

УДК 577.175.722

Шевряков М.

ІНСУЛІН: ШЛЯХ ДО ІСТИНИ

Херсонський державний університет
м. Херсон; e-mail: shevriakov@ksu.ks.ua

Ключові слова: інсулін, острівці Лангерганса, вивчення інсуліну

Інсулін... Мабуть немає жодної людини у цивілізованому світі, яка б не чула це слово: одні знають про інсулін майже все, інші знають про нього багато, треті чули це слово у сполученні про хворобу на цукровий діабет.

Так що ж таке інсулін? Для чого він потрібен? Інсулін – гормон підшлункової залози, що має білкову природу; недостатнє утворення його в організмі людини і тварин або недостатнє проникнення глюкози з крові у клітини є причиною цукрового діабету.

При цукровому діабеті відбувається порушення усіх видів обміну речовин, в першу чергу вуглеводів, внаслідок абсолютної чи частіше відносної недостатності в організмі інсуліну. У виникненні функціональної неповноцінності острівцевого апарату підшлункової залози, що продукує інсулін, є спадковий фактор. Ця неповноцінність може також виникнути через травми, запальні процеси, склероз судин підшлункової залози, інфекції, інтоксикації, внаслідок психічної травми, надмірного вживання вуглеводів; має значення і функціональний стан інших залоз внутрішньої секреції – гіпофізу, наднирників, щитоподібної залози та інших, а також центральної та вегетативної нервової систем. Внаслідок недостатності інсуліну печінка і м'язи втрачають здатність перетворювати цукор, що поступає в організм, в глікоген, а всі тканини втрачають здатність окиснювати глюкозу та використовувати її як джерело енергії.

Інсулін займає особливе місце в історії біології, медицини, хімії. Це перший гормон, для якого була встановлена білкова природа. Це перший білок, первинна структура якого була розшифрована. І, нарешті, це перший білок, який вдалося отримати синтетичним (хімічним) шляхом поза живого організму. Інсулін – єдина у світі речовина, за дослідження якої було присуджено дві Нобелівські премії.

Так який же зв'язок інсуліну з цукровим діабетом? Діабет (без визначення «цукровий») був відомий ще лікарям Давньої Греції. Вони спостерігали у хворих слабкість, втомлюваність, спрагу, надмірне виділення сечі. Через таке надмірне виділення сечі і була дана назва хворобі діабет, що грецькою мовою означає як «протікаючий».

У середині XVII століття один із засновників Лондонського королівського товариства, відомий лікар Томас Вілліс, виявив, що у більшості хворих на діабет сеча на смак солодка.

Ще через сто років інший англійський лікар Добсон встановив, що в сечі діабетиків є цукор, як було з'ясовано пізніше – глюкоза. Але не у всіх людей з надмірним виділенням сечі виявлявся цукор. І тоді стали розрізняти цукровий діабет (*Diabetes mellitus*) від нецукрового (*Diabetes insipidus*). Другий вид діабету з інсуліном ніякого зв'язку не має.

Нецукровий діабет пов'язаний з пониженим вмістом у крові гормону нейрогіпофізу вазопресину; характеризується постійною посиленою спрагою і надзвичайно підвищеним сечовиділенням. Хворі на нецукровий діабет виділяють за добу від 5 до 50дм³ прозорої сечі дуже низької густини без запаху, що не містить патологічних компонентів, в тому числі глюкози. Невдовзі було встановлено, що при цукровому діабеті глюкоза виділяється з сечею через те, що різко збільшується її вміст у крові.

Щоб зрозуміти, як це відбувається, розглянемо роботу нирок. Нирки працюють у два етапи. На першому етапі у ниркових клубочках фільтрується кров, і у фільтрат, що називається первинною сечею, переходить майже вся вода крові і більшість розчинених в ній речовин, в тому числі і глюкоза. На другому етапі первинна сеча рухається нирковими каналцями, і там відбувається зворотній процес: багато компонентів первинної сечі інтенсивно всмоктується знову в кров. А те, що залишилось в каналцях, збирається у ниркові цебри і звідти поступає у сечовий міхур – це і є остаточна сеча.

Коли концентрація глюкози в крові в межах 3,9-6,2 ммоль/дм³, то практично вся глюкоза всмоктується в каналцях, і тому у здорових людей глюкози в сечі немає. Повне зворотне всмоктування глюкози відбувається і тоді, коли рівень її у крові дещо перевищує норму. Але починаючи з деякої порогової концентрації (зазвичай, 10-12ммоль/дм³) каналці вже не можуть справитися з надлишком глюкози і вона з'являється в сечі. При цукровому діабеті концентрація глюкози в крові може досягати 8-60ммоль/дм³. При тяжких формах діабету за добу може виділитись декілька грамів глюкози.

Лікарі вже давно здогадувались, що діабет якимось зв'язаний з підшлунковою залозою – головною фабрикою травних соків. Підшлункова залоза є залозою зовнішньої секреції. У цій залозі синтезуються ферменти, що беруть участь у розщепленні білків, жирів, вуглеводів: протеїнази, ліпази, амілази. Вивідною протокою ці ферменти поступають у кишечник, де й відбувається розщеплення компонентів їжі.

У кінці XVIII та на початку XIX століття з'являються роботи, які свідчать про те, що цукровий діабет якимось пов'язаний з порушенням роботи підшлункової залози. Але прямий експериментальний доказ був отриманий лише в 1889 році.

У цей час німецькі фізіологи І. Мерінг та О. Мінковські досліджували роль підшлункової залози, як залози зовнішньої секреції, у травленні, і зовсім не займались цукровим діабетом. На зв'язок підшлункової залози з

цукровим діабетом вони вийшли цілком випадково. Вони видаляли у тварин (собак) підшлункові залози і спостерігали до чого це призведе. Після таких операцій тварини швидко гинули.

Одного разу влітку 1889 року вони провели чергову операцію з видалення підшлункової залози у дослідної собаки. Залишили прооперовану тварину на служителя віварію. Прийшовши у лабораторію наступного дня, запитали у служителя віварію про стан дослідної собаки. Той сказав, що стан собаки цілком відповідний післяопераційному періоду, але вона була буквально обліплена мухами. Мухи... мухи! Мухи летять на цукор... Дуже швидко фізіологи встановили, що мух приваблював дійсно цукор, який у великій кількості містився у сечі прооперованої собаки.

