

На правах рукописи

Ильина Ольга Сергеевна

**ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИНКА В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ
САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ТИПА I И ОСОБЕННОСТИ
ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИНКСОДЕРЖАЩЕГО
КОМПЛЕКСА ИНСУЛИН - ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТ**

03.01.06. – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

03.01.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Уфа – 2012

Работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего профессионального образования «Башкирский государственный
университет»

Научные руководители доктор биологических наук,
 Гарипова Маргарита Ивановна
 доктор биологических наук, профессор
 Киреева Наиля Ахняфовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
 Алимова Фарида Кашифовна
 доктор биологических наук, профессор
 Чемерис Алексей Викторович

Ведущая организация *Институт биохимии и биофизики Казанского НЦ РАН*

Защита диссертации состоится 23 марта 2012 г. в 14.00 часов на заседании
Объединенного диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Федеральном
государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии
Уфимского научного центра Российской академии наук по адресу: 450054, г.
Уфа, пр. Октября, д. 69, тел.: 235-53-62, e-mail: ib@anrb.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Института биологии
Уфимского научного центра РАН, с авторефератом – в сети Интернет по адресу
<http://ib.anrb.ru> и на сайте ВАК Минобрнауки РФ.

Автореферат разослан

« ____ » 2012 г.

Ученый секретарь Объединенного
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Р.В. Уразгильдин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Известно, что в составе секреторных гранул клеток островков Лангерганса инсулин находится в комплексе с катионами цинка (Грачева и др., 1972). Кроме того, была доказана роль этого катиона во взаимодействии инсулина с транспортными белками крови (Гарипова и др., 2005, 2007), что свидетельствует о важности этих катионов для поддержания структуры и проявления биологической активности гормона, а также о необходимости присутствия физиологических концентраций солей цинка в препаратах для гормональной терапии сахарного диабета. Возможные отклонения концентрации катионов цинка в крови человека от нормы могут быть одной из причин снижения эффективности проявления биологической активности и доставки инсулина к чувствительным клеткам. Данные литературы о соответствии норме концентрации катионов цинка в крови больных сахарным диабетом противоречивы (McNair et al., 1981; Pai и Prasad, 1988, Greenwood et. al., 1997, Скальный и др., 2003, Мухина и др., 2005, King et. al., 2011). В связи с этим представляет интерес сравнение содержания этого катиона в крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом.

Обязательным компонентом внутреннего пространства секреторных гранул и лизосом, наряду с двухвалентными катионами металлов, согласно современным представлениям, являются сульфатированные мукополисахариды (протеогликаны), подобные хондроитинсульфату (ХС), формирующие основу, на которой сорбируются заключенные в гранулах активные компоненты, такие как ферменты, гормоны и катионы металлов. Протеогликаны также формируют основу межклеточного матрикса (Марри и др., 1993, Segal, 2005). В крови присутствуют транспортные гликопротеиды, такие как трансферин и α -фетопропротеин, имеющие структурное сходство с мукополисахаридами, и связывающие наряду с катионами металлов, гормоны, витамины, ферменты (Грачева, 1976, Марри, 1993, Гарипова, 2009). Таким образом, формирование комплекса гормонов, в том числе инсулина, с протеогликанами необходимо на всех стадиях существования гормона от синтеза и секреции до транспортировки

и связывания с чувствительными клетками. Особенности протеогликанов, формирующих комплексы с секретруемыми соединениями - высокая гидрофильность, связанная с высоким содержанием углеводов, низкая иммуногенность, высокая плотность отрицательного заряда, антикоагулянтные свойства. Подобными свойствами обладает низкомолекулярная форма хондроитинсульфата (ХС), для которой доказано наличие антикоагулянтных и иммуносупрессорных свойств (Бычков и др., 1979, Vait et al., 1983, Марри и др., 1993), что делает перспективным использование комплекса инсулина с низкомолекулярной формой ХС в качестве лекарственной формы инсулина, близкой по свойствам природной транспортной форме гормона. Учитывая важность присутствия катионов цинка для реализации действия инсулина, мы предположили, что в составе подобной лекарственной формы гормона должна присутствовать соль цинка в физиологической концентрации. В связи с этим, **цель данного исследования** - выявить возможные отклонения от нормы в содержании катионов цинка в крови больных сахарным диабетом типа I, получить комплекс инсулина с низкомолекулярной формой хондроитинсульфата и исследовать особенности его гипогликемического действия.

Для достижения поставленной цели сформулированы следующие **задачи исследования**:

1. Разработать вариант метода количественного определения катионов цинка в плазме крови с применением дитизона.
2. Сравнить концентрации общего цинка в плазме крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом типа I.
3. Провести сравнение концентрации несвязанных с белком катионов цинка в крови больных сахарным диабетом и здоровых доноров.
4. Разработать метод получения частично гидролизованного хондроитинсульфата из хрящей крупного рогатого скота.
5. Получить комплекс инсулина с хондроитинсульфатом.

6. Исследовать особенности сахароснижающего действия комплекса инсулина с хондроитинсульфатом по сравнению с действием свободного инсулина.

Научная новизна

Показано, что концентрация катионов цинка в крови больных сахарным диабетом типа I достоверно превышает этот показатель в крови здоровых доноров. Установлено, что это повышение обусловлено увеличением количества катионов цинка, связанных с белками крови больных сахарным диабетом, что согласуется с данными других авторов (Скальный А.В., 2001, Мухина и др., 2005), при этом концентрация свободных катионов цинка в крови больных сахарным диабетом достоверно снижается по сравнению с нормой. Полученные данные позволяют сделать предположение о том, что повышение связывания катионов цинка белками крови обусловлено изменением их состава, в частности повышением концентрации в крови больных диабетом α_1 -кислого гликопротеина.

