

ультрафильтратов гидролизованного молока и молозива возрастали на 8–12%, а показатели IC_{50} по сухому веществу уменьшались в 3,2/4,5 раза, а по белку в 5/5,3 раза по сравнению с образцами КСБ и молозива.

Образцы комплексов белков молока и молозива с γ -циклоцистинами показывали повышение АОА по сравнению с исходными образцами КСБ и молозива, а также с γ -циклоцистином. Показатели A_{max} образцов комплексов ГСБ–ЦД и ГМ–ЦД увеличивались на 17/18 % по сравнению с образцами КСБ и молозива и на 9/17 % по сравнению с γ -циклоцистином. Показатели IC_{50} комплексов ГСБ–ЦД и ГМ–ЦД по сухому веществу уменьшались в 2,4/1,9 раза, а по белку в 9,2/8,5 раза по сравнению с исходными образцами КСБ и молозива. Также они уменьшались в 2/2,4 раза и по сравнению с IC_{50} циклоцистина.

Сравнение комплексов белков молока и молозива с γ -циклоцистинами с ультрафильтратами гидролизатов молока (ГСБ–УФ) и молозива (ГМ–УФ) показывает повышение показателя A_{max} на 5–10 % при максимальных концентрациях и снижение показателей IC_{50} по белку в 1,7 раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wada, Y. Bioactive peptides derived from human milk proteins – mechanisms of action / Y. Wada, B. Lönnnerdal // J. Nutr. Biochem. 2014. V. 25, № 5. P. 503–514.*
2. *Mohanty, D. et al. Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food / D. Mohanty // Int. J. Food Prop. 2016. V. 19. P. 837–846.*
3. *Tsabouri, S. Cow's milk allergenicity / S. Tsabouri, K. Douros, K.N. Priftis // Endocr. Metab. Immune. 2014. V. 14, № 1. P. 16–26.*
4. *Madureira, A.R. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins / A.R. Madureira [et al.] // J. Dairy Sci. 2010. V. 93, № 2. P. 437–455.*
5. *Тарун Е.И. Антиоксидантная активность гексагидрохинолов / Е.И. Тарун, А.В. Данькова, А.Н. Пырко // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. – 2019. – № 2. – С. 77–83.*

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА ЦИНКА НА ФИБРИЛЛООБРАЗОВАНИЕ ИНСУЛИНА

EFFECT OF ZINC CHLORIDE ON INSULIN FIBRILLATION

В. В. Саган^{1,2}, Н. В. Богданова^{1,2}

V. Sagan^{1,2}, N. Bogdanova^{1,2}

¹Белорусский государственный университет, БГУ

²Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь
kbb@iseu.by, sagan_lera@mail.ru

¹Belarusian State University, BSU

²International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Выявлено влияние температурного и механического фактора на фибриллообразование инсулина. Установлено, что в процессе инкубации инсулина в течении 30 часов концентрация фибрилл возрастает по сравнению с контролем. Показано, что инкубирование инсулина с хлоридом цинка приводило к снижению фибриллообразования инсулина.

The influence of temperature and mechanical factors on insulin fibril formation was revealed. It was found that during the incubation of insulin for 30 hours, the concentration of fibrils increases compared to the control. It was shown that the incubation of insulin with zinc chloride led to a decrease in insulin fibril formation.

Ключевые слова: инсулин, хлорид цинка, фибриллообразование, сахарный диабет.

Keywords: insulin, zinc chloride, fibril formation, diabetes mellitus.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2022-2-14-17>

Благодаря экспериментальным исследованиям процессов денатурации и ренатурации белков и условиях *in vitro*, известно, что вся информация о пространственной структуре белков заключена в их аминокислотной последовательности. Некоторые белки обладают способностью после денатурации спонтанно восстанавливать свою уникальную конформацию и функцию. Во время нарушения пространственной укладки белков, могут образоваться жесткие агрегаты – амилоиды. Образование амилоидов (амилоидогенез) представляет собой стадийный процесс, в основе которого лежит изменение пространственной формы белка. Для этого белковая молекула

частично разворачивается (денатурирует) и вне зависимости от того, какая у нее была вторичная структура (α -спирали или β -складки, или они обе), она формирует β -складчатый жесткий каркас на всем своем протяжении. Этот процесс не зависит от того, в каком порядке расположены аминокислоты, как при обычной укладке белка, то есть белок с любой последовательностью может подвергаться этому процессу. Далее новые формируемые β -складчатые молекулы агрегируют между собой и образуют фибриллу. Фибрилла представляет собой длинный тяж из агрегатов белков с новой формой. Такая новая пространственная форма белков устойчива к протеазам (ферментам, расщепляющим белки) и растворителям, и потому они могут накапливаться в клетках и тканях организма. Амилоиды считают главной причиной развития таких патологий, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, диабет второго типа.