Наступні експерименти довели, що при видаленні підшлункової залози розвиваються й інші ознаки цукрового діабету. Про саму ж підшлункову залозу на той час було відомо лише, що вона виділяє у кишечник травний сік, що містить ферменти, які розкладають харчові речовини. Однак ніякого відношення до цукрового діабету це не мало.

Досліди про якусь причетність підшлункової залози до цукрового діабету були настільки переконливі, що, здавалось, засіб від діабету невдовзі буде знайдено. Цей засіб – ось він, у підшлунковій залозі.

Медики з ентузіазмом почали готувати різні витяжки та екстракти з підшлункової залози. Вони пробували застосовувати з лікувальною метою саму залозу у сухому, сирому, вареному вигляді, але безуспішно. Тепер ми знаємо причину цих невдач: інсулін – білок, і при застосуванні екстрактів із підшлункової залози *per os* (через рот) інсулін розщеплювався протеазами підшлункової залози як звичайний харчовий білок.

На початку ХХ століття російський патолог Л. Соболев перев'язував тваринам вивідну протоку підшлункової залози – діабет при цьому не розвивався. Не з'являвся він і при повній атрофії залозистих клітин. Якщо це так, то залишалось лише припустити, що підшлункова залоза має не тільки зовнішньо-секреторну, але і внутрішньо-секреторну функцію – виділяє безпосередньо в кров якусь речовину, причетну до запобігання цукрового діабету.

Звертав увагу на підшлункову залозу і німецький патологоанатом П.Лангерганс. Досліджуючи підшлункові залози померлих людей, П.Лангерганс виявив у підшлунковій залозі особливі групи клітин з незрозумілою функцією. Ці клітини були названі острівцями Лангерганса. Клітини острівців Лангерганса суттєво відрізняються від клітин самої підшлункової залози як за будовою, так і за функцією. Мабуть треба вважати, що острівці Лангерганса є залозою внутрішньої секреції, яка тільки морфологічно розташована в масі клітин підшлункової залози. Отже, це дві різні залози. Тому, можливо, слід говорити, що до цукрового діабету пряме

відношення має острівцева залоза, а вже потім – підшлункова. Тобто острівцева залоза, а не підшлункова продукує інсулін.

У 1902 році Л. Соболев довів, що дійсно лангергансові острівці виконують іншу функцію, ніж вся залоза у цілому, і виділяють якесь активне начало, недостатність якого призводить до цукрового діабету. Л. Соболев зрозумів причину невдач своїх попередників, які намагались лікувати цукровий діабет тканиною підшлункової залози. На його думку, під впливом травних соків активне начало острівців Лангерганса руйнувалось.

Для збереження активності необхідно було досягти припинення діяльності клітин основної частини підшлункової залози. Це можна було зробити, перев'язавши її вивідну протоку. Соболев писав: «Через труднощі отримання у великій кількості таких залоз, в яких збереглись лише острівці, можливо замінити їх залозами новонароджених тварин, наприклад телят, у яких острівці розвинуті порівняно з травним апаратом досить добре, і підшлункова залоза у новонароджених майже нездатна до травної роботи, і тому можна сподіватися, що травні соки не будуть заважати дії острівців». Та ці ідеї Соболева його сучасники не почули. Але було очевидно, що рано чи пізно до інсуліну доберуться.

Прагнення якомога швидше отримати гормон підшлункової залози в очищеному вигляді диктувалось не тільки науковим інтересом. Діабет у ту пору був невиліковною хворобою, діагноз цукровий діабет означав, як правило, смертний вирок хворому. Ефективних ліків не було. Цю похмуру картину доінсулінової ери намалював автор відомих книжок з мікробіології і медицини Поль де Крайф: «У Європі та Америці мільйони людей хворіють на діабет і тисячі з них вмирають. Діти, несподівано уражені діабетом, перетворюються у змарнілих карликів і гинуть. Молоді чоловіки і жінки, яких мучить спрага і її вони не можуть втамувати, та голод, який вони не можуть наситити, гинуть у розквіті літ.»

Ідея про те, що саме з острівців Лангерганса можна отримати активну субстанцію для лікування діабету, вже назріла. Пошуки тривали. У багатьох країнах були отримані різні витяжки з підшлункової залози, експерименти з якими вже давали надії на отримання бажаного результату. У 1909 році діюче, але ще не виділене активне начало цих витяжок, назвали інсуліном (від латинського слова *insula* – острівець).

Вже в ті роки найбільш далекоглядні вчені здогадувались, що гіпотетичний інсулін – це гормон, який якимось зв'язаний з перетворенням цукру в організмі.

Інсулін чекав людину, яка його відкриє. Цією людиною виявився Фредерік Бантінг, 29-річний канадець, асистент університету Західного Онтаріо. У 1920 році він узнав з одної роботи, що при закупорці вивідної протоки підшлункової залози перероджуються клітини, які продукують

травні ферменти, а острівці Лангерганса зберігаються. Приблизно таке ж виявив ще у 1902 році Л. Соболев.

Ф. Бантінг вирішив виділяти гормон не з нормальної, а з переродженої підшлункової залози, адже там інсуліну не загрожувало ферментативне руйнування. З цією ідеєю Ф. Бантінг звернувся до професора Джона Мак-Леода, який керував тоді кафедрою фізіології Торонтського університету. Мак-Леод не тільки морально підтримав Бантінга, але ще й дав йому помічника в роботі – студента п'ятого курсу Чарлі Беста, який добре володів методиками визначення цукру в крові.

Сам Мак-Леод мав сумнів щодо гормональної функції підшлункової залози, але роботі Бантінга не заважав. Не варто осуджувати його за ці сумніви – за десятки років безперервних пошуків багатьох дослідників у всьому світі результатів, що подавали б надію, не було. Але Бантінг, раніше провінціальний лікар з далекого ескімоського поселення, сумнівів не мав. Він зразу приступив до справи.