Установлено, что в присутствии катионов цинка в растворе, инсулин формирует надмолекулярный комплекс с ХС, причем формирование комплекса тормозится при добавлении свободных аминокислот (гидролизата бычьего сывороточного альбумина). Это позволяет предположить, что формирование комплекса инсулина с белковыми фрагментами протеогликана происходит также как в случае формирования гексамеров цинка, за счет взаимодействия катионов с гистидином и цистеином, включенными в состав инсулина и коровых белков хондроитинсульфата.

Показано, что при введении лабораторным животным инсулина с хондроитинсульфатом в присутствии катионов цинка гипогликемическое действие инсулина сохранялось более длительное время, чем при введении свободного инсулина. Вероятно, освобождение инсулина из этого комплекса происходит постепенно, в результате чего формируется эффект пролонгированного действия гормона. Обнаруженное явление заслуживает

дальнейшего исследования и может быть использовано для получения новых лекарственных форм инсулина с пролонгированным действием.

Практическая значимость работы

Предложен вариант метода количественного определения катионов цинка в сыворотке крови с использованием цветной реакции с дитизоном (дифенилтиокарбазоном).

Разработан метод получения высокоочищенного частично гидролизованного хондроитинсульфата.

Разработаны принципы получения препаратов инсулина пролонгированного действия на основе низкомолекулярной формы хондроитинсульфата и солей цинка.

Показано, что связывание инсулина с протеогликаном тормозится в присутствии свободных аминокислот, что свидетельствует об участии в образовании комплекса аминокислотных остатков корового белка ХС и инсулина, формирующих координационные связи с катионом цинка. Это явление может быть использовано для получения препаративной формы инсулина, из которой инсулин освобождается в результате вытеснения из комплекса свободными аминокислотами при повышении их концентрации, происходящем после приема пищи. Таким образом, может быть создан препарат, имитирующий выброс инсулина из β -клеток в кровь после еды.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Доказано, что в крови больных сахарным диабетом типа I происходит достоверное снижение концентрации свободных катионов цинка, обусловленное повышенным связыванием катионов с белками плазмы крови.
2. Для формирования комплекса инсулина с хондроитинсульфатом необходимо присутствие катионов цинка.
3. Гипогликемическое действие инсулина в комплексе с низкомолекулярным хондроитинсульфатом и катионами цинка при

введении лабораторным мышам продолжается более длительное время по сравнению с использованием свободного инсулина.

Апробация работы

Результаты исследований были представлены на Международной научной конференции «Проблемы биоэкологии и пути их решения» (Саранск, 2008), XIII международной экологической студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий» (Новосибирск.-2008), 12-ой международной пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2008), Международной научно-практической конференции «Роль классических университетов в формировании инновационной среды регионов» (Уфа, 2009, на XLIX), на XLVIII Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Биология (Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2011), IV Международной научно-практической конференции (Ростов-на-Дону, 22–25 сентября 2011 г.),

Публикации. Основные материалы диссертации изложены в 17 печатных работах, в том числе в четырех статьях в журналах, рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 120 страницах, содержит 8 рисунков, 3 таблицы и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 149 работы.

Благодарности. Выражаю глубокую признательность научным руководителям – д.б.н. Маргарите Ивановне Гариповой, профессору, д.б.н. Наиле Ахняфовне Киреевой за консультации и ценные советы, способствовавшие совершенствованию работы, а также всем моим коллегам, оказавшим неоценимую помощь в работе.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследовании использованы пробы крови 42 больных сахарным диабетом типа I, находившихся на стационарном лечении в эндокринологическом отделении РКБ им. Куватова (г.Уфа), с процентным содержанием в капиллярной крови гликозилированной формы гемоглобина от 8 % до 18,6 %.

Формирование группы здоровых доноров проводили на основании заключения эндокринолога об отсутствии отклонений от нормы в регуляции углеводного обмена и процентного содержания гликозилированного гемоглобина (%Ггб) в капиллярной крови. Для исследования отобраны пробы крови 53 здоровых добровольцев 20-25 лет с содержанием Ггб от 4 до 7,5%, что соответствует нормальному уровню гликемии.

Определение концентрации глюкозы в крови лабораторных мышей экспериментальных животных проводили с использованием диагностического набора «Глюкоза – ФКД», произведенного ООО «Фармацевтика и клиническая диагностика» (Москва), глюкозооксидазным методом (Меньшиков, 1987).

Определение % Ггб проводили с использованием аффинной диагностической системы, содержащей микроколонки с сорбентом, представляющим собой мета-аминофенилбороновую кислоту (м-АФБК), иммобилизованную на поливиниловой матрице (Гарипова и др.1994). Для приготовления гемолизатов использовали 0,2 мл капиллярной крови пациента, взятой общепринятым методом. Пробу крови суспендировали в 10 мл физиологического раствора и центрифугировали при 600g с использованием клинической центрифуги. Надосадок отбрасывали, эритроциты вновь суспендировали в физиологическом растворе и повторяли центрифугирование. Лизировали отмытые эритроциты добавлением 0,4 мл дистиллированной воды. Гемолизат выдерживали 5 минут для завершения лизиса эритроцитов и центрифугировали в течение 10 минут при 800 g для удаления стромы

