

УДК 577.175.722:616.379

©Коллектив авторов

## ДЕГРАДАЦИЯ ИНСУЛИНА В ГЕПАТОЦИТАХ И ЭРИТРОЦИТАХ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ.

С. Л. НИКОЛАЕВ, М. А. СТРЕЛКОВА, В. П. КОМОВ

Кафедра биохимии Санкт-Петербургской государственной  
Химико-Фармацевтической Академии  
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14 Факс: 234-60-44

В статье представлены экспериментальные данные по изучению метаболизма инсулина в эритроцитах крови крыс и в цитозоле гепатоцитов крыс в норме и при экспериментальном диабете. Изучено состояние инсулин деградирующего комплекса эритроцитов и гепатоцитов крысы при уменьшении концентрации инсулина в крови. Показана зависимость кинетических параметров инсулиназы от концентрации инсулина в крови. Из лизата эритроцитов и цитозоля гепатоцитов выделены и охарактеризованы термокислотоустойчивые ингибиторы инсулиназы с неконкурентным типом ингибирования. Обнаружено увеличение влияния ингибиторов эритроцитов и гепатоцитов на инсулиназу при диабете и уменьшение синтеза этого фермента в гепатоцитах. Полученные данные позволяют говорить о регуляции инсулиназной активности в изученных клетках, на уровне ингибиторов и на уровне синтеза инсулин-деградирующего фермента. Эти результаты указывают на ответ практически всех компонентов инсулин-деградирующего комплекса на изменение концентрации инсулина в крови в процессе развития экспериментального диабета.

**Ключевые слова:** диабет, инсулиназа, активаторы инсулиназы, ингибиторы инсулиназы, гепатоциты, эритроциты.

**ВВЕДЕНИЕ.** Инсулин - один из важнейших полипептидных гормонов, подвергающихся быстрому расщеплению в клетках-мишенях животных и человека. По современным представлениям этот гормон оказывает комплексное действие как на плазматические мембраны клетки мишени так и на их органеллы, включая ядро. Именно поэтому внимание исследователей в последнее время направлено на выяснение внутриклеточных компонентов, воспринимающих гормональный сигнал гормон-рецепторного комплекса или отдельного гормона после их интернализации.



Работами нашей лаборатории показано, что эффекты гормона на уровне трансляции обеспечиваются процессами, происходящими после интернализации гормон-рецепторного комплекса в клетку. При исследовании механизма воздействия инсулина на рибосомный синтез белка на модели бесклеточной системы было установлено, что нативный инсулин не влиял на синтез белка, тогда как фрагменты инсулина, образовавшиеся под действием печеночной инсулиназы, увеличивали в два раза включение  $H^3$ -метионина в синтезированные *de novo* белки [1,2]. В связи с этим, изучение деградации инсулина представляет большой интерес. Основными клетками-мишенями инсулина являются гепатоциты, адипоциты и миоциты. Вместе с тем, доказательство наличия в эритроцитах инсулина, стало причиной интенсивного исследования метаболизма этого гормона в клетках, считавшихся до этого узкоспециализированными переносчиками кислорода [3,4]. Кроме того известна способность лизата эритроцитов деградировать  $^{125}I$ -инсулин до фрагментов, растворимых в трихлоруксусной кислоте [5-7]. В эритроцитах существует комплекс веществ, участвующих в реализации биологического действия инсулина [8-11]. Этот комплекс включает в себя две частично исследованные инсулин-специфические протеиназы - инсулиназы [3,5,12,13], их ингибиторы [13-16] и активаторы [17,18]. Функционирование этого комплекса изучено в норме [9,14,19]. Целью нашей работы было изучение компонентов инсулин-деградирующего комплекса эритроцитов и гепатоцитов при экспериментальном диабете.

