

Состояние цитоплазматических мембран при экспериментальном сахарном диабете

Н.П. Микаэлян, Ю.А. Князев, А.Е. Гурина, А.Г. Максина, Ф.С. Дзугкоева

*Российский государственный медицинский университет
МЗ РФ, Москва,
Северо-Осетинская медицинская академия, Владикавказ*

Как известно, конечный метаболический эффект (КМЭ) гормона зависит от состояния мембран клеток-мишеней, на которых расположены рецепторы. Действие инсулина в клетке модулируется на уровне инсулиновых рецепторов (ИР) за счет изменения их количества или сродства к гормону: инсулин + ИР → ИРК (инсулинрецепторный комплекс) → КМЭ (пострецепторные влияния).

Ранее нами показано, что связывающие параметры ИР зависят от степени пероксидации фосфолипидов в липидном бислое мембран эритроцитов при сахарном диабете (СД) 1 типа [6] и при аллоксановом диабете у крыс [7].

Целью настоящего исследования явилось изучение состояния цитоплазматических мембран клеток при экспериментальном СД путем определения связывающих параметров ИР эритроцитов (Эр), гепатоцитов (Г), почечной ткани (ПТ), скелетных мышц (СМ) и легочной ткани (ЛТ), а также структурных свойств их плазматических мембран (ПМ) с применением электронно-парамагнитно-резонансной (ЭПР) спектроскопии.

Материалы и методы

Эксперименты поставлены на 180 крысах — самцах линии «Вистар». СД вызывали однократным внутрибрюшинным введением аллоксана из расчета 17 мг на 100 г массы тела после 30-48-часового голодания. Исследования проводились на 3-и, 7-е и 14-е сутки после введения аллоксана при гликемии не ниже 16 ммоль/л. Концентрацию инсулина определяли с помощью радиоиммунных наборов, количество ИР в ПМ определяли по ранее описанному методу [5]. Связывание ^{125}J инсулина с рецепторами ПМ клеток исследовали с использованием метода вытеснения ^{125}J -инсулина из комплекса с рецепторами возрастающими концентрациями немеченого гормона в условиях равновесия инсулина [10, 11]. Общее количество инсулинсвязывающих мест и сродство рецепторов к гормону определяли по стандартным методикам [10-12]. Структурно-функциональные свойства мембран оценивали по результатам измерения микровязкости и гидрофобности методом ЭПР-спектроскопии; использовали метод спиновых зондов, позволяющий количественно оценить поверхностный потенциал липидно-белковых комплексов [8]. Перекисное

окисление липидов (ПОЛ) определяли по концентрации малонового диальдегида (МДА) [13].

В ПТ определяли также активность Na^+ , K^+ — АТФазы [15] по приросту неорганического фосфора. Белок в пробах определяли по методу Лоури. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием t -критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Данные, полученные по усредненным сатурационным кривым насыщения, показатели количества и сродства свободных и занятых ИР (R_0 , K_e , K_f соответственно), а также средние величины максимального специфического связывания ^{125}J -инсулина в ПМ гематоцитов свидетельствуют о том, что через 3 сут. после введения аллоксана количество ИР достоверно возрастает, через 7 сут. до $24,8 \pm 0,9\%$ по сравнению с контролем (табл. 1).

Анализ данных [14] показал, что количество рецепторов на 1 мг белка на 3-и сутки составляло 4 пг/мг и 7 пг/мг для контрольных и диабетических животных соответственно. Параллельный ход кривых связывания инсулина у опытных и контрольных животных указывает на то, что сродство гормона к рецептору аналогично; различия заключаются в увеличении в 2 раза числа ИР при СД за счет увеличения рецепторной емкости и количества ИР с высоким сродством. Введение инсулина нормализовало состояние ИРК и КМЭ.

На 7-е сутки наблюдалось увеличение количества ИР в ПМ печени без изменения их аффинитета. Через 3 сут. после введения аллоксана имели место аналогичные изменения. Степень отрицательной кооперативности рецепторов, характеризуемая величиной $a = K_f/K_e$, не изменилась; максимальное уменьшение этой величины при «кратковременном» диабете для мембран печеночных клеток было в пределах 30%.

