

been found in the basal activity of Na^+ , K^+ -ATPase. In old age the activation of Na^+ , K^+ -ATPase by the low concentrations of acetylcholine and vasopressin weakens and the inhibiting effect of high vasopressin concentrations increases. The inhibiting effect of high acetylcholine concentrations in old rats retains at the level of the adult ones. No significant changes in the effect of norepinephrine on Na^+ , K^+ -ATPase activity during aging have been observed.

Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences
of the Ukrainian SSR, Kiev

1. Априкян Г. В., Шагинян В. А., Мкртчян Г. А. и др. Особенности захвата нейромедиаторных аминокислот в препаратах головного мозга белых крыс при старении // Физиол. журн.— 1984.— 30, № 1.— С. 69—73.
2. Богацкая Л. Н., Потапенко Р. И. Возрастные особенности энергетического обмена головного мозга // Нервная система и старение.— Киев, 1983.— С. 50—54.
3. Болдырев А. А. Биохимические аспекты электрохимического сопряжения.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1977.— 208 с.
4. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Инактивация Na , K -АТФазы как триггерный фактор сопряжения и секреции нейромедиаторов: (Обзор) // Укр. биохим. журн.— 1983.— 55, № 4.— С. 460—474.
5. Коменгони З. П., Джарашавили Т. Я., Цакадзе Л. Г. Действие ацетилхолина на Na^+ , K^+ -АТФазу синапсом // Биохимия.— 1975.— 4, № 5.— С. 1039—1045.
6. Фролькис В. В., Безруков В. В. Старение центральной нервной системы // Физиология человека.— 1978.— 4, № 4.— С. 596—619.
7. Фролькис В. В., Головченко С. Ф., Пугач Б. В. Содержание вазопрессина в крови и чувствительность к нему сердечно-сосудистой системы // Физиол. журн. СССР.— 1976.— 62, № 4.— С. 486—593.
8. Bartus R. T., Fleming D. L., Johnson H. R. Aging in the rhesus monkey debilitating effects on short term memory // J. Gerontol.— 1978.— 33, N 6.— P. 858—871.
9. Briggs R. S., Petersen M. M., Cook P. I. Muscarinic agonist receptor subtypes in aging rat brain // Neurobiol. Ageing.— 1982.— 3, N 3.— P. 259—261.
10. Calderini G., Bonetti A. C., Battistella A. et al. Biochemical changes of rat brain membranes with aging // Neurochem. Res.— 1983.— 8, N 4.— P. 483—492.
11. Hajoš S. An improved method for the preparation synaptosomal fractions in high purity // Brain Res.— 1975.— 93, N 3.— P. 485—489.
12. Hawthorn J., Ang V. T. Y., Jenkins J. S. Localization of vasopressin in the rat brain // Brain Res.— 1980.— 197, N 1.— P. 75—81.
13. La Manna J. C., Doull G., McCracken K. H., Haric S. I. (Na^+ , K^+)-ATPase activity and ouabain-binding sites in the cerebral cortex of young and aged Fischer-344 rats // Gerontology.— 1983.— 29, N 4.— P. 242—247.
14. Markwell M., Haas S. M., Riebel L. L. et al. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples // Anal. biochem.— 1978.— 87, N 1.— P. 206—210.
15. Ratbun B., Bettlach V. Estimation of enzymically produced orthophosphate in presence of cysteine and adenosine triphosphate // Anal. Biochem.— 1969.— 28.— N 2.— P. 436—445.
16. Sun A. Y., Samorajski T. Effect of age and alcohol on (Na^+ , K^+)-ATPase activity of whole homogenate and synaptosomes prepared from mouse and human brain // J. Neurochem.— 1975.— 24, N 1.— P. 161—164.
17. De Wied D. Pituitary neuropeptides and behaviour // Central. regulation of the endocrine system.— New York; London: Plenum press, 1979.— P. 297—314.
18. Zbuzek V. K. Age-related vasopressin changes in rat plasma and the hypothalamo-hypophyseal system // Exp. Gerontol.— 1982.— 17, N 2.— P. 133—138.

