

ПРОВ 98

Ордена Ленина Академия Наук СССР
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ им. И. П. ПАВЛОВА

На правах рукописи

ЮНЕВ
Олег Алексеевич

**ВЫДЕЛЕНИЕ ИНСУЛИНОВ
РАЗЛИЧНЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ
И СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИХ ХИМИЧЕСКИХ
И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ**

(03.00.04 — Биологическая химия)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ЛЕНИНГРАД
1975

Пров. 1980

Ордена Ленина Академия Наук СССР
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ
имени И.П.ПАВЛОВА

ПРОВ 2010

На правах рукописи

Ю Н Е В
Олег Алексеевич

ВЫДЕЛЕНИЕ ИНСУЛИНОВ РАЗЛИЧНЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ
И СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИХ
ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
(03.00.04 — биологическая химия)

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ленинград
1975

В

1051
Эволюция
Работа выполнена в лаборатории эволюции эндокринных функций (зав.лабораторией - доктор биологических наук профессор Л.Г.Лейбсон) Института эволюционной физиологии и биохимии им.И.М.Сеченова АН СССР (директор - академик Е.М.Крепс).

Научные руководители -

доктор биологических наук профессор Л.Г.Лейбсон и
доктор биологических наук Э.М.Плисецкая

Официальные оппоненты -

доктор биологических наук Р.Н.Этингоф
доктор биологических наук О.Н.Савченко

Ведущее научно-исследовательское учреждение -

Ордена Трудового Красного Знамени Институт экспериментальной
медицины АМН СССР

Автореферат разослан "19" декабрь 1975 года

Защита состоится на заседании Ученого совета Института
физиологии им.И.П.Павлова АН СССР (Ленинград, наб.Макарова,6).

"19" сентябрь 1976 года.

в 14 час.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института.

Ученый секретарь

кандидат медицинских наук

Б.В.Алякринский

ВВЕДЕНИЕ

Инсулин — полипептидный гормон, который принимает существенное участие в регуляции белкового, жирового и углеводного обмена. Этот гормон вырабатывается В-клетками островковой ткани поджелудочной железы. Впервые экстракты поджелудочной железы, содержавшие активное начало, были получены канадскими учеными Бантингом и Бестом (Banting, Best, 1922), а в 1926 году американским исследователем Абелем (Abel, 1926) была осуществлена первая кристаллизация инсулина. Первичная структура инсулина была установлена Сенжером и сотрудниками (Ryle, Sanger et al., 1955). Последующие годы ознаменовались успешным химическим синтезом биологически активного гормона, проведенным рядом авторов (Meinhofer et al., 1963; Katsoyannis et al., 1963; Kung et al., 1965; Кривцов и др., 1974). Синтез инсулина полностью подтвердил работу Сенжера. Значительным аккордом химических исследований инсулина, выполненных к настоящему моменту, явилось построение трехмерной модели гормона (Adams, Blundell et al., 1969; Blundell et al., 1971; Blundell et al., 1972; Hodgkin, 1971; Hodgkin, Mercola, 1972).

Молекула инсулина состоит из двух полипептидных цепей А и В, содержащих соответственно 21(22) и 30(29) аминокислотных остатков. Полипептидные цепи соединены друг с другом двумя дисульфидными мостиками цистила. Третий дисульфидный мостик соединяет два аминокислотных остатка цистеина внутри А-цепи.

В настоящее время уже определены аминокислотные последовательности более чем 20 инсулинов млекопитающих, птиц и рыб (Dayhoff, 1972). Оказалось, что инсулины всех млекопитающих, за исключением морской свинки и нутрии, очень сходны. Инсулины птиц мало отличаются от гормона млекопитающих (5-8 аминокислотных замещений). Иначе обстоит дело с инсулинами рыб и инсулином представителя класса круглоротых миксины, у которых обнаружено большое число (17-20) аминокислотных за-

мещений в А- и В-цепях гормона (Humbel et al., 1972; Falkmer et al., 1974).

Несмотря на различия в структуре, все исследованные гормоны обладают качественно одинаковым биологическим действием на обменные процессы; так, например, все они вызывают гипогликемию, стимулируя переход глюкозы из крови в ткани. Однако качественно одинаковая биологическая активность не исключает возможности количественных различий в действии инсулинов, полученных от различных животных. Природа предоставляет нам ряд естественных модификаций инсулинов; сопоставляя их влияние на одну и ту же ткань, можно подойти к решению интереснейших проблем биологии — проблемы взаимодействия гормона с тканевыми рецепторами и взаимосвязи между химическим строением и биологическим действием гормона. Эти вопросы изучены совершенно недостаточно, поскольку до недавнего времени в лабораторных опытах на представителях всех классов позвоночных животных использовали коммерческие препараты гормона млекопитающих.

Целью настоящей работы было выделение и очистка инсулинов куры (*Gallus sp.*) и черноморской костистой рыбы — скорпены (*Scorpaena porcus L.*) — животных, исследование гормональной регуляции у которых проводится в лаборатории эволюции эндокринных функций, и сопоставление химических и биологических свойств этих инсулинов со свойствами коммерческого препарата млекопитающего (свиньи).