Ще будучи студентом, Бантінг намагався застосовувати для лікування цукрового діабету екстракт підшлункової залози, але невдало. Однак зупинитися він не міг: від діабету помер його батько, від цієї ж хвороби гинув його друг. Разом із студентом Чарльзом Бестом він розробив методику отримання активної спиртової витяжки спочатку з дегенерованих залоз, а потім із залоз ненароджених телят, які він діставав на місцевих м'ясокомбінатах.

Незважаючи на багато труднощів, які довелося перебороти молодим дослідникам, вже у серпні 1921 року вони отримали перший препарат гормону і зразу ж впевнились у його потужній лікувальній дії: він допомагав піддослідній собаці при дуже важкій формі експериментального діабету. Невдовзі гормон навчилися отримувати з підшлункової залози ембріонів телят, а потім і звичайних корів.

Активну речовину лангергансових острівців можна було побачити, при бажанні пощупати, а головне, нею можна було лікувати. Ін'єкції (саме ін'єкції) цієї витяжки врятували безнадійно хворого діабетика – друга Бантінга.

У грудні 1921 року на засіданні Американського товариства фізіологів Дж. Мак-Леод від імені маленького колективу дослідників зробив перше повідомлення про отримання нової речовини підшлункової залози – інсуліну. Повідомлення викликало сенсацію. Проте для перемоги над діабетом необхідно було мати загальнодоступний препарат. Канадці взялись за розробку промислового виробництва інсуліну з тваринної сировини, і в рекордно короткий термін нові ліки з'явилися на світовому ринку.

Канадський інсулін коштував астрономічні суми.

У 1923 році Дж. Мак-Леод і Ф. Бантінг були удостоєні за роботу з інсуліном Нобелівської премії. Свою частку премії Ф. Бантінг чесно розділив з Ч. Бестом. А через 18 років у 1941 році першовідкривач інсуліну, відомий усьому вченому світу 50-річний Фредерік Бантінг, загинув у авіаційній катастрофі.

Як могло так статися, що Ф. Бантінг і Ч. Бест – нікому невідомі молоді вчені (власне, і вченими їх можна було назвати з натяжкою: один був фактично самоучкою, а інший – студентом) – протягом декількох місяців звершили те, чого не могли зробити за багато років маститі фізіологи всього світу? У той час Бантінгу було 30 років, а Бесту 22 роки. Пізніше вони, так чи інакше, відповіли на це питання.

Фредерік Бантінг: «Не починайте наукове дослідження, доки не зможете бути у ньому корисними. Задавайте собі питання «чому» з приводу кожного твердження, яке кимось зроблене, і дійдіть до власної відповіді. Коли ваші роздуми приведуть вас до достойної ідеї – розпочинайте! Сила переконання заставить вас пожертвувати всім і шукати полегшення вашого розуму в дослідницькій роботі...».

Чарльз Бест: « Нам треба було поєднувати хірургію з хімією. Я думаю, що наші попередники, а серед них було декілька дослідників, що стояли на порозі відкриття інсуліну, мали на своєму шляху дві труднощі. Це, поперше, відсутність майже до 1921 року мікрометодів з визначення цукру, ацетонових тіл та інших компонентів крові. Я думаю ще, що багато дослідників були збентежені невдачами попередників. Треба бути молодим, щоб не мати розчарувань, не боятися труднощів і не тільки сподіватися на успіх, а бути впевненим у ньому».

Хімічна будова інсуліну ще не була відома, і канадські вчені побоювались, що у продажу можуть з'явитися підробки, які видаватимуть за інсулін. Тому рада Торонтського університету, де працював Ф. Бантінг, встановила контроль за виробництвом та застосуванням інсуліну в Канаді та США. Мабуть, канадці взагалі не дуже поспішали розкрити до кінця секрет отримання інсуліну. Хоч було багато статей про інсулін, жоден з авторів, в тому числі і першовідкривачі, в жодному з повідомлень не оголошували точного способу його отримання.

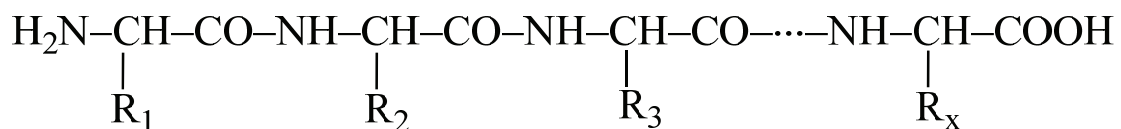
Та все ж, через два роки після відкриття інсуліну в лабораторії Харківського органотерапевтичного інституту основоположник вітчизняної ендокринології В. М. Коган-Ясний приготував спиртову витяжку інсуліну. Через відсутність надійних даних йому довелося, як писав він сам, «йти наосліп, кожен свій крок перевіряючи експериментом і, можливо, повторювати те, що вже давно відомо в Канаді, Англії та Франції».

Тим часом вивчення інсуліну тривало у двох напрямках. З практичною метою прагнули отримати найбільш ефективні лікарські препарати, з теоретичних позицій – вияснили будову гормону та механізм

його біологічної дії. Білкова природа інсуліну не викликала сумнівів, проте хімія білка на той час була в зародковому стані. Було тільки відомо, що білки побудовані із залишків амінокислот.