эритроцитов. Содержание гликогемоглобина в пробах определяли сразу после приготовления гемолизата или в течение одного месяца при хранении гемолизатов при -20°C . Хроматографическое разделение гемоглобина на гликозилированную и негликозилированную фракции регистрировали при помощи проточного спектрофотометра “Uvicord-2” и самописца фирмы “LKB” (Швеция) (рисунок 1). На каждой порции сорбента проводили не менее 20 определений. На колонку, содержащую 2 мл аффинного сорбента, уравновешенную 0,025 М натрий-фосфатным буфером pH 8,5, наносили 0,4 мл ранее приготовленного гемолизата. Температура растворов и колонки поддерживалась в пределах $20 - 24^{\circ}\text{C}$. После проникновения гемолизата в слой сорбента ток буфера останавливали на 15 минут для проведения связывания гликогемоглобина с м-АФБК, иммобилизованной на сорбенте. Затем сорбент промывали 25 мл стартового буфера для сбора фракции гемоглобина, не содержащего остатков глюкозы (фракция 1). Гликозилированный гемоглобин элюировали с колонки тем же буфером, содержащим 200 мМолей конкурирующего сахара – сорбитола, содержащего гидроксильные группы в соседнем положении, и способного вытеснять Ггб с поверхности сорбента (фракция 2), объем этой фракции также довели до 25 мл. Затем следы гликогемоглобина отмывали от сорбента 20 мл элюирующего буфера и проводили регенерацию колонки 50 мл 0,0001М соляной кислоты pH 4,0. После завершения цикла колонку уравновешивали стартовым буфером pH 8,5 и проводили следующие определения.

Процент гликогемоглобина в пробе по отношению к общему содержанию гемоглобина определяли по формуле:

$$\% \text{ Ггб} = \frac{0\text{П}_{414}(2)}{0\text{П}_{414}(1) + 0\text{П}_{414}(2)} * 100, \text{ где}$$

% Ггб - % содержания в пробе гликозилированного гемоглобина;

$0\text{П}_{414}(1)$ - оптическая плотность фракции 1 при 414 нм;

$0\text{П}_{414}(2)$ - оптическая плотность фракции 2 при 414 нм;

Измерение оптической плотности фракций проводили в области максимума поглощения гемоглобина, то есть при 414 нм, благодаря чему

присутствие других белков во фракциях не сказывалось на результате определения.

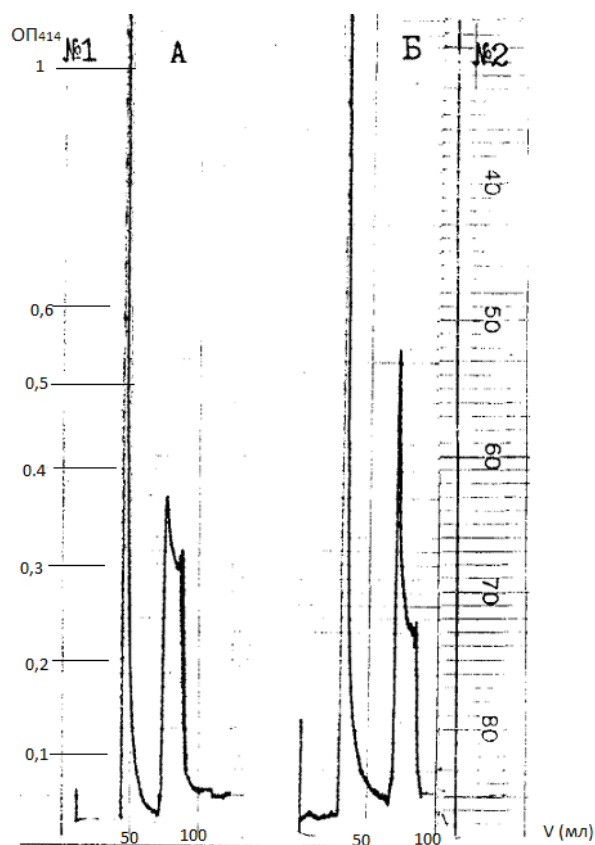


Рисунок 1. Хроматографическое выделение гликогемоглобина на сорбенте с иммобилизованной мета-аминофенилбороновой кислотой. №1-гемолизат больного сахарным диабетом на стадии декомпенсации; №2 - гемолизат здорового донора;

Определение концентрации катионов цинка проводили по авторской методике, описанной в главе II, п.4.1 диссертации с использованием дитизона.

Исследование сахароснижающего действия комплекса инсулина с хондроитинсульфатом проведено на самцах белых беспородных лабораторных мышей.

Определение содержания в пробах α_1 -кислого гликопротеина и трансферина проводили методом иммунонефелометрии при помощи диагностических наборов фирмы Иммунотех (Россия) по прилагаемой инструкции. Для количественной оценки результатов применялась оценка интенсивности реакции в баллах по трехбалльной шкале. Пределы нормального содержания α_1 -кислого гликопротеина в сыворотке крови взрослых обследуемых составляют 25-135 мг на 100 мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка метода количественного определения катионов цинка в плазме крови с применением дитизона

Метод количественного определения катионов цинка в сыворотке крови человека разработан на основе качественного варианта дитизинового метода определения цинка (Алексеев, 1960).

Известно, что комплексное соединение малиново-красного цвета с катионами цинка дитизон образует при щелочных значениях рН. В связи с этим, было предложено проводить количественное определение катионов цинка по следующей методике.