**МЕТОДИКА.** Работу проводили на белых беспородных крысах самцах весом 160-180 гр. Выделение цитозольной протеиназы из гепатоцитов осуществляли следующим образом: печеночную ткань гомогенизировали в буферном растворе (1:3), содержащем 0,25 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 0,01 М Трис HCl, pH 7,4. Цитозольную фракцию выделяли методом дифференциального центрифугирования. Супернатант высаливали сульфатом аммония в диапазоне концентраций 30-60 % насыщения. Осадок растворяли в небольшом объеме 0,02 М ацетатного буфера, pH 7,4 и диализовали в течение 12 часов против 100 объемов буферного раствора, меняя трижды буфер.

Аффинную хроматографию осуществляли на колонке размером 1,2x15 см при 4° С. Препарат фермента, диализованного против 0,02 М ацетатного буфера pH 6,4, наносили на колонку с биоспецифическим сорбентом (бромциан-активированная сефароза - 4В с инсулином в качестве лиганда), уравновешенную 0,02 М ацетатным буфером pH 6,4. Сорбированный фермент элюировали 0,02 М ацетатным буфером pH 6,4 в присутствии 0,2 М NaCl и 0,01 М дитиотреитола. Фракцию с максимальной протеиназной активностью наносили на колонку, заполненную сефадексом G-75 и уравновешенную 0,02 М ацетатным буфером pH 6,4 в присутствии 0,01 М дитиотреитола. Фракцию с максимальной протеиназной активностью диализовали в течение 3 часов против 100 объемов 0,01 М фосфатного буфера pH 8,0.

Об активности протеиназы судили по приросту свободных аминокрупп, которые определяли, используя нингидриновую реакцию. Состав инкубационной среды для определения активности: инсулин 500 мкг 0,1 М фосфатный буфер pH 8,0, анализируемая проба 20-30 мкг. Время инкубации 1 час. Реакцию останавливали добавлением 0,1 мл 50% ТХУ.

Содержание белка определяли по методу Лоури. Для оценки гомогенности фермента проводили диск-электрофорез в 7,5 % ПААГ с ДС-Na. Влияние ионов металлов и ингибиторов изучали, измеряя активность протеиназы в присутствии



$\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР, ЭДТА, ЭГТА, п-ХМБ, ФМСФ, пепстатина, меркаптоэтанола и дитиотреитола в следующих концентрациях: 100 мМ, 100 мМ, 1 мМ, 1 мМ, 1 мМ, 0,1-10 мМ, 0,1-1 мМ, 1 мкг/мл, 1 мМ, 1 мМ соответственно. Субстратная специфичность была изучена в отношении к следующим белковым субстратам: каталаза, лизоцим, сывороточный альбумин, яичный альбумин, инсулин. Кинетические параметры рассчитывали в координатах Лайнуивера-Берка.

Ингибитор цитозольной протеиназы выделяли по следующей схеме: цитозольный супернатант высаливали сульфатом аммония в диапазоне концентраций 30-60 %, осадок растворяли в небольшом объеме 0,02 М ацетатного буфера pH 6,4, диализировали в течение 12 часов. После диализа и концентрирования в глицерине наносили на колонку, заполненную сефадексом G-75 и уравновешенную 0,02 М ацетатным буфером pH 6,4, в присутствии 0,001 М дитиотреитола.

Для дальнейших исследований использовали фракцию, вызывающую 100 % ингибирование протеиназной активности. Характер ингибирования и константу ингибирования рассчитывали графически: скорости ферментативной реакции исследовали при двух постоянных концентрациях субстрата, но при увеличивающемся уровне ингибитора. Значения константы ингибирования определяли по точке пересечения прямых линий [20].