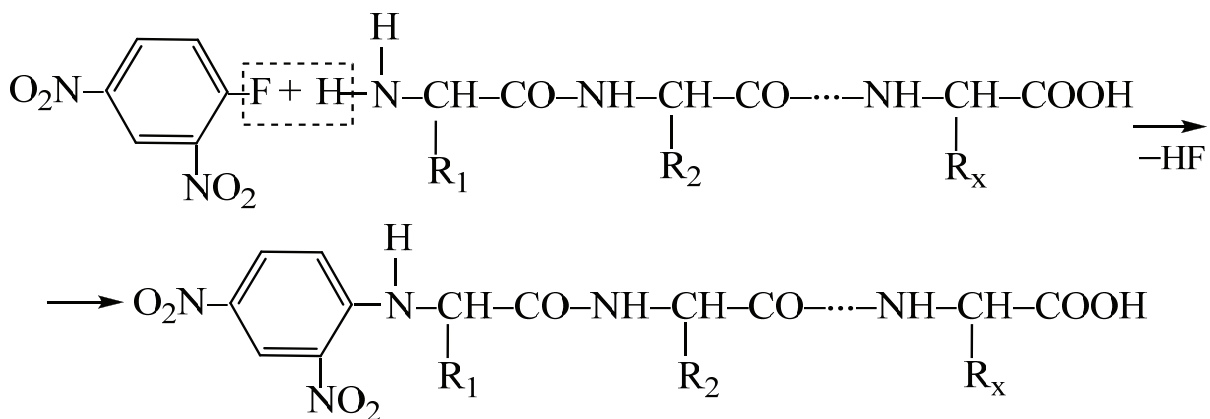
Було встановлено, що відносна молекулярна маса мономера інсуліну становить 5733 Дальтон. При визначенні в різних умовах відносна молекулярна маса інсуліну може становити 12000 Дальтон чи 36000 Дальтон, оскільки в молекулу інсуліну може об'єднуватися різна кількість мономерів. На основі визначення відносної молекулярної маси мономера інсуліну можна зробити висновок, що до його складу входить приблизно п'ятдесят амінокислот. Такий висновок можна було зробити після того, як у хімії білка стали застосовувати хроматографію. Білки спочатку гідролізували кислотним чи ферментативним методом, а потім утворені вільні амінокислоти розділяли хроматографічно, виявляли скільки залишків і яких амінокислот входило до складу білка. Проте у якій послідовності ці амінокислоти розташовані у поліпептидному ланцюзі білка, тобто первинну структуру, встановити було неможливо.

У середині сорокових років ХХ століття структурою інсуліну зацікавився молодий (йому не було ще й тридцяти років) англійський хімік Фредерік Сенджер. Сенджер придумав простий метод узнавання N-кінцевої амінокислоти в поліпептидах. Білки, які і є поліпептидами, побудовані із залишків α,L-амінокислот, що з'єднуються за рахунок пептидного зв'язку (–CO–NH–):

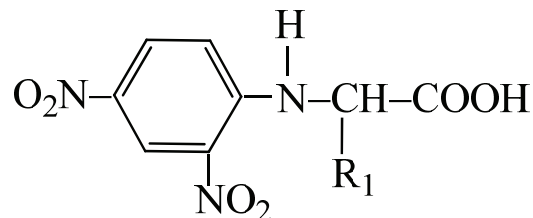


Тобто за рахунок карбоксильних груп (–COOH) одної амінокислоти та аміногрупи (–NH₂) іншої амінокислоти й утворюється пептидний зв'язок. На одному кінці поліпептидного ланцюга є амінокислота з вільною аміногрупою (N-кінцева амінокислота), а на протилежному кінці цього ланцюга амінокислота з вільною карбоксильною групою (C-кінцева амінокислота).

Метод Сенджера полягає в тому, що поліпептид обробляють динітрофлуорбенzenом, який вибірково реагує з N-кінцевою амінокислотою:

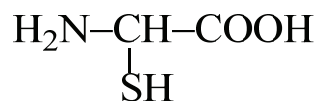


Потім продукт цієї реакції гідролізують. Утворюється суміш вільних амінокислот, серед яких одна, яка була N-кінцевою, стала динітрофенільованою:



Це динітрофенілпохідне N-кінцевої амінокислоти відрізняється від інших вільних амінокислот жовтим забарвленням. Розділивши суміш речовин після гідролізу хроматографічним методом, можна легко встановити, яка амінокислота у цьому поліпептиді була N-кінцевою.

Ф.Сенджер розщеплював молекулу інсуліну на пептиди різної довжини, визначав їх склад та природу N-кінцевої амінокислоти, комбінував отримані фрагменти, змінював їхні розміри, зіставляв та порівнював. Разом з тим він застосовував і інші методи, наприклад, виявляв дисульфідні зв'язки (-S-S-), які виникають при взаємодії амінокислот, що містять SH-групи, зокрема цистеїн:



Складанням мозаїки Сенджер займався протягом восьми років. Нарешті у 1953 році він визначив точний порядок розташування амінокислот у молекулі інсуліну.

Пізніше таким же способом вдалося встановити первинну структуру ще декількох білків. За цю роботу у 1958 році Фредерік Сенджер отримав Нобелівську премію з хімії.

Після цього Сенджер почав розробляти методи, якими можна в'яснити будову індивідуальних нуклеїнових кислот. Це були пошуки шляхів, що вели до розшифровки структури генів. За ці роботи у 1980 році

Ф. Сенджеру (разом з У. Гілбертом) була присуджена друга Нобелівська премія з хімії – в історії хімії це безпрецедентний випадок.

Так як же побудована молекула інсуліну? Молекула інсуліну складається з двох поліпептидних ланцюгів: ланцюг *A*, що має 21 амінокислотний залишок, та ланцюг *B*, що має 30 амінокислотних залишків. Ці ланцюги сполучені двома дисульфідними містками: між цистеїном з порядковим номером 7 ланцюга *A* та цистеїном під номером 7 ланцюга *B*; між цистеїном під номером 20 ланцюга *A* та цистеїном під номером 19 ланцюга *B* – другий дисульфідний місток. Крім того, в молекулі інсуліну у ланцюзі *A* є ще внутрішній дисульфідний місток між цистеїнами під номерами 6 та 11 (рис.1.) Цікаво відмітити, що до складу інсуліну зовсім не входить аспарагінова амінокислота, яка широко розповсюджена в білках і пептидах, але входить три залишки аспарагіну – аміду аспарагінової кислоти.

