

Н. П. Микаелян, Ю. А. Князев, А. Г. Максина, Б. А. Дайняк, А. Е. Гурина, Э. П. Микаелян, Ф. С. Дзугоева

ИНСУЛИНРЕЦЕПТОРНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ И ЭПР-СПЕКТРОСКОПИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Российский государственный медицинский университет, Москва

Состояние инсулиновых рецепторов (ИР) при экспериментальном сахарном диабете изучено значительно меньше, чем при клиническом сахарном диабете, и полученные результаты не позволяют связать его изменения только с влиянием инсулина. Общеизвестным является тот факт, что при диабете значительно ускоряются процессы перекисного окисления липидов [3], особенно в мембранах и цитоплазме клеток, в частности эритроцитов [1, 2]. В наших предыдущих исследованиях было показано, что в мембранах эритроцитов у беременных с инсулинзависимым сахарным диабетом значительно возрастают процессы перекисного окисления липидов, и это коррелирует со связывающими параметрами ИР [6]. Подобно другим интегральным белкам ИР должен испытывать на себе влияние физико-химических сдвигов в липидном бислое мембраны. Этот вопрос мы исследовали путем определения связывающих параметров ИР эритроцитов, гепатоцитов, скелетных мышц и легочной ткани и структурных свойств плазматических мембран гепатоцитов, эритроцитов и легочной ткани с применением электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

Материалы и методы

Эксперименты ставили на 120 крысах линии Вистар. Диабет вызывали однократным внутрибрюшинным введением 17 мг аллоксана из расчета на 100 г массы животного после 30–48-часового голодания. Крыс брали в опыт через 3, 7 и 14 сут после введения аллоксана с содержанием сахара в крови не ниже 280 мг%. Концентрацию инсулина определяли с помощью радиоиммунных наборов, количество ИР в плазматических мембранах (ПМ) — по ранее описанному методу [5]. Связывание ^{125}I -инсулина с рецепторами ПМ клеток исследовали, как описано в работе [9], с использованием метода вытеснения ^{125}I -инсулина из комплекса с рецепторами возрастающими количествами немеченого гормона в условиях

равновесия [10]. Общее количество инсулинсвязывающих мест и сродство рецепторов к гормону определяли по методу [9, 11, 12]. Структурно-функциональные свойства мембран оценивали по результатам измерения микровязкости и гидрофобности мембран клеток методом ЭПР. Использовали метод спигового зонда, позволяющий количественно оценить поверхностный потенциал липидбелковых комплексов [7]. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Полученные по усредненным сатурационным кривым насыщения показатели количества и проведенного сродства свободных и занятых ИР (R_0 , K_c , K_f соответственно), а также средние величины максимального специфического связывания ^{125}I -инсулина в ПМ гепатоцитов свидетельствуют о том, что через 3 сут после введения аллоксана количество ИР достоверно возрастает с $14,3 \pm 0,7$ до $21,5 \pm 2,3$ %, через 7 сут — до $24,8 \pm 0,9$ % по сравнению с контролем (табл. 1). Анализ этих данных по Скэтчарду [12] показал, что количество рецепторов на 3-и сутки составляет 4 и 7 пг/мг белка соответственно для контрольных животных и крыс с диабетом (см. рисунок). Параллельный ход кривых связывания инсулина у подопытных и контрольных животных указывает на то, что сродство гормона к рецептору аналогично у этих групп животных, а различия заключаются в увеличении приблизительно в 2 раза числа ИР на фоне диабета за счет увеличения рецепторной емкости связывания. Введение инсулина нормализовало связывание с рецепторами. Эти данные согласуются с представлением о существовании обратной зависимости между концентрацией инсулина в крови и уровнем его связывания в тканях и о влиянии инсулина на свои собственные рецепторы.