К 2 мл сыворотки крови добавляли 0,1 мл 10% NaOH и 0,2 мл раствора 1% раствора дитизона в четыреххлористом углероде. В отрицательном контроле вместо сыворотки крови добавляли 2 мл дистиллированной воды, в положительном контроле – 2 мл 0,0001 М раствора сульфата цинка. Пробы фотометрировали при 540 нм. Расчет концентрации катионов цинка в пробе проводили по формуле:

$$C_{Zn} = 0,0001 \text{ М} * \text{ОП}_{540} \text{ Пробы} / \text{ОП}_{540} \text{ Стандарта}$$

Проведено определение катионов цинка в сыворотках крови 53 здоровых доноров 23-35 лет и 42 больных сахарным диабетом типа I 20-35 лет. Результат измерения ОП_{540} представлен в таблице 1. Как следует из данных, приведенных в таблице, концентрация катионов цинка в крови обследованных больных сахарным диабетом достоверно превышает этот показатель в крови здоровых доноров. В норме ОП_{540} проб составила $23,6 \pm 1,32$ мкмоль/л, при сахарном диабете – $34,3 \pm 1,26$ мкмоль/л. Проведена проверка достоверности различия полученных показателей с использованием параметрических критериев Стьюдента и Фишера после проведения тестов на нормальность распределений. Полученные данные достоверно различаются как по критерию Стьюдента ($t = -3,66$; $p = 0,0007$), так и по

Таблица 1

Результат определения цинка в сыворотке крови здоровых доноров (I) и больных сахарным диабетом (II)

Здоровые доноры ОП ₅₄₀		Больные сахарным диабетом ОП ₅₄₀
Средние значения	23,6 ±1,32 мкМоль/л	34,3±1,26 мкМоль/л
t- критерий Стьюдента	T = -3,66; p = 0,0007	
F-критерий Фишера	F=3,42, p=0,008	

критерию Фишера (F=3,42, p=0,008). Данные литературы об изменениях концентрации цинка при сахарном диабете противоречивы: по данным ряда авторов содержание цинка при всех формах диабета ниже нормы (Niewoehner et al., 1986; Mocchegiani et al., 1989), в то время как данные других авторов свидетельствуют о повышении концентрации цинка в крови больных диабетом типа I (Medeiros et al., 1983, Canfield et al., 1984, Pai et al., 1988, Larry et. al., 2001). Мы предположили, что для устранения этого противоречия необходимо дифференцировать свободную и связанную с белками формы катионов цинка в крови обследуемых.

Таблица 2

Результат определения свободных катионов цинка в сыворотке крови здоровых доноров (I) и больных сахарным диабетом (II)

Здоровые доноры ОП ₅₄₀		Больные сахарным диабетом ОП ₅₄₀
Средние значения	1,62±0,093 мкМоль/л	0,98± 0,036 мкМоль/л
критерий Манна-Уитни	Z=-4,14; p=0,000034	

Для определения концентрации несвязанных с белками катионов цинка (свободный цинк), проводили предварительное осаждение белков сыворотки крови равным объемом 15% раствора трихлоруксусной кислоты.

Полученные данные представлены в таблице 2. Как следует из таблицы 2, концентрация свободного цинка в крови больных сахарным диабетом ниже, чем в крови здоровых доноров: среднее значение свободного цинка в крови больных диабетом составило $0,98 \pm 0,036$ мкМоль/л, в то время как в крови здоровых доноров концентрация составила $1,62 \pm 0,093$ мкМоль/л. Так как полученные ряды данных не соответствуют нормальному распределению, различие доказано с использованием критерия Манна-Уитни ($Z=-4,14$; $p=0,000034$).

Таким образом, показано, что концентрация несвязанного с белком цинка в крови диабетиков достоверно ниже, чем в крови здоровых доноров. Соответственно, полученные данные свидетельствуют о повышенном связывании катионов цинка белками крови при сахарном диабете типа I. Явление повышения прочности связывания катионов цинка белками крови больных сахарным диабетом всех клинических форм было описано в работах ряда авторов (McNair et al., 1981 Sagara et al., 1982). Авторы высказывают предположение, что это явление обусловлено повышенным гликозилированием белков крови при декомпенсированном сахарном диабете. Предполагается, что неферментативно (в результате Maillard-реакции) связанная с аминокетонами белков глюкоза способна образовывать хелаты с цинком, что способствует повышению связывания с белками крови и, вследствие этого, к снижению концентрации свободного катиона в крови. Однако, формирование комплекса цинка с остатками глюкозы маловероятно, так как основными органическими соединениями, формирующими комплексы с катионами цинка, являются аминокислоты гистидин, лизин, треонин, цистин и глютамин (Greenwood et al., 1997). В связи с этим, было высказано предположение, что прочность связывания цинка с белками крови возрастает в связи с изменением их состава. При сравнении концентраций в исследованных сыворотках здоровых доноров и

больных сахарным диабетом не выявлено достоверного различия в концентрациях трансферина, однако, концентрация α_1 -гликопротеина в крови больных сахарным диабетом достоверно превышала этот показатель в крови здоровых доноров ($1,86 \pm 0,4$ балла в крови больных диабетом по сравнению с $0,3 \pm 0,2$ балла).

Повышение общей концентрации ионов цинка в крови больных сахарным диабетом, вероятно, направлено на компенсацию дефицита свободного цинка, но не достигает своей цели.

Сниженная концентрация свободных катионов цинка в крови больных сахарным диабетом может служить одной из причин нарушения включения инсулина в транспортный комплекс, основу которого формируют транспортные гликопротеины крови: трансферин и α -фетопропротеин, для формирования которого необходимо присутствие катионов цинка (Гарипова, 2009).

Выделение хондроитинсульфата из трахей крупного рогатого скота проводили методом, описанным С.Е. Васюковым и соавторами (Васюков и др., 1996) с дополнительным двукратным осаждением ХС концентрированной соляной кислотой, повышающим производительность выделения. Для выделения ХС 50 г хряща после двукратного обезжиривания ацетоном гомогенизировали при помощи ножевого гомогенизатора и проводили экстракцию ХС в 300 мл 3 М хлорида калия при перемешивании в течение 24 часов при 50° С. Затем надосажок отделяли центрифугированием при 600 g в течение 15 минут и проводили нейтрализацию с последующим осаждением концентрированной соляной кислотой. Осадок ХС отделяли центрифугированием в течение 10 минут при 600 g и перерастворяли в незабуференном физиологическом растворе в минимальном объеме и проводили повторное осаждение ХС концентрированной соляной кислотой из расчета 6 мл HCL на 100 мл раствора. Образовавшийся осадок выделяли центрифугированием и вновь перерастворяли в 100 мл дистиллированной воды и доводили рН до 6. Благодаря двукратному переосаждению ХС концентрация белка, определенного при помощи биуретовой реакции, в

