

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМЕННЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ НА СЕКРЕЦИЮ ИНСУЛИНА ОСТРОВКАМИ ЛАНГЕРГАНСА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Лев Евгеньевич ПАНИН¹, Ольга Николаевна ПОТЕРЯЕВА², Галина Сергеевна РУССКИХ¹

¹НИИ биохимии СО РАМН

630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

²ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава

630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

В работе изучено влияние липопротеинов очень низкой, низкой и высокой плотности (ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП) и их белковых компонентов апопротеинов В и А-I (апо В, апо А-I) на продукцию инсулина β -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы крыс Wistar. Кроме того, исследовали влияние на секрецию инсулина липопротеина(α) (ЛП(α)) и синтетического дипептида, имеющего общие антигенные детерминанты с инсулином и молекулой апо В-100. Дипептид был синтезирован в НИИ биохимии СО РАМН. Показано, что развитие сахарного диабета (СД) 2 типа сопровождается увеличением содержания в сыворотке крови ЛПОНП и ЛПНП и снижением концентрации ЛПВП. В опытах *in vitro* показано, что ЛПВП и очищенный аполипопротеин А-I усиливали секрецию инсулина β -клетками островков Лангерганса, тогда как ЛПНП таким эффектом не обладали. Впервые выявлен у аполипопротеина В иммунохимический перекрест с инсулином человека. Липопротеины очень низкой плотности и апо В взаимодействовали с антителами к инсулину в концентрационной зависимости. Липопротеины высокой плотности не имели перекрестного иммунохимического взаимодействия с антителами к инсулину. Липопротеин(α) и синтетический дипептид существенно снижали секрецию гормона. Мы предполагаем, что инсулин и апо В несут общие антигенные детерминанты, определяющие конкурентные взаимоотношения между обоими белками за инсулиновый рецептор.

Ключевые слова: инсулин, островки Лангерганса, липопротеины.

Сахарный диабет 2 типа обусловлен двумя основными факторами: инсулиновой резистентностью и недостаточной функцией β -клеток. В настоящее время полагают, что в патогенезе СД 2 типа основную роль играет преобладание в крови веществ с контринсулярным эффектом [1]. Многие из этих соединений до сих пор не идентифицированы, и природа их остается неизвестной. Обнаружено, что вещества с выраженным контринсулярным действием могут быть связаны с липопротеиновой фракцией сыворотки крови. Впервые в НИИ биохимии СО РАМН было показано, что атерогенные фракции липопротеинов плазмы крови обладают контринсулярным эффектом, связанным со снижением поглощения глюкозы периферическими тканями, в первую очередь мышцами [2, 3].

Не исключено, что ЛПНП и ЛПОНП могут влиять на продукцию инсулина β -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы. В данной работе было изучено влияние ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП на продукцию инсулина β -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы крыс Wistar. Изучали влияние основных белковых компонентов липопротеинов, апо А-I и апо В, на секрецию инсулина. Кроме того, исследовали влияние ЛП(α). Появление данного белка в боль-

шом количестве характерно для больных сахарным диабетом, особенно при СД 2 типа [4].

Материал и методы

Сыворотка крови была получена у больных СД 2 типа, которые проходили лечение в клинике Научного центра клинической и экспериментальной медицины СО РАМН. Диагноз был поставлен в соответствии с критериями Комитета экспертов ВОЗ по сахарному диабету (1999 г.). Контрольную группу составили 30 условно здоровых человек. Исследование проведено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2000 г.). У всех пациентов получено письменное информированное согласие на проведение обследования.

Экспериментальная часть работы была выполнена на крысах-самцах Wistar массой 180–200 г, полученных из вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Исследования проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Островки Лангерганса выделяли седиментационным методом согласно Lacy P. et al. [5]. Выделение липопротеинов из плазмы крови человека проводили флотацией в растворах KBr [6] на ультрацентрифуге «Optima L-90K, Beckman-Coulter» (Австрия) с использованием ротора 70.1 Ti. По-

Панин Л.Е. — д.м.н., академик РАМН, директор, e-mail: ibch@soramn.ru

Потеряева О.Н. — д.м.н., проф. кафедры общей и биоорганической химии, e-mail: Olga_Poteryaeva@mail.ru

Русских Г.С. — к.б.н., старш.н.с. лаборатории медицинской биотехнологии НИИ биохимии СО РАМН, e-mail: Russkikh_g@soramn.ru

лученные ЛП диализовали в течение 24 ч против 0,05 М калий-фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 0,15 М NaCl, при 4 °С. Диск-электрофорез липопротеинов сыворотки крови человека проводили в полиакриламидном геле. Процентное содержание липопротеинов рассчитывали после элюирования фракций тритоном X-100 [7]. Содержание инсулина измеряли радиоиммунным набором «DSL-1600» (Франция). Измеренная радиоактивность обратно пропорциональна концентрации присутствующего в образце инсулина.

