

М.М. Кондро, Т.І. Галенова, М.Ю. Кузнєцова, О.М. Савчук

Експресія інсулінового рецептора у субклітинних фракціях м'язової та жирової тканин як фактор розвитку тканинної інсулінорезистентності у щурів за умов висококалорійної дієти

Нами було встановлено різнонаправлені зміни вмісту інсулінового рецептора у мембранній фракції та цитозолі клітин жирової тканини щурів за умов їх довготривалого перебування на висококалорійній дієті. Його зниження у мембранах жирової тканини можливо зумовлено порушеннями цілісності ліпідного бішару адипоцитів через посилення пероксидації. Підвищення вмісту у цитозолі клітин цієї тканини може вказувати на активацію синтезу цього білка, але внаслідок ушкодження плазматичної мембрани ймовірно порушується внутрішньоклітинна транслокація інсулінового рецептора, за рахунок чого новосинтезовані молекули рецептора не надходять до мембрани і накопичуються у цитозолі. Наші результати показали, що досліджувані тканини по-різному реагують на довготривале вживання висококалорійної їжі. Так, вміст рецепторів до інсуліну у плазматичних мембранах клітин м'язової тканини підвищується, а у мембранах жирової навпаки знижується. Це може скоріш за все є наслідком порушень функціонування клітин жирової тканини.

Ключові слова: висококалорійна дієта, інсулінорезистентність, інсуліновий рецептор.

ВСТУП

Нині все більшої актуальності у медицині набуває проблема інсулінорезистентності (ІР), яка має тісні причинно-наслідкові зв'язки з ожирінням, цукровим діабетом (ЦД) 2-го типу, метаболічним синдромом тощо. ІР – це патологічний стан, який характеризується нормальним або підвищеним синтезом інсуліну одночасно з порушенням чутливості периферичних тканин до його біологічних ефектів [1, 9]. Інсулін, взаємодіючи з відповідними рецепторами на поверхні клітин-мішеней, індукує низку внутрішньоклітинних реакцій, через які регулюються вуглеводневий, ліпідний і білковий обмін, забезпечується прояв мітогенних, проліферативних, а також протизапальних ефектів гормону [2, 10]. При ІР біологічна відповідь на дію інсуліну знижена, в результаті чого порушуються основні

метаболічні процеси в організмі, ініціюються мітогенні реакції [1, 3].

На жаль, не існує єдиної концепції розвитку ІР. Виділяють декілька потенційних її механізмів, що реалізуються на рецепторному та пострецепторному рівнях і можуть бути пов'язані зі зміною вмісту чи порушенням функціонування ключових ланок інсулінового сигнального каскаду [4, 5, 13]. Відомо, що ІР може бути не тільки генетично детермінована, але й індукована несприятливою дією таких факторів зовнішнього середовища, як надмірне вживання калорійної їжі та низької фізичної активності. Встановлено, що споживання їжі, незбалансованої за вмістом жирів і вуглеводів, призводить до розвитку абдомінального ожиріння, сприяє накопиченню вільних жирних кислот і суттєво погіршує чутливість до інсуліну [6, 7, 12]. Зважаючи на такий взаємозв'язок перспективним є вивчен-

ня функціонування компонентів інсулінової сигнальної системи за умов довготривалого перебування на висококалорійній дієті.

Метою нашої роботи було визначити вміст інсулінового рецептора у субклітинних фракціях м'язової та жирової тканин дослідних щурів та встановити можливий взаємозв'язок зміни його вмісту, розвитку ІР і довготривалого вживання висококалорійної їжі.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на білих щурах лінії Вістар з початковою масою 200–215 г. Упродовж 18 тиж тварини перебували на висококалорійній дієті, яка складалася зі стандартної їжі (47 %), солодкого концентрованого молока (44 %), кукурудзяної олії (8 %) і рослинного крохмалю (1 %) (дієта #С 11024, Research Dietes, New Brunswick, NJ). Від групи дослідних тварин на 6, 9, 12, 15 та 18-му тижні експерименту рандомізовано відбирали по п'ять щурів. Сироватку отримували з цільної крові, яку, для вилучення фібриногену та супутніх білків, залишали при 37° С на 4 год, а потім центрифугували при 2000 g протягом 15 хв. Мембранну фракцію та цитозоль клітин м'язової та жирової тканин щурів отримували з загальних гомогенатів методом диференційного центрифугування [8]. Контрольну групу складали щури такої самої маси і віку, що перебували на стандартному раціоні віварію.

