



## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИИ

УДК 612.018:591.481.1

ВЫДЕЛЕНИЕ ИНСУЛИНА ИЗ ТКАНИ МОЗГА КРЫС И  
ЕГО БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

БОНДАРЕВА В. М., ЛЕЙБУШ Б. Н., РУСАКОВ Ю. И.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова  
АН СССР, Ленинград

Методом ИОХ с использованием сульфокатионита КУ-23 из целого мозга крыс выделен и очищен инсулин. Полученный гормон по физико-химическим и иммунным свойствам имеет близкое сходство с панкреатическим инсулином. По данным радиоиммунологического анализа, содержание инсулина мозга в 6 раз превышает уровень гормона в периферической крови. Препарат инсулина мозга связывается с рецепторами плазматических мембран печени, не отличаясь в этом отношении от панкреатического инсулина.

Присутствие в ткани мозга пептидов, сходных по биологическим свойствам с гормонами, выделяемыми периферическими эндокринными железами, в настоящее время является установленным фактом. К числу нейропептидов инсулин отнесен сравнительно недавно, несмотря на то, что его физиологическая роль в организме изучена наиболее полно. Из-за невозможности прохождения инсулина через ГЭБ нервную ткань не отнесли к числу объектов, регулируемых этим гормоном.

Стимулом к поискам инсулина в нервной ткани послужило обнаружение в ней инсулиновых рецепторов [1, 2], а позднее — их выделение и очистка [3]. Естественно, возник вопрос, какова функция рецепторов, если панкреатический гормон, циркулирующий в крови, не доступен большей части мозга.

Первая попытка идентификации инсулина мозга была предпринята в 1978 году [4]. В головном мозгу крыс был обнаружен белок, близкий по биологическим свойствам панкреатическому инсулину, в количестве, в 25 раз превышающем уровень гормона в периферической крови. Примечательным оказалось и неравномерное распределение гормона в отдельных областях мозга: наибольшее в гипоталамусе и в обонятельных луковицах и наименьшее в коре больших полушарий. В последующем инсулин мозга был обнаружен у других млекопитающих [5, 6], человека [7], а также в культурах клеток нейронов [8].

Для выделения инсулина из мозговой ткани обычно используется экстракция кислым этанолом с последующей очисткой экстрактов гель-фильтрацией на сефадексах или концентрированием методом гидрофобной адсорбции. Оценку количества инсулина в выделенном материале производят радиоиммунологическим методом. При этом результаты оказываются противоречивыми. Так, количество инсулина, приводимое авторами для ткани мозга крыс, различается более чем в 50 раз: от 0,2 до 11 нг/г ткани [4—6, 9]. Следует подчеркнуть, что количественная оценка инсулина в мозгу принципиально важна; о синтезе гормона в нервной ткани можно говорить только в том случае, если его уровень в ЦНС определенно выше уровня гормона в периферической крови. Противоречия в оценке количества инсулина в ткани мозга можно объяснить особенностями методов, применяемых для его выделения. Кислотно-этаноловые экстракты содержат большое количество белков, присутствие которых может исказить результаты определения инсулина радиоиммунным методом. Гель-фильтрация экстрактов и применяемые варианты гидрофобной адсорбции гормона не гарантируют освобождения от сопутствующих белков, что делает необходимым расширить круг методов, применяемых с целью идентификации инсулина в ЦНС.

### Материалы и методы

Для решения вопроса о содержании инсулина в ткани мозга нами был применен метод ИОХ, разработанный в лаборатории для получения инсулина из эндокринной ткани, с использованием отечественного катионообменника КУ-23 [10]. Основное преимущество сульфокатионита КУ-23 заключается в избирательной сорбции инсулина из солянокислых экстрактов тканей и возможности проведения последующих этапов очистки гормона непосредственно на колонке.