целевом продукте снизилась с 46% до $15 \pm 1,5\%$. На следующем этапе очистки хондроитинсульфата к 100 мл экстракта добавляли 100 г анионита Дауэкс 1 x 2 фирмы "Sigma" и встряхивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем анионит промывали двадцатикратным объемом дистиллированной воды и элюировали ХС 200 мл 1,5 М хлорида натрия. Проведение ионообменной хроматографии в хроматографической колонке было невозможно в связи с высокой вязкостью хондроитинсульфата. Выделенный хондроитинсульфат содержал $15 \pm 1,5\%$ белка, и характеризовался высокой вязкостью, что затрудняло работу с ним. Известно, что низкомолекулярная фракция ХС обладает свойствами антикоагулянта, менее выраженными, чем у гепарина и свойствами иммунодепрессанта (Мейл и др., 2007), что позволяет предположить, что его использование для получения комплекса с инсулином позволит смоделировать иммуносупрессорные свойства гликопротеидов крови, транспортирующих инсулин в крови здорового человека (Гарипова, 2009). В связи с этим, для получения комплекса с инсулином был использован ХС, подвергнутый кислотному гидролизу при 60°C в 0,5 М соляной кислоте в течение 6 часов. Подтверждением осуществления гидролитического расщепления ХС в указанных условиях является снижение вязкости полученного раствора ХС с $74,3 \text{ м}^2/\text{сек}$ до $6,9 \text{ м}^2/\text{сек}$.

Частично гидролизованный ХС, полученный описанным методом, при гельхроматографии на колонке с Сефадексом G- 75 выходит преимущественно в свободном объеме, но содержит и более низкомолекулярные фракции (рисунок 2).

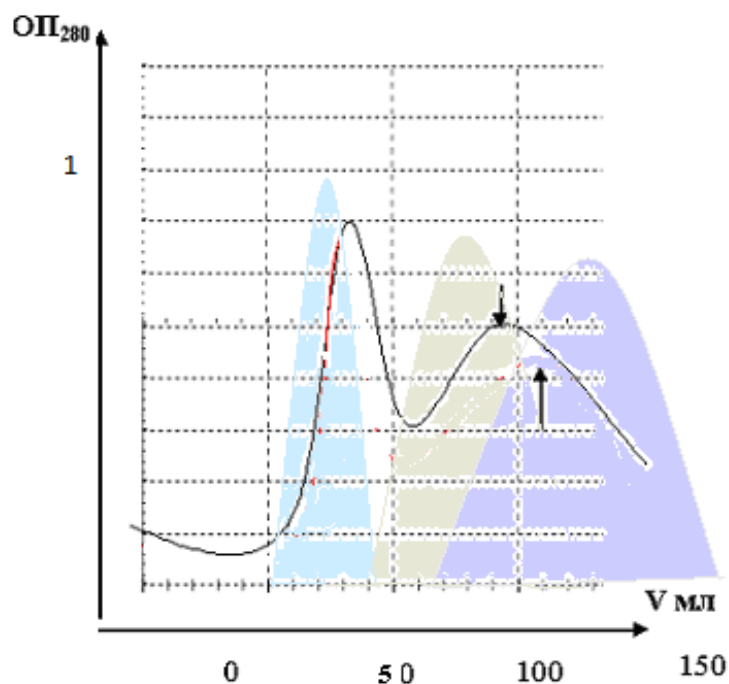


Рисунок 2. Гельхроматография гидролизованного ХС на Сефадексе G-75, откалиброванной при помощи молекулярных маркеров: голубого декстрана (молекулярный вес $2 \cdot 10^6$ Д), гемоглобина (молекулярный вес $68 \cdot 10^3$ Д) и амидочерного В (молекулярный вес $\sim 10^3$ Д). Стрелками показан объем выхода фракций хондроитинсульфата, использованных для получения комплекса с инсулином.

Для получения комплекса с инсулином отобраны фракции, вышедшие в средней части второго пика, имеющие молекулярный вес около 50 тысяч Д.

Получение комплекса инсулина с хондроитинсульфатом и исследование его сахароснижающего действия. Гипогликемическое действие инсулина в присутствии ХС в сравнении с эффектом свободного инсулина исследовали на трех группах самцов белых лабораторных беспородных мышей, каждая из которых состояла из 20 животных весом 10- 15 грамм. На первой группе определено действие свободного инсулина из расчета 0,08 единиц гормона на мышь, на второй - действие инсулина в присутствии хондроитинсульфата (0,08 единиц инсулина с добавлением 0,2 мг хондроитинсульфата в 0,2 мл физиологического раствора в расчете на мышь). На третьей группе мышей исследовалось действие инсулина в комплексе с хондроитинсульфатом и сульфатом цинка (0,08 единиц гормона в комплексе с

0,2 мг хондроитинсульфата в 0,2 мл физиологического раствора, содержащего 1 мкМ/л сульфата цинка, в расчете на мышь).