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ИНСУЛИНОВ ПТИЦ И РЫБ И ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ИХ ЧИСТОТЫ

§ 1. Материал

Инсулин птиц экстрагировали из поджелудочной железы трехмесячных цыплят, которую получали на птицефабрике Ленинградского мясокомбината им. С.М. Кирова. Железу извлекали через 20–30 минут после забоя птиц, тотчас замораживали и сохраняли в сосуде Дьюара с мелко измельченным сухим льдом до начала обработки. Для выделения одной партии инсулина железу брали приблизительно от 1000 цыплят. Общий вес железы в каждой партии

составлял около 2,5 кг. Таких партий было обработано три.

Инсулин рыб выделяли из так называемых Брокмановских тельц скорпены (морского ерша). Как и у ряда других костистых рыб, у скорпены островковые клетки в виде небольших скоплений встречаются в области желчного пузыря, селезенки, пилорических отростков и тонкой кишки. Среди этих скоплений можно обнаружить одну хорошо различимую невооруженным глазом островковую массу, сконцентрированную в компактный орган — Брокмановское тельце (Epple, 1969; Falkmer, Patent, 1972). Брокмановские тельца извлекали сразу после отлова рыбы (производившегося в районе г.Севастополя) и помещали в сосуд Дьюара с сухим льдом. В течение трех лет — 1972—1974гг — был взят материал примерно от 15000 скорпен. Средний вес главного Брокмановского тельца вместе с капсулой у скорпен весом 200—300 г составлял 1,5 — 2,5 мг. Общий вес островков партии рыб, выловленной в каждом году, был равен 10—12 граммам.

§2. Выделение и очистка инсулинов птиц и рыб с помощью ионообменной хроматографии на сульфокатионите КУ-23

Экстракцию инсулинов проводили обычным способом с использованием 70% кислого этанола (Weitzel et al., 1969). Для очистки гормонов птиц и рыб нами были применены колонки с ионообменной смолой КУ-23 — сополимером сульфостирола и дивинилбензола. Метод разработан совместно с сотрудниками лаборатории физической химии полиэлектролитов Института высокомолекулярных соединений АН СССР (Юнев и др., 1973). Сорбция инсулина на катионите КУ-23 возможна непосредственно из экстракта железы, причем КУ-23 сорбирует гормон с большой емкостью. Комплексы "инсулин-КУ-23" стабилизированы в основном электростатическими силами и полностью обратимо диссоциируют при изменении pH внешнего раствора (Дмитренко и др., 1973).

Сначала будет описана очистка на колонке с КУ-23 инсулина скорпен. Основные отличия, наблюдаемые при работе с инсулином кур, будут указаны ниже. Колонку (34 x 0,4 см) приводили в H^+ форму (Дмитренко и др., 1973) и, доведя pH экстракта до 2,3, пропускали его через колонку со скоростью

100 мл/час.см². После сорбции инсулина выход колонки подключали к спектрофотометру СФ-4, в который была вмонтирована проточная кварцевая кювета. Регистрацию состава элюата вели при $\lambda = 280$ нм на высокоомном электронном самописце ЭППВ-60МЗ.

Обезжиривание (70%-ным этанолом) и элюцию балластных белков (0,5 М раствором уксуснокислого аммония с pH 5,0) проводили со скоростью 100 мл/час.см². Инсулин сорблен элюировали 0,2 н аммонийным буфером с pH 9,4 со скоростью 60 мл/час.см² (рис.1, пик Б). Объем пика Б составил 22,5мл. Устанавливая pH элюата 4,5, осаждали балластные белки и отделяли их центрифугированием.

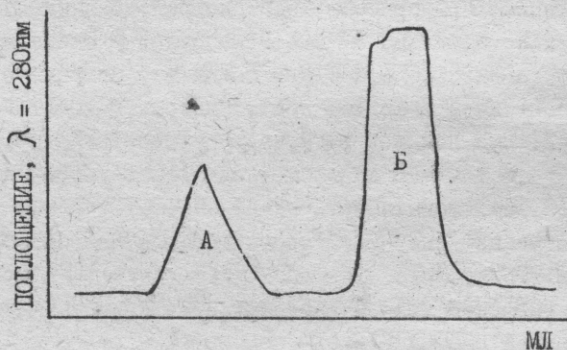


Рис.1. Выходная кривая инсулина рыб. А - балластные белки, pH = 5,0; Б - инсулин, pH = 9,4.

Аморфный рыбий цинк-инсулин осаждали, добавляя 0,64 мл 10%-ного $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Zn}$ и устанавливая pH 6,0 (12%-ным NH_4OH). Осаждение проводили в течение 24 часов при 4°C. Осадок аморфного цинк-инсулина растворяли в 10 мл 0,1 н лимонной кислоты. К раствору добавляли 0,2 мл 5%-ного NH_4OH и 2 мл ацетона и устанавливали pH 6,0 (12%-ным NH_4OH). Кристаллизация началась через 1 час при комнатной температуре и продолжалась в течение последующих 48 часов при 4°C. Кристаллы имели форму ромбододекаэдров. Осадок кристаллического цинк-инсулина собирали центрифугированием, промыва-

ли охлажденной дистиллированной H_2O , дважды сушили ацетоном и затем в эксикаторе над $CaCl_2$. Выход инсулина скорпен от одной партии островков составил 16 мг или 3 мг/1 г сырого веса Брокмановских талец.