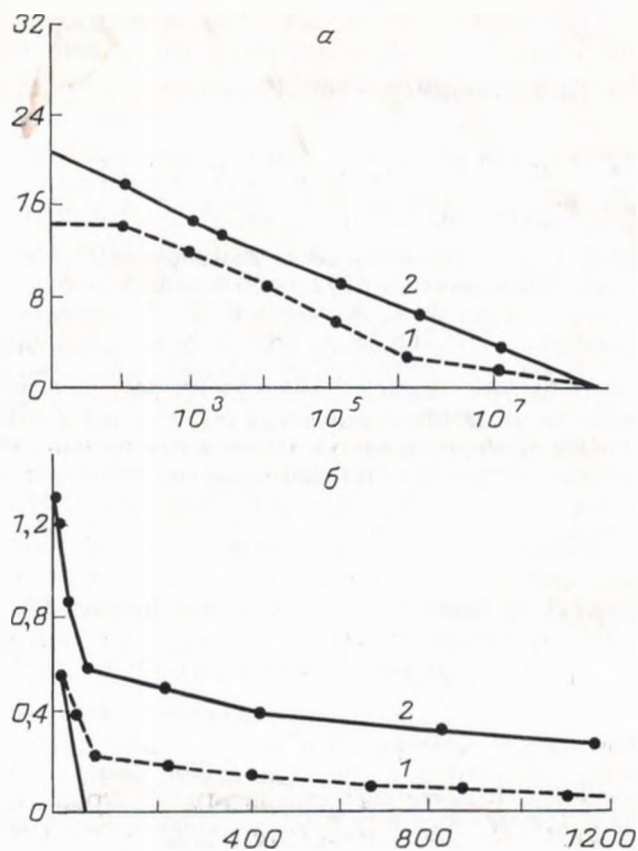
С целью проверки предположения о том, что изменение сродства и количества ИР сопряжено

Таблица 1

Показатели инсулинрецепторного взаимодействия ПМ клеток печени контрольных животных и крыс с диабетом

Группа животных	Число животных	Максимальное специфическое связывание ^{125}I -инсулина, % ($M \pm m$)	R_0 , нмоль/мг белка	10^7 M^{-1}		$\bar{K}_f/\bar{K}_c$
				$\bar{K}_c$	$\bar{K}_f$	
Контроль	10	$14,3 \pm 0,7$	0,021	14,8	4,3	0,288
Диабет, сут:						
3	8	$21,5 \pm 2,3^*$	0,033	16,3	3,1	0,206
7	10	$24,8 \pm 0,9^*$	0,035	16,9	4,2	0,244

Примечание. * — различия с контролем достоверны при $p < 0,01$.



Специфическое связывание ^{125}I -инсулина печеночными плазматическими мембранами контрольных (1) и подопытных (2) крыс через 3 сут после введения аллоксана.

a — сатурационные кривые; b — зависимости Скэтчарда. По осям ординат: a — специфически связанный ^{125}I -инсулин (в %); b — соотношение связанного и свободного инсулина; по осям абсцисс: a — общая концентрация инсулина (в пМ); b — связанный инсулин (в фмоль/150 мкг белка).

и изменение сродства ИР предшествует изменению их количества, определяли параметры инсулинрецепторного взаимодействия в ПМ гепатоцитов крыс через 3 и 7 сут после введения аллоксана. При 7-суточном аллоксановом диабете в соответствии с данными других авторов [4, 8] наблюдалось увеличение количества ИР в ПМ печени без изменения их сродства. Через 3 сут после введения аллоксана отмечены аналогичные изменения, т. е. не обнаружено повышения сродства рецепторов, предшествующего увеличению их количества. Степень отрицательной кооперативности рецепторов, характеризуемая соотношением K_i/K_e , при диабете значительно не изменяется. Максимальное уменьшение этой величины при кратковременном диабете для мембран печеночных клеток было в пределах 30 %.

Таким образом, результаты опытов, проведенных в одних условиях и на одной группе животных, не подтверждают предположения о том, что изменения в сродстве ИР являются первой фазой в изменении их активности, предшествующей изменению количества.

Повышенное связывание инсулина с рецепторами при аллоксановом диабете нами установлено также в ПМ скелетных мышц, причем это наблюдалось при всех исследованных концентрациях гормона по сравнению с контролем (табл. 2). Анализ данных графика Скэтчарда показал, что увеличение связывания инсулина с рецепторами в исследуемом диапазоне концентрации инсулина обусловлено увеличением количества ИР ($p < 0,05$). Число рецепторов ПМ составляло 2,8 и

3,3 пг/мг белка для контрольных и подопытных животных соответственно. При этом сродство гормона к рецептору не изменилось.