У групі щурів, залучених до експерименту, проводили моніторинг концентрації глюкози крові за допомогою глюкометра «Глюкофот-ІІ» виробництва фірми «Норма» (Україна). Дослідження проводили згідно з інструкцією приладу.

Вміст інсуліну визначали у сироватці крові дослідних тварин (натщесерце) за допомогою методу імуноферментного аналізу з використанням поліклональних антитіл проти інсуліну. Фракцію анти-інсулінових антитіл отримували самостійно з сироватки крові імунізованого кроля, яку поступово очищали

за допомогою афінної хроматографії на колонках з протеїн А-сефарозою («Amersham», США) та інсулін-сефарозою, що готували за стандартною методикою іммобілізації лігандів на матриці за допомогою бромціану [9]. Всі процедури щодо отримання, очищення та перевірки специфічності антитіл були проведені згідно з рекомендаціями стандартних протоколів [10, 11].

Вміст інсулінового рецептора визначали методом імуноферментного аналізу з використанням комерційних моноклональних антитіл проти β-субодиниці інсулінового рецептора щурів («Millipore», США). Як антиген використовували білковий матеріал цитозольної та мембранної фракцій досліджуваних тканин щурів у концентрації 10 мкг/мл, попередньо солюбілізованих за наявності 1 % неіонного детергенту Тритон Х-100. Про вміст інсулінових рецепторів у зразках судили за адсорбцією специфічних антитіл, яку визначали як різницю екстинцій при 450 нм (робоча хвиля) та 492 нм (поправка на похибку вимірювання) і виражали в умовних одиницях.

Додатково у групі контрольних тварин, а також щурів, які перебували на висококалорійній дієті (на 7-му та 15-му тижні експерименту) було проведено тест на інсулінолеерантність [12]. Для цього у крові дослідних тварин (натщесерце) визначали концентрацію глюкози, після чого щурам внутрішньовенно вводили розчин інсуліну («Монодар», Україна) з розрахунку 0,75 од./кг. Через 15, 30, та 60 хв з хвостової вени щурів за допомогою внутрішньовенного катетера відбирали проби крові у об'ємі 100 мкл та визначали концентрацію глюкози. За результатами тесту будували глікемічні криві, що відображають швидкість зниження вмісту глюкози в крові у відповідь на екзогенний інсулін.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як показали отримані нами результати, концентрація глюкози в сироватці крові щурів на

6-й тиждень вживання висококалорійної їжі зростала на 75 % відносно контролю (рис. 1). На 9-му та 12-му тижні вона знижувалася до контрольних значень, що може бути результатом активації адаптаційних механізмів організму. Однак на більш пізніх строках експерименту спостерігали поступове зростання концентрації глюкози, і на 18-му тижні різниця між значеннями контрольних щурів і тварин, що перебували на дієті становила 70 % (див. рис. 1).

Встановлено, що довготривале перебування тварин на висококалорійній дієті супроводжувалося прогресуючим підвищенням вмісту інсуліну в сироватці крові дослідних тварин (рис. 2). Так, цей показник у тварин, які вживали висококалорійну їжу, на останньому тижні експерименту вдвічі перевищував значення контрольних щурів. Такі зміни можуть бути як наслідком активації компенсаторних реакцій у відповідь на розвиток гіперглікемії у дослідних щурів, так і результатом негативного впливу надлишку висококалорійної дієти на метаболізм інсуліну в печінці та зв'язування гормону з відповідними поверхневими рецепторами.