Диабет относится к группе самых распространенных заболеваний человека, одним из основных признаков которого является гипергликемия, – следствие недостаточной секреции инсулина или нарушения его функции.

Инсулин – практически единственный гормон, снижающий уровень глюкозы и секретируемый β -клетками поджелудочной железы

Эффективность инсулина в лечении сахарного диабета, обусловленная способностью этого гормона снижать уровень глюкозы в крови, была доказана в течение десятилетий его применения в медицинской практике. Тем не менее, в настоящее время актуально проводить поиск новых подходов к терапии сахарного диабета в связи с увеличением количества случаев заболевания и необходимостью учета индивидуальных особенностей и предпочтений пациентов [1].

Инсулин имеет большую склонность к агрегации и формированию фибрилл. Фибриллообразование инсулина является нежелательным явлением при использовании инсулина в терапевтических целях. Инсулин для инъекций склонен при различных внешних воздействиях формировать фибриллы. Частое явление при получении, хранении, транспортировке инсулина – его спонтанная полимеризация. Кроме того, существует еще проблема инъекционного амилоидоза инсулина, наблюдаемая при частых инъекциях препаратов.

В настоящее время известны условия, приводящие к образованию активных инсулиновых фибрилл. Фибрилляция инсулина возникает при различных изменениях окружающей среды (рН, ионные условия, температура, органические растворители и перемешивание); она также зависит от способов получения инсулина, его доставки и хранения. Следует отметить, что фибрилляция инсулина у человека протекает медленнее, чем у наиболее изученных бычьих инсулинов.

При лечении диабета инсулин проникает в мышцы путем инъекций, где он агрегирует с образованием амилоидных фибрилл в месте инъекций лекарств диабетическим пациентам и вызывает патологическое состояние, называемое инсулиновым инъекционным амилоидозом. Агрегация происходит из-за того, что большой размер гексамера инсулина замедляет его адсорбцию, поскольку гексамер должен пройти через димеры в мономерном состоянии и только таким образом проникнуть в кровоток. Это приводит к замедлению взаимодействия с рецепторами инсулина и необходимости приема инсулина за 1-1,5 ч до приема пищи. При этой патологии амилоидные фибриллы инсулина образуют твердую подкожную массу в месте инъекции, где так же может возникнуть иммунный ответ.

Несмотря на интенсивные исследования фибриллогенеза инсулина, не существует общепринятой схемы формирования зрелых фибрилл. Основные трудности возникают при интерпретации начала фибрилляционного процесса. Полимеризация инсулина начинается с перехода мономерного белка из нативного состояния в частично развернутую конформацию, которая может быть амилоидогенной. Сильная зависимость реакции полимеризации от различных внешних параметров приводит к образованию инсулиновых фибрилл с различной морфологией, что затрудняет анализ общей схемы формирования фибрилл.

Существует модель образования фибрилл инсулина, согласно которой росту амилоидов предшествует диссоциация димеров/гексамеров инсулина до мономеров, образующих в дальнейшем промежуточную структуру, соответствующую ядру нуклеации фибриллы. Также было показано, что первой стадией фибриллогенеза инсулина является переход от нативной к частично развернутой, промежуточной конформации мономера. В последнее время на основе представлений о наличии общего структурного элемента в амилоидных фибриллах были предложены модели фибрилл инсулина, в которых повторяющейся структурной единицей являются β -арки либо кольцевые олигомеры. Представляет интерес обнаружение в аминокислотной последовательности мономера инсулина амилоидогенных фрагментов, ответственных за формирование остова фибриллы. Для амилоидов характерна высокая устойчивость к химическим физическим воздействиям, таким как изменение температуры и давления, а также к обработке протеазами.

Цинк является важным микрэлементом, участвующим в правильной упаковке и хранении инсулина. Общее содержание цинка в β -клетках поджелудочной железы является одним из самых высоких в организме, и было обнаружено, что изменения уровня Zn^{2+} связаны с диабетом. Наиболее распространенной формой комплекса Zn -инсулин является гексамер, содержащий два иона цинка. Инсулин не может образовывать комплексы с ионами цинка в кровотоке из-за низкой концентрации свободного Zn^{2+} в этой среде. Гексамер является формой хранения инсулина, тогда как мономер является активной формой гормона (рисунок 1).

Связываясь с центральной частью полипептидной цепи, Zn^{2+} влияет на пространственное строение всей белковой молекулы, в итоге концевая часть полипептида становится более структурированной и упорядоченной. Именно такая упорядоченность в конструкции концевой части предохраняет белковые молекулы от взаимного слипания [2].