При очистке инсулина кур использовали колонку 102 x 2 см и соответственно скорости обезжиривания, элюции балластных белков и десорбции инсулина рассчитывали, исходя из диаметра этой колонки. Объем элюата инсулинового пика составил 220 мл. Балластные белки в элюате осаждались при двух значениях pH — 1,9 и 4,5. Аморфный цинк-инсулин осаждали, добавляя к супернатанту 5 мл 10%-ного $(CH_3COO)_2 Zn$ и устанавливая pH = 6,0 (12% NH_4OH). Осаждение проходило в течение 24 часов при 4°C. Осадок аморфного цинк-инсулина кур растворяли в 70 мл 0,1 н лимонной кислоты. К раствору добавляли 1,8 мл 5%-ного $ZnCl_2$ и 15 мл ацетона (высаливающий агент, для уменьшения растворимости). Кристаллизация начиналась через 15–20 минут при комнатной температуре, после установления pH = 6,0. Далее кристаллизация продолжалась при 4°C в течение 48 часов. Кристаллы куриного инсулина имели форму ромбов. Выход кристаллического продукта от одной партии железы составил 25 мг или 1 мг/100 г железы.

§ 3. Установление химической чистоты выделенных инсулинов

а) Определение N-концевых аминокислот дансилхлоридным методом

ДНС-метод (Cole et al., 1965; Беленький и др., 1967) может служить не только методом оценки чистоты белка, но и его идентификации. После проведения дансирования и кислотного гидролиза ДНС-аминокислоты в гидролизатах инсулинов (птичьего, рыбьего и свиного) обнаруживали с помощью тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинках (6x6 см) двумерным способом в двух системах растворителей (I и II, согласно Беленькому и др., 1967). Регистрацию ДНС-аминокислот гидролизатов инсулинов проводили контактным люминесцентным фотографированием. На фотографии гидролизата инсулина кур в системе I проявились ДНС-глицин и ДНС-аланин. В инсулине скорпен в системе растворителей I также проявились ДНС-гли-

ции и ДНС-аланин. В соответствии с данными литературы можно полагать, что глицин является N-концевой аминокислотой A-цепи, а аланин - В-цепи у обоих выделенных инсулинов.

Двумерное хроматографирование гидролизатов в системе II выявляло Σ -ДНС-лизин и O-ДНС-тирозин, которые не могут быть N-концевыми аминокислотами полипептидных цепей белка, так как их NH_2 -группы хотя и взаимодействуют с ДНС-хлоридом, но не находятся в α -положении.

б) Диск-электрофорез в полиакриламидном геле

Одним из наиболее высокоразрешающих современных методов разделения сложных белковых систем является дисковый электрофорез в полиакриламидном геле, предложенный Орнштейном (Ornstein, 1964) и Дэвисом (Davis, 1964). Этот метод по своей чувствительности может быть сравним только с иммунофорезом (Бреслер, 1973).

В нашей работе для оценки гомогенности выделенных гормонов птиц и рыб мы использовали диск-электрофорез в 7% полиакриламидном геле и буферной системе с pH 8,9. Для проведения электрофореза был применен венгерский прибор завода "Реанал" с использованием трубок с внутренним диаметром 6 мм и длиной 100 мм. Навески инсулинов: птичьего, рыбьего, свиного и смеси трех инсулинов растворяли в крупнопористом геле в расчете 100 мкг препарата на одну трубку и далее проводили полимеризацию трех слоев полимеров обычным образом (Маурер, 1971). Электрофорез проводили в холодной комнате при 4° C и силе тока 3 мА на трубку в течение 90 минут. После электрофореза гели удаляли из трубок с помощью стальной иглы и прокрашивали в течение 2 часов в 1% растворе амидового черного 10 В в 7% уксусной кислоте. Избыток амидового черного 10 В отмывали уксусной кислотой той же концентрации в течение 3 суток. Полученная картина представлена на рисунке 2.

Как видно из рисунка, электрофоретические подвижности птичьего и свиного инсулинов совпадают. Подвижность рыбьего инсулина в этой системе несколько ниже. Последнее подтверждается и тем, что при электрофорезе смеси трех инсулинов мы наблюдаем две основные полосы (рис. 2, D). Наличие на

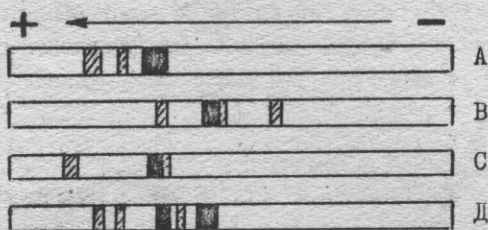


Рис.2. Схематическое изображение диск-электрофореграмм инсулина кур (А), рыб (В), свиный (С) и смеси трех инсулинов (Д). Хотя ряд легко окрашенных полос виден невооруженным глазом, эти полосы не проявляются ни в черно-белой, ни в цветной фотографии, поэтому целесообразно приводить схематическое изображение электрофореграмм.