Аналізуючи отримані результати щодо зміни вмісту глюкози та інсуліну в сироватці крові дослідних тварин, було зроблено висновок, що вживання висококалорійної їжі може

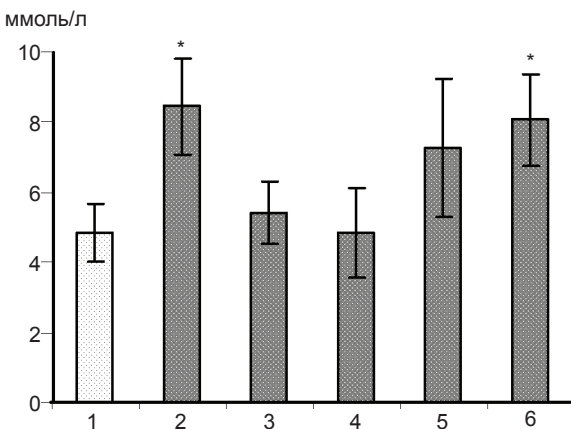


Рис. 1. Концентрація глюкози у крові дослідних щурів, які вживали висококалорійну дієту: 1 – контроль, 2, 3, 4, 5, 6 – 6, 9, 12, 15, 18-й тиждень відповідно. * P < 0,05 порівняно з контролем

приводити до гіперглікемії, у відповідь на що β-клітини підшлункової залози починають секретувати більше інсуліну. За рахунок цукрознижувальних ефектів останнього рівень глікемії на деякий час нормалізується, що підтверджується зниженням вмісту глюкози на 9-му та 12-му тижнях експерименту (див. рис. 1). Підвищення цього показника на більш пізніх строках можливо є наслідком зниження чутливості (резистентності) периферичних тканин до біологічних ефектів гормону.

У групі контрольних тварин і щурів, які вживали висококалорійну їжу протягом 7 та 14 тиж, було проведено інсулінотолерантний тест, за результатами якого були побудовані глікемічні криві (рис. 3). Слід відмітити, що у групі дослідних тварин на 7-й тиждень експерименту, незважаючи на підвищення базального вмісту глюкози в крові, чутливість до гіпоглікемічних ефектів інсуліну була на рівні контролю (див. рис. 3,а). На 14-й тиждень разом з гіперглікемією спостерігали зниження поглинання глюкози периферичними тканинами організму під дією інсуліну (див. рис. 3,б), що може бути результатом резистентності клітин і тканин різних органів до цукрознижувальної дії цього гормону.

Ключову роль у реалізації метаболічних ефектів інсуліну відіграє його рецептор. У зв'язку з цим нами було досліджено вміст

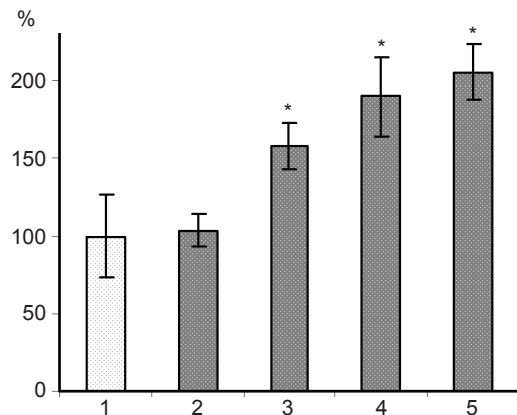


Рис. 2. Вміст інсуліну у сироватці крові дослідних щурів, які вживали висококалорійну дієту: 1 – контроль, 2, 3, 4, 5, – 6, 9, 12, 18-й тиждень відповідно. * P < 0,05 порівняно з контролем

останнього у складі плазматичних мембран і цитозолі клітин основних інсулінозалежних тканин – м'язовій та жировій. Відомо, що зменшення кількості інсулінового рецептора на поверхні клітин ймовірно є причиною зниження проникності мембран цих тканин для глюкози і порушення механізмів її утилізації та призводити до розвитку ІР.