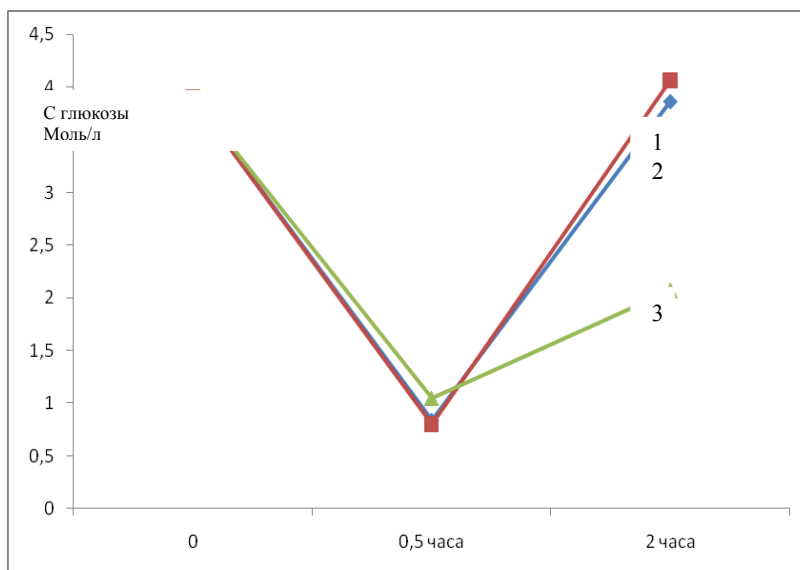


Рисунок 3. Динамика гликемии после введения лабораторным мышам **1**- свободного инсулина в дозе 0,08 единиц гормона на мышь в физиологическом растворе; **2** - 0,08 единиц инсулина с добавлением 0,2 мг частично гидролизованного хондроитинсульфата в 0,2 мл физиологического раствора в расчете на мышь; **3.** 0,08 единиц гормона в комплексе с 0,2 мг хондроитинсульфата и 1 мкМ сульфата цинка в 0,2 мл физиологического раствора в расчете на мышь.

Этот вариант комплекса исследовался в связи с тем, что в предыдущих исследованиях было установлено, что для включения инсулина в комплекс с транспортными белками крови необходимо присутствие катионов цинка (Гарипова и др., 2010). Результаты сравнения концентрации глюкозы в крови мышей в период от 30 минут до 6 часов после инъекции инсулина в трех группах мышей представлены на **рисунке 3**.

Установлено, что исходный уровень гликемии белых беспородных лабораторных мышей в среднем составляет $3,9 \pm 0,61$ ммоль/л и колеблется в пределах от 3,13 ммоль до 4,66 ммоль глюкозы на литр крови. После введения 0,08 единиц свободного инсулина на мышь концентрация глюкозы в крови животных снизилась и составила $0,84 \pm 0,07$ ммоль/л через 30 минут после введения гормона. Гликемия через 30 минут после инъекции той же дозы

инсулина с хондроитинсульфатом (группа 2) и хондроитинсульфатом в присутствии соли цинка (группа 3) составила соответственно $0,8 \pm 0,08$ ммоль/л и $1,045 \pm 0,11$ ммоль/л и достоверно не отличалась от гликемии через 30 минут после введения свободного инсулина.

Через 2 часа после введения инсулина гликемия в первой и второй группах мышей нормализовалась и составила соответственно $3,86 \pm 0,4$ ммоль/л и $4,06 \pm 0,35$ ммоль/л. Однако, в группе мышей, получавших инсулин в комплексе с хондроитинсульфатом и солями цинка, через 2 часа после введения гликемия была достоверно ниже нормального значения и составила $2,07 \pm 0,19$ ммоль/л.

Таким образом, при введении инсулина с хондроитинсульфатом в присутствии катионов цинка сахароснижающее действие инсулина сохранялось более длительное время, чем при введении свободного инсулина и инсулина с хондроитинсульфатом без соли цинка.

Полученные результаты позволяют предположить, что при введении инсулина с хондроитинсульфатом и катионами цинка, гормон формирует комплекс с хондроитинсульфатом с участием катионов цинка. Вероятно, освобождение инсулина из этого комплекса происходит постепенно, в результате чего формируется эффект пролонгированного действия инсулина.

Для подтверждения предположения о необходимости присутствия катионов цинка для формирования комплекса инсулина с ХС, проведена гельхроматография на колонке с Сефадексом G-75 трех проб: 1. 5 мг ХС с 2 ед. инсулина в 1 мл физиологического раствора; 2. 5 мг ХС с 2 ед. инсулина в 1 мл физиологического раствора, содержащего 1 мкМ/л сульфата цинка, 3. 5 мг ХС с 2 ед. инсулина в 1 мл физиологического раствора, содержащего 1 мкМ/л сульфата цинка в присутствии гидролизата 5 мг бычьего сывороточного альбумина.