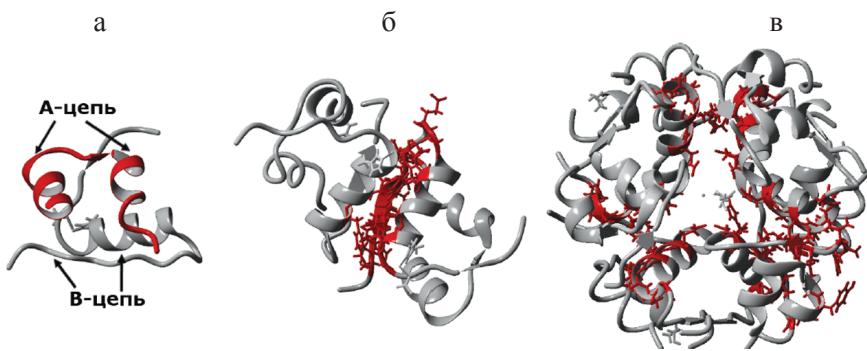


Рисунок 1 – Рентгеновская структура инсулина (а – мономер, б – димер, в – гексамер)

Цель исследования. Оценка влияния ионов Zn^{2+} на фибриллообразование молекулы инсулина.

Материалы и методы исследования. Инсулин готовили в физиологическом растворе в концентрации 2 мг на 1 мл. Хлорид цинка вносили в исследуемые пробы в концентрации 30 мкмоль. В полимерную микропробирку вносили 1 мл инсулина и 30 мкл хлорида цинка и подвергали инкубации при 37 °C и механическому воздействию. Измерение интенсивности флуоресценции проводили на флуориметре RF-5301 PC («Shimadzu», Япония) при 481 нм. Длина волны возбуждения – 440 нм. Для измерения флуоресценции в кювету вносили 2 мл физиологического раствора, 10 мкл пробы и 10 мкл тиофлавина (ThT).

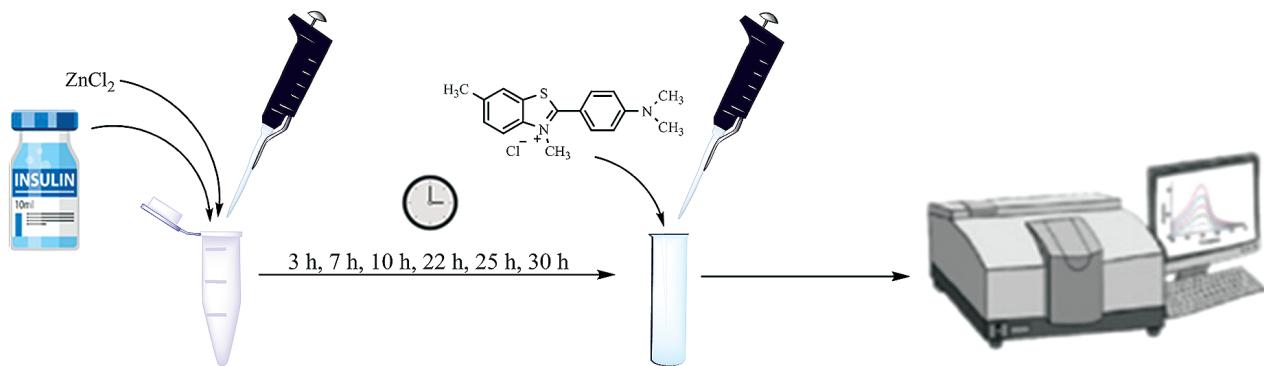


Рисунок 2 – Схема эксперимента по проверке хлорида цинка на влияние фибриллообразования инсулина

Результаты исследования. Тиофлавин Т – флуоресцентное вещество, соль из группы бензотиазолов. Краситель способен специфическим способом связываться с амилоидными фибриллами в растворах, вследствие чего значительно возрастает квантовый выход его флуоресценции. Фибриллы, образующиеся при механическом воздействии и температуре были изучены при помощи амилоидного красителя ThT.

Результаты исследования по влиянию температурного и механического факторов на фибриллообразования молекулы инсулина представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние температурного и механического факторов на фибриллообразования молекулы инсулина

№	Время	Длина волны (нм)	Показатели интенсивности флуоресценции молекулы инсулина, связанного с тиофлавином (отн. ед)
1	Контроль	481	1.4±0,03
2	3 часа		1.7±0,05
3	7 часов		2.61±0,17
4	10 часов		3.81±0,4
5	22 часа		100.25±0,13
6	25 часа		87.24±0,02
7	30 часов		56.8±0,3

Результаты исследования по влиянию хлорида цинка на фибриллообразования молекулы инсулина представлены в таблице 2.