Для изучения обмена инсулиназы из гепатоцитов крыс был выделен гомогенный белок. Для получения антител к протеиназе 800 мкг антигена эмульгировали с равным объемом адъюванта и эмульсию вводили подкожно в область лопатки в несколько приемов кроликам массой 2 кг. Через 3 недели проводили повторную иммунизацию через ушную вену трижды по 50 мкг антигена через день. Через 10 дней после последней иммунизации отбирали кровь. Иммунизация кролика препаратом высокоочищенной протеиназы сопровождалась выработкой антител к данному ферменту. Для определения моноспецифичности антител в полученных антисыворотках использовали метод радиальной диффузии в 1% агаре. При проведении реакции иммунодиффузии протеиназы и полученной антисыворотки в присутствии некоторых белков было показано, что антитела дают одну полосу преципитации только с анализируемой протеиназой, что свидетельствует о гомогенности препарата антигена и высокой специфичности антисыворотки. Меченный  $\text{H}^3$ -лейцин вводили крысам веса 150 г из расчета 600 мКи/мл. Оценку скорости синтеза и распада фермента проводили в интервале от 15 минут до 48 часов после инъекции  $\text{H}^3$ -лейцина. После введения  $\text{H}^3$ -лейцина осуществляли иммунопреципитацию протеиназы специфической антисывороткой. Полученные осадки анализировали радиоизотопным методом.

Эритроциты для лизата получали при помощи центрифугирования крови крысы в градиенте верографин-фикколл с последующим пятикратным промыванием в 0,9 % растворе NaCl. Количество эритроцитов в эритроцитарной массе определяли безмеланжерным методом. Эритроцитарная масса содержала  $18,6 \cdot 10^9$  эритроцитов крысы в 1 мл. Лизат эритроцитов крысы содержал белок в концентрации 50 мг/мл. Модель диабета на крысах самцах весом 120 г создавали внутрибрюшинным введением раствора аллоксана в 0,9 % растворе NaCl из расчета 150 мг/кг веса. Стадии экспериментального диабета устанавливали по концентрации глюкозы в крови. Острая стадия начиналась на 3-й день после инъекции аллоксана и характеризовалась повышением уровня глюкозы в крови до максимального. Инсулиназу выделяли при помощи ионообменной



хроматографии на DEAE-сефадексе с последующим использованием аффинной хроматографии на колонке с активированной Бром-циан-сефарозой 4В, используя 4-аминофенилмеркурийацетат в качестве лиганда. Гомогенность фракции полученной после аффинной хроматографии исследовали при помощи диск- и пластинчатого электрофореза в 7,5 % ПААГ.

Препарат инсулина, меченного  $^{125}\text{I}$ , был получен йодированием рекомбинантного инсулина по хлорамин-Т методу. Средняя специфическая радиоактивность препарата составляла 80 мкКи/мкг.  $^{125}\text{I}$ -инсулин более чем на 95% осаждался в 5% трихлоруксусной кислоте (ТХУ). Активность инсулиназы определяли по приросту радиоактивности в ТХУ супернатанте после инкубации пробы. Термокислотоустойчивый низкомолекулярный ингибитор инсулиназы получали инкубируя лизат эритроцитов при 100°C в течение 15 мин. После чего в пробу добавляли 50% ТХУ из расчета конечной концентрации ТХУ в растворе 5%, а затем инкубировали 10 мин. при 4°C и центрифугировали. Нейтрализацию полученного ТХУ супернатанта проводили 0,5 М NaOH с последующим диализом в течение 12 часов против 100 объемов 0,01 М трис-HCl буфера pH 7,8, меняя трижды буфер.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Для выделения инсулиназы использовали цитозольную фракцию гепатоцитов и лизат эритроцитов крысы. Высаливание сульфатом аммония, ионообменной, гель и аффинной хроматографии позволило получить высокоочищенный фермент из гепатоцитов (табл.1) (степень очистки 170 раз) и эритроцитов (табл.2) (степень очистки ~ 2000 раз)

Таблица 1. Выделение и очистка инсулиназы из гепатоцитов крыс.

Стадия очистки	Белок мг	Активность		Выход по активности (%)	Степень очистки
		Суммарная (ед)	Удельная (ед/мг белка)		
Супернатант (105000 g)	352,5	27300	77,44	-	-
Высаливание, диализ	88,48	15400	171,87	56,4	2,21
Аффинная хроматография	0,408	3200	7843,1	11,72	101,2
Хроматография G-75	0,21	2800	1333,3	10,25	172,17

Чистоту фермента контролировали методом диск электрофореза в 7,5 % ПААГ. Исследуемые препараты из эритроцитов и гепатоцитов были представлены одной полосой. Молекулярную массу ферментов определяли электрофоретически в 10% ПААГ в присутствии ДС-Na. Для инсулиназы из гепатоцитов получено значение 80 кДа, а для инсулиназы из лизата эритроцитов – 78 кДа.