электрофореграммах А, В, С одной ярко выраженной полосы свидетельствует о достаточно высокой степени чистоты выделенных препаратов. Присутствие слабых полос на электрофореграммах всех трех инсулинов является, возможно, следствием существования природной гетерогенности гормона.

в) УФ-спектры

Для подтверждения чистоты выделенных препаратов нами были сняты УФ-спектры инсулинов кур, скорпион и, для сравнения, инсулина млекопитающих (рис.3) на регистрирующем спектрофотометре фирмы "Хитачи". Совпадение трех спектров и их максимума поглощения на 278 нм может служить дополнительным подтверждением химической чистоты наших препаратов.

Глава 2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ И СРАВНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИНСУЛИНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ПТИЦ И РЫБ

§ 1. Оценка активности инсулинов птиц и рыб *in vivo* по судорожной реакции у мышей

В силу своей простоты и эффективности судорожный тест получил широкое распространение при оценке активности самих

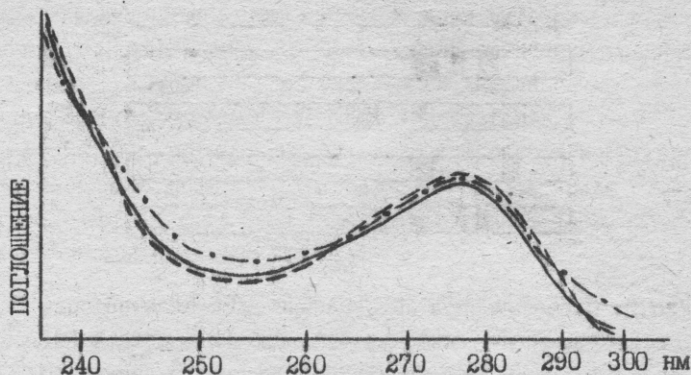


Рис.3. УФ-спектры свиного (—————), куриного (- - - -) и рыбьего (- . - . -) инсулинов. По вертикали - поглощение; по горизонтали - длина волн (нм).

различных инсулинов. В основу метода положено свойство мышей реагировать на инъекцию инсулина отчетливым судорожным синдромом, проявляющимся при повышенной температуре (29-37° С) (Smith, 1962). Выше пороговой дозы имеется прямая зависимость между логарифмами доз гормона и количеством мышей, у которых развились конвульсии (Hemmingsen, Krogh, 1926). Для расчета активностей гормонов был использован "2+2-тест" (Smith, 1962, Брискин и др., 1971), в котором две дозы стандартного препарата млекопитающих с активностью 25 ед/мг сравнивали с двумя дозами испытуемого препарата (инсулина кур или скорпен). Результаты опытов выражали в пробитах и заносили в таблицы (табл.1 и 2).

Расчет относительной величины активностей птичьего и рыбьего инсулинов производили по формуле (1):

$$M = \frac{T_1 + T_2 - C_1 - C_2}{T_2 - T_1 + C_2 - C_1} \times K \quad (\text{Брискин и др., 1971}) \quad (1)$$

где C_1 и T_1 - эффекты меньших доз стандартного (С) и испытуемого (Т) препаратов, выраженные в пробитах;
 C_2 и T_2 - эффекты больших доз, выраженные в пробитах;

М - логарифм относительной активности испытуемого препарата;
 К - логарифм отношения доз; в наших опытах $K = 0,3674$, так
 как использовали дозы 0,3 и 0,7 мкг/мышь.

Таблица 1

Величины пробитов, выражающих реакцию мышей на введение
 свиного (I) и рыбьего (II) инсулинов

№ опыта	I			II	
	Конц.	0,3	0,7	0,3	0,7
1		4,16	4,68	4,33	4,84
2		5,13	6,15	4,87	5,67
3		5,32	6,25	3,84	5,06
4		5,97	6,62	5,59	5,93
5		4,46	5,81	4,33	5,97
6		4,57	5,32	4,33	5,0
7		4,68	6,16	4,45	5,67
8		4,79	6,38	4,19	5,81

Таблица 2

Величины пробитов, выражающих реакцию мышей на введение
 свиного (I) и птичьего (III) инсулинов

№ опыта	I			III	
	Конц.	0,3	0,7	0,3	0,7
1		4,33	4,84	4,61	5,48
2		4,87	5,16	4,75	4,84
3		4,52	5,89	4,36	5,48
4		5,08	6,59	5,22	6,19
5		3,78	4,41	4,03	5,14
6		4,92	5,49	4,33	5,67

Расчеты показали, что активность куриного инсулина в
 этой тест-системе равна $22,8 \pm 3,2$ ед/мг ($n = 6$), а активность
 рыбьего инсулина - $18,6 \pm 2,2$ ед/мг ($n = 8$); n - число опытов.