Ин-т геронтологии АМН СССР, Киев

Поступила 27.06.86

УДК 612.349.8:611—018.26:616.441.018

Состояние инсулиновых рецепторов плазматических мембран жировых клеток при повышенном содержании тиреоидных гормонов у людей и животных

П. М. Павлюк, Н. Ю. Евдокимова, Ю. В. Бездробный, О. В. Божок

Известно, что развитие гипертиреоза при сахарном диабете утяжеляет течение последнего и что у больных с гипертиреозом нарушается глюкозный гомеостаз, а также чувствительность к инсулину [2], вследст-

ние чего увеличивается вероятность возникновения сахарного диабета. Сообщалось и об ослаблении тиреоидными гормонами эффектов инсулина в клетке [5, 12]. Однако механизм такого действия тиреоидных гормонов остается неясным, в связи с чем закономерен вопрос: «Не угнетают ли тиреоидные гормоны активность инсулиновых рецепторов на поверхности клетки, через взаимодействие с которыми инсулин индуцирует свои внутриклеточные эффекты?» Результаты изучения этого вопроса в опытах на животных противоречивы. Сообщалось об увеличении количества инсулиновых рецепторов в жировых клетках крыс при введении им тироксина [12] и о снижении их количества при преемственности изолированных жировых клеток с триодтиронином [7]. Вместе с тем у крыс гипотиреоз не влиял на связывание инсулина с его рецепторами в жировой ткани [8], а гипо- и гипертиреоз — на связывание инсулина с рецепторами печени [18]. Фетальный гипотиреоз у кролика снижал количество инсулиновых рецепторов в мембранах печени и легкого плодов (4 нед беременности). У человека наблюдали и повышение [13] и понижение [20] связывания инсулина с моноцитами при тиреотоксикозе, как и снижение количества инсулиновых рецепторов в клетках глутеальной подкожной жировой ткани [5]. При нагрузке здоровых людей тиреоидными гормонами наблюдали снижение связывания инсулина с эритроцитами за счет сродства [15] и повышение сродства рецепторов моноцитов к инсулину [9]. В первом случае нагрузка длилась 7 нед, во втором — 2 нед.

Такая противоречивость данных может быть обусловлена видовыми различиями, а также различиями длительности гипертиреоза и реакций на гипертиреоз инсулиновых рецепторов разных тканей.

С целью выяснения влияния гипертиреоза на инсулиновые рецепторы типичной ткани-мишени инсулина мы изучали состояние инсулиновых рецепторов плазматических мембран жировой ткани у людей с длительным тиреотоксикозом и у крыс с экспериментальным гипертиреозом, вызванным подсадкой на 3 нед гранулы, содержащей тироксин.

Методика

Для изучения инсулиновых рецепторов у людей (8 больных тиреотоксикозом и 8 больных эутиреоидным зобом) брали пробы подкожной жировой ткани из области шеи во время операции тиреоидэктомии. Длительность заболеваний была не менее полугода. Из-за недостаточности материала пробы жировой ткани, взятые у нескольких больных, в каждой группе объединяли и использовали их смеси для оценки состояния рецепторов. Активность рецепторов у остальных больных определяли индивидуально. Подкожную жировую ткань абдоминальной области (для сравнения ее плазматических мембран с плазматическими мембранами ткани области шеи) брали во время аппендэктомии у 4 людей без эндокринной патологии.

Экспериментальный гипертиреоз индуцировали у крыс по описанной ранее методике [4], имплантируя подкожно на 21-е сутки гранулу, содержащую в каолине 2 мг тироксина, животным массой 110—130 г. После забоя животных для исследования использовали всю жировую ткань брюшной полости. Плазматические мембраны из жировой ткани получали по методике Бездробного [1], активность инсулиновых рецепторов в полученных мембранах определяли с помощью сатурационного анализа, как описано ранее [3]. Активность 5'-нуклеотидазы и концентрацию белка в плазматических мембранах определяли по методикам Emmelot и соавт. [10] и Lowry и соавт. [16] соответственно.

Концентрацию иммунореактивного инсулина в сыворотке экспериментальных животных определяли с помощью наборов рино-ИНС-ПГ-¹²⁵I¹. В сыворотке больных концентрацию гормонов определяли радиоиммунным методом с помощью следующих наборов: кортизол и тироксин², инсулин³, С-пептид⁴, соматотропин и пролактин⁵.