У результаті проведених досліджень встановлено, що у щурів, які перебували на висококалорійній дієті, протягом перших 12 тиж експерименту, вміст інсулінового рецептора у мембранній фракції м'язової тканини був таким, як у контрольних тварин. На 15-му тижні цей показник у мембранах клітин м'язової тканини підвищувався на 20 %, порівняно з контролем і залишався на цьому рівні до кінця експерименту (рис. 4). Водночас у цитозолі клітин м'язової тканини щурів, які перебували на дієті спостерігалися наступні зміни: на 9-му тижні експерименту вміст інсулінового рецептора зменшувався на 30 % порівняно з контролем, мінімальні його значення нами були зафіксовані на 12-й тиждень, тоді як на більш пізніх етапах експерименту (15-й тиждень) він поступово збільшувався і повертався до значень контролю на 18-му тижні експерименту (рис. 4).

Незначне підвищення вмісту інсулінового рецептора у мембранах м'язової тканини може бути наслідком активації компенсаторних механізмів у відповідь на вживання

висококалорійної їжі. Ймовірно, що на більш ранніх строках експерименту підвищується кількість інсулінового рецептора на поверхні клітин внаслідок виснаження їхніх внутрішньоклітинних резервів, тоді як на більш пізніх термінах вживання висококалорійної дієти активуються процеси синтезу нових молекул, що може призводити до підвищення вмісту інсулінового рецептора не лише у складі мембран, а й у цитозолі клітин.

При дослідженні вмісту інсулінового рецептора у мембранній фракції жирової тканини нами була відмічена протилежна тенденція. Так, уже на 6-му тижні висококалорійної дієти показано зниження вмісту цього показника на 26 % порівняно з контролем. Максимально низьке його значення (зниження на 35 % порівняно з контролем) зафіксовано на 9-му тижні експерименту. Починаючи з 12-го тижня вміст інсулінового рецептора поступово підвищувався і на 15-му тижні різниця між значеннями контрольних і дослідних тварин становила лише 10 %. На 18-му тижні цей показник у мембранах клітин жирової тканини залишався достовірно зниженим порівняно з контролем. Показано відсутність змін вмісту інсулінового рецептора у цитозолі клітин жирової тканини щурів, які перебували на дієті, протягом перших 12 тиж. На більш пізніх строках експерименту (15-й тиждень) було встановлено збільшення вмісту інсулінового рецептора на 25 % щодо

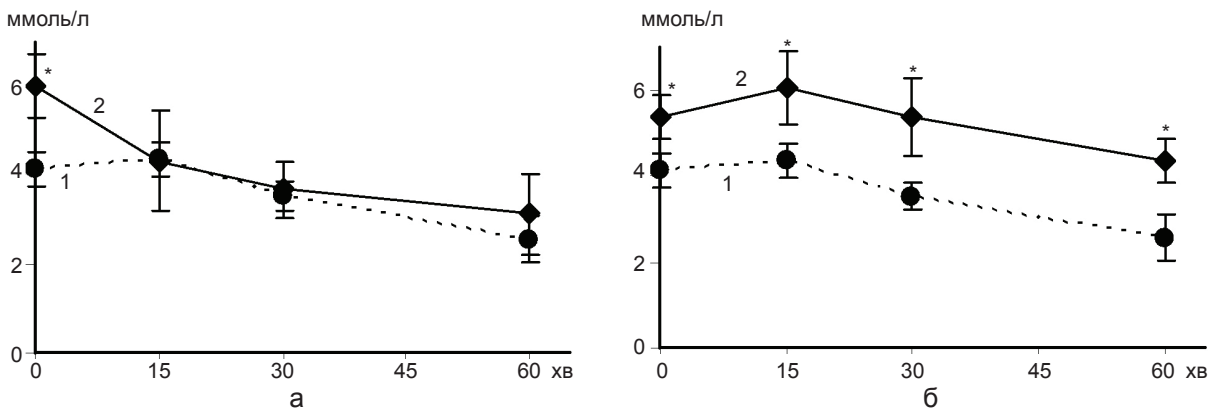


Рис. 3. Глікемічні криві отримані під час інсулінотолератного тесту у групі контрольних тварин (1) та щурів, які вживали висококалорійну їжу (2) на 7-й (а) та 14-й (б) тиждів експерименту. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