§ 2. Сравнение биологического действия гормонов млекопитающих, птиц и рыб *in vitro*

а) Диафрагмальный метод

Одним из наиболее распространенных объектов при изучении действия инсулина на мышцу является изолированная диафрагма крысы (Gemmill, 1941). Мы использовали метод, описанный Валланс-Оуэн (Vallance-Owen, 1954) в модификации Лейбсона и соавторов (Лейбсон и др., 1961). Принцип диафрагмального метода заключается в сравнении величин поглощения глюкозы двумя половинками изолированной диафрагмы, одна из которых инкубируется в растворе без инсулина, другая — с инсулином, причем оба раствора содержат глюкозу в одинаковой концентрации. Половинка диафрагмы, инкубируемая в растворе с инсулином, поглощает глюкозу интенсивнее, чем вторая половинка. Чем выше доза инсулина, тем больше разница в поглощении между двумя половинками диафрагмы. Эту разницу (добавочное поглощение глюкозы) мы выражали в мкг глюкозы на 100 мг влажного веса диафрагмы за 90 минут инкубации. Затем строили кривую "доза — ответ" (рис.4). Сопоставляя кривые "доза — ответ" для трех инсулинов, мы видим, что эффекты свиного и птичьего гормонов по отношению к диафрагме крысы приблизительно одинаковы. Действие на мышцу рыбьего гормона отличается от действия двух вышеуказанных инсулинов. Во-первых, его минимально эффективная концентрация в 50 раз превышает соответствующую концентрацию свиного инсулина. Во-вторых, кривая "доза — ответ" для рыбьего инсулина характеризуется более крутым, чем в случае свиного инсулина, подъемом при увеличении дозы гормона.

б) Жировой метод

Важнейшей точкой приложения действия инсулина наряду с мышечной является жировая ткань. Жир также используется в качестве тест-объекта для определения активности инсулина. Мы применили для сравнения биологического действия инсулина *in vitro* метод Штауба (Staub, 1958) в модификации Хамбела (Humbel, 1959). Метод основан на том, что под влиянием возрастающих доз инсулина поглощение глюкозы кусочками изо-

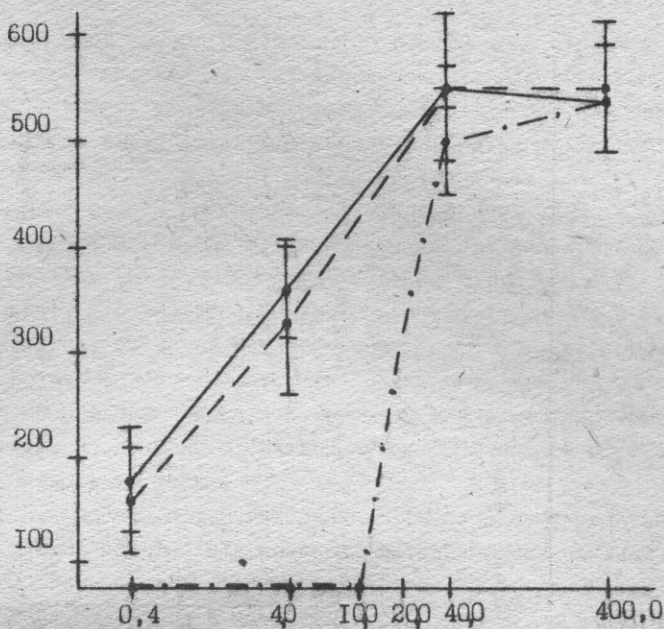


Рис.4. Кривые доза - ответ для свиного (—), птичьего (---) и рыбьего (- · - · -) инсулинов. (Метод изолированной полудиафрагмы). По оси ординат - поглощение глюкозы диафрагмой (мкг/100 мг сырого веса за 90 мин), по оси абсцисс - концентрации инсулина (нг, по логарифмической шкале). Вертикальные линии - средняя ошибка среднего.

лированного эпидидимального жира крыс увеличивается. Величины поглощения выражали в мг глюкозы на 1 г жира за 1 час инкубации (рис.5).

Результаты этой серии экспериментов свидетельствуют, что, как и в опытах на изолированной диафрагме, эффекты свиного и куриного гормонов на жировую ткань крысы приблизительно одинаковы во всех испытываемых концентрациях. Однако, в отличие от мышечной ткани, жир оказался чувствительным к рыбьему гормону уже в области низких концентраций (0,4-4,0 нг/мл), хотя в этих концентрациях его эффект на жировую ткань досто-