Для характеристики протеиназ из цитозоля гепатоцитов и лизата эритроцитов было изучено влияние ингибиторов и активаторов на их ферментативную активность. Результаты этих экспериментов представлены в таблице 3. Влияние на активность инсулиназ ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  позволяет говорить о том, что они являются металлозависимыми ферментами. В большей



степени это выражено для инсулиназы лизата эритроцитов. Стимулирующий эффект, показанный для сульфгидрильных агентов, и ингибирование фермента п-хлораминомеркурийбензоатом дает основание отнести выделенные инсулиназы к классу тиоловых протеиназ.

Таблица 2. Выделение и очистка инсулиназы из лизата эритроцитов крыс.

Стадия очистки	Белок мг	Активность		Выход по активности (%)	Степень очистки
		Суммарная (ед)	Удельная (ед/мг * белка)		
Гемолизат	1171,44	64,03	0,05467	-	-
DEAE-хроматография (стационарная)	12,12	48,53	4,004	75,79	73,24
DEAE-хроматография	1,92	16,46	8,57	25,71	156,75
Аффинная хроматография	0,0559	7,88	140,97	12,22	2581

Таблица 3. Влияние активаторов и ингибиторов на активность инсулиназы.

Активаторы и ингибиторы	Концентрация	Активность инсулиназы лизата эритроцитов	Активность инсулиназы гепатоцитов
Контроль	-	100 %	100 %
Ca <sup>2+</sup>	100 мМ	225 %	256 %
Mn <sup>2+</sup>	100 мМ	199 %	
Zn <sup>2+</sup>	100 мМ	124 %	94,8 %
Mg <sup>2+</sup>	100 мМ	166 %	25,6%
АТФ	1 мМ		25,6%
Fe <sup>2+</sup>	100 мМ	84 %	
Меркаптоэтанол	1 мМ		160%
Дитиотреитол	1 мМ	318 %	120%
ПХМБ	0,1-1 мМ	53 %	10%
Пепстатин	1 мкг/мл		100%
ЭГТА	1 мМ		100%
ЭДТА	1 мМ	62 %	100%
Фенилметил сульфонилфторид	0,1-1 мМ	88 %	100%

Субстратную специфичность протеиназы из гепатоцитов оценивали по ее действию на некоторые синтетические и белковые субстраты. Данные представлены в табл. 4.

Результаты определения кинетических параметров инсулиназы из лизата эритроцитов в норме показали, что она обладает несколько меньшим сродством к инсулину, чем инсулиназа цитозоля гепатоцитов (табл.5).

При тестировании активности протеиназы, выделенной из гепатоцитов, с использованием ряда синтетических и белковых субстратов показано, что инсулиназа неактивна в отношении АТЭЭ и ВААЕ, но проявляла биологическую активность к испытуемым белковым субстратам. Анализ кинетических констант



показывает, что наилучшим субстратом для инсулиназы из гепатоцитов является инсулин. Сродство к инсулину этой протеиназы было в 1,7 раза выше по сравнению с каталазой и более чем в 10 раз превышает этот показатель для таких субстратов как БСА, яичный альбумин и лизоцим.

Таблица 4. Характеристика субстратной специфичности инсулиназы цитозоля гепатоцитов.

Субстрат	Константа Михаэлиса, М
Каталаза	$1,9 \cdot 10^{-8}$
Лизоцим	$41,0 \cdot 10^{-8}$
Бычий сывороточный альбумин	$14,0 \cdot 10^{-8}$
Яичный альбумин	$14,0 \cdot 10^{-8}$
Инсулин	$1,14 \cdot 10^{-8}$

По мнению многих авторов, регуляция протеиназной активности в гепатоцитах и эритроцитах связана с уровнем эндогенных ингибиторов [18]. Из цитозольной фракции гепатоцитов крыс был выделен ингибитор с молекулярной массой, 74 кДа который конкурентно ингибировал инсулиназу ( $K_i = (1,46 \pm 0,076) \cdot 10^{-12}$  М).