В работе с островками Лангерганса для инкубации использовали 20 мМ раствор глюкозы, ЛП всех классов (ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП), а также основной белок β -ЛП (апо В) и ЛПВП (апо А-I). Апопротеины получены из соответствующих липопротеинов, очищены путем аффинной хроматографии д.м.н., зав. лабораторией медицинской биотехнологии НИИ биохимии Л.М. Поляковым. Белок ЛП(α) был получен в НИИ терапии СО РАМН и любезно предоставлен д.м.н., ведущим научным сотрудником этого института А.В. Тихоновым в 2002 г. Кроме того, исследовали влияние синтетического дипептида, имеющего общие антигенные детерминанты с инсулином и молекулой апо В-100. Дипептид был синтезирован в НИИ биохимии СО РАМН.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием пакета программ «Statistica, ver. 6.0». Определяли среднее арифметическое (M), ошибку среднего (m); различия между группами оценивали с помощью t -критерия Стьюдента и считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

На рис. 1 представлена типичная картина электрофоретического разделения липопротеинов сыворотки крови здоровых лиц и больных СД 2 типа. Следует отметить, что полоса, соответствующая ЛПОНП, практически отсутствовала на электрофореграмме здоровых людей и отчетливо проявлялась у больных. Фракции ЛПНП больных были представлены широкой и более интенсивно окрашенной полосой, а фракции ЛПВП₂ и ЛПВП₃ были размыты и выражены менее отчетливо по сравнению с контролем.

Количественная оценка содержания липопротеинов различных классов представлена в таблице.

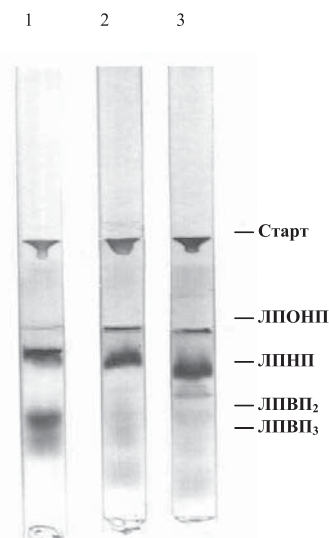


Рис. 1. Электрофореграммы липопротеинов, полученных методом диск-электрофореза в ступенчатом полиакриламидном геле, от образцов сывороток крови: 1 – здоровых людей; 2, 3 – больных с СД 2 типа.

У больных СД 2 типа доля атерогенных фракций ЛП была выше ($p < 0,05$), чем у здоровых людей (ЛПОНП – на 42 %, ЛПНП – на 15,2 %). Наоборот, содержание антиатерогенных ЛП было снижено: ЛПВП₂ – на 56 % ($p < 0,001$), а ЛПВП₃ – на 13 % ($p < 0,05$).

В экспериментах *in vitro* показано, что островки Лангерганса при добавлении к ним 20 мМ глюкозы секретируют в среду (раствор Кребса – Рингера) $7,6 \pm 0,53$ мкЕД/мл инсулина в течение одного часа (рис. 2). Добавление глюкозы с ЛПОНП или ЛПНП не изменяло продукцию инсулина, которая при этом составила $11,5 \pm 1,32$ мкЕД/мл и $6,8 \pm 0,67$ мкЕД/мл соответственно. При добавлении в среду глюкозы и апо В секреция инсулина также не изменялась. Добавление глюкозы и ЛПВП сопровождалось увеличением концентрации инсулина в среде в 3,4 раза, которая составила $26,0 \pm 1,61$ мкЕД/мл ($p < 0,001$). Совместное введение глюкозы с аполипопротеином А-I приводило к увеличению секреции инсулина ($15,3 \pm 1,21$ мкЕД/мл, $p < 0,002$), но в меньшей степени (в 2 раза), чем добавление самих ЛПВП (рис. 2).

