

ИЗУЧЕНИЕ ЭРИТРОЦИТАРНОГО ТРАНСПОРТА ИНСУЛИНА В НОРМЕ И ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ПЕРВОГО ТИПА

В экспериментах по сравнению коэффициентов распределения между эритроном и плазмой крови инсулина и ряда гидрофобных и гидрофильных гормонов установлено, что особенность транспорта инсулина по сравнению с транспортом других белковых гормонов заключается в равноценном использовании сывороточного и эритроцитарного механизмов. Показано, что при сахарном диабете первого типа наблюдается достоверное увеличение вклада эритроцитарной системы в доставку инсулина к периферическим тканям, обусловленное снижением его включения в гормонотранспортирующий комплекс плазмы крови.

Ключевые слова: инсулин, транспорт гормонов эритроцитами, сахарный диабет, транспортные гликопротеиды крови.

В литературе описано два механизма транспорта гормонов к периферическим тканям. Считается, что гидрофобные гормоны транспортируются в комплексе со специфическими транспортными белками плазмы [3]. Второй системой, транспортирующей гормоны, является поверхность эритроцитов, имеющая рецепторы ко многим гидрофильным гормонам, в том числе к инсулину [4, 5]. Однако многие факты противоречат общепринятым представлениям о различных механизмах транспорта гормонов первой и второй групп: в литературе описано наличие транспортных сывороточных белков для таких гормонов второй группы, как релаксин и инсулинподобные факторы роста [6]. В то же время показано, что гормоны первой группы – тиреоидные и стероидные – доставляются к периферическим тканям не только в комплексе с транспортными белками сыворотки крови, но и за счет эритроцитарного транспорта [2]. Цель данного исследования – оценить соотношение вкладов сывороточной и эритроцитарной систем транспорта в доставку инсулина, а также некоторых других гормонов первой и второй групп к периферическим тканям.

Объекты и методы исследования

Определение коэффициентов распределения между эритроцитами и плазмой крови ряда гормонов проведено в пробах крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом первого типа. Для исследования отобраны пробы крови 30 здоровых добровольцев 20-25 лет.

Определение коэффициента распределения инсулина проводили также в пробах крови 30 больных сахарным диабетом первого типа,

находившихся на стационарном лечении в эндокринологическом отделении городской клинической больницы №21 г. Уфы.

Концентрацию гормонов (за исключением инсулина), связанных с поверхностью эритроцитов и находящихся в плазме крови, определяли на автоматическом анализаторе Amerham с использованием наборов Amerlite.

Для получения проб, содержащих связанные с рецепторами эритроцитов гормоны, 250 мл свежей гепаринизированной крови донора отмывали физиологическим раствором от плазмы многократным центрифугированием при 1500 об/мин по 10 минут. С поверхности отмывтых эритроцитов элюировали связанные с рецепторами молекулы 0,1М уксусной кислотой, приготовленной на 0,9% хлористом натрии. В полученном элюате и плазме данного донора провели количественное определение гормонов с использованием четырехкратной повторности ($C_{св}$ – концентрация связанного гормона). Параллельно с той же повторностью определяли содержание каждого гормона в плазме ($C_{пл}$). Для вычисления величины коэффициента распределения данного гормона между поверхностью эритроцитов и плазмой вычисляли отношение $K = C_{св} / C_{пл}$. Определили коэффициенты распределения пролактина, прогестерона, хорионического гонадотропина, тиреотропного гормона, тироксина, трийодтиронина, лютеинизирующего гормона, фолликулостимулирующего гормона.

Распределение инсулина между специфическими рецепторами эритроцитов и сывороточными транспортными молекулами было изучено при помощи вновь разработанного метода. Для оценки распределения инсулина меж-

Таблица 1. Распределение гормонов между рецепторами эритроцитов и сывороточными транспортными гликопротеидами