Из гемолизата эритроцитов был выделен и исследован термокислотоустойчивый ингибитор. Этот гликолипопротеин с молекулярной массой 2,5 кДа, очищенный в 2500 раз, неконкурентно ингибировал инсулиназу ( $K_i = 39,4$  мкМ).

Для более глубокого понимания патогенеза сахарного диабета определяли активность представленных выше компонентов инсулин-деградирующего комплекса эритроцитов и цитозоля гепатоцитов, как в норме, так и при экспериментальном диабете. Результаты проведенных исследований показали, что при остром экспериментальном аллоксановом диабете инсулин-деградирующая активность лизата эритроцита понижается на  $23 \pm 1,6$  % по отношению к норме (табл.5). Инсулиназная активность цитозоля гепатоцитов при остром экспериментальном аллоксановом диабете уменьшается гораздо сильнее (в 5 раз по сравнению с нормой). Кроме того, отмечено изменение кинетических параметров инсулиназы лизата эритроцитов и цитозоля гепатоцитов. Так при остром экспериментальном диабете сродство эритроцитарной инсулиназы к инсулину увеличивается по сравнению с контролем. Аналогичные изменения характерны и для инсулиназы цитозоля гепатоцитов, сродство которой к инсулину так же увеличивается (табл.5).  $V_{\max}$  инсулиназы из лизата эритроцитов при остром диабете понижается незначительно, тогда как  $V_{\max}$  инсулиназы цитозоля гепатоцитов при остром диабете понижается в 7 раз (табл.5).

Исходя из того, что протеиназная активность в гепатоцитах может зависеть от уровня эндогенного ингибитора, была исследована активность обнаруженного высокомолекулярного ингибитора при экспериментальном диабете. Данные показывают, что при остром диабете процент ингибирования инсулиназы эндогенным ингибитором повышается, а значение  $K_i$  составляет  $(0,567 \pm 0,05) \cdot 10^{-12}$  М. Что касается активности термокислотоустойчивого ингибитора инсулиназы, выделенного из лизата эритроцитов, то достоверного изменения ингибиторной активности при остром экспериментальном диабете не



отмечено. Кроме термокислотоустойчивого ингибитора инсулиназы из лизата эритроцитов был исследован термокислотоустойчивый ингибитор инсулиназы из плазмы крови. Ингибирующая активность составила  $21,83 \pm 1,05\%$ , т.е. достоверного изменения ингибирующей активности при экспериментальном диабете обнаружено не было. Кроме торможения активности инсулиназы эндогенным ингибитором представлялось важным изучить регуляцию инсулиназы на уровне синтеза и распада фермента. Константы скорости синтеза  $K_s$  и деградации  $K_d$  определяли по методу Shimke [21], время функционирования фермента  $t_{1/2}$  по методу Ageas и соавт. [22]. Истинную концентрацию фермента рассчитывали исходя из общей активности инсулиназы в цитозоле гепатоцитов и удельной активности гомогенной протеиназы во фракции, получаемой с колонки при выделении и очистке фермента.

Таблица 5. Активность и кинетические параметры инсулиназы из лизата эритроцитов и цитозоля гепатоцитов.

