой деструкции, ее расчетное значение составило 0,049 час⁻¹. Из таблицы 5 видно, что концентрация инсулиназы в цитозоле гепатоцитов при экспериментальном диабете уменьшается примерно в 4,5 раза, что, вероятно, может служить подтверждением регуляции активности инсулиназы в гепатоцитах на уровне синтеза фермента.

Клинические исследования.

При анализе связывания инсулина рецепторами эритроцитов у женщин видно, что эритроциты человека специфически связывают больше инсулина, чем эритроциты крыс (Рис. 3).

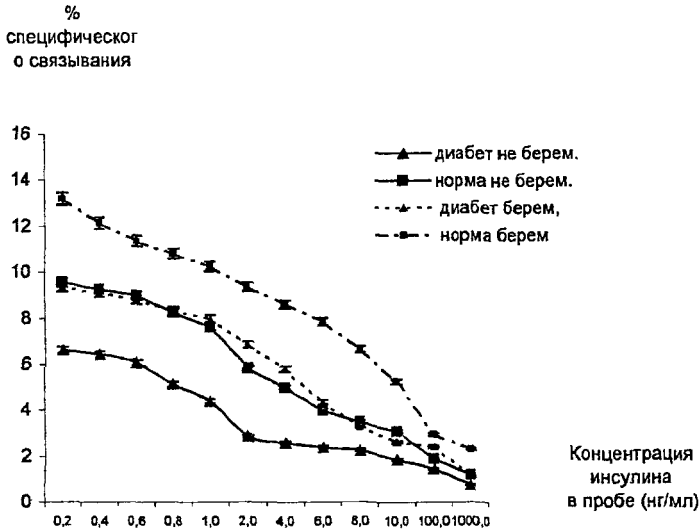


Рисунок 3. Специфическое связывание инсулина рецепторами эритроцитов человека в норме и при инсулин-зависимом диабете.

Представленные данные показывают, что в норме у беременных женщин процент специфического связывания инсулина выше, чем у небеременных, что, вероятно обусловлено повышением интенсивности метаболизма этого гормона при беременности. При инсулин-зависимом диабете у небеременных и беременных женщин, эритроциты специфически связывали меньше инсулина на 44% и 41% соответственно. Сравнение этого параметра связывания инсулина с экспериментальной моделью диабета позволяет провести параллель между этими состояниями, так как на третьей стадии эксперимента специфическое связывание инсулина эритроцитами крыс тоже понижалось, правда, менее значительно. Эта связь

прослеживается в реакции эритроцитов на инсулинопению, возникающую, как в эксперименте, так и при инсулин зависимом диабете у человека, когда уменьшение связывания инсулина эритроцитами ведет к снижению его метаболизма этими клетками в условиях дефицита инсулина в крови. Эти результаты говорят о том, что механизмы компенсаторной реакции на инсулинопению на уровне связывания инсулина эритроцитами формируются как у крыс, так и у человека при эритропоэзе.

Как и на модели диабета у крыс, у человека изучены параметры двух функциональных типов рецепторов: обладающих высоким сродством к субстрату при малых концентрациях субстрата и низким сродством к субстрату при высоких концентрациях субстрата в инкубационной среде. Исследования рецепторов эритроцитов небеременных женщин показали, что у низко-аффинных рецепторов при диабете сродство к инсулину уменьшается с $27,2 \pm 0,1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ до $24,6 \pm 0,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ т.е. на $\sim 10,6\%$. Количество этого типа рецепторов при диабете также уменьшается с $534 \pm 5,1$ в норме до $326 \pm 4,2$ при диабете, т.е. на $\sim 64\%$. Что касается высоко-аффинных рецепторов небеременных женщин, то при диабете сродство их к инсулину также снижалось с $43,1 \pm 0,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ в норме до $38 \pm 0,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, т.е. на $\sim 13,4\%$. Количество высоко-аффинных рецепторов при диабете у небеременных женщин также уменьшается с $1374 \pm 11,6$ в норме до $1198 \pm 10,9$ при диабете, т.е. на $14,7\%$. Вероятно, уменьшение процента специфического связывания инсулина эритроцитами как у крыс при экспериментальном диабете, так и у небеременных женщин при инсулин зависимом диабете происходит вследствие уменьшения как сродства к инсулину высоко- и низко- аффинных инсулиновых рецепторов так и уменьшения их количества.