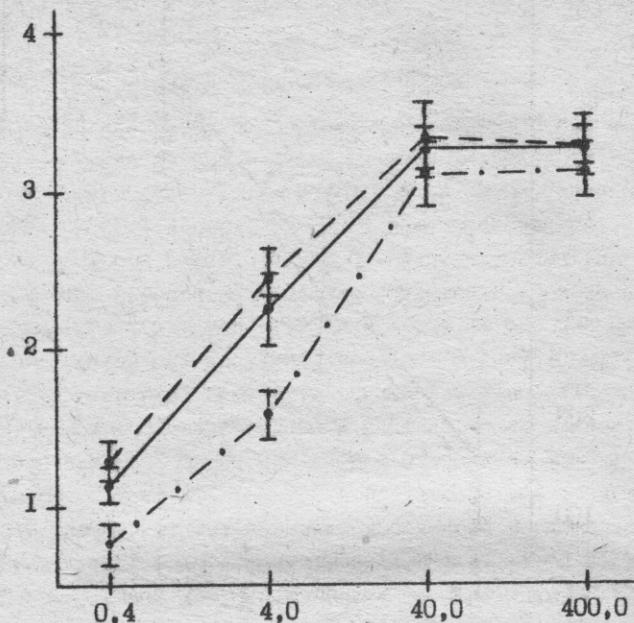


Рис.5. Кривые доза - ответ для свиного (—), птичьего (---) и рыбьего (-.-.-.-) инсулинов (метод изолированного эпидидимального жира). По оси ординат - поглощение глюкозы жиром (мг/г жира за 1 час); по оси абсцисс - концентрации инсулина (нг, по логарифмической шкале). Вертикальные линии - средняя ошибка среднего.

верно ниже, чем эффект птичьего и свиного инсулинов. При высоких дозах гормона все три инсулина действуют на жировую ткань одинаково.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Начиная с 60-х годов, для очистки инсулинов, получаемых от различных животных, исследователи применяют колонки с молекулярными ситами (сефадексами) и ионообменниками на основе целлюлоз, сефадексов и биогелей. Эти носители обладают до-

вольно высокой емкостью сорбции по отношению к белкам и мягкими условиями десорбции. Использование для очистки белков классических ионитов на основе синтетических сополимеров, имеющих малую емкость и неполную обратимость сорбции, было до настоящего времени весьма ограничено.

Однако работы последних лет, выполненные у нас в стране и за рубежом (Самсонов, Пасечник, 1969; Салдадзе и др., 1970; Pollio, Kunin, 1971; Benneville, Blessing, 1972) доказывают, что возможно целенаправленное изменение структуры ионитов, приводящее к получению синтетических сорбентов с новыми физико-химическими свойствами. Эти вещества обладают по сравнению с гелями хорошими гидродинамическими свойствами и способны с большой емкостью и полной обратимостью сорбировать белки.

Г.В.Самсонов и Л.В.Дмитренко с сотрудниками (Дмитренко и др., 1973) разработали высокоэффективный промышленный метод очистки инсулина из экстрактов поджелудочной железы млекопитающих, применив в качестве сорбента жесткий ненабухающий сульфокатионит макропористой структуры КУ-23, синтезированный Е.И.Люстгартен (Люстгартен и др., 1964). Мы использовали колонки с КУ-23 для очистки инсулинов кур и морских ершей. Хорошие гидродинамические и кинетические свойства этого сульфокатионита имели немаловажное значение в работе по очистке инсулина кур.

Поджелудочная железа кур богата липидами, забивающими колонки, а объем обрабатываемых экстрактов должен быть значительным из-за низкого содержания инсулина в железе кур. Применение КУ-23 позволило сорбировать гормон непосредственно из экстрактов поджелудочной железы. Сорбция инсулина из экстрактов исключала, кроме того, использование таких стадий очистки белков, как высаливание, изoeлектрическое осаждение и т.д., которые необходимы при работе с гелевыми носителями типа сефадексов и которые ведут к дополнительным потерям белка (Бреслер, 1973). Последнее имело значение при работе с незначительными количествами инсулина рыб. Все вышесказанное позволило нам получить инсулины кур и морских ершей в кристаллическом виде и с достаточно высокими выхо-

дами гормонов на 100 г поджелудочной железы кур или 1 г островковой ткани ершей.

Химическая чистота выделенных препаратов подтверждена такими методами, как диск-электрофорез в полиакриламидном геле, определение N-концевых аминокислот, снятие УФ-спектров и тем фактом, что оба инсулина получены в кристаллическом виде.

Для исследования биологического действия и для количественной оценки активностей полученных инсулинов птиц и рыб мы применили судорожный тест на мышах (*in vivo*) и диафрагмальный и жировой методы (*in vitro*). Наши данные, касающиеся активности инсулина кур *in vivo*, совпадают с результатами, опубликованными Фолкмером, Уилсоном (Falkmer, Wilson, 1967) и Хазельвудом с соавторами (Hazelwood et al., 1971) и расходятся с данными других исследователей (Kemmler, Rager, 1968; Hahn, Martini, 1971), которые указывают на повышенную активность инсулинов кур и индока. Такая повышенная активность птичьих гормонов в опытах на млекопитающих пока трудно объяснима. Это подчеркивают и сами авторы работ.