Параметр	В норме	При диабете
Инсулиназная активность лизата эритроцита(%)	100	$76,45 \pm 1,58$
$K_m$ инсулиназы лизата эритроцита (М)	$(8,33 \pm 0,22) \cdot 10^{-8}$	$(6,25 \pm 0,14) \cdot 10^{-8}$
$V_{max}$ инсулиназы лизата эритроцита (М)	$(286 \pm 31) \cdot 10^{-8}$	$(201 \pm 11) \cdot 10^{-8}$
Инсулиназная активность цитозоля гепатоцитов (%)	100	$20,16 \pm 1,3$
$K_m$ инсулиназы гепатоцитов (М)	$(1,14 \pm 0,15) \cdot 10^{-8}$	$(0,47 \pm 0,63) \cdot 10^{-8}$
$V_m$ инсулиназы гепатоцитов (М)	$(93,51 \pm 11,13) \cdot 10^{-8}$	$(14,05 \pm 1,17) \cdot 10^{-8}$

По данным табл. 6, время “полужизни” цитозольной протеиназы составляло 14 часов и за 1 час синтезируется 10 мкг фермента. Стабильность фермента характеризуется константой деградации; ее расчетное значение составило  $0,049 \text{ час}^{-1}$ . Концентрация инсулиназы в цитозоле гепатоцитов при экспериментальном диабете уменьшается примерно в 4,5 раза. Эти изменения могут происходить за счет уменьшения синтеза инсулиназы и за счет усиления деструкции фермента в цитозоле гепатоцитов. Возможно, эти изменения объясняют понижение инсулиназной активности гепатоцитов при остром экспериментальном аллоксановом диабете.

Таблица 6. Кругооборот цитозольной протеиназы и ее эндогенного ингибитора из гепатоцитов крыс в норме и при экспериментальном диабете.

Параметры		$K_d, \text{час}^{-1}$	$t_{1/2}, \text{час}$	$K_s$ мкг/г, час	E мкг/г
Протеиназа	норма	$0,049 \pm 0,005$	$14,3 \pm 1,5$	$9,99 \pm 0,3$	$204,0 \pm 12,0$
	диабет	$0,127 \pm 0,03$	$5,45 \pm 0,9$	$5,58 \pm 0,5$	$44,0 \pm 5$
Ингибитор	норма	$0,021 \pm 0,0006$	$33 \pm 0,9$	$0,7 \pm 0,1$	$34 \pm 2,0$
	диабет	$0,122 \pm 0,01$	$5,7 \pm 0,2$	$6,3 \pm 1,0$	$52 \pm 3,0$

В связи с тем, что было показано достоверное увеличение активности ингибитора инсулиназы в гепатоцитах при экспериментальном диабете, проводилась оценка обмена эндогенного ингибитора инсулиназы в норме и при патологии. Как видно из табл. 6, при экспериментальном аллоксановом диабете резко интенсифицируются обменные процессы данного белка. Константа



скорости синтеза возрастает в 10 раз на фоне роста скорости деградации, что в конечном итоге приводило к увеличению содержания вновь синтезированного ингибитора при диабете более чем в 1,5 раза по сравнению с нормой. Этот факт свидетельствует о том, что торможение активности инсулиназы эндогенным ингибитором в гепатоцитах при диабете играет существенную роль.

Как показано выше, уменьшение инсулиназной активности лизата эритроцитов при экспериментальном диабете не может быть обосновано только увеличением активности ингибитора инсулиназы. Исходя из того, что эритроциты не обладают белок-синтезирующей системой, можно предположить, что уменьшение инсулиназной активности пула эритроцитов после введения аллоксана, происходит за счет уменьшенной активности инсулин-деградирующего комплекса эритроцитов, вышедших в кровь. Так как в ретикулоцитах активны процессы синтеза белка, можно полагать, что синтез инсулиназы в них подвержен тем же закономерностям, что и синтез инсулиназы в гепатоцитах при экспериментальном диабете. Это дает основания предполагать, что эритроциты, созревшие в условиях экспериментального диабета и вышедшие в кровь обладают пониженным уровнем содержания инсулиназы.