Интенсивность собственной флуоресценции инсулина медленно уравновешиваются, после добавления в раствор Zn^{2+} . Агрегация пептида была очевидной из-за увеличения мутности раствора, следовательно, процесс связывания Zn^{2+} может быть более сложным при высоких концентрациях инсулина.

Таблица 2 – Влияние хлорида цинка на фибриллообразование молекулы инсулина

№	Время	Длина волны (нм)	Показатели интенсивности флуоресценции молекулы инсулина, связанного с тиофлавином при добавлении хлорида цинка (отн. ед)
1	Контроль	481	1.4±0,03
2	3 часа		1.97±0,06
3	7 часов		2.74±0,07
4	10 часов		1.82±0,008
5	22 часа		6.56±0,18
6	25 часа		1.81±0,19
7	30 часов		2.14±0,3

120

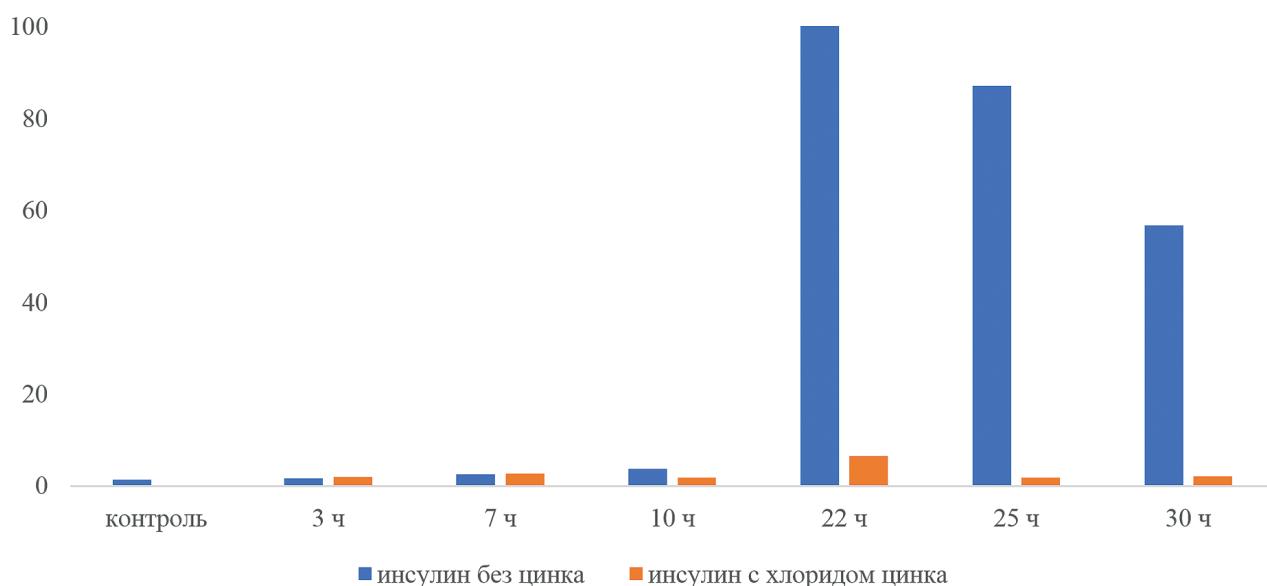


Рисунок 4 – График зависимости образования фибрилл инсулина и процессе инкубации при 37 °С и механическом воздействии

Образование амилоида подавлялось ионами Zn^{2+} . Таким образом добавление ионов цинка ингибировало фибриллообразование молекулы инсулина.

Выводы. Хлорид цинка обеспечивает стабилизацию гексамерной формы молекулы инсулина что в свою очередь предупреждает деградацию во время хранения (гексамер инсулина более стабилен в отношении химической или физической деградации, чем мономер инсулина). Гексамерные формы инсулина ввиду их стабильности широко используются в фармацевтических препаратах.

Концентрация фибрилл по сравнению с контролем увеличилась, это свидетельствует о том, что механическое воздействие и температура увеличивает фибриллообразование молекулы инсулина. Концентрация фибрилл при инкубации инсулина с хлоридом цинка по отношению к концентрации фибрилл без хлорида цинка уменьшалась.

ЛИТЕРАТУРА

1. Селиванова, О. М. Анализ аналогов инсулина и стратегия их дальнейшей разработки / О. М. Селиванова, С. Ю. Гришин, А. В. Глякина, А. С. Садгян, Н. И. Ушакова, О. В. Галзитская // Успехи биологической химии. – 2018. – Т. 58. – С. 313 – 346.
2. Gavrilova, J. Affinity of zinc and copper ions for insulin monomers / Julia Gavrilova, Vello Tougu and Peep Palumaa // Metallomics. – 2014. – Vol. – P. 1296 – 1300.