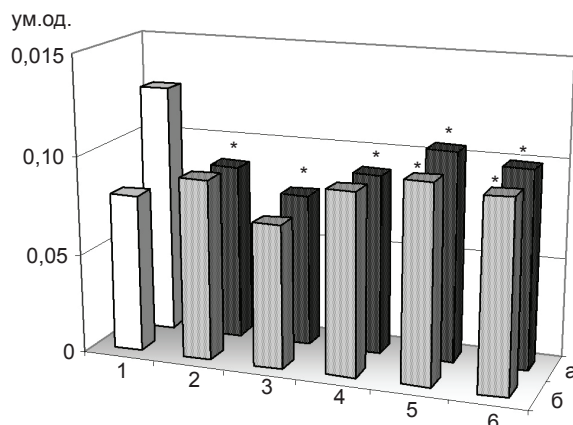


Рис. 4. Вміст інсулінового рецептора у мембранній фракції (а) та цитозолі клітин (б) жирової тканини щурів за умов висококалорійної дієти: 1 – контроль, 2, 3, 4, 5, 6 – 6, 9, 12, 15 і 18-й тиждень відповідно. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

контролю. Цей показник залишався достовірно підвищеним порівняно з контролем і на 18-му тижні.

Таким чином, нами було встановлено різнонаправлені зміни вмісту інсулінового рецептора у мембранній фракції та цитозолі клітин жирової тканини щурів за умов їх довготривалого перебування на висококалорійній дієті. Його зниження у мембранах жирової тканини можливо зумовлено порушеннями цілісності ліпідного бішару адипоцитів через активацію процесів пероксидації. Підвищення вмісту у цитозолі клітин цієї тканини може вказувати на посилення синтезу цього білка, але внаслідок ушкодження плазматичної мембрани ймовірно порушуються процеси внутрішньоклітинної транслокації інсулінового рецептора, за рахунок чого новосинтезовані молекули рецептора не надходять до мембрани і накопичуються у цитозолі.

Отже, встановлені нами результати показали, що досліджувані тканини по-різному реагують на довготривале вживання висококалорійної їжі. Так, вміст рецепторів до інсуліну у плазматичних мембранах клітин м'язової тканини підвищується, а у мембранах жирової навпаки знижується. Це вказує

на те, що розвиток ІР на пізніх термінах експерименту скоріш за все є наслідком порушень функціонування клітин жирової тканини. Наші висновки можуть мати значення для розуміння механізму розвитку ІР за умов довготривалого вживання висококалорійної їжі.

М.М. Кондро, Т.І. Галенова, М.Ю. Кузнецова, А.Н. Савчук

ЭКСПРЕСИЯ ИНСУЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ МЫШЕЧНОЙ ТА ЖИРОВОЙ ТКАНИ КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ ТКАНЕВОЙ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У КРЫС В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОКАЛОРИЙНОЙ ДИЕТЫ

Нами были установлены разнонаправленные изменения содержания инсулинового рецептора в мембранной фракции и цитозоле клеток жировой ткани крыс в условиях их длительного пребывания на высококалорийной диете. Снижение его содержания в мембранах жировой ткани, возможно, обусловлено нарушением целостности липидного бислоя адипоцитов вследствие усиления пероксидации. Повышение содержания инсулинового рецептора в цитозоле клеток этой ткани может указывать на активацию синтеза данного белка, но вследствие повреждения плазматической мембраны, возможно, происходит нарушение внутриклеточной его транслокации, за счет чего новосинтезированные молекулы рецептора не поступают к мембране и накапливаются в цитозоле. Наши результаты показали, что исследуемые ткани по-разному реагируют на длительное употребление высококалорийной пищи. Так, содержание рецепторов к инсулину в плазматических мембранах клеток мышечной ткани повышается, а в мембранах жировой наоборот снижается. Это может указывать на то, что развитие инсулинорезистентности на поздних сроках эксперимента, скорее всего, является следствием нарушений функционирования клеток жировой ткани. Ключевые слова: высококалорийная диета, инсулинорезистентность, инсулиновый рецептор.