В литературе имеются данные относительно активности рыбных инсулинов при тестировании их *in vivo* на млекопитающих. При сравнении со стандартным гормоном млекопитающих активность инсулина трески составила 80%, а сайды — 100% (Falkmer, Wilson, 1967). Активность инсулина скорпен, выделенного нами, составляет 72%.

Информация, получаемая в опытах *in vivo*, представляет собой совокупный результат действия инсулина в организме на различные метаболические процессы. Для более точного исследования биологического действия инсулина служат опыты *in vitro* на изолированных ^к тканях, а именно мышечной — диафрагме крысы и жировой — эпидидимальном жире крысы, которые являются основными точками приложения действия инсулина в организме. Кроме того, результаты опытов *in vitro* приближают нас к пониманию особенностей контакта гормона с клеткой-мишенью.

При сопоставлении биологического действия инсулинов млекопитающих, птиц и рыб на мышечную и жировую ткани крыс *in vitro* оказалось, что эффекты куриного и свиного инсулинов на эти ткани приблизительно одинаковы (рис. 4 и 5). По-видимому, различия в структуре молекулы между свиным и куриным инсулинами не настолько велики, чтобы отразиться на эффекте гормона. К такому же выводу приходят и другие исследователи, изучавшие действие куриного инсулина на изолированные ткани крысы (Goodridge, 1968; Hazelwood et al., 1968; Langslow, Hales, 1969), но он противоречит данным Вайтцеля и сотрудников, которые, сравнивая этот инсулин, а также инсулин индюка со свиным гормоном, нашли его значительно более активным в способности стимулировать метаболизм глюкозы в мышце и жире млекопитающих (Kemmler, Rager, 1968; Weitzel et al., 1969). Повышенная активность птичьих инсулинов была, как отмечалось выше, получена этими авторами и в опытах *in vivo*.

Инсулин скорпен в принципе способен стимулировать поглощение глюкозы как диафрагмой, так и эпидидимальным жиром, однако ткани реагируют на него иначе, чем на два других гормона. Особенно в этом отношении показательна реакция мышечной ткани, характеризующаяся, во-первых, более высоким порогом чувствительности к рыбьему инсулину (его минимально эффективная концентрация в 50 раз превышает соответствующую концентрацию свиного инсулина) и, во-вторых, более крутым, чем в случае свиного инсулина, нарастанием эффекта при увеличении дозы гормона. Если первое обстоятельство как будто указывает на относительно низкую активность инсулина скорпен в отношении диафрагмы крысы, то второе этому явно противоречит. Объяснить это противоречие можно, приняв во внимание тот факт, что инсулин действует на клетку, не проникая в нее, а реализуя свои потенции исключительно с наружной поверхности клеточной мембраны, где он взаимодействует со специальным рецептором, являющимся частью структуры мембраны (Никольский, Трошин, 1973).

Связывая гормон, рецептор переходит в активное состояние и инициирует в мембране процессы, обуславливающие специфический ответ клетки (Rasmussen, 1972). Относительно специфики действия рыбьего гормона можно высказать два предположения. Первое состоит в том, что особенность действия рыбьего инсулина проявляется не в его связывании с рецептором, а именно на той стадии, когда связавшийся гормон активирует рецептор. Не исключено, что активация рецептора и, соответственно, запуск системы с помощью рыбьего инсулина осуществляются с трудом и возможны только при достаточно большом накоплении инсулина на мембране. Но когда запуск происходит, реализуется потенция всего накопленного гормона, поэтому ответ клетки сразу оказывается большим по величине. При таком скачкообразном развитии эффекта максимум ответа со стороны ткани достигается при концентрации, не намного отличающейся от пороговой (отсюда и большая в сравнении со свиным инсулином крутизна кривой доза - ответ), но это не свидетельствует о большей активности рыбьего гормона, а лишь указывает на его неадекватность структуре рецептора. Предложенное объяснение исходит из того, что две функции рецептора - функция связывания гормона и функция активации внутримембранных процессов до известной степени независимы и в определенных условиях могут оказаться диссоциированными (Hechter, Braun, 1972).

Альтернативное объяснение заключается в следующем. Неспособность рыбьего инсулина вызывать эффект в области низких концентраций гормона обусловлена тем, что он не связывается с рецептором при этих концентрациях. Однако с этой точки зрения необъясним более крутой наклон кривой доза - ответ. Тем не менее, предварительные данные, полученные в нашей лаборатории в опытах по специфическому связыванию меченного I^{125} инсулина позволяют думать, что рыбий гормон действительно обладает меньшим сродством к рецептору мышечной ткани крыс и не связывается рецептором в тех концентра-

циях, в которых он не вызывает эффекта. Вопрос требует дальнейшего изучения, которое и проводится в лаборатории в настоящее время.

По существу, те же закономерности выявляются при действии инсулина скорпен на жировую ткань (см.рис.5). Эта ткань также менее чувствительна к рыбьему инсулину (в дозах 0,4 и 4,0 нг/мл его эффект достоверно ниже, чем эффект свиного). В то же время с увеличением концентрации эффект рыбьего инсулина нарастал более круто и при 40,0 нг/мл эффекты гормонов уравнивались. Все же кривая зависимости эффекта от дозы, полученная на жировой ткани, походила на кривую свиного инсулина больше, чем в опытах на мышце, и это свидетельствует, по-видимому, о неодинаковой способности рецепторов инсулина в этих тканях дифференцировать различия в строении гормонов.