Преинкубация мембран клеток этих тканей с АТФ подавляла повышенное связывание инсулина с рецепторами и не влияла на этот процесс в контроле. Эти данные могут свидетельствовать в пользу предположения о том, что АТФ оказывает модулирующее влияние на биологическое действие инсулина. То обстоятельство, что АТФ не влияет на связывание инсулина с мембранами здоровых животных, может быть связано с наличием гетерогенных рецепторов в этих тканях, а также с тем, что при диабете происходит более интенсивное фосфорилирование некоторых мембранных белков или групп рецепторов, обуславливающих угнетение связывания гормона с частью рецепторов. Представляет интерес также тот факт, что ингибирование связывания инсулина в мышечной ткани происходило при концентрациях АТФ, которые были значительно ниже физиологических (10^{-12} М). В печени эти же концентрации АТФ давали дополнительный угнетающий эффект, хотя максимальное торможение связывания гормона наблюдалось при физиологических концентрациях АТФ (10^{-3} М). Различие концентраций АТФ, подавляющих связывание гормона в печеночной и мышечной тканях, может свидетельствовать также о наличии нескольких АТФ-зависимых ступеней, обуславливающих связывание в этих тканях. Поскольку полагают, что способность рецепторов связывать инсулин регулируется фосфорилированием мембранных белков, возможно, даже самих рецепторов, есть основание допустить, что АТФ может оказывать существенное влияние на процесс связывания инсулина с его рецепторами при состояниях, связанных с резистентностью к инсулину (не только при сахарном диабете).

Инкубирование клеток в среде с оптимальным содержанием глюкозы (10 мМ) и неорганического фосфата (14 мМ) позволило выявить снижение скорости утилизации глюкозы эритроцитами животных после введения аллоксана на 40 % и уровень АТФ на 13 %. Развитие высокой связывающей активности ИР при экспериментальном диабете обусловлено, по-видимому, не только гипoinsулинемией, вызванной аллоксаном, но и функциональной неполноценностью ИР.

Мы выявили зависимость связывания инсулина от состояния липидов мембран эритроцитов и

Таблица 2

Специфическое связывание ^{125}I -инсулина с цитоплазматическими мембранами скелетных мышц

Группа животных	Свободный инсулин (F), нг/мл	Связанный инсулин (B), нг ($M \pm m$)	B/F · 10^{-2} на 1 мг белка мембран
Контроль	10	$0,81 \pm 0,08$	8,1
	50	$3,40 \pm 0,29$	6,8
	100	$5,20 \pm 0,49$	5,2
	1000	$14,0 \pm 1,5$	1,4
Диабет	10	$0,95 \pm 0,08$	0,5
	50	$3,70 \pm 0,29$	7,5
	100	$6,00 \pm 0,59$	6,0
	1000	$18,0 \pm 0,20$	1,80

гепатоцитов. Связывающие характеристики рецептора в первую очередь сопоставляли с такими интегральными показателями структурного свойства липидного матрикса, как его жидкость и гидрофобность. Установлено, что понижение мембранной жидкости и гидрофобности гепатоцитов и эритроцитов после введения аллоксана сопровождалось значительным повышением связывания за счет увеличения числа доступных рецепторов. Однако в мембранах легочной ткани крыс большая микровязкость сочеталась с большим числом рецепторов и с более высокой инсулинсвязывающей активностью.

Простые корреляции между уровнем связывания гормона и средней микровязкостью и гидрофобностью мембраны мало что разъясняют в существе липидрецепторных взаимодействий. По-видимому, эти взаимодействия определяются состоянием пограничных липидов (в частности, степенью их перекисления), составляющих непосредственное микроокружение рецепторов. Изменения в липидном матриксе влияют не только на доступность рецепторов для инсулина (т. е. на число рецепторов), но и на их аффинность. Возможно, изменение липидов в микроокружении рецептора влияет на его конформацию и доступность для регуляторных белков (в частности, для инсулина).

Выводы

1. Установлен факт обратной зависимости между концентрацией иммунореактивного инсулина в крови и уровнем его связывания в тканях и влияния инсулина на собственные рецепторы.