Повышенное связывание инсулина с рецепторами при аллоксановом диабете имеет место также и в ПМ СМ. Этот эффект наблюдался при всех исследованных концентрациях инсулина, но особенно

Таблица 1

Показатели инсулин-рецепторного взаимодействия ПМ клеток печени в контроле и при СД

Группа животных	n	Максимальное специфическое связывание ^{125}J -инсулина, % ($M \pm m$)	R_0 , нмоль/мг белка	K_e 10^3 M^{-1}	K_f	K_f/K_e (a)
Контроль	15	$14,3 \pm 0,7$	0,021	14,8	4,3	0,288
СД						
3-и сутки	10	$21,5 \pm 2,3$	0,033	16,3	3,1	0,206
7-е сутки	12	$24,8 \pm 0,9$	0,035	16,9	4,2	0,244

значительно при высоких (табл. 2)*. Увеличение связывания инсулина с рецепторами обусловлено увеличением количества ИР ($p < 0,05$). Количество рецепторов на 1 мг белка ПМ составляло 2,8 и 3,3 пг/мг для контрольных и опытных животных соответственно. Сродство гормона к рецептору не изменялось. Количество рецепторов на 1 мг белка ПМ составляло 2,8 и 3,3 пг/мг для контрольных и опытных животных соответственно. Сродство гормона к рецептору не изменялось [4, 9].

Преинкубация мембран клеток печени и СМ с АТФ подавляла связывание инсулина с рецептора-

Ингибирование связывания инсулина в мышечной ткани происходило при концентрациях АТФ значительно ниже физиологических (10^{-12} М). В печени эти концентрации АТФ давали дополнительный угнетающий эффект, хотя торможение связывания гормона наблюдалось и при физиологических концентрациях АТФ (10^{-3} М). Различие концентраций АТФ, подавляющих связывание гормона в печеночной и мышечной тканях, свидетельствует также о наличии нескольких АТФ-зависимых ступеней, обуславливающих это связывание. Поскольку способность рецепторов связывать инсулин регулируется фосфорилирова-

Таблица 2

Специфическое связывание ^{125}J -инсулина с цитоплазматическими мембранами скелетных мышц ($M+m$)

Группа животных	Концентрации инсулина (F), нг/мл	Связанный инсулин (B), нг/мл	$B/F \cdot 10^{-2}$ 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
СД	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

ми и не влияла на этот процесс в контроле, что свидетельствует о модулирующем влиянии АТФ на действие инсулина. То обстоятельство, что АТФ не влияет на связывание инсулина с мембранами клеток здоровых животных, может быть связано с наличием гетерогенных рецепторов в этих тканях, а также с тем, что при СД происходит более интенсивное фосфорилирование некоторых мембранных белков и групп рецепторов, обуславливающих угнетение связывания гормона с частью рецепторов.

нием мембранных белков, возможно даже самих рецепторов, есть основание допустить, что АТФ может оказывать существенное влияние на процесс связывания инсулина с его рецепторами при состояниях инсулинрезистентности, а не только при СД.

Инкубирование Эр в среде с оптимальным содержанием глюкозы (10 ммоль) и неорганического фосфора (14 ммоль) позволило выявить снижение скорости утилизации глюкозы после введения аллоксана на 40% и уровня АТФ на 13%.

Известно, что при диабете значительно ускоряются процессы ПОЛ [3] в мембранах клеток, в частности, Эр [1, 2]. Результаты наших исследований показали значительное увеличение концентрации МДА в Эр и почечной ткани крыс по сравнению с контрольной группой (табл. 3) При «хронической»

* *In vitro* использовались следующие концентрации инсулина: 10, 50, 100, 1000 нг/мл.

Таблица 3

Концентрация МДА в эритроцитах и почечной ткани при аллоксановом диабете ($M \pm m$)

Группа животных	Концентрация МДА		
	в эритроцитах, нмоль/кл	В мозговом веществе почечной ткани, нмоль/мг белка	В корковом веществе почечной ткани, нмоль/мг белка
Контроль	0,687±0,045	2,4325±0,435	2,3014±0,11
Диабет	0,865±0,047 0,01	3,7329±0,3047 0,05	3,4019±0,279 0,001

Примечание: n – число животных; p – достоверность результатов опытной группы по сравнению с контролем.

стадии аллоксанового диабета отмечается повышение концентрации МДА до $0,865 \pm 0,047$ нмоль/мл ($p < 0,001$). Концентрация МДА возрастает и в почечной ткани: в корковом веществе уровень МДА на 62,2% выше, чем в контрольной группе, в мозговом веществе – на 39,9% ($p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно), по-видимому, вследствие изменения оксигенации клеток и качественного состава фосфолипидов, составляющих основу бислоя мембран. В почечной ткани имеет место значительное снижение активности Na^+ , K^+ -АТФазы при диабете (табл. 4). Существует тесная корреляционная связь между концентрацией МДА в почечной ткани и активностью Na^+ , K^+ -АТФазы ($r = -0,73$).

Изучение инсулинрецепторного взаимодействия в мембранах Эр показало снижение процесса связывания инсулина с собственными рецепторами во всех группах крыс, что зависело от тяжести диабета; в группе животных с легкой степенью инсулинсвязывающая активность (ИСА) клеток уменьшается на 55% ($p < 0,01$), при тяжелой степени – в 2,7 раза ($p < 0,001$).

При гипергликемии в корковом и мозговом веществе ПТ снижен процент связывания ^{125}J -инсулина с собственными рецепторами. Между активностью Na^+ , K^+ -АТФазы и ИСА отмечается прямая корреляционная зависимость ($t = 0,73$, $p < 0,05$), т.е. снижение активности энзима сопровождается снижением ИСА рецепторов, которые также обладают ферментативной (протеинкиназной) активностью. В снижении ИСА в Эр и клетках коркового и мозгового вещества ПТ также имеет место параллелизм ($t = +0,73$, $t = +0,75$ соответственно).

Связывающие характеристики ИР нами сопоставлялись с интегральными показателями структурного свойства липидного матрикса – жидкостностью и экспонированием белков (табл. 5).

Повышение мембранной жидкостности и экспонирования белков Г и Эр после введения аллоксана сопровождалось значительным повышением связывания гормона за счет увеличения количества доступных рецепторов, т.е. выявлена достоверная зависимость связывания инсулина с собственными рецепторами от состояния липидов мембран Эр и Г. В мембранах ЛТ крыс большая микровязкость также сочеталась с большим количеством рецепторов и более высокой ИСА. Изменения в липидном матриксе влияют на доступность рецепторов и их аффинность. Возможно, что изменение спектра липидов в микроокружении рецептора влияет на его конформацию и доступность для регуляторных белков, в частности, для инсулина.

Утилизация глюкозы Эр при аллоксановом диабете у крыс прямо зависят от степени тяжести болезни: снижено базальное и стимулированное инсулином потребление глюкозы в большей степени. Даже при легкой степени СД утилизация глюкозы снижается на 33,2% ($p < 0,05$), что дает основание предположить развитие инсулинрезистентности. При инкубации гомогенатов коркового и мозгового вещества ПТ с инсулином получены аналогичные данные: при тяжелой степени СД в корковом веществе базальное потребление глюкозы снижается на 76% ($p < 0,001$), стимулированное инсулином – на 81,3% ($p < 0,001$); в мозговом веществе – на 91,3% и 96,8%

Таблица 4

Изменение ИСА эритроцитов и клеток коркового и мозгового вещества и ферментативная активность Na^+ , K^+ -АТФазы почечной ткани ($M \pm m$)

Группа животных	ИСА, %			Активность Na^+ , K^+ -АТФазы, мкмоль р н/мг белка в час	
	Эритроциты	Мозговое вещество	Корковое вещество	Мозговое вещество	Корковое вещество
Контроль	18,38±1,32	14,36±0,744	14,56±0,689	8,426±0,59	4,839±0,5
Диабет	10,72±1,08*	10,34±0,994*	10,22±0,913*	4,543±0,86*	3,3±0,27*

* Различия с контролем достоверны ($p < 0,05$).