¹ Наборы изготовлены в Институте биоорганической химии АН БССР

² Фирма «Amersham» (Англия)

³ Фирма «International CIS» (Франция)

⁴ Фирма «Byk Mellinkrodt» (ФРГ)

⁵ Фирма «Immuno Nuclear Corporation» (США)

Результаты и их обсуждение

В литературе мы не обнаружили данных, характеризующих инсулиновые рецепторы в подкожной жировой ткани шеи. Вместе с тем были сообщения о различиях в экспрессии инсулиновых рецепторов в жировых клетках подкожной клетчатки различной локализации [6]. Учитывая это, мы сравнили инсулинсвязывающую активность плазматических мембран жировой ткани подкожной клетчатки шеи с таковой абдоминальной области, изучаемой рядом авторов. Параллельно в сравниваемых препаратах определяли активность фермента-маркера плазматических мембран 5'-нуклеотидазы, по удельной активности которой часто судят о чистоте препаратов мембран. Представленные в табл. 1 результаты указывают на резко сниженную активность 5'-нуклеотидазы в препаратах жировых плазматических мембран области шеи по сравнению с таковой в препаратах мембран абдоминальной области. Однако инсулинсвязывающая активность у первых была значительно выше, чем у вторых. Неспецифическое связывание ^{125}I -инсулина было также достоверно повышено для мембран жировой ткани, взятой из области шеи. Такие данные подтверждают топографическую специфичность плазматических мембран подкожной жировой ткани, отражающуюся в удельной активности 5'-нуклеотидазы и в инсулинсвязывающей способности. Они также указывают на то, что удельная активность 5'-нуклеотидазы не может служить абсолютным показателем чистоты плазматических мембран. Значения этого показателя для препаратов мембран области шеи на порядок ниже, чем для препаратов мембран абдоминальной области. Но концентрация инсулиновых рецепторов для обеих областей близка, судя по результатам анализа Scatchard [19] усредненной сатурационной кривой для четырех препаратов приготовленных из абдоминальной ткани (99,35 пмоль/мг белка) и сатурационной кривой для смеси мембран области шеи больных эутиреоидным зобом (137,00 пмоль/мг белка).

В табл. 2 приведены значения концентрации инсулина, С-пептида и ряда контринсулиновых гормонов в сыворотке обследованных больных. Видно, что больные тиреотоксикозом имеют (по сравнению с больными эутиреоидным зобом) кроме повышенной концентрации тироксина повышенную концентрацию иммунореактивного инсулина и кор-

Таблица 1. Связывание ^{125}I -инсулина и активность 5'-нуклеотидазы ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$) в плазматических мембранах подкожной жировой ткани, взятой из абдоминальной области и области шеи

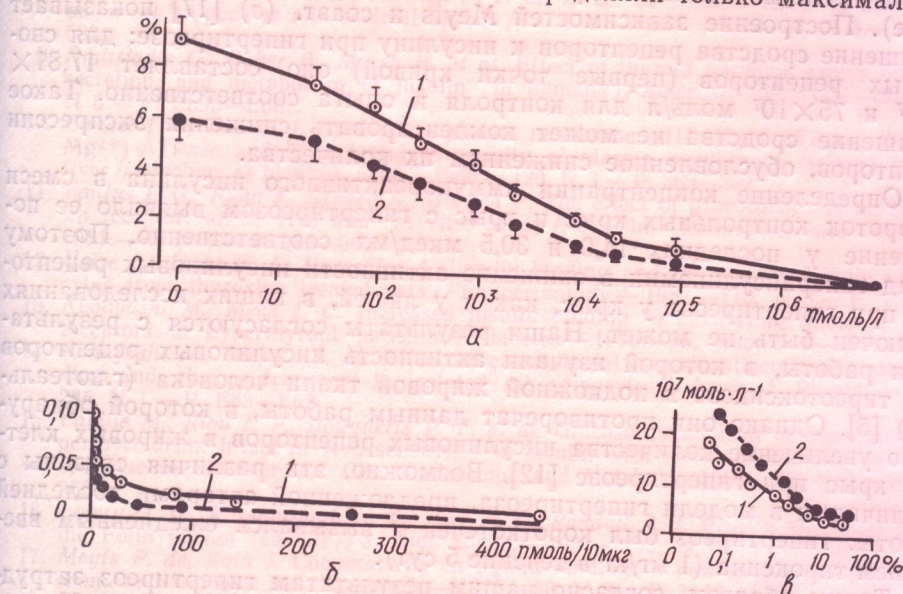
Локализация подкожной жировой ткани	Связывание ^{125}I -инсулина, % его общего количества		Активность 5'-нуклеотидазы, мкмоль РХ $\times \text{мг}^{-1}$ белка $\cdot \text{ч}^{-1}$
	максимальное специфическое	неспецифическое	
Абдоминальная область	$12,4 \pm 0,9$	$2,7 \pm 0,2$	$5,82 \pm 0,58$
Область шеи	$34,8 \pm 1,2$ $P < 0,001$	$10,6 \pm 2,4$ $P < 0,05$	$0,77 \pm 0,14$ $P < 0,001$