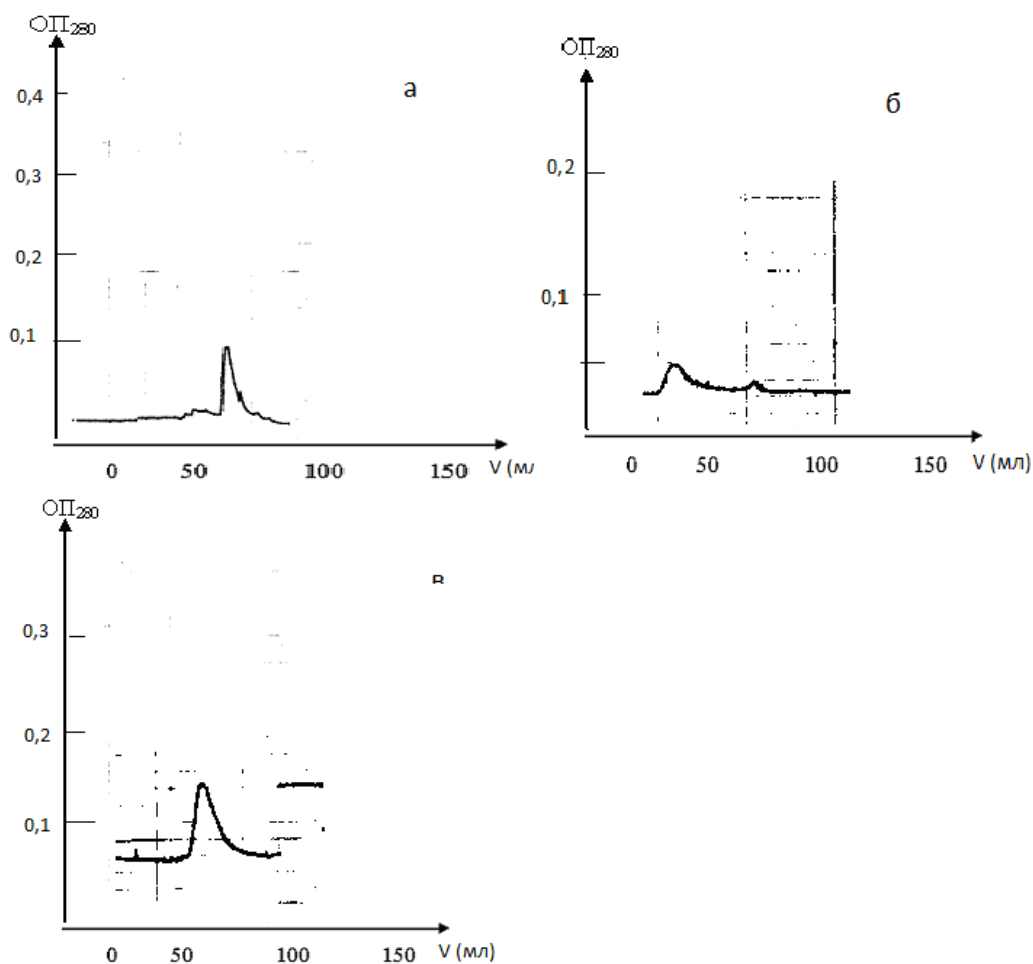


Рисунок 4. Гельхроматография на колонке с Сефадексом G-75 проб, содержащих 1. 5 мг ХС с 2 ед. инсулина в 1 мл физиологического раствора; 2. 5 мг ХС с 2 ед инсулина в 1 мл физиологического раствора, содержащего 1 мкМ/л сульфата цинка, 3. 5мг ХС с 2 ед инсулина в 1 мл физиологического раствора, содержащего 1мкМ/л сульфата цинка в присутствии гидролизата 5 мг бычьего сывороточного альбумина.

Эта проба была исследована для изучения возможности торможения сшивки ХС с инсулином катионами цинка, свободными аминокислотами, такими как гистидин, лизин, треонин, цистин, глютамин (принимают участие в формировании цинксодержащих белковых структур, Мухина и др., 2005). Полученные хроматограммы приведены на рисунке 4.

Как следует из приведенных хроматограмм, смесь Хс и инсулина без соли цинка при хроматографии выходит во внутреннем объеме Сефадекса G-75, совпадающем с объемом выхода исходного ХС. Очевидно, это свидетельствует о том, что оба компонента присутствуют в свободном виде, что согласуется с отсутствием отличия в действии инсулина в присутствии ХС от

действия исходного инсулина (рисунок 4а). В то же время, добавление соли цинка приводит к появлению пика, соответствующего свободному объему колонки и, следовательно, имеющего молекулярный вес больше 100 тысяч Д, что свидетельствует о сшивке ХС и инсулина катионами цинка (рисунок 4 б).

Добавление смеси аминокислот отменяет сшивающее действие катионов цинка (рисунок 4в), что, вероятно, свидетельствует о том, что в формировании связи с инсулином принимают участие аминокислотные остатки белкового компонента ХС, формирующие хелатные комплексы с катионами цинка.

Таким образом, показано, что при сахарном диабете в связи с изменением состава сывороточных белков, повышается их цинксвязывающая активность, что приводит к снижению концентрации свободных катионов цинка по сравнению с нормой. Повышение общей концентрации катионов цинка в плазме крови больных сахарным диабетом, возможно, направлено на компенсацию дефицита свободного цинка, но в обследованной нами группе не достигает своей цели.

Ранее было показано, что для включения инсулина в комплекс с транспортными белками крови необходимо присутствие катионов цинка (Гарипова и др., 2010). В связи с этим, снижение свободных катионов цинка при сахарном диабете может нарушать доставку экзогенного инсулина к тканям. Следовательно, препараты инсулина для терапии сахарного диабета должны включать экзогенный цинк.

Применение низкомолекулярного хондроитинсульфата в качестве носителя при добавлении соли цинка позволяет получить комплекс, обладающий пролонгированным гипогликемическим действием по сравнению с действием свободного инсулина. Заслуживает внимания тот факт, что добавление смеси свободных аминокислот препятствует формированию комплекса инсулина с хондроитинсульфатом. Можно предположить что, их добавление также может приводить к постепенному вытеснению гормона из комплекса, что может имитировать выброс инсулина в кровь из

поджелудочной железы после приема пищи. Таким образом, при использовании комплекса хондроитинсульфата с цинком может быть получена форма инсулина «выбрасывающая» гормон в кровь после приема пищи, то есть имитирующая активность бета клеток островков Лангерганса.