Гормон	Группа	Поверхность эритроцитов	Плазма	Коэффициент распределения эритроциты/плазма
Кортизол	I	0	148,5±3,52 нмоль/л	0
Прогестерон	I	0	0,88±0,041 нмоль/л	0
T ₃	I	0	1,1±0,05 нмоль/л	0
T ₄	I	0	57,9±2,64 нмоль/л	0
Тиреотропный гормон (ТТГ)	II	65,7±2,98 мкМЕ/мл	0,55±0,027 мкМЕ/мл	119,4545±3,56
Лютеинизирующий гормон (ЛГ)	II	200±8,36 МЕ/мл	0,49±0,025 МЕ/мл	408,1633±8,64
Фолликулостимулирующий (ФСГ)	II	360±17,55 МЕ/мл	3,56±0,182 МЕ/мл	101,12±17,56
Пролактин	II	132,4±6,74 МЕ/мл	0	∞
Хорионический гонадотропин (ХГ)	II	301,9±14,25 МЕ/мл	0,21±0,011 МЕ/мл	1437,619±14,26
Инсулин норма	II	33,03±2,66%	66,97±4,56%	0,49±0,0053
Инсулин сахарный диабет	II	41,96±3,84%	58,04 ±3,84%	0,73±0,0065

ду поверхностью эритроцитов и плазмой крови получен инсулин, меченный пероксидазой, по методу Fage и Nakane с использованием человеческого генно-инженерного инсулина хумулин Р производства фирмы Lilly France S.A. Предложенный метод определения коэффициента распределения инсулина между рецепторами поверхности эритроцитов и транспортными белками сыворотки крови заключается в определении соотношения пероксидазной активности, связанной с поверхностью эритроцитов, и активности пероксидазы в плазме крови после инкубации с исследуемой пробой крови рабочего разведения конъюгата инсулина с пероксидазой, выполняющей роль маркерного фермента. Контрольный опыт с изучением распределения свободной пероксидазы показал, что неспецифическое связывание пероксидазы поверхностью эритроцитов практически отсутствует. Это позволяет сделать вывод о том, что в эксперименте фиксировалось специфическое взаимодействие инсулина с рецепторами эритроцитов.

Результаты и обсуждение

При определении $K_{\text{инсулина}}$ в крови 30 здоровых доноров 20-30 лет отмечена очень высокая степень варьирования этого показателя: с поверхностью эритроцитов в крови практически здоровых людей с нормальным значением % Гб связывалось от 17 до 51% меченого пероксидазой инсулина. В среднем с эритроцитами в крови обследованных здоровых доноров связано $33,03 \pm 2,66\%$. Следовательно, $K_{\text{инсулина}}$ опре-

деленный для здоровых доноров, составляет 0,52. Обследована группа 30 больных сахарным диабетом первого типа с неудовлетворительной компенсацией заболевания (% Гб $9,36 \pm 0,52$). Выявлено достоверное повышение процента связывания инсулина с поверхностью эритроцитов в крови этой группы больных по сравнению с аналогичным показателем здоровых доноров: среднее значение процента связывания инсулина с поверхностью эритроцитов в крови диабетиков составило $41,96 \pm 3,84\%$, соответственно значение в крови больных $K_{\text{инсулина}} = 0,73$. Достоверность различия средних значений доказана с помощью критерия Стьюдента ($t=2,176$ при уровне значимости $p=0,036$). Таким образом, показано, что при сахарном диабете первого типа наблюдается значительное увеличение вклада эритроцитарной системы в доставку инсулина к периферическим тканям (в $41,96/33,03=1,27$ раза). Полученные данные согласуются с нашими результатами титрования активности связывающих инсулин сывороточных белков в крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом, из которых следует, что при сахарном диабете их титры снижаются примерно в 1,5 раза [1]. Увеличение эритроцитарного транспорта инсулина при диабете, очевидно, носит компенсаторный характер и обусловлено снижением его содержания в комплексе с транспортными белками крови.