2. Существует обратная корреляционная связь между инсулинсвязывающей активностью в клетках и микровязкостью и гидрофильностью в мембранах по данным ЭПР-спектроскопии.

© А. А. Булатов, 1997

УДК 616.154:577.175.328]-088.61-07

А. А. Булатов

ФЕНОМЕН МАКРОПРОЛАКТИНЕМИИ, ЕГО ПРОИСХОЖДЕНИЕ И КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ*

Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАМН И. И. Дедов) РАМН, Москва

Количественный анализ гипофизарного белкового гормона пролактина (ПРЛ) в циркулирующей крови человека стал возможным лишь в 70-е годы, когда этот гормон был впервые получен в высокоочищенном состоянии и на этой основе был разработан радиоиммунологический метод его определения. С тех пор в клинических исследованиях под ПРЛ, циркулирующим в крови, обычно имеется в виду иммунореактивный гормон, определяемый с помощью радиоиммунологического или иного иммунохимического метода. Широкое использование иммунохимического подхода к анализу ПРЛ показало, что повышение его уровня в крови — гиперпролактинемия — яв-

3. АТФ может оказывать существенное влияние на процесс связывания инсулина с его рецепторами при сахарном диабете.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балашова Т. С., Голега Е. Н., Рудько И. А. и др. // Тер. арх. — 1993. — № 10. — С. 25—27.
2. Дедов И. И., Горелышева В. А., Романовская Г. А. и др. // Пробл. эндокринол. — 1992. — № 6. — С. 52—55.
3. Зверихановский Ф. А., Жулкевич И. В., Данилишина В. С., Жулкевич Г. Д. // Там же. — 1987. — № 4. — С. 15—18.
4. Любарская С. Г., Грачева Н. К., Князева А. П., Старосельцева Л. К. // Биохимия. — 1980. — Т. 45, № 1. — С. 66—71.
5. Микаелян Н. П. Метаболический статус и инсулинсвязывающая активность клеток крови и печени при экстремальных состояниях (экспериментально-клиническое исследование): Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 1992.
6. Микаелян Н. П., Князев Ю. А., Максина А. Г., Микаелян Э. П. // Бюл. exper. биол. — 1994. — № 10. — С. 388—392.
7. Cafiso D. S., Hubbell W. L. // Ann. Rev. Biophys. Bioenerg. — 1981. — Vol. 10. — P. 217.
8. Davidson M. B., Kaplan S. A. // J. clin. Invest. — 1977. — Vol. 59, N 1. — P. 22—30.
9. Gruber M. // Biochim. biophys. Acta. — 1974. — Vol. 370, N 1. — P. 297—307.
10. Kahn C. R., Freychet P., Roth I. // J. Biol. Chem. — 1974. — Vol. 249. — P. 2249—2257.
11. Meyis I. P. M., Roth I. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1975. — Vol. 66, N 8. — P. 1118—1126.
12. Scatchard L. O. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1949. — Vol. 51, N 6. — P. 660—672.

Поступила 17.12.96

N. P. Mikaelyan, Yu. A. Knyazev, A. G. Maxina, B. A. Dainyak, A. Ye. Gurina, E. P. Mikaelyan, F. S. Dzugkoyeva — INSULIN-RECEPTOR INTERACTIONS AND EPR SPECTROSCOPY IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

Summary. Insulin concentration in the blood and the level of its binding in tissues inversely correlate in experimental diabetes mellitus. Insulin-binding activity in cells and the microviscosity and hydrophilism of plasma membranes are in inverse correlation. ATP modifies insulin reception.

ляется одним из частых проявлений эндокринной патологии у человека.

К настоящему времени клинические состояния, сопровождающиеся гиперпролактинемией, достаточно подробно изучены, особенно у женщин. Типичными симптомами гиперпролактинемии у женщин являются нарушения менструального цикла, бесплодие, галакторея, составляющие классический синдром гиперпролактинемии или синдром персистирующей галактореи—аме-нореи [4, 8]. У мужчин гиперпролактинемия может сопровождаться импотенцией с потерей ли-бидо [1]. В качестве эффективного средства медикаментозного лечения гиперпролактинемических состояний широко применяют агонисты дофамина (бромкриптин, парлодел, норпролак и др.), подавляющие секрецию ПРЛ лактотрофами и та-

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований.