

4. Кошелев, Д.И. Параметры зрительных вызванных потенциалов и характеристики движений глаза при фиксации у испытуемых с нормальным зрением / Д.И. Кошелев, А.В. Пономарев, И.В. Сироткина // Физиология адаптации: Материалы 1-й Всероссийской науч.-практ. конф. – Волгоград, 2008. – С.23-26.
5. Кошелев, Д.И. Особенности движений глаза при фиксации неподвижного объекта учащихся первых и четвертых классов в норме и при миопии / Д.И. Кошелев, Р.А. Мухамадеев, И.В. Сироткина // Оздоровление средствами образования и экологии: Материалы V Междунар. науч.-практ. конф. – Челябинск, 2008. – С. 146-148.
6. Филин, В.А. Автоматия саккад / В.А. Филин. – М.: Изд-во МГУ, 2002. – 240с.
7. Шагас, Ч. Вызванные потенциалы мозга в норме и патологии / Ч.Шагас. – М., Мир, 1975. С.315.
8. Ярбус, А.Л. Роль движений глаз в процессе зрения / А.Л. Ярбус. – М.: Наука, 1965. – 166с.

УДК 612.018

**Елисеева О.С., Киреева Н.А., Першина А.С.,
Буторина О.Л., Бикбулатова С.М., Гарипова М.И.**
Башкирский государственный университет

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ИНСУЛИНА С ПОВЕРХНОСТЬЮ ЭРИТРОЦИТОВ И СОСТАВА ГОРМОНТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Показано, что в обеспечении инсулиндепонирующей функции эритрона принимают участие специфические и гидрофобные взаимодействия. Установлено, что транспортирующий гормоны комплекс плазмы крови является общим для гидрофильных и гидрофобных гормонов. Наряду с инсулином в него включаются гидрофобные (тироксин, трийодтиронин, тестостерон) и гидрофильные (тиреотропный гормон, пролактин, лютеинизирующий гормон) гормоны, а также триглицериды и холестерол. Ядро комплекса формируют альбумин, а-фетопротеин и трансферин.
Ключевые слова: инсулин, эритроциты, гормоны, плазма крови, гидрофобные взаимодействия.

Впервые предположение об участии эритроцитов в транспорте инсулина в крови человека сформулировано в работах Л.И. Сандуляк и соавторов [1,2]. В работах этих авторов сформулирована гипотеза о инсулиндепонирующей функции эритроцитов. Показано [3,4], что коэффициент распределения инсулина между эритроном и плазмой крови в крови здоровых доноров составляет 0,52. Известно, что несмотря на то, что эритроциты не относятся к классическим чувствительным к инсулину клеткам, на их плазматической мембране присутствуют рецепторы к этому гормону [1]. Одна из функций рецепторов к инсулину, локализованных на поверхности эритроцитов, вероятно, заключается в доставке гормона к периферическим тканям. Однако, существует возможность того, что в формировании фракции связанного с эритроцитами инсулина, принимают также гидрофобные взаимодействия. Цель данного исследования – оценить роль гидрофобных взаимодействий во взаимодействии инсулина с эритроцитами, определить состав белков транспортирующего гормоны комплекса плазмы крови человека, а также состава транспортируемых им гормонов.

Объекты и методы исследования

Коэффициент распределение инсулина между поверхностью эритроцитов и плазмой крови оценивали с использованием ранее описанного метода. Для оценки распределения инсулина между 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, к активности пероксидазы в плазме крови после инкубации с исследуемой пробой крови рабочего разведения коньюгата инсулина с пероксидазой, выполняющей роль маркерного фермента [4]. В контроле определялось распределение несвязанной с инсулином пероксидазы в пробах крови с использованием как физиологических условий, так и 1,М хлорида натрия рН 4,0. Определение коэффициентов распределения меж-

ду эритроцитами и плазмой крови в пробах крови здоровых доноров проводили в физиологических условиях (0,14М хлорид натрия, забуференный 0,01М фосфатным буфером рН 7,2). Вклад гидрофобных взаимодействий во взаимодействии инсулина с поверхностью эритроцитов оценивали при торможении специфического связывания меченного пероксидазой инсулина в присутствии немеченого гормона. Для исследования отобраны пробы крови 30 здоровых добровольцев 20-25 лет.

Выделение транспортирующего гормоны комплекса плазмы крови человека проводили методом аффинной хроматографии на сорбенте с иммобилизованным инсулином по ранее описанному методу [5]. Концентрацию гормонов в пробах определяли на автоматическом анализаторе Amerham с использованием наборов Amerlite (Амерлайт) конкурентным методом по инструкции, прилагаемой к набору реактивов. Определение содержания в пробах α_1 -кислого гликопротеина и трансферина проводили методом иммунонефелометрии при помощи диагностических наборов фирмы Иммунотех (Россия) по прилагаемой инструкции. Иммуноферментное определение человеческого альбумина и α -фетопротеина в выделенных аффинно пробах проводили с использованием диагностических наборов фирмы Иммунотех (г.Москва) по прилагаемой инструкции. Гель-хроматографию на Сефадексе G-75 проводили по стандартной методике [6].

Результаты и обсуждение

Установлено, что при конкурентном торможении связывания меченного пероксидазой инсулина со специфическими рецепторами плазматической мембраны эритроцитов свободным гормоном, с поверхностью эритроцитов связывается $14 \pm 1,32\%$ меченного пероксидазой инсулина, соответственно коэффициент распределения инсулина в этих условиях составил 0,16. Вероятно, уровень связывания инсулина эритроцитами в этих условиях отражает вклад гидрофобных взаимодействий в формировании фракции инсулина, связанной с плазматической мембраной эритроцитов. Таким образом, установлено, что в формировании инсулиндепонирующей емкости эритрона принимают участие гидрофобные взаимодействия.

Ранее показано, что в крови человека инсулин транспортируется в составе комплекса, ядро которого формируют белки крови [3]. Методом иммуноферментного анализа установлено, что в состав белков, формирующих транспортирующий гормоны комплекс в крови здоровых доноров входит $0,015 \pm 0,0007$ мг/мл альбумина. Методом иммунонефелометрии в пробах обнаружен трансферин – транспортный белок крови с подвижностью β -глобулинов, что согласуется с результатами Н.К. Грачевой и соавторов [7]. Трансферин, согласно современным представлениям, относится к классу липокалинов и принимает участие в транспорте широкого спектра биологически активных соединений [8]. По данным иммуноферментного анализа, в состав транспортного комплекса также входят гликопротеин с доказанной транспортной, иммуномодулирующей и детоксицирующей функцией α -фетопротеин ($6,7 \pm 0,3$ нг/мл).

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод о том, что в крови здоровых доноров в состав связывающего инсулин комплекса входят транспортные белки, в том числе, альбумин, α -фетопротеин и трансферин.

Наличие в составе гормонотранспортирующего комплекса трансферина, относящегося к липокалинам, послужило основанием для изучения содержания в полученных фракциях липидов. В полученных аффинно гормонотранспортирующих фракциях проведено определение холестерина и триглицеридов. В пробах здоровых доноров содержание холестерина составило $0,07 \pm 0,0004$ ммоль/л, содержание триглицеридов – $0,1010 \pm 0,003$ ммоль/л. Вероятно, полученные данные свидетельствуют о том, что изучаемый комплекс транспортирует широкий спектр гидрофобных биологически активных соединений.

Установлено, что в состав изучаемого комплекса входят следующие гидрофобные гормоны: тироксин ($11,0 \pm 0,5$ нмоль/л), трийодтиронин ($1,3 \pm 0,06$ нмоль/л), тестостерон ($7,0 \pm 0,03$ нмоль/л). Достоверного различия в содержании липидов и гидрофобных гормонов во фракциях здоровых доноров и больных сахарным диабетом не выявлено. В то же время, в составе связывающих инсулин фракций выявлены незначительные количества белковых гормонов: 1 МЕ/мл лютеинизирующего гормона, 0,03

мкМЕ/мл тиреотропного гормона, 0,5 МЕ/мл пролактина. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что изучаемый комплекс транспортирует не только гидрофобные соединения, но и белковые гормоны.