Таблица

Содержание липопротеинов различных классов в сыворотке крови у больных сахарным диабетом 2 типа

	ЛПОНП, %	ЛПНП, %	ЛПВП ₂ , %	ЛПВП ₃ , %	ЛПНП + ЛПОНП, мг/дл
Больные СД 2 типа, n = 58	$22,4 \pm 1,8$	$53,2 \pm 2,0$	$10,4 \pm 1,2$	$13,9 \pm 1,1$	877 ± 40
Контрольная группа, n = 30	$12,9 \pm 1,05$	$44,6 \pm 1,8$	$24,5 \pm 2,0$	$18,0 \pm 1,4$	496 ± 29
Достоверность отличия от значения в контроле	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p < 0,001$

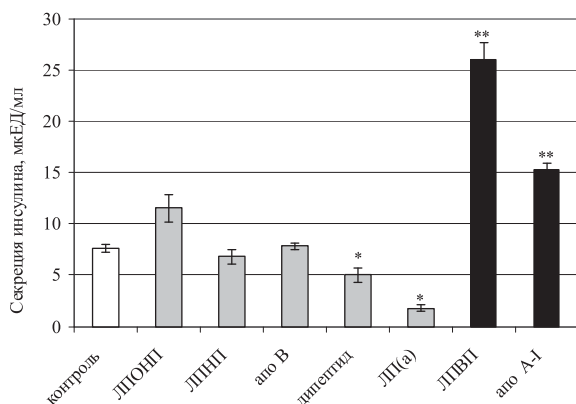


Рис. 2. Влияние липо- и апопротеинов различных классов на синтез инсулина островками Лангерганса поджелудочной железы крыс.

Отличие от контроля достоверно:

* — при $p < 0,05$, ** — при $p < 0,01$.

Синтезированный аналог рецепторного участка инсулина, дипептид, уменьшал концентрацию инсулина в среде на 34 % ($5,00 \pm 0,71$ мкЕД/мл, $p < 0,04$), в то время как ЛП(α) снижал содержание гормона в 4,3 раза ($1,77 \pm 0,29$ мкЕД/мл, $p < 0,001$). ЛП(α) — это липид-белковый комплекс, относящийся к апо В-содержащим ЛП. В сыворотке крови здоровых людей он отсутствует, но появляется при многих патологических состояниях, сопровождающихся изменениями в липидном обмене. Известно, что концентрация этого белка существенно увеличивается при сахарном диабете 2 типа [4].

В ранних исследованиях НИИ биохимии СО РАМН было показано, что инсулин и апо В, входящий в ЛПОНП и ЛПНП, содержат общие антигенные детерминанты. С помощью дот-иммуноанализа обнаружили, что суммарная фракция ЛПНП и ЛПОНП человека и крыс специфически взаимодействует с антителами к инсулину человека. Лимитированный протеолиз молекулы апо В β-меркаптоэтанолом приводил к образованию 10–12 пептидов с различной молекулярной массой. Последующий иммуноэлектроблоттинг выявил, что все пептиды взаимодействовали с антителами к апо В и только 5–6 пептидов — с антителами к инсулину человека [2]. В настоящих экспериментах было исследовано, могут ли липопротеины различных классов взаимодействовать с антителами к инсулину.

На рис. 3 показана калибровочная кривая стандартных растворов инсулина и кривые титрования липопротеинов различных классов с антителами к инсулину в зависимости от их разведения. Оказалось, что ЛПОНП взаимодействуют с антителами к инсулину в концентрационной зависимости (кривая 2). Липопротеины низкой плотности и апо В также взаимодействовали с инсулиновыми антителами, но обладали менее выраженным сродством (кривые 3, 4). Возможно, поэтому не

удалось показать предполагаемое нами ингибирующее действие ЛПОНП и ЛПНП на секрецию инсулина. При измерении концентрации инсулина радиоиммунным методом происходила перекрестная реакция между ЛПОНП, ЛПНП и гормоном, что могло дать завышенный результат. При вычитании этого фона оказалось, что ЛПОНП и, в меньшей степени, ЛПНП снижали секрецию инсулина β-клетками островков Лангерганса поджелудочной железы. Напротив, ЛПВП не имели перекрестного взаимодействия с антителами к инсулину.

Обсуждение

Таким образом, нами было показано, что развитие СД 2 типа сопровождается увеличением содержания в сыворотке крови ЛПОНП и ЛПНП и снижением концентрации ЛПВП. Изменялась подвижность ЛП в геле, что, возможно, указывает на изменение размера и заряда липопротеиновых частиц в результате гликирования или окисления их белкового компонента [8]. Ранее нами было показано, что у больных в сыворотке крови увеличивалась концентрация апо В ($101,8 \pm 5,4$ мг/дл, $p < 0,01$) по сравнению со здоровыми лицами ($84,6 \pm 7,4$ мг/дл), особенно у больных с высоким содержанием триглицеридов ($114,5 \pm 6,0$ мг/дл, $p < 0,01$). Наоборот, содержание апо А-1 достоверно снижалось [9].