Ткань целого мозга (крысы линии *Wistar*) гомогенизировали в 20-и объемах солянокислого этанола. Экстракцию осуществляли при комнатной температуре в течение 4-х ч. Осветленные центрифугированием экстракты (3500 г, 20 мин) налили на колонку (32×1 см), заполненную катионитом в  $H^+$  форме. В работу брали партию смолы, не использованную ранее. Последующие этапы обработки комплекса инсулин-катионит состояли из обезжиривания (70%-ным этанолом), отмывки от балластных белков (0,5 М раствор  $CH_3COOH$ ), элюции инсулина (0,2 н. аммонийным буфером, рН 9,4). Контроль состава элюатов осуществляли при 280 нМ. В тех же условиях мы выделили инсулин из поджелудочной железы крыс, а также поставили контроли с обработкой на КУ-23 коммерческого кристаллического инсулина как стандарта. Было найдено, что при хроматографии кислотно-этаноловых экстрактов ткани мозга на колонке с КУ-23 четкий белковый пик обнаруживается в той же области, что и стандарт; в этой же зоне выходил белковый пик при обработке панкреатического экстракта. Элюаты объединяли во фракции согласно пикам на кривой. Далее проводили дополнительное осаждение балластных белков ступенчатым доведением рН полученных фракций до 2,0 и после добавления

ацетона (20% от объема раствора) до 4,0. Через 24 ч раствор центрифугировали (3500 г, 20 мин) и надсадочную жидкость лиофилизировали.

Для обессоливания полученных препаратов инсулина гель-фильтрацию проводили на сефадексе G-25. Колонку (52×1,6 см) уравнивали раствором 1 М уксусной кислоты, этим же раствором элюировали нанесенные на колонку образцы фракций, полученных при хроматографии на сульфокатионите. Детектирование проводили в проточной кювете спектрофотометра СФ-26 при 280 нм, элюаты, хорошо выраженные пики в зоне выхода инсулина, объединяли и лиофилизировали.

Инсулин во фракциях определяли твердофазным радиоиммунологическим методом [11] с использованием в качестве стандарта свиного инсулина (Ely Lilly, США, партия PJ 7214).

## Результаты и обсуждение

Разбавление элюатов из ткани мозга крыс приводит к пропорциональному уменьшению в них количества определяемого инсулина (рис. 1, а); ход калибровочной кривой (рис. 1, б, 1) не изменяется при добавлении к стандартным концентрациям инсулина равных количеств элюата мозга (рис. 1, б, 2); ход кривой не изменяется при добавлении к стандарту элюата поджелудочной железы крыс (рис. 1, б, 3). Результаты этих опытов свидетельствуют, во-первых, об иммунологическом сходстве выделенного из ткани мозга инсулина с панкреатическим гормоном крыс, во-вторых, указывают на правомерность тестирования его в данной радиосимпунной системе. Кроме того, было показано, что полученный материал вытесняет инсулин [<sup>125</sup>I], специфически связанный с плазматическими мембранами печени крысы, не отличаясь в этом отношении от стандартного свиного инсулина (рис. 2). Это свидетельствует о его способности связываться с рецепторами инсулина в данной ткани, что является дополнительным доводом в пользу инсулиновой природы выделенного из мозга гормона.

Данные о содержании инсулина, выделенного из ткани мозга и поджелудочной железы крыс, приводятся в таблице. Для сравнения указано количество иммунореактивного инсулина в сыворотке крови крыс, измеренное в той же радиосимпунной системе. Как видно из таблицы, содержание инсулина в ткани целого мозга крыс в 6 раз превышает уровень гормона в крови. Даже без учета потерь (свыше 50%), неизбежных в процессе экстракции ИОХ и гель-фильтрации, концентрация инсулина в ткани мозга значительно выше его уровня в периферической крови, что согласуется с данными ряда авторов [4, 5].

Как указывалось выше, метод очистки инсулина с помощью сульфокатионита позволил ранее выделить из островковой ткани ряда животных инсулин высокой чистоты, что подтверждено при расшифровке аминокислотной последовательности в их молекуле [12]. С большой долей вероятности мы можем утверждать, что инсулин, выделенный из мозга крыс на смоле КУ-23 с проведением тех же стандартных процедур, является

высокоочищенным, и определение его количества радиоиммунным методом отражает с достаточной точностью его действительное содержание в мозговой ткани.