Проведено разделение белков, принимающих участие в транспорте гормонов, методом гельхроматографии при рН 2,8 и физиологическом значении рН. При рН 2,8 исследуемые белки разделились на два пика, соответствующие молекулярному весу более 100 тысяч Д и около 50 тысяч Д. После плавного доведения рН до физиологических значений при гельхроматографии исследуемого комплекса белков получен один пик, соответствующий молекулярному весу более 100 тысяч Д. Вероятно, это свидетельствует о том, что при физиологических условиях исследуемые белки ассоциируют, формируя ядро гормонотранспортирующего комплекса.

Таким образом, установлено, что транспортирующие инсулин белки плазмы крови при физиологических значениях рН формируют транспортный комплекс, ядро которого в норме формируют альбумин, а-фетопропротеин и трансферин. Выявленный транспортный комплекс является общим для ряда гидрофильных и гидрофобных гормонов. Комплекс, наряду с инсулином, включает примерно 50% всего содержащегося в сыворотке трийодтиронина, зна-

чительный процент тестостерона и других гидрофобных гормонов, а также некоторое количество белковых (пролактина) и гликопротеидных (лютеинизирующего и тиреотропного) гормонов. Можно предположить, что транспортный комплекс содержит оптимальное для клеток соотношение гормонов и его биологическое значение заключается в обеспечении дублирующего механизма доставки гормонов за счет клеточных рецепторов к транспортным белкам.

Показано, что в крови здоровых доноров при физиологических условиях инсулин распределяется между поверхностью эритроцитов и плазмой крови с коэффициентом распределения 0,52. В среднем с эритроцитами в крови обследованных здоровых доноров связано $33,03 \pm 2,66\%$.

Показано, что у лиц, занятых на нефтеперерабатывающих производствах, происходит достоверное изменение состава белков ядра транспортирующего гормоны комплекса: в гормонотранспортирующих комплексах, выделенных из крови 35 лиц, работающих на предприятиях нефтеперерабатывающей промышленности, обнаружено присутствие $2,6 \pm 0,036$ нг/мла₁-кислого гликопротеина – белка острой фазы воспалительной реакции. Возможно, изменение состава белков транспортирующего гормоны комплекса может служить причиной нарушений транспорта гормонов в крови обследованных.

Список использованной литературы:

1. Сандуляк Л.И. Эритроциты как депо и система транспорта инсулина // Доклады Академии наук С С С Р.-1974.-т. 219.- №4.-с. 1020 – 1021;
2. Сандуляк Л.И, Ковалев В.П. – Иммунофлуоресцентный метод выявления инсулина в эритроцитах.-Проблемы эндокринологии.-1978.-т. 24.-№5.-с. 77 – 78.
3. Гарипова М.И. Транспорт инсулина в крови человека. – Уфа. – РИЦ БашГУ.-2007.-127 С.(б);
4. Першина А.С., Киреева Н.А., Елисеева О.С, Гарипова М.И. Изучение эритроцитарного транспорта инсулина в норме и при сахарном диабете первого типа. – Вестник Оренбургского государственного университета.-В печати.
5. 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 Баш.гос.ун-та.-2005.-№4. – с.44-46.
6. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука.-1985.-536 С.
7. Грачева Н.К., Харитоненков И.Г. Изучение «связанного инсулина» сывороток крови доноров и больных сахарным диабетом методом кругового дихроизма. // Лабораторное дело.-1977.-стр.8-13.
8. Flower, D.R. the Lipocalin Protein Family: Structure and Function.// Biochem. J. -1996.– v. 318.– p. 1-14.