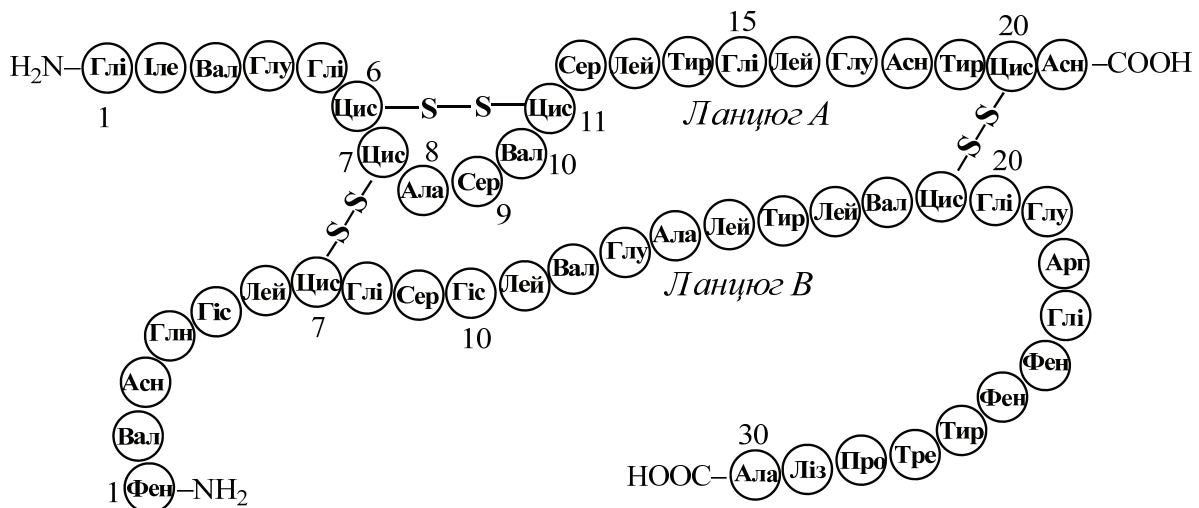


Рис. 1. Первинна структура інсуліну бика

Будова молекули інсуліну у різних тварин дещо відрізняється. Видова відмінність будови інсуліну полягає у різному розташуванні амінокислотних залишків з порядковими номерами 8, 9 та 10 в ланцюзі *A* між двома залишками цистеїну у внутрішньому дисульфідному містку (рис. 2.)

Хоча ця різниця існує, вона незначна. Це означає, що інсулін одних тварин можна вводити іншим тваринам чи людині, тобто цукровий діабет у людей можна лікувати інсуліном тварин. У медичній практиці зараз широко застосовується інсулін великої рогатої худоби, але найбільше наближається за будовою до інсуліну людини інсулін свині та кита кашалота.

В острівцях Лангерганса є клітини двох типів: α -клітини та β -клітини. Інсулін синтезується тільки в β -клітинах, а в α -клітинах виробляється інший гормон – глюкагон, дія якого спрямована на підвищення рівня цукру в крові.

| | |
|--|-------|
| $ \begin{array}{cccccc} 6 & S_7 & 8 & 9 & 10 & 11 \\ & & & & & \\ -\text{Цис}-\text{Цис}-\text{Ала}-\text{Сер}-\text{Три}-\text{Цис}- \\ & & & & & \\ S & \text{-----} & & & & S \end{array} $ | КИТ |
| $ \begin{array}{cccccc} 6 & S_7 & 8 & 9 & 10 & 11 \\ & & & & & \\ -\text{Цис}-\text{Цис}-\text{Три}-\text{Глі}-\text{Іле}-\text{Цис}- \\ & & & & & \\ S & \text{-----} & & & & S \end{array} $ | КІНЬ |
| $ \begin{array}{cccccc} 6 & S_7 & 8 & 9 & 10 & 11 \\ & & & & & \\ -\text{Цис}-\text{Цис}-\text{Ала}-\text{Глі}-\text{Вал}-\text{Цис}- \\ & & & & & \\ S & \text{-----} & & & & S \end{array} $ | ВІВЦЯ |
| $ \begin{array}{cccccc} 6 & S_7 & 8 & 9 & 10 & 11 \\ & & & & & \\ -\text{Цис}-\text{Цис}-\text{Три}-\text{Сер}-\text{Іле}-\text{Цис}- \\ & & & & & \\ S & \text{-----} & & & & S \end{array} $ | СВИНЯ |
| $ \begin{array}{cccccc} 6 & S_7 & 8 & 9 & 10 & 11 \\ & & & & & \\ -\text{Цис}-\text{Цис}-\text{Ала}-\text{Сер}-\text{Вал}-\text{Цис}- \\ & & & & & \\ S & \text{-----} & & & & S \end{array} $ | БИК |

Рис. 2. Видові особливості будови інсуліну

Власне, в β -клітинах острівців Лангерганса синтезується не інсулін, а його попередник – проінсулін. Проінсулін – довгий пептид, що складається з 78-86 амінокислотних залишків у залежності від виду тварин.

Відносна молекулярна маса проінсуліну близько 10000 Дальтон. Під дією особливих ферментів протеаз у секреторних гранулах острівцевих клітин із середини молекули інсуліну відщеплюється С-пептид, який з'єднує N-кінцеву амінокислоту ланцюга А (гліцин) з С-кінцевою амінокислотою ланцюга В (аланін). Готовий гормон разом з С-пептидом виходить з клітини та поступає в кров. Інсулін та С-пептид секретуються приблизно в еквімолярних кількостях. До складу С-пептиду в проінсуліні бика входить 30 амінокислотних залишків.

Як вже зазначалося, проінсуліни різних видів відрізняються за величиною; вони містять від 78 (собака) до 86 (людина, кінь, щур) амінокислотних залишків. Ці відмінності пов'язані тільки з розмірами С-пептиду, який знаходиться в проінсуліні між С-кінцем В-ланцюга та N-кінцем А-ланцюга інсуліну. Всі відомі проінсуліни ссавців мають по два залишки основних амінокислот на кожному кінці С-пептиду; ці пари залишків є зв'язуючими між С-пептидом та інсуліновими ланцюгами в проінсуліні. Мають місце значно більші міжвидові варіації первинних

структур фізіологічно, очевидно, несуттєвих С-пептидів, ніж відповідних інсулінів.