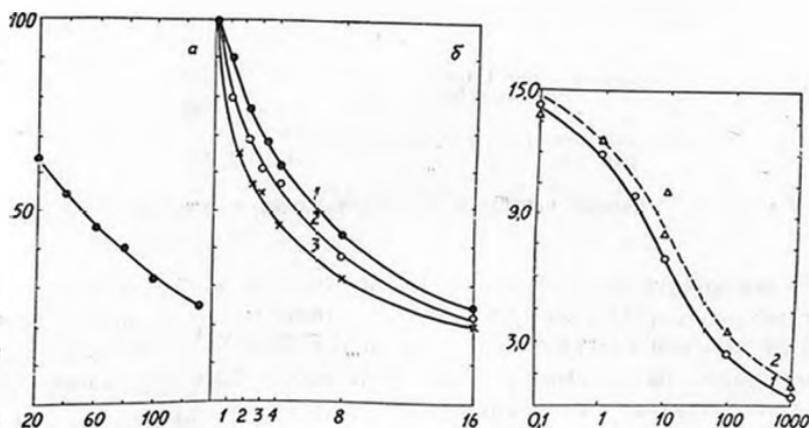


Рис. 1. Радиоиммунологическое определение инсулина в элюатах мозга и поджелудочной железы: а—кривая зависимости иммунной активности инсулина мозга от количества препарата. По оси абсцисс—объем в  $\mu\text{г}$ , по оси ординат—% связанного инсулина; б—1—стандартная кривая коммерческого инсулина; 2—стандартная кривая коммерческого инсулина с добавлением элюата мозга (1:40); 3—стандартная кривая коммерческого инсулина с добавлением элюата поджелудочной железы (1:32000). По оси абсцисс—концентрация немеченого инсулина в  $\text{нг}$ , по оси ординат—% связанного инсулина

Рис. 2. Связывание инсулина [ $^{125}\text{I}$ ] плазматическими мембранами печени крысы в присутствии возрастающих концентраций стандартного инсулина (1) и препарата инсулина мозга (2). По оси абсцисс—инсулин  $\text{нг/мл}$ , по оси ординат—% связывания инсулина [ $^{125}\text{I}$ ]

Вопрос о происхождении инсулина в ЦНС является дискуссионным. Некоторые авторы, не выявившие в мозгу инсулина в количествах более высоких, чем в плазме крови, полагают, что ими определяется инсулин, находящийся в сосудистом пространстве мозга [6]. Полученные нами результаты, как и данные ряда других исследователей [4, 5], не позволяют согласиться с такой точкой зрения. В пользу того, что инсулин синтезируется в ЦНС, помимо количественных расчетов, свидетельствуют и такие факты, как независимость уровня инсулина мозга от колебаний его концентраций в крови [13], цитохимическое обнаружение инсулина в нейронах [4, 8], а также недавно полученные данные о том, что у 5% растущих *in vitro* клеток мозга имеется РНК, способная к гибридизации с инсулиновым геном [14].

Физиологическое значение инсулина в ЦНС не ясно. Высказывается предположение, что инсулин в мозгу может выполнять функции нейротрансмиттера или нейромодулятора [15]. Кроме того, значительное количество гормона, обнаруживаемое в ткани растущего мозга и в культуре

растущих нейронов [8], позволяет предположить, что гормон важен для регуляции роста ткани.

Таблица

Содержание иммунореактивного инсулина в сыворотке крови, ткани мозга и поджелудочной железе крыс

Сыворотка крови (нг/мл)	1,26±0,05
Ткань целого мозга (нг/г сырого веса)*	7,57±1,53
Поджелудочная железа (нг/г сырого веса)*	11700±2600

Примечание. \* Данные приведены без учета потерь в процессе экстракции и очистки.

В заключение можно сказать, что полученные нами результаты количественного определения инсулина согласуются с концепцией об относительно высоком содержании гормона в головном мозгу крыс, а метод хроматографии на сульфокатионите КУ-23 может быть использован для выделения инсулина из внепанкреатических тканей.

## RAT BRAIN INSULIN: ISOLATION AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

BONDAREVA V. M., LEIBUSH B. N., RUSAKOV Yu. I.

Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Leningrad

Rat brain insulin has been isolated by means of ion-exchange chromatography on cation exchange resin KU-23. Its physico-chemical and immunological properties are similar to those of pancreatic insulin. The insulin content in the brain (radioimmune assay) is 6-fold higher, than in the blood. Brain insulin binds to the specific receptors in liver cell membranes, the affinity being equal to that of pancreatic insulin.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Havrankova J., Roth J., Brownstein M. Nature, v. 272, № 5656, p. 827-829, 1978.
2. Лейбуш Б. Н. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 19, № 4, с. 407-413, 1983.
3. Roth R. A., Morgan D. O., Buechedoin J., Vicki Sara J. Biol. Chem., v. 261, № 8, p. 3753-3757, 1985.
4. Havrankova J., Schmechel D., Roth J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 75, № 11, p. 5737-5741, 1978.
5. Stevenson R. W. Horm. Metab. Res., v. 15, № 11, p. 526-528, 1983.
6. Eng J., Yalow R. Diabetes, v. 29, № 2, p. 105-109, 1980.
7. Dorn A., Bernstein H. G., Rinne A., Hahn H. J., Zeitler M. Histochem., v. 74, № 2, p. 293-300, 1982.

8. *Ratzada M. K.* Exp. Cell. Res., v. 143, № 2, p. 351—357, 1983.
9. *Baskin D. G., Parte D., Guest K., Dorsa D. M.* Endocrinol., v. 112, № 3, p. 878—903, 1983.
10. *Русаков Ю. И., Бондарева В. М.* Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 15, № 2, с. 136—140, 1979.
11. *Асйбуш Б. Н.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 72, № 11, с. 89—91, 1971.
12. *Русаков Ю. И., Карасев В. С., Перцева М. Н., Панков Ю. А.* Биохимия, т. 52, № 2, с. 247—254, 1987.
13. *Havránková J., Roth J., Brownstein M. J.* J. Clin. Invest., v. 64, № 2, p. 636—642, 1979.
14. *Cooper D., Clarke D., MacLaren N., Ratzada M., Stein J., Stein G.* Red. Proc. Abst., v. 44, № 3, p. 435, 1985.
15. *Puro D. G., Agardh E.* Science, v. 225, № 4667, p. 1170—1172, 1984.

Поступила 1. XII 1987

Избранные работы по нейрохимии. 580 с., 1985. Selected topics from neurochemistry (ed. N. N. Osborne), Pergamon Press, Oxford, G. B. 580 p., 1985.

Книга содержит современные версии работ, завоевавших популярность при первой начальной публикации их в «*Neurochemistry International*». Статьи эти привлекают внимание к достижениям в специфических сферах, возможно, не слишком близких читателю тем, что связывают в единое целое наблюдения из широкой области, открывающие новые направления, раскрывают авторскую позицию относительно противоречивых проблем или содержат критический анализ широко распространенных и ставших догматическими принципов в нейронауках. В сборник включены статьи: Н. Hillman «Некоторые фундаментальные, теоретические и практические проблемы, связанные с нейрохимическими исследованиями на млекопитающих»; А. Hardy, P. R. Dodd «Метаболические и функциональные посмертные исследования человеческого мозга»; N. N. Osborne «Связи между нейронами: современные концепции»; J. R. Coopers, E. M. Meyer «Возможные механизмы, вовлекающиеся в высвобождение или модулирующие высвобождение нейроактивных агентов»; В. Н. Wainer et al. «Холинэргические системы в человеческом мозгу, идентифицированные с помощью антител к холинацетилтрансферазе»; S. R. Maxs, G. J. Markelonis «Нейрональный контроль мышц»; U. Havemann, K. Kuschinsky «Нейрохимические аспекты вызываемой опиоидами кататонии»; В. E. Leonard «Современное состояние теории о роли биогенных аминов в возникновении депрессии»; F. V. DeFeudis «ГАМК-ергические системы и поведение питания»; F. V. DeFeudis «ГАМК и нейрокардиоваскулярные механизмы»; F. V. DeFeudis «Влияние физиологических агентов на процессы связывания ГАМК».

Книга представляет значительный интерес для нейрохимиков, неврологов и невропатологов.