Таблица 2. Содержание инсулина и контринсулиновых гормонов в сыворотке обследованных больных тиреотоксикозом и эутиреоидным зобом ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Концентрация вещества	Тиреотоксикоз	Эутиреоидный зоб	P
Тироксин, нмоль/л	$165,62 \pm 7,72$	$108,39 \pm 6,43$	$< 0,001$
Инсулин, пмоль/л	$180,85 \pm 13,06$	$100,12 \pm 8,28$	$< 0,001$
С-пептид, мкг/л	$2,3 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	$> 0,05$
Кортизол, нмоль/л	$325,6 \pm 19,0$	$232,0 \pm 28,2$	$< 0,05$
Соматотропин, мкг/л	$2,6 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,3$	$> 0,05$
Пролактин, мкг/л	$14,0 \pm 1,7$	$13,2 \pm 1,1$	$> 0,05$

тизола. Концентрация С-пептида в обеих группах достоверно не отличалась, что не позволяет объяснить повышение концентрации инсулина в сыворотке увеличением его продукции поджелудочной железой.

Количество жировой ткани, которое удается взять при тиреоидэктомии, не позволяет получить для построения сатурационной кривой (кривой вытеснения при связывании ^{125}I -инсулина возрастающим количеством немеченого гормона) достаточное количество плазматических мембран. Поэтому для больных определяли только максимальное



Критерии связывания инсулина с плазматическими мембранами жировой ткани контрольных крыс (1) и крыс гипертиреозом (2):

а — сатурационные кривые (по вертикали — специфически связавшийся ^{125}I -инсулин; по горизонтали — концентрация немеченого инсулина); б — зависимость Scatchard (по вертикали B/F , где B — количество связанного, F — количество свободного ^{125}I -инсулина; по горизонтали — связанный ^{125}I -инсулин); в — зависимость Meys и Roth (по вертикали — приведенное сродство $\bar{K}_0 = (B/F)/(R_0 - B)$; по горизонтали — доля занятых рецепторов $\bar{Y} = B/R_0$, где R_0 — количество инсулиновых рецепторов.

специфическое и неспецифическое связывание ^{125}I -инсулина. Пробы жировой ткани нескольких больных в каждой группе из-за недостатка материала объединяли и связывание инсулина определяли в этих смешанных пробах. Максимальное специфическое связывание ^{125}I -инсулина (по результатам анализа препаратов плазматических мембран жировых клеток) у больных тиреотоксикозом по сравнению с больными эутиреоидным зобом было достоверно сниженным (сравнивались индивидуальные препараты мембран и их смеси):

Эутиреоидный зоб

1—32,8
2—38,5
3—31,6
4—35,9
1—4—35,8
 $\bar{x} \pm \bar{S}_x$ —34,8 $\pm$ 1,2

Тиреотоксикоз

1—30,3
2—33,4
3—24,9
1—3—26,8
 $\bar{x} \pm \bar{S}_x$ —28,8 $\pm$ 1,9
 $P < 0,05$

Это говорит об угнетении экспрессии инсулиновых рецепторов в жировой ткани под влиянием повышенной продукции тиреоидных гормонов. Такое угнетение может быть опосредовано и увеличением в сыворотке концентрации инсулина и кортизола, которые, как сообщалось [3, 11, 14], угнетают экспрессию инсулиновых рецепторов в жировой ткани. При изучении влияния повышенного содержания в организме тироксина на связывание ^{125}I -инсулина с жировыми плазматическими мембранами брали всю жировую ткань брюшной полости. Количество выделенных из нее плазматических мембран было достаточным для