Возникает естественный вопрос: какова активность инсулинов птиц и рыб, если ее оценивать на животных, от которых они получены? В нашей лаборатории было исследовано действие выделенных инсулинов кур и рыб на поглощение глюкозы изолированными мышцами — *m.obliquus abdominis externus* и *m.rectus abdominis* кур и *m.adductor superficialis* скорпен (Плисецкая, Бондарева, 1974). Было обнаружено, во-первых, что все эти мышцы обладают значительно более низкой чувствительностью к инсулину, чем диафрагма крысы, обычно употребляемая в качестве тест-объекта при изучении активности этого гормона. Во-вторых, было показано, что даже и в этих условиях наблюдается специфичность в действии различных инсулинов. Мышцы рыб оказались более чувствительными к собственному гормону, чем к инсулинам птиц и млекопитающих. Мышцы кур были одинаково чувствительны к инсулинам кур и млекопитающих и в меньшей степени — к инсулину скорпен. Другими исследователями тоже не обнаружено различия в действии инсулинов птиц и млекопитающих на изолированные мышечную и жировую ткани кур (Goodridge, 1968; Rager et al., 1969; Langslow, Hales, 1971). Действие различных инсулинов на изолирован-

ные мышцы рыб до сих пор никем кроме Э.М.Плисецкой и В.М.Бондаревой не исследовано.

ВЫВОДЫ

1. Выделены кристаллические препараты инсулина птиц (кур) и рыб (морских ершей) с использованием для очистки гормонов колонок с ионообменной смолой сульфокатионитом КУ-23. Выходы кристаллических продуктов составили: 1-2 мг на 100 г поджелудочной железы кур и 2 мг на 1 г Брокмановских телец скорпен.

2. Химическая чистота полученных инсулинов подтверждена современными высокочувствительными методами: диск-электрофорезом в полиакриламидном геле и определением N-концевых аминокислот. Чистоту препаратов подтверждает также совпадение УФ спектров свиного (контрольного), птичьего и рыбьего инсулинов.

3. N-концевыми аминокислотами инсулина как кур, так и морских ершей являются глицин (A-цепь) и аланин (B-цепь).

4. Биологическая активность куриного инсулина, оцененная по судорожной реакции у мышей (*in vivo*), равна $22,8 \pm 3,2$ ед/мг, активность инсулина скорпен в этом тесте несколько ниже ($18,6 \pm 2,2$ ед/мг).

5. Кривые "доза - ответ" для свиного и куриного инсулинов при сравнении их биологического действия *in vitro* (диафрагмальным и жировым методами) совпадают. Инсулин скорпен в отношении мышечной и жировой ткани крыс менее эффективен, чем свиной гормон. При этом для получения минимального эффекта на мышечную ткань требуется значительно большая доза рыбьего инсулина, чем свиного. Максимальной величины эффект достигает при той же дозе, что и в случае свиного инсулина. На жировую ткань крыс рыбий инсулин оказывает более слабое действие, чем свиной, при низких дозах и одинаковое - при высоких.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы

1. Кристаллический куриный инсулин. Получение и некоторые химические и биологические свойств. Ж.эвол.биохим. и физиол., 9, 521, 1973 (совместно с Л.Г.Лейбсоном, Д.И.Островским, Л.В.Дмитренко).

2. Стабильность инсулина в комплексе с полиэлектrolитами к действию пепсина. Хим.-фарм. журн., 7, 49, 1973 (совместно с Д.И.Островским, Л.В.Дмитренко, Г.В.Самсоновым, Л.Г.Лейбсоном).

3. Выделение инсулинов птиц и рыб и характеристика их некоторых физико-химических и биологических свойств в сравнении с инсулином млекопитающих. В сб. "Материалы межинститутской конференции молодых ученых". Л., 1973, стр.52.

4. Влияние свиного, куриного и рыбьего инсулинов на поглощение глюкозы изолированными тканями крысы. Ж.эвол.биохим. и физиол., 10, 512, 1974 (совместно с Б.Н.Лейбушем).

5. О связи химической структуры и биологического действия инсулинов в ряду позвоночных. Тезисы III Всес.симпоз.по химии пептидов и белков, Киев, 1974, стр.176 (совместно с Б.Н.Лейбушем, Э.М.Плисецкой).

6. Выделение кристаллического инсулина скорпион и определение его биологической активности. В сб. "Физиология и биохимия низших позвоночных", Л., 1974, стр.44 (совместно с В.М.Бондаревой, Д.И.Островским).

Материалы диссертации доложены на Межинститутской конференции молодых ученых (Ленинград, 1973), на заседании Ленинградского отделения Всесоюзного биохимического общества (Ленинград, 1974) и на III Всесоюзном симпозиуме по химии пептидов и белков (Киев, 1974).