Таблица 5

Показатели структурных свойств и количество ИР эритроцитов, гепатоцитов и легочной ткани контрольных и диабетических крыс

Группа животных	Ro, нмоль на 1 мг белка	Параметр упорядоченности (S), отн. Ед.	Коэффициент корреляции, (t)	Экспонирование белков (а/б), отн. Ед.
Эритроциты				
Контроль	0,015	0,5	–	0,15
Диабет				
3-и сутки	0,026	0,65	0,65	0,25
7-е сутки	0,031	0,78	0,71	0,48
Печень				
Контроль	0,021	0,35	–	0,10
Диабет				
3-и сутки	0,033	0,74	0,53	0,35
7-е сутки	0,035	0,81	0,59	0,64
Легкие				
Контроль	0,32	0,4	–	0,12
Диабет				
3-и сутки	0,41	0,48	0,42	0,14
7-е сутки	0,45	0,53	0,48	0,15

($p < 0,001$) соответственно. Следовательно, при аллоксановом диабете связывание ^{125}J -инсулина собственными рецепторами в Эр, корковом и мозговом веществе ПТ сопровождается уменьшением потребления глюкозы в данных клетках ($t=0,72$ и $t=0,69$ соответственно).

Таким образом, при аллоксановом диабете происходит снижение ИСА в эритроцитах в клетках почечной ткани, что свидетельствует об односторонности метаболических нарушений в этих тканях, в то время как в ПМ гепатоцитов, легочной ткани и скелетных мышц при всех исследованных концентрациях инсулина *in vitro* имеет место повышенное связывание инсулина с собственными рецепторами за счет увеличения рецепторной емкости и количества ИР с высоким сродством.

Выводы

Повышение активности ПОЛ при аллоксановом диабете приводит к увеличению «жесткости» мембранного бислоя, способствует снижению активности Na^+ , K^+ -АТФазы и нарушению инсулинсвязывающей активности в цитоплазматических мембранах клеток.

Нарушение инсулинрецепторного взаимодействия приводит к угнетению потребления глюкозы в тканях вследствие изменения количества инсулиновых рецепторов и их сродства, что является причиной нарушения синтеза АТФ и угнетения активности Na^+ , K^+ -АТФазы.

АТФ может оказывать существенное влияние на

процесс связывания инсулина с его рецепторами при экспериментальном 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. эндокринологии.-1992. - № 6. - С. 52-55.
3. Заверхановский 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. Микаэлян Н.П. - Метаболический статус и инсулинсвязывающая активность клеток крови и печени при экстремальных состояниях (экспериментально-клиническое исследование): Автореф. дисс. д.б.н., М., 1992.
6. Князев Ю.А., Максина А.Г., Микаэлян Э.П. // Бюлл. экспер. биол. и мед.-1994.- № 10.- С. 388-392.
7. Микаэлян Н.П., Максина А.Г., Гурина А.Е., Микаэлян Э.П. // Вестн. РГМУ 1998. - № 2 (5). - С. 70-73.
8. Cafiso D.S., Hubbell W.L. // Ann.Rev. Biophys. Bioenerg.- 1981. - Vol 10.-P.217.
9. Davidson V.B., Raplan S.A. // I. Clin. Invest.-1977.-Vol. 59, N 1.-P. 22-30.
10. Gruber M. // Biochem. Biophys. Acta.-1974.-Vol.370, N 1. Ц.Р. 297-307.
11. Kahn C.R., Freychet P., Roth I. // J.Biol. chem.-1974.-Vol.249.-P.2249-2257.
12. Meyts L.P.M., Roth I. // Biochem.biophys.Res commun.-1975.-Vol.66, N 8.- P.1118-1126.
13. Osacawa I., Matsushita S. Coloring conditions of thioarbituric acid test pf detecting lipid hidroperoxides. // Lipids.-1980.-Vol.15.-N 3.-P. 137-140.
14. Scatchard L.O. // Ann. N.Y. Acad/ Sci.- 1949.-Vol. 51, N 6.-P.660-672.
15. Scou I.C. The unfluence of some cations on an adenosine triphosphatase from periferal nerve. // Biochem. Diophys. Acta.-1957.-V.23, p. 394-401.