получения сатурационных кривых. На рисунке (а) показаны сатурационные кривые для контрольных крыс и крыс с гипертиреозом, демонстрирующие снижение связывания ^{125}I -инсулина у последних при всех концентрациях немеченого гормона. Выражение этих кривых в виде зависимостей Scatchard (б) [19], позволяющих определить количество инсулиновых рецепторов (по пересечению кривой с осью абсцисс), выявляет снижение количества рецепторов у опытных животных (66,36 пмоль/мг белка по сравнению с 141,89 пмоль/мг белка в контроле). Построение зависимостей Meutts и соавт. (в) [17] показывает повышение сродства рецепторов к инсулину при гипертиреозе: для свободных рецепторов (первые точки кривой) оно составляет $17,81 \times 10^7$ и 75×10^7 моль/л для контроля и опыта соответственно. Такое повышение сродства не может компенсировать снижения экспрессии рецепторов, обусловленное снижением их количества.

Определение концентрации иммунореактивного инсулина в смеси сывороток контрольных крыс и крыс с гипертиреозом выявило ее повышение у последних 14,0 и 30,5 мкЕд/мл соответственно. Поэтому вклад гиперинсулинемии в снижение активности инсулиновых рецепторов при гипертиреозе у крыс, как и у людей, в наших исследованиях исключен быть не может. Наши результаты согласуются с результатами работы, в которой изучали активность инсулиновых рецепторов при тиреотоксикозе в подкожной жировой ткани человека (глутеальной) [5]. Однако они противоречат данным работы, в которой обнаружено увеличение количества инсулиновых рецепторов в жировых клетках крыс при гипертиреозе [12]. Возможно, эти различия связаны с различиями в модели гипертиреоза, предложенной авторами последней работы: гипертиреоз был короткотечен и вызывался ежедневным введением тироксина (1 мг/кг в течение 5 сут).

Таким образом, согласно нашим результатам гипертиреоз затрудняет инсулин-рецепторное взаимодействие в жировой клетке. Но вопрос о том, является ли это действие прямым или опосредованным другими биологически активными веществами, в частности инсулином или кортизолом, остается открытым.

THE STATE OF INSULIN RECEPTORS OF PLASMA MEMBRANES FROM ADIPOSE CELLS WITH INCREASED CONTENT OF THYROID HORMONES IN PEOPLE AND ANIMALS

P. M. Pavlyuk, N. Yu. Evdokimova, Yu. V. Bezdrobny, O. V. Bozhok

A decrease in specific binding of ^{125}I -insulin to membranes from adipose cells of subcutaneous tissue in the neck region was detected in the patients with prolonged thyrotoxicosis not less than 0.5 years. Binding of ^{125}I -insulin to plasma membranes from the adipose tissue in the abdominal cavity of rats with hyperthyroidism caused by subcutaneous implantation of coalin granule with 2 mg of thyroxin was observed to decrease on the 21st day. This decrease was induced by the lowering of insulin receptors concentration with simultaneous increase in the affinity of receptors to insulin. The obtained result show that prolonged hyperthyreosis in people and animals contributes to a decrease of the insulin action in adipose cells on the level of its interaction with the receptors.

Institute of Endocrinology and Metabolism,
Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev

1. Бездробный Ю. В., Евдокимова Н. Ю. Выделение плазматических мембран жировых клеток без применения коллагеназы // *Вопр. мед. химии.*— 1979.— № 3.— С. 354—359.
2. Журова Т. Э. Чувствительность к инсулину у больных тиреотоксикозом // *Пробл. эндокринологии.*— 1981.— 27, № 6.— С. 20—25.
3. Комиссаренко В. П., Бездробный Ю. В., Евдокимова Н. Ю. и др. Характеристика инсулиновых рецепторов плазматических мембран адипоцитов при гиперкортицизме // *Докл. АН СССР.*— 1979.— 244, № 2.— С. 474—478.
4. Шостак Г. М., Корнюшенко Н. П., Мартиненко Ф. П. Чутливість соматотропних