При беременности в норме сродство как низко-аффинных, так и высоко-аффинных рецепторов к инсулину выше, чем при отсутствии беременности, что, вероятно, происходит из-за повышения метаболизма

инсулина при беременности. У больных диабетом беременных женщин по отношению к норме снижается как сродство низко-аффинных, так и сродство высоко-аффинных рецепторов к инсулину, на 12,3% и 17,2% соответственно. Количество низко-аффинных рецепторов при диабете у беременных женщин снижалось на 10,8% , а высоко-аффинных на 25,5%. Таким образом, изменения параметров связывания инсулина рецепторами мембран эритроцитов при беременности подчиняются тем же закономерностям, что и при отсутствии беременности, а именно, при инсулин зависимом диабете происходит уменьшение связывания инсулина. Это ведет к уменьшению проникновения инсулина в эритроцит, и как следствие, снижению скорости деградации инсулина в условиях инсулинопении.

В нашей работе инсулиназа из лизата эритроцитов человека очищена в 1990 раз, выход составил 13,5%. Полученный препарат инсулиназы из человеческих эритроцитов являлся гомогенным. Исследования показали, что эритроцитарная инсулиназа является тиоловой протеиназой. Оказалось, что основные свойства человеческой инсулиназы практически идентичны свойствам крысиной инсулиназы, что говорит о высокой консервативности этого фермента. В связи с тем, что кроме регуляции активности инсулиназы на уровне синтеза, регуляция может осуществляться за счет изменения активности специфических ингибиторов, в представленной работе исследован ингибитор инсулиназы из эритроцитов и плазмы крови человека. Отработана методика выделения и очистки ингибитора, позволившая очистить его в 2500 раз. Данные показывают, что выделенный термо-кислотоустойчивый ингибитор является специфическим для инсулиназы. Исследованный ингибитор по свойствам и качествам идентичен термо-кислотоустойчивому ингибитору из лизата эритроцитов и плазмы крови крыс.

Изучение кинетических параметров человеческой инсулиназы показали, что сродство эритроцитарной инсулиназы к инсулину у изученных групп пациентов изменяется незначительно. Результаты определения максимальной скорости реакции для инсулиназы в норме показали, что V_m человеческой инсулиназы выше этого показателя для крысиной инсулиназы. При беременности V_m инсулиназы лизата эритроцитов повышается примерно на 15%. При диабете максимальная скорость реакции для инсулиназы у небеременных понижается на 25%, а у беременных на 11%.

Определение активности термо-кислотоустойчивого ингибитора инсулиназы, выделенного из лизата эритроцитов показали, что достоверного изменения ингибирующей активности при инсулин зависимом диабете у небеременных и при беременности не отмечается (Рис. 4).

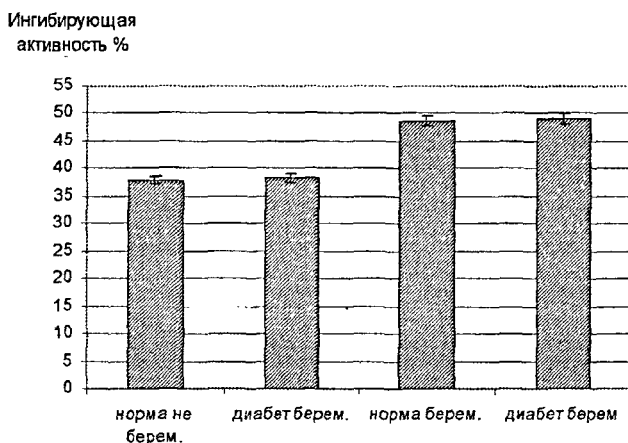


Рисунок 4. Активность ингибитора из лизата эритроцитов человека.

При этом, очевидно, что повышенный уровень активности этого ингибитора при беременности направлен на снижение деградации инсулина внутри эритроцитарной инсулиназой.