М.М. Kondro, T.I. Galenova, M.U. Kyznecova, O.M. Savchyk

EXPRESSION CHANGES IN INSULIN RECEPTOR IN SUBCELLULAR FRACTIONS OF MUSCULAR AND ADIPOSE TISSUE AS THE FACTOR OF THE TISSUE INSULIN RESISTANCE DEVELOPMENT IN RATS UNDER CONDITIONS OF THE HIGH-ENERGY DIET

Nowadays the problem of insulin resistance, which has close cause-effect relations with obesity, diabetes mellitus type 2,

metabolic syndrome, etc., is of urgent importance in medicine. We have revealed bidirectional changes of the IR content in crude membrane and cytosol of the adipose tissue cells in rats under conditions of the long-term high-energy diet. It is possible that reduction of the IR content in the adipose tissue cells has been predetermined by the disruption of lipid bilayer of adipocytes as a result of peroxidation processes activation. Increase in the IR content in the cytosol of cells of this tissue may indicate the activation of synthesis of this protein; however, it is possible that the IR translocation process disorder occurs due to the damage of plasma membrane, preventing the transfer of newly synthesized molecules of the receptor to the membrane and causing their accumulation in cytosol. The obtained results show that the tissues react to the long-term consumption of high-energy food in different ways. Thus, the content of insulin receptors in the plasma membrane of the muscle tissue cells increases, and, on the contrary, it decreases in adipose tissue cells. Such results may indicate that IR development at the late period of the experiment is likely the result of the adipose tissue cells disfunction. The obtained data may be of high significance in understanding the mechanism of the IR development under conditions of the long-term consumption of the high-energy food.

Key words: High-Energy Diet, Insulin Resistance, Insulin Receptor.

Danylo Halatsky Lviv National Medical University Department of Human Physiology;

Teaching and Research Center "Institute of Biology" at Taras Shevchenko Kyiv National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Кетти Д. Антитела // Методы. – Книга 1. – М.: Мир, 1991. – С. 288.
- Кот Л.І. Богданова О.В., Остапченко Л.І. Сучасні уявлення про біохімічні механізми патогенезу інсуліннезалежного цукрового діабету // Вісн. НАН України. – 2008. – № 9. – С. 18–26.
- Скибчик В.А. ІР: клінічне значення, методи визначення, підходи до лікування // Укр. мед. часопис. – 2006. – 6, № 56. – С. 61–67.
- Рыбальченко В.К. Коганов М.М. Структура и функции мембран // Практикум. – К.: Выща школа, 1988. – С. 312.
- Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1985. – С. 536.
- Antti Virkamäki, Kohjiro Ueki, C. Ronald Kahn. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance // J. Clin. Invest. – 1999. – 103(7). – P. 931–943.
- Bruning J.C., Winnay J., Bonner-Weir S., Taylor S.I., Accili D., Kahn C.R. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles // Cell. – 1997. – 88(4). – P. 561–72.
- Chad R. Hancock, Dong-Ho Han, May Chen, Shin Terada, Toshihiro Yasuda, David C. Wright, and John O. Holloszy. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria // PNAS. – 2008. – 105, № 22. – P. 7815–7820.
- Jellinger P.S. Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance // Clin. Cornerstone. – 2007. – № 8. – P. S30–42.
- Huse K., Böhme H.J., Scholz G.H. Purification of antibodies by affinity chromatography // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2002. – 51, № 3. – P. 217–31.
- Pessin J.E., Saltiel A.R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance // J. Clin. Invest. – 2000. – 106(2). – P. 165–169.
- Vasudevan A.R., Garber A.J. Insulin resistance syndrome // Minerva Endocrinol. – 2005. – 30(3). – P. 101–119.
- Pandona P., Aliada A., Chaudhuri A. Metabolic syndrome. A comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes and inflammation // Circulation. – 2005. – 110, № 11. – P. 1448–1454.
- Yang H. Obesity accelerates thymic aging // Blood. – 2009. – 114(18). – P. 100–110.

*Львів. нац. мед. ун-т ім. Данила Галицького;
 ННЦ «Ін-т біології» Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка
 E-mail: kondro78@mail.ru*

*Матеріал надійшов
 до редакції 18.12.2012*