В опытах *in vitro* было показано, что ЛПВП и очищенный апопротеин А-1 усиливали секрецию инсулина β-клетками островков Лангерганса. Липопротеины очень низкой и низкой плотности, вероятно, снижают содержание инсулина. В литературе имеются сообщения о том, что ЛПНП в дозе 6 мкг/мл приводят к гибели β-клеток поджелудочной железы крыс [10]. В наших экспериментах β-ЛП не изменяли секрецию гормона, но проявляли иммунохимический перекрест с инсулином человека. ЛПОНП, апо В взаимодействовали

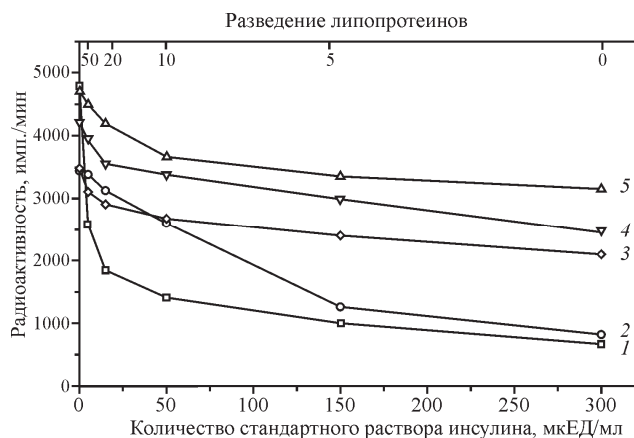


Рис. 3. Калибровочные кривые раствора инсулина с известной концентрацией и липопротеинов различных классов: 1 — стандартные растворы инсулина; 2 — ЛПОНП, 3 — апо В, 4 — ЛПНП, 5 — ЛПВП.

с антителами к инсулину в концентрационной зависимости. ЛПВП не имели перекрестного взаимодействия с антителами к инсулину. Показано, что ЛП(α) и синтетический дипептид существенно снижали секрецию гормона. Липопротеин(α) — патологический белок, в него входит апо В-100 и уникальный белок — апо (α), представляющий собой высокогликозилированный полипептид. Под влиянием апо (α) высокогидрофобный апо В приобретает способность растворяться в воде [4]. Используемый в работе дипептид пространственно соответствует сайту связывания инсулина с его рецептором и представляет собой С-концевой тетрапептид из А-цепи молекулы (A18–A21) и С-концевой тетрадекапептид из В-цепи (B17–B30), соединенные дисульфидной связью [11]. Методами иммуноферментного анализа с использованием полученных к пептиду антител показана иммунохимическая идентичность модельного димера и соответствующего ему фрагмента молекулы инсулина. Дипептид при введении мышам внутривенно, не обладая гипогликемическим эффектом, достоверно подавлял гипогликемическое действие инсулина [2]. Кроме того, антитела к синтетическому пептиду реагировали с ЛПНП и ЛПОНП.

Суммируя факты, полученные в предыдущих работах и в данном исследовании, мы можем предположить, что инсулин и апо В имеют общие антигенные детерминанты, определяющие конкурентные взаимоотношения между обоими белками за инсулиновый рецептор. Это, в конечном итоге, может привести к нарушению связывания инсулина, гиперинсулинемии, гликемии и СД 2 типа.