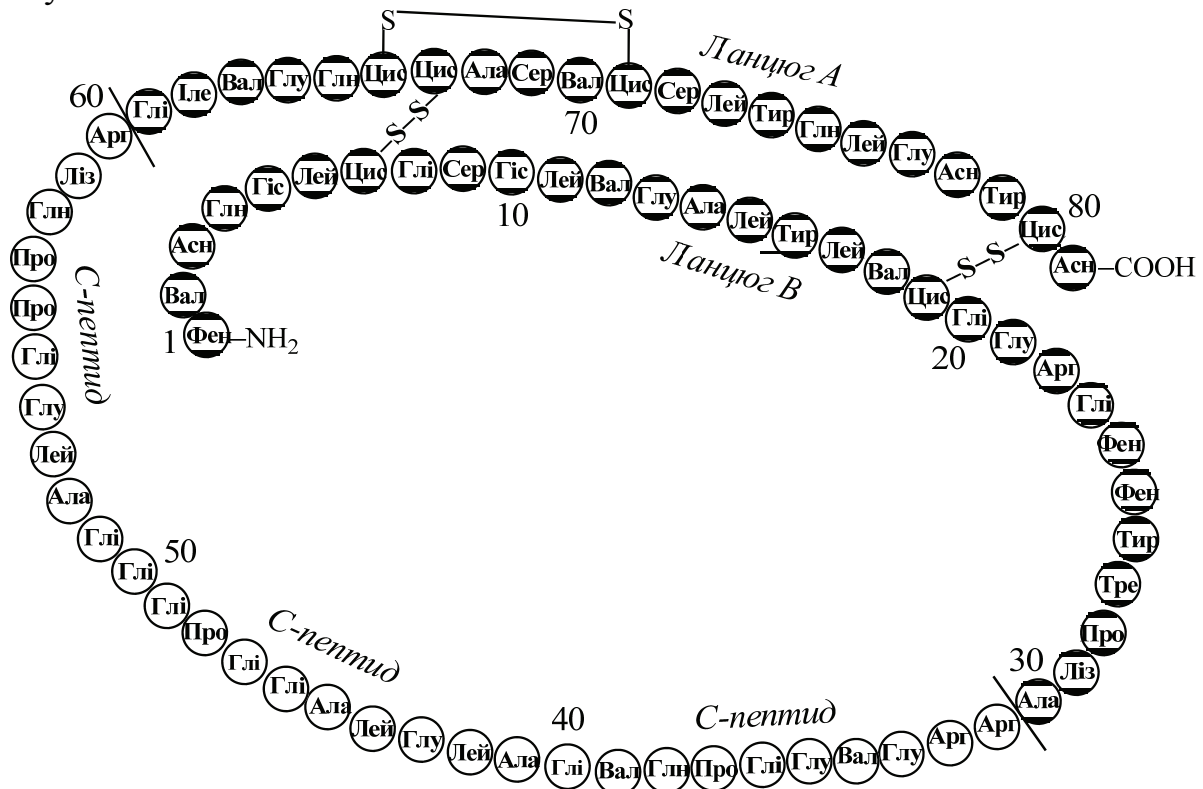


Рис. 3. Структура проінсуліну бика

Швидкість секреції інсуліну залежить від концентрації глюкози в крові. При підвищенні вмісту глюкози в крові секреція інсуліну зростає, а при зниженні концентрації глюкози в крові синтез інсуліну в острівцях Лангерганса зменшується. Будь-яке підвищення концентрації глюкози в крові призводить до подразнення інсуляторного апарату і до надлишку інсуліну, внаслідок чого це сприяє безперервному виведенню глюкози з кровоносної системи та зниженню рівня глюкози в крові.

Гормон глюкагон, що синтезується в α -клітинах острівців Лангерганса, призначений підвищувати рівень глюкози в крові за рахунок прискорення розщеплення полісахариду глікогену в печінці. Пришвидшення глюкагоном глікогенолізу у печінці є результатом збільшення активності ферменту кінази фосфорилази; воно пояснює механізм гіперглікемічної дії глюкагону.

Глюкагон підсилює секрецію глюкози шляхом активації ферменту аденілатциклази, що каталізує утворення циклічної АМФ (ц-АМФ) з АТФ, мембран β -клітин підшлункової залози. Секреція інсуліну значно збільшується також внаслідок вживання в їжу білків, а також при введенні в організм деяких амінокислот, а саме, аргініну та лейцину. Введення аргініну може бути тестом здатності підшлункової залози секретувати інсулін.

Отже, інсулін та глюкагон проявляють протилежну дію по відношенню до рівня глюкози в крові. Такий своєрідний гормональний пушпул (тяги-штовхай) підтримує концентрацію глюкози в крові на певному рівні, сприяючи нормальній швидкості перебігу реакцій вуглеводного обміну. Але внаслідок недостатності інсуліну або його дефектності відбувається порушення цієї рівноваги. Організм викидає глюкозу в кров, а її перетворення уповільнюється, процеси окиснення її йдуть не до кінця. Продукти викривлених біохімічних перетворень отруюють організм.

При цьому утворюється ацетооцтова кислота та зв'язані з нею β -оксималяна кислота і ацетон. Їх концентрації в крові перевищують нормальні величини. Такий стан називається кетонемією. Якщо рівень цих речовин у плазмі крові перевищує їх рівень у нирках, то в сечі з'являються значні кількості кетонових речовин, виникає кетонурія. У тих випадках, коли є виражена кетонемія чи кетонурія, у повітрі, що видихається, виявляється запах ацетону. Ці три симптоми – кетонемія, кетонурія і запах ацетону при диханні об'єднуються під загальною назвою кетоз. У хворих на цукровий діабет з вираженим кетозом виведення кетонових тіл із сечею може доходити до 5000мг за добу, а концентрація їх у крові може досягати 90мг/100см³, в той час як нормальні величини цих показників становлять <125мг за добу та <3мг/100см³ крові.

Ускладнення, що спостерігаються, коли кетонових тіл утворюється більше, ніж може бути утилізовано, зв'язані переважно з характером виведення ацетооцтової та β -оксималяної кислот. Ці дві речовини є помірно сильними кислотами. Кетоз обумовлює ацидоз (закислення). При цьому у повітрі, що видихається, відчувається запах ацетону, у сечі з'являються кетонові тіла, глюкоза (глюкозурія) та спостерігається гіперглікемія.