Значения коэффициентов распределения для исследованных гормонов представлены в таблице 1. Как следует из представленных данных, для всех белковых и гликопротеидных гор-

монов (пролактин, хорионический гонадотропин, тиреотропный гормон, лютеинизирующий гормон, фолликулостимулирующий гормон) характерно резкое преобладание связанной с эритроцитами фракции гормона по сравнению с гормоном, находящимся в плазме крови. Гидрофобные гормоны, напротив, содержатся в основном в плазме крови (по литературным данным – в комплексе с соответствующими транспортными гликопротеидами). Таким образом, установлено, что для исследованных белковых и гликопротеидных гормонов (пролактин, хорионический гонадотропин, тиреотропный гормон, лютеинизирующий гормон, фолликулостимулирующий гормон) характерно резкое преобладание связывания с поверхностью эритроцитов по сравнению со связыванием с транспортными белками плазмы крови. Очевидно, это свидетельствует прежде всего о наличии на поверхности эритроцитов специфических рецепторов к этим гормонам и о чрезвычайно низкой концентрации в плазме крови связываю-

щих эти гормоны белков. Гидрофобные гормоны, напротив, содержатся в основном в плазме крови, что согласуется с данными литературы о существовании в плазме крови транспортирующих эти гормоны гликопротеидов.

В отличие от других исследованных гормонов инсулин в норме распределяется между поверхностью эритроцитов и плазмой крови более равномерно: коэффициент распределения инсулина между поверхностью эритроцитов и плазмой крови человека близок к 1. Таким образом, показано, что в норме в транспорт инсулина вносят сопоставимый вклад эритроцитарный транспорт и перенос гормона в плазме крови, что предполагает существование специфических к инсулину транспортных молекул. При сахарном диабете коэффициент распределения инсулина между поверхностью эритроцитов и плазмой крови достоверно увеличивается и составляет 0,73, что свидетельствует об относительном увеличении вклада эритроцитарного транспорта инсулина при формировании заболевания.

19.11.2009

Список использованной литературы:

1. Гарипова М.И., В.Ю. Умнова, Л.И. Штыкова, Пиндюрина Т. Е. Инсулинсвязывающий компонент сыворотки человека в норме и при заболевании сахарным диабетом первого типа // Вестник Башкирского университета. - 2005. - №4. – С. 44-46.
2. Доломатов С.И., Пишак В.П., Слипенок Т.С., Мешишен И.Ф., Окопная Т.В. Способность эритроцитов депонировать тиреоидные гормоны: регуляторная роль физико-химических факторов in vitro // Вопросы медицинской химии. – №6. – 1999. - С. 572-577.
3. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. – М.: Мир, 1993 - С. 247-263.
4. Сандуляк Л.И. Эритроциты как депо и система транспорта инсулина // Доклады Академии наук СССР, -1974. - Том 219. -№4. - С. 1020–1021.
5. Gluszek J., Szczesniak, L., Banaszak, F., Tykarski, A.R. and Rychlewski, T. (1990) Pol. Arch. Med.r 101, 191-196.
6. Suikkari A., Koivisto V., Rutanen E., Yki-Jarvinen H., Karonen S., Seppala M. Insulin regulates the serum levels of low molecular weight insulin-like growth factor-binding protein. // J.of Clinical Endocrinology and Metabolism. – 1988. – v. 66. – p. 266-272.

Гарипова Маргарита Ивановна, доцент кафедры биохимии и биотехнологии Башкирского государственного университета

Киреева Наиля Ахняфовна, профессор кафедры биохимии и биотехнологии Башкирского государственного университета

Першина Альбина Сабирьяновна, аспирант кафедры биохимии и биотехнологии Башкирского государственного университета

Елисеева Ольга Сергеевна, аспирант кафедры биохимии и биотехнологии Башкирского государственного университета

450074, г. Уфа, ул. Фрунзе, д. 32, кафедра биохимии и биотехнологии,
тел. (347) 2736871, E-mail – marqarita@list.ru

Pershina A.S., Kireeva N.A., Eliseeva O.S., Garipova M.I.

STUDY OF ERYTHROCYTE INSULIN TRANSPORT IN NORMAL AND FIRST TYPE DIABETES CONDITIONS

The experiments to compare the distribution coefficients between erythron and insulin plasma and a number of hydrophobic and hydrophilic hormones showed that the insulin transport, compared to transport of other protein hormones, is the equivalent use of serum and erythrocyte mechanisms. It is shown that in first type diabetes, a significant increased erythrocyte systems contribution to the delivery of insulin to peripheral tissues occurred, due to decreased insulin inclusion in the blood plasma hormonal transport complex.

Key words: insulin, erythrocyte transport of hormones, insular diabetes, transport blood glycoproteids