- клетин аденогипофизу щурів до факторів гіпоталамічної регуляції // Доп. АН УРСР. Сер. Б.— 1982.— № 1.— С. 69—71.
5. Arner P., Bolinder J., Wennlund A., Östman J. Influence of thyroid hormone level on insulin action in human adipose tissue // Diabetes.— 1984.—33, N 4.— P. 369—375.
 6. Bolinder J., Engfeldt P., Östman J., Arner P. Site differences in insulin receptor binding and insulin action in subcutaneous fat of obese females // J. Clin. Endocrinol. and Metabol.— 1983.—57, N 3.— P. 455—461.
 7. Cech J. M., Amatruda J. M. The effect of triiodothyronine on insulin binding and action in rat adipocytes // Hormone and Metab. Res.— 1983.—15, N 11.— P. 530—532.
 8. Czech M. P., Malbon C. C., Kerman K. et al. Effect of thyroid status on insulin action in rat adipocytes and skeletal muscle // J. Clin. Invest.— 1980.—6, N 3.— P. 574—582.
 9. Dmitriadis G., Baker B., Marsh H. et al. Effect of thyroid hormone excess on action, secretion, and metabolism of insulin in humans // Amer. J. Physiol.— 1985.—248, N 5.— P. E593—E601.
 10. Emmelot P., Bos C. J. Studies on plasma membranes. III. Mg^{2+} -ATPase, (Na^+ , K^+ , Mg^{2+})-ATPase and 5'-nucleotidase activity of plasma membranes isolated from rat liver // Biochim. et biophys. acta.— 1966.— 120, N 3.— P. 369—382.
 11. Fantus I. G., Ryan J., Hizaka A., Gorden P. The effect of glucocorticoids on the insulin receptor: an in vivo and in vitro study // J. Clin. Endocrinol. and Metabol.— 1981.—52, N 5.— P. 953—960.
 12. Heise E., Joost H. J., Hasseblatt A. Insulin binding and response to insulin of adipocytes from thyroxine treated rats // Endocrinology.— 1982.—110, N 3.— P. 955—960.
 13. Kobayashi M., Meck J. C. Increased insulin binding to circulating monocyte insulin receptors in hyperthyroid patients // Diabetes.— 1976.—25, Suppl. 1.— P. 299.
 14. Kobayashi M., Olefsky J. M. Effect of experimental hyperinsulinemia on insulin binding and glucose transport in isolated rat adipocytes // Amer. J. Physiol.— 1978.—235, N 1.— P. E53—E62.
 15. Laville M., Riou J. P., Bougneris P. F. et al. Glucose metabolism in experimental hyperthyroidism: intact in vivo sensitivity to insulin with abnormal binding and increased glucose turnover // J. Clin. Endocrinol. and Metabol.— 1984.—58, N 6.— P. 960—965.
 16. Lowry O. H., Rosenbrough N. F., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.— 1951.—193, N 1.— P. 265—275.
 17. Meyts P. de, Roth J. Cooperativity in ligand binding: a new graphic analysis // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1975.—66, N 8.— P. 1118—1126.
 18. Ruyter H. de, Burman K. D., Wartofsky L., Taylor S. I. Effects of thyroid hormone on the insulin receptor in rat liver membranes // Endocrinology.— 1982.—110, N 6.— P. 1922—1925.
 19. Scatchard L. The attractions of protein for small molecules and ions // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1949.—51, N 6.— P. 660—672.
 20. Scherthaner G., Prager R., Weissel M., Höfer R. Decreased insulin receptor binding in hyperthyroidism // Klin. Wochenschrift.— 1984.—62, N 10.— P. 1074—1080.
 21. Sterman B. M., Ganguli S., Devaskar S., Sperling M. A. Hypothyroidism and glucocorticoids modulate the development of hepatic insulin receptor // Pediat. Res.— 1983.—17, N 1.— P. 111—116.

Київ. Ин-т ендокринології та обміну речовин
М-ва здоров'я України УССР

Поступила 04.06.86

УДК 616.36—092:612.017.1

Влияние антител к цитохрому с на восстановительные процессы в печени и возможное участие в реализации их действия антиидиотипических антител

И. Н. Алексеева, А. И. Назаренко, С. И. Павлович, М. В. Скок

Стимулирующее действие малых доз антител, содержащихся в противораковых цитотоксических сыворотках, установлено в эксперименте и подтверждено применением лечебных препаратов, созданных на основе этих сывороток [5, 8]. Ранее мы показали, что противопеченочные антитела — γ -глобулиновая фракция антигепатотоксической сыворотки (γ -АГЦС), примененные на фоне поражения печени четыреххлористым углеродом, стимулируют регенерацию печени и способ-