Отже, інсулін поступає в кров. Ми вже дуже багато знаємо, що робить інсулін в організмі, але майже нічого не знаємо як він це робить.

Встановлено, що інсулін впливає на обмін багатьох речовин. При спостереженні на людях і в дослідах на тваринах, на клітинних культурах та екстрактах з тканин показано, що інсулін підсилює синтез білків, жирів та знижує швидкість їх розпаду, прискорює синтез глікогену з глюкози, але уповільнює розпад глікогену та бере участь ще в багатьох процесах. Було встановлено, що інсулін впливає принаймні на 22 реакції обміну речовин, причому ці дії незалежні між собою.

Історично вплив інсуліну на обмін вуглеводів викликає найбільшу увагу. Цей гормон отримав навіть назву гіпоглікемічний фактор, проте інсулін впливає також на швидкості ряду інших процесів, не зв'язаних з утилізацією глюкози. Так, як і інші гормони, інсулін діє на поверхні клітин, на їхню плазматичну, зовнішню мембрану. При цьому виникають якісь

хімічні сигнали, міняється концентрація речовин, які впливають на ті чи інші процеси обміну. Головними мішенями інсуліну є клітини м'язів, печінки, жирової тканини. Крім того, інсулін впливає на інші клітини, наприклад, на фібробласти і лімфоцити.

Рецептори інсуліну локалізовані на поверхні клітин-мішенів; гормон проявляє свою дію не проникаючи в клітину. Рецептор інсуліну в мембранах печінкових і жирових клітинах є, очевидно, глікопротеїном (білком, зв'язаним з вуглеводним компонентом) з відносною молекулярною масою близько 300000 Дальтон, з яким об'єднані ліпіди; вони впливають на доступність зв'язуючих ділянок для гормона.

Потрапивши на поверхню клітини-мішені і сполучившись з білком-рецептором, інсулін стимулює два незалежних процеси. Перший – глюкоза легше та швидше проникає з крові у клітину. Це пояснюється тим, що під дією інсуліну зростає проникність клітинних мембран для глюкози. Другий процес – утилізація глюкози клітинами (зокрема перетворення її в глікоген). Відбувається це тому, що підвищується активність ферменту гексокінази, що каталізує перетворення глюкози у глюкозо-6-фосфат і залучає її в реакції обміну речовин.

При недостатності інсуліну, тобто при цукровому діабеті, глюкоза повільно переходить з крові у клітини печінки, скелетних м'язів, жирової тканини і в той же час клітини все гірше її використовують. Інакше кажучи, клітини починають голодувати. Організм прагне виправити це становище, він подає в кров все більше глюкози, щоб наситити клітини, але це не допомагає. Створюється ситуація, яку можна охарактеризувати як загибель серед багатства. Таке виникає лише в клітинах-мішенях, які безпосередньо атакуються інсуліном. В інших же клітинах, наприклад, мозку та серцевого м'язу, глюкоза утилізується навіть при вираженому діабеті, більш того, у міру збільшення глюкози в крові це відбувається все швидше.

Маса жирової тканини, скелетних м'язів і печінки настільки велика, що глибокі порушення обміну речовин в цих тканинах призводять до дуже тяжких наслідків. Єдиний порятунок – ввести інсулін.

Досліджено вплив інсуліну на синтез білків та нуклеїнових кислот. Під впливом інсуліну збільшується включення амінокислот у білки печінки та більшості інших тканин. Транспорт амінокислот з позаклітинного середовища у внутрішньоклітинний простір підсилюється, одночасно збільшується швидкість синтезу мембранних білків або білків, які функціонують у процесах транспорту. Така дія інсуліну блокується інгібіторами синтезу білка.

Іншим шляхом дії інсуліну на синтез білка є, можливо, стимулювання ініціації синтезу пептидних ланцюгів; це проявляється у збільшенні здатності рибосом транслювати матричні РНК. Крім того, припускається,

що інсулін прискорює синтез РНК та ДНК, оскільки він стимулює проліферацію клітин і є необхідним для росту і диференціації.

Інсулін стимулює синтез жирів з вуглеводів у печінці та жировій тканині. Вважалося, що інсулін, керуючи системою транспорту глюкози (у непечінкових тканинах), контролює внутрішньоклітинний обмін вуглеводів і зв'язані з ним обміни інших речовин. Однак в результаті досліджень про стимулюючий вплив інсуліну на біосинтез РНК і білка, який не залежить від транспорту субстратів, стало зрозуміло, що звести всі ефекти інсуліну тільки до збільшення транспорту глюкози не можна. Виявилось, що не всі амінокислоти рухаються крізь клітинну оболонку м'язів за вказівкою інсуліну, значить їх транспорт не можна вважати первинним актом інсуліну у синтезі білків, який він стимулює. Питання полягає в тому, яким способом інсулін допомагає субстрату подолати мембранний бар'єр.

Було досліджено, що сам гормон має протеолітичну активність, може каталізувати гідроліз гемоглобіну та міоглобіну, але ця активність виражена слабо. Якщо це так, зроблено висновок, що інсулін взаємодіє з рецептором, що знаходиться у клітинній мембрані. Вважається, що інсулін зв'язується за рахунок свого дисульфідного містка з сульфгідрильною (–SH) групою білка чи ліпопротеїну клітинної мембрани, викликає зміну її конформації і пришвидшує транспорт речовин, зокрема глюкози та амінокислот.

Надмірна продукція і секреція інсуліну пухлиною острівцевих клітин призводить до гіперінсулінізму. У такому стані виникає понижений вміст глюкози в крові, який обумовлений не тільки підвищеним використанням глюкози тканинами, що чутливі до інсуліну, та зменшенням утворення глюкози в печінці, але також і зниженням притоку до печінки субстратів, необхідних для гліюконеогенезу, наприклад, зниження притоку амінокислот. Швидке зниження рівня глюкози в крові активує автономну нервову систему і виділення адреналіну. У людини спостерігається пітливість, посмикування, тремтіння, неспокій, слабкість, відчуття втоми та голоду. Якщо гіпоглікемія є тривалою, то зменшується поступлення глюкози в мозок; це призводить до різних неврологічних порушень як у руховій, так і в чутливій сферах. При частих і тривалих станах гіпоглікемії можуть спостерігатися виражені порушення психічного чи неврологічного характеру.