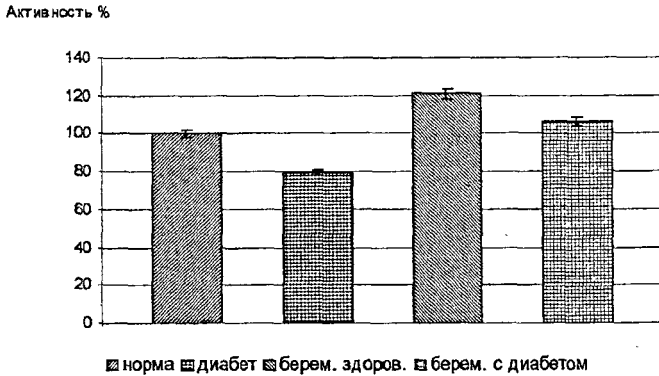


Рисунок 5. Инсулиназная активность лизата эритроцитов небеременных и беременных женщин в норме и при инсулин зависимом диабете.

Изучение инсулин деградирующей активности эритроцитов показало, что при инсулин зависимом диабете у небеременных женщин, инсулин деградирующая активность лизата эритроцитов понижается до $79,4 \pm 1,6\%$ по отношению к норме принятой за $100 \pm 1,4\%$ (Рис. 5). При беременности инсулин деградирующая активность лизата эритроцитов выше, чем в норме, но понижается при диабете на 11,2%. Исходя из выше сказанного видно, что уменьшение инсулин деградирующей активности эритроцитов при инсулин зависимом диабете не может быть объяснено влиянием сродства инсулиназы к инсулину и влиянием эндогенного ингибитора. Следовательно, есть основания предполагать, что регуляция деградации инсулина в эритроцитах осуществляется на уровне синтеза этого фермента в созревающих эритроцитах. Здесь прослеживается прямая

аналогия с третьей стадией экспериментального диабета, характеризующейся подобными изменениями инсулин деградирующего комплекса эритроцитов крыс. Этот факт говорит о том, что существуют общие биологические закономерности регуляции метаболизма инсулина в эритроцитах крыс и человека при диабетической инсулинопении.

ВЫВОДЫ.

1. Установлено, что содержание инсулина в крови влияет на интенсивность его связывания и деградации эритроцитами крыс и человека.

2. Впервые охарактеризованы свойства высоко- и низко-аффинных инсулиновых рецепторов мембраны эритроцитов крыс и человека при экспериментальной инсулинопении и инсулин зависимом диабете соответственно. Выделена и изучена инсулиназа из эритроцитов крыс и человека и гепатоцитов крыс.

3. Впервые обнаружен и охарактеризован эндогенный, низко молекулярный ингибитор эритроцитарной инсулиназы. Изучено влияние этого ингибитора на инсулиназу и изменение его активности в плазме крови и лизате эритроцитов при экспериментальном диабете у крыс и инсулин зависимом диабете у человека. Установлено наличие высокомолекулярного ингибитора в гепатоцитах крыс и охарактеризована его активность при экспериментальном диабете.

4. Установлено, что механизмы компенсации инсулинопении у крыс осуществляются в процессе эритропоэза, путем уменьшения синтеза инсулиновых рецепторов и растворимой инсулиназы

эритроцитов. Основной причиной уменьшения деградации инсулина в гепатоцитах крыс, также является уменьшение синтеза инсулиназы гепатоцитами при экспериментальном диабете.

5. Выявлено, что при беременности у женщин происходит увеличение связывания инсулина рецепторами эритроцитов и увеличение темпов деградации инсулина в эритроцитах. При диабете у беременных и не беременных женщин происходит уменьшение, как связывания, так и деградации инсулина эритроцитами.

Результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Комов В.П., Николаев С.Л., Стрелкова М.А. Инсулиназа как фактор регуляции содержания инсулина в крови в норме и при экспериментальном диабете. // В кн.: Тезисы докладов "Юбилейной Конференции Молодых Ученых, посвященной 200-летию ВМА", С-Петербург, 1998. С.92-93.

2. Николаев С.Л., Стрелкова М.А., Комов В.П. Метаболизм инсулина в эритроцитах крови крыс в норме и при экспериментальном диабете. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2001, №2, С.1

3. Николаев С.Л., Стрелкова М.А. Изучение эритроцитарной инсулиназы лизата эритроцитов крысы в норме и при экспериментальном диабете. // В кн.: Тезисы докладов международной конференции "Фармация в XXI веке: инновации и традиции". С-Петербург, 1999. С.184-185.