Список литературы

1. Дедов И.И., Фадеев В.В. Введение в диабетологию. М., 1998. 199 с.
2. Dedov I.I., Fadeev V.V. Introduction in diabetology. M., 1998. 199 p.
3. Панин Л.Е., Останина Л.С., Атучина Н.В. Иммунохимический анализ общих антигенных детерминант в молекуле инсулина и апопротеина В // Бюл. экспер. биол. и мед. 1994. 118. (9). 258–261.
4. Panin L.E., Ostanina L.S., Atuchina N.V. Immunochemical analysis of common antigenic determinants in insulin and apoprotein B // Bul. eksp. biol. and med. 1994. 118. (9). 258–261.
5. Панин Л.Е., Останина Л.С., Колпаков А.Р. К механизму контринсулярного эффекта апопротеина В // Вопр. мед. хим. 1995. 41. (6). 12–16.
6. Panin L.E., Ostanina L.S., Kolpakov A.R. The mechanism of anti-insulin effect of apoprotein B // Vopr. med. khim. 1995. 41. (6). 12–16.
7. Song K.H., Ahn Y.B., Yoon K.H. et al. The effect of long-term glycaemic control on serum lipoprotein (a) levels in patients with type 2 diabetes mellitus // Diab. Med. 1999. 16. 1036–1039.
8. Lacy P.E., Kostianovsky M., Louis St. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas // Diabetes. 1967. 16. (1). 35–39.
9. Hatch F.T., Lees R.S. Practical method for plasma lipoprotein analysis // Adv. Lipid Res. 1968. 6. 2–68.
10. Поляков Л.М., Панин Л.Е. Метод количественного определения липопротеинов сыворотки крови путем элюирования участков диск-электрофореграмм тритоном X-100 // Лаб. дело. 1975. (2). 131–137.
11. Polyakov L.M., Panin L.E. Method of the quantitative determination lipoproteins of blood serum by elution of parts disk-electrophoresis Triton X-100 // Lab. delo. 1975. (2). 131–137.
12. Ducobu J. Type 2 diabetes mellitus and dyslipidemia // Diabetography. 1997. 10. 8–15.
13. Потеряева О.Н., Панин Л.Е., Шевкопляс О.П. и др. Липопротеины сыворотки крови при инсулиннезависимом сахарном диабете // Пробл. эндокринологии. 2003. 49. (4). 4–8.
14. Poteryaeva O.N., Panin L.E., Schevkoptyas O.P. et al. Lipoproteins of the blood serum in development of the non-insulin dependent diabetes mellitus // Probl. endocrinol. 2003. 49. (4). 4–8.
15. Snop M., Hannaert J.C., Gruppig A.Y. et al. Low density lipoprotein can cause death of islet beta-cells by its cellular uptake and oxidative modification // Endocrinology. 2002. 143. (9). 3449–3453.
16. Панин Л.Е., Сабиров А.Н., Максюттов А.З. и др. Дизайн, синтез и иммунохимическая идентификация предполагаемого рецепторного домена инсулина человека // Мол. биол. 1997. 32. (2). 378–384.
17. Panin L.E., Sabirov A.N., Maksyutov A.Z. et al. Design, synthesis and immunochemical identification of the proposed receptor domain of human insulin // Mol. Biol. 1997. 31. (2). 366–372.

INFLUENCE OF PLASMA LIPOPROTEINS ON INSULIN SECRETION BY ISLETS OF LANGERHANS FROM THE PANCREAS

Lev Evgen'evich PANIN¹, Olga Nicolaevna POTERYAEVA², Galina Sergeevna RUSSKIKH¹

¹*Scientific Research Institute of Biochemistry of SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov st., 2*

²*Novosibirsk State Medical University of Roszdrav
630091, Novosibirsk, Krasnyi av., 52*

The influence of plasma lipoproteins (VLDL, LDL, HDL) and their protein components on production of insulin by β -cells of islets of Langerhans from a pancreas of Wistar rats has been studied in the present work. In addition, we studied the influence of LP(α) and synthetic dipeptide containing the common antigen determinants with insulin and apo B-100 molecule on secretion of the hormone. Dipeptide has been synthesized in scientific research Scientific Research Institute of Biochemistry of SB RAMN. It was shown that development of diabetes mellitus 2 types is accompanied with increase in serum of blood VLDL and LDL and decrease HDL. HDL and purified apo A-I increase the secretion of insulin, while VLDL has no similar effect. For the first time it was shown that apo B has immunochemical recross with human insulin. VLDL and apo B interacted with insulin antibody in dose dependent fashion. LP(α) и synthetic dipeptide significantly decrease the secretion of the hormone. We suppose that insulin and apo B have common antigen determinants defined competitive interaction between both proteins for insulin receptors.

Key words: insulin, islets of Langerhans, lipoproteins.

Panin L.E. — doctor of medical sciences, academician RAMS, director, e-mail: ibch@soramn.ru

Poteryaeva O.N. — doctor of medical sciences, professor of the general and bioorganic chemistry department, e-mail: Olga_Poteryaeva@mail.ru

Russkikh G.S. — candidate of biological sciences, the senior scientific researcher of laboratory of medical biotechnology, Scientific Research Institute of Biochemistry of SB RAMS, e-mail: Russkikh_g@soramn.ru