Для доведення правильності дослідженої структури молекули інсуліну необхідно було синтезувати цей гормон поза живого організму – хімічним шляхом.

Одними з перших штучний інсулін синтезували у 1963 році німецькі хіміки з Аахена під керівництвом Г. Цана. Вони синтезували обидва поліпептидні ланцюги за 221 стадію. Це була неймовірно складна задача.

Найбільш важким виявилось розташувати необхідним чином дисульфідні містки в молекулі інсуліну. У препараті з Аахена ці містки

займали випадкові положення, різні в різних молекулах; через це лише незначна частка отриманих молекул мала правильну будову. Біологічна активність продукту була, природно, низькою, не перевищувала 1% активності натурального інсуліну. Але так чи інакше, продукт був активним, а це означало, що штучний синтез інсуліну відбувся.

Невдовзі американський біохімік Р. Мерифілд розробив новий метод синтезу пептидів. Мерифілд сполучив один ланцюг натурального інсуліну з іншим ланцюгом – синтетичним і отримав напівсинтетичний інсулін з дуже високим виходом чистої речовини – 66%. У 1973 році синтез інсуліну був проведений вченими на чолі з дійсним членом Академії медичних наук М. О. Юдаєвим.

Роботи з синтезу інсуліну хімічним шляхом заслуговують найвищого світового визнання в науці. Спроби отримати лікувальні препарати з синтетичного інсуліну, будова якого ідентична будові людського гормону, тривають у багатьох країнах світу.

Перша ін'єкція інсуліну хворому була зроблена в січні 1923 року – через 20 місяців після відкриття гормону. З того часу інсулін врятував життя мільйонам людей, але його застосування не вирішило всіх проблем лікування цукрового діабету.

Доза інсуліну повинна строго відповідати рівню глюкози в плазмі крові; проте аналізи роблять час від часу, а препарат доводиться вводити щоденно. Якщо його передозувати, то може виникнути тяжке ускладнення – гіпоглікемія, тобто різке падіння концентрації глюкози в крові. Інколи буває навіть гіпоглікемічний шок – гострий розлад роботи мозку при недостатці глюкози. Навпаки, лікування дуже малими дозами не приносить полегшення.

Рівень глюкози в крові залежить від багатьох факторів: харчових, фізичного навантаження та прийому ліків. Щоденні ін'єкції інсуліну неприємні, їх необхідно робити часто. Зараз застосовують препарати інсуліну пролонгованої дії. Щоб підвищити стійкість інсуліну до ферментів пептидгідролаз, які розщеплюють інсулін, його сполучають з білком протаміном та цинком. В результаті утворюється нерозчинна у воді сіль. Найдовше виявляє терапевтичний ефект препарат – суспензія протамін-цинк-інсулін кристалічний; після одноразової ін'єкції ефект спостерігається 30-36 годин. Можна підібрати суміш препаратів так, щоб дія наставала швидко, але без небезпеки гіпоглікемічної коми.

На жаль, отримати чистий препарат інсуліну все ще не вдається: навіть у кращих препаратах є 15-20% домішок. Це різні пептиди і білки, що викликають алергічні реакції. У такому випадку доводиться переходити на іншу серію препарату.

Протамін у препаратах пролонгованої дії також може викликати алергію. Крім того, до інсуліну, отриманого із залоз тварин, виробляється

імунітет, оскільки цей інсулін чужорідний людині. Ефективність лікування при цьому знижується. Найближчий за будовою до інсуліну людини є інсулін свиней. Різниця лише в тому, що у 30-му положенні В-ланцюга замість амінокислоти треоніну знаходиться аланін.

Зараз отримано фрагменти ДНК, які кодують утворення проінсуліну. Коли ці фрагменти ввести у кишкову паличку, вона починає синтезувати інсулін людського типу.

І на завершення. Дехто вважає, що інсулін не лікує. Дійсно, нова залоза у хворого не виростає. Та важливо те, що кожна порція гормону дає лікувальний ефект, що у повній мірі відновлює працездатність людини. І якщо раніше цукровий діабет неминуче призводив до смерті, то тепер гормонозамінна терапія дає довге та повноцінне життя. Тепер у людей, хворих на цукровий діабет, – це особливий спосіб повноцінного життя!

ЛІТЕРАТУРА

1. Биологи: биографический справочник / [авт.-уклад. Бабий Т. П., Коханова Л. Л., Костюк Г. Г. и др.]. – К. : Наукова думка, 1984.– 816с.
2. Химики: биографический справочник / [авт.-уклад. Волков В. А., Вонский Е. В., Кузнецова Г. И.]. – К. : Наукова думка, 1984. – 736с.
3. Германюк Я. Л. Роль инсулина в биосинтезе нуклеотидов, нуклеиновых кислот и белков / Германюк Я. Л. – К. : Здоров'я, 1973. – 200с.
4. Гонський Я. І. Біохімія людини / Я. І. Гонський, Т. П. Максимчук. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2001. – 736 с.
5. Мецлер Д. Биохимия. В трех томах / Мецлер Д. – М. : Мир, 1980. – т. I – 480с.; т. II – 606с.; т. III – 488 с.
6. Основы биохимии / А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, И. Леман. – М. : Мир, 1981. – т. I – 532с.; т. II – 610с.; т. III – 726с.

Шевряков Н.

ИНСУЛИН: ПУТЬ К ИСТИНЕ

Ключевые слова: *инсулин, островки Лангерганса, изучение инсулина*

Статья посвящена истории открытия инсулина, усовершенствование очистки препарата инсулина, изучение его химической структуры. В статье описаны современные аспекты получения рекомбинантных препаратов человеческого инсулина.

Shevryakov N.

INSULIN: THE WAY TO TRUTH

Keywords: *insulin, islets of Langerhans, study of insulin*

The article is devoted to the history of insulin discovery, improvement of purification of insulin preparation, study of its chemical structure. The article describes modern aspects of obtaining recombinant drugs of human insulin.