Таким образом, представленные данные расширяют наши представления по оценке механизмов деградации инсулина при диабете с учетом метаболических изменений инсулиназы и ее ингибиторов при данной патологии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Komov V.P., Malykch A.G., Strelkova M.A.* (1987), 18-th FEBS Meeting, Ljubljana, Yugoslavia, FEBS Abstr., p.86.
2. *Малых А.Г., Комов В.П.* IX Всесоюзн. конф. "Восстановительные и компенсаторные процессы при лучевых поражениях", (1986), Ленинград, Тез. докл. с.65-66.
3. *Matulevichus V., Coculescu M., Urbonavichus V.* (1980) *Physiologie.*, **17**, 217-219.
4. *Ogawa W., Shii K., Yonezawa K., Baba S., Yokono K.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**(2), 1310-1316.
5. *Akiyama H., Yokono K., Shii K., Ogawa W., Taniguchi H., Baba S., Kasuga M.* (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170**, 1325-1330.
6. *Goldberg A. L., Swamy K. H. C., Chung C. H., Larymor F. S.* (1981) *Meth. Enzymol.*, **80**, 680-702.
7. *Misbin R. I., Almira E. C.* (1989), *Diabetes*. **38**(2), 152-158.
8. *Duckworth W. C., Hamel F. G., Bennett R., Ryan M. P., Roth R. A.* (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 2984-2987.
9. *Kitabchi R. G., Goldberg A. L.* (1981) *Meth. Enzymol.*, **80**, 702-711.
11. *Snehalatha C., Timothy H., Mohan V., Ramachandran A., Viswanathan M.* (1990) *J. Assoc. Physicians India.*, **38**, 558-561.
12. *Duckworth W. C., Kitabchi A. E.* (1981) *Endocr. Rev.*, **2**, 117-121.
13. *Kaylar C., Wong W. T., Hendrickson L.* (1990), *J. Cell. Biochem.*, **44**(3), 137-151.
14. *Bennet R. G., Hamel F. G., Duckworth W. C.* (1997) *Diabetes.*, **46**(2), 197-203.



15. *Medina V., Kesner L., Stracher A.* (1993) *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **49**(2), 255-264.
16. *Werlen R. C., Offord R. E., Rose K.* (1994) *Biochem. J.*, **302**(Pt 3), 907-911.
17. *Gavin J. R., Roth J., Neville D. M., Melyts P. De.* (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 84.
18. *Matulevichus V., Vareikis E., Lasas L.* (1983) *Sveikatos Aspauga*, N-5., 29-31.
19. *Okamoto M., Kuzuya H., Seino V., Ikeda M., Imura H.* (1981) *Endocrinol Jpn.*, **28**, 615-622.
20. *Мосс Д.В., Бамтерворт П.Дж.* (1978) *Энзимология и медицина*. Москва. Медицина. с.82-86.
21. *Shimke R.T.* (1973) *Arhv. Enzymol.*, **37**, 135-137.
22. *Areas I.M., Doile D., Shimke R.* (1969) № 12, 3303-3315.

Поступила 03.04.00.

# **INSULIN DEGRADATION IN HEPATOCYTES AND ERYTHROCYTES FROM NORMAL AND EXPERIMENTAL DIABETIC RATS**

**S.L. NIKOLAEV, M.A. STRELKOVA, V.P. KOMOV.**

Department of Biochemistry, Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy  
197376 Saint-Petersburg, prof. Popova str., 14; fax: 234-60-44

Insulin metabolism in erythrocytes and hepatocytes of normal and experimental diabetic rats was studied. Insulin-degrading complex of erythrocytes and hepatocytes was investigated at low insulin concentration in blood. Kinetic parameters of insulinase depend on insulin concentration in blood have shown. Thermo-acid resistant non-competitive endogenous inhibitors were purified from erythrocytes and hepatocytes. Increase of endogenous inhibitors influence insulin-degrading enzyme in diabetes. Synthesis of insulin-degrading enzyme in hepatocytes of diabetic rats was reduced. These results suggest that insulin-degrading activity in erythrocytes and hepatocytes is regulated by endogenous inhibitors, by synthesis of insulinase. This change of blood insulin concentration influences practically all the components of insulin-degrading complex.

**Key words:** Diabetes mellitus, insulin-degrading enzyme, insulinase activators, insulinase inhibitors, hepatocytes, erythrocytes.