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод количественного определения катионов цинка в плазме крови с использованием дитизона.
2. Достоверно показано, что общая концентрация катионов цинка в крови больных сахарным диабетом выше, чем в крови здоровых доноров: среднее значение концентрации цинка в крови больных диабетом составило $34,3 \pm 1,26$ мкМоль/л, в крови здоровых доноров - $23,6 \pm 1,32$ мкМоль/л. Различие доказано с использованием критериев Стьюдента и Фишера ($t=-3,66$, $p=0,0007$, $F=3,42$, $p=0,008$).
3. Установлено, что концентрация несвязанных с белком катионов цинка в крови больных сахарным диабетом достоверно ниже, чем в крови здоровых доноров: среднее значение показателя в крови больных диабетом составило $0,98 \pm 0,036$ мкМоль/л, в то время как в крови здоровых доноров концентрация составила $1,62 \pm 0,093$ мкМоль/л. Различие доказано с использованием критерия Манна-Уитни ($Z=-4,14$; $p=0,000034$).
4. Разработан метод получения частично гидролизованного хондроитинсульфата с содержанием углеводов $85 \pm 1,5\%$ и молекулярным весом около 50 тысяч Д.
5. Установлено, что образование комплекса инсулина с хондроитинсульфатом требует присутствия катионов цинка и тормозится смесью свободных аминокислот.
6. Показано, что гипогликемическое действие комплекса инсулина с протеогликаном является более продолжительным по сравнению с действием свободного инсулина. Эффект пролонгированного действия

инсулина, возможно, объясняется постепенным освобождением гормона из комплекса.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. **Елисеева О.С.**, Киреева Н.А., Першина А.С., Буторина О.Л., Бикбулатова С.М., Гарипова М.И. Исследование природы взаимодействий инсулина с поверхностью эритроцитов и состава гормонтранспортирующего комплекса плазмы крови человека. // Вестник Оренбургского государственного университета.- 2009.-№6.-С.476-478.
2. Першина А.С., Киреева Н.А., **Елисеева О.С.**, Гарипова М.И. Изучение эритроцитарного транспорта инсулина в норме и при сахарном диабете первого типа. // Вестник Оренбургского государственного университета.- 2010.-№ 2. – С.141-143.
3. Гарипова М.И., Киреева Н.А., Баранова М.В., **Елисеева О.С.**, Першина А.С., Набиуллина Р.Р. Аффинное выделение связывающих инсулин сывороточных гликопротеидов человека и изучение их разнообразия в норме и при сахарном диабете. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова.- 2007.-т.3.-№1.-С 27-32.
4. Гарипова М.И., Моругова Т.В., Киреева Н.И., Ибрагимов Р.И., Першина А.С., **Елисеева О.С.**, Баранова М.В. Аффинное выделение и изучение состава связывающих инсулин белков сыворотки крови человека. Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2010. - № 8.- С.40-44

Статьи, материалы, тезисы

5. Першина А.С., **Елисеева О.С.**, Гарипов О.С., Киреева Н.А., Гарипова М.И. Влияние условий современного промышленного города на соотношение эритроцитарного и сывороточного транспорта инсулина. // Материалы международной научной конференции «Проблемы биоэкологии и пути их решения».- Саранск.-2008.-С.318-319.
6. **Елисеева О.С.**, Киреева Н.А., Гарипова М.И. Влияние экологических условий промышленного города на состав связывающих инсулин

- транспортных белков крови человека. // Материалы международной научной конференции «Проблемы биоэкологии и пути их решения».-Саранск.-2008.-С.303-305.
7. Першина А.С., **Елисеева О.С.**, Гарипова М.И. Транспорт инсулина в крови человека эритроцитарной системой. // Материалы XIII международной экологической студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий».- Новосибирск.-2008.-С.157-158.
 8. **Елисеева О.С.**, Першина А.С. Состояние инсулинсвязывающего белкового комплекса крови человека в условиях промышленного города. // Материалы XIII международной экологической студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий».- Новосибирск.-2008.-С.158-159.
 9. Першина А.С., Гарипова М.И., Киреева Н.А., **Елисеева О.С.** Особенности транспорта инсулина в крови человека. // 12-ая международная пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века».- Пушкино.-2008.-С.101-102.
 10. **Елисеева О.С.**, Першина А.С., Гарипова М.И., Киреева Н.А. Транспорт инсулина в сыворотке крови здоровых людей и больных сахарным диабетом первого типа. // 12-ая международная пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века».-Пушино.-2008.-С.84.
 11. Першина А.С., Гарипова М.И., Моругова Н.А., Киреева Н.А., **Елисеева О.С.** Аффинные методы в исследовании транспорта инсулина в крови человека. // Вестник биотехнологии. Оригинальные статьи.- Москва.- 2007.-№3.- С. 33-34.
 12. Гарипова М.И., Киреева Н.А., Моругова Н.А., **Елисеева О.С.**, Першина А.С. Аффинное выделение связывающих инсулин сывороточных гликопротеидов человека и изучение их состава в норме и при сахарном диабете первого типа. // Вестник биотехнологии. Оригинальные статьи.- Москва.-2007.-№3.- С. 27-32.
 13. Гарипова М.И. ,**Елисеева О.С.**, Першина А.С. Инсулинтранспортирующие системы крови человека в норме и при сахарном диабете первого типа. // Материалы Международной научно-практической конференции «Роль

классических университетов в формировании инновационной среды регионов». Уфа РИЦ БашГУ.-2009.- Т.2.-С.69-72.

14. Гарипова М.И., Буторина О.Л., **Елисеева О. С.**, Калимуллина Р. А. Изменение концентрации катионов цинка в крови человека при сахарном диабете типа I. // Материалы IV Международной научно-практической конференции Ростов-на-Дону.- 2011.-С.85.
15. Буторина О. Л., **Елисеева О. С.**, Калимуллина Р. А., Першина А. С. Сравнительный анализ содержания катионов цинка в крови больных сахарным диабетом типа I и здоровых доноров. // Материалы XLVIII Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Биология.- Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т.- 2011.- С. 164.
16. Буторина О. Л., **Елисеева О. С.**, Калимуллина Р. А., Першина А. С. Изменение концентрации катионов цинка в крови человека при сахарном диабете типа I.- Материалы студенческих научных конференций «Студент и наука».-Уфа РИЦ БашГУ.- 2011.-С.26-27.
17. Факиева С. А., Гарипов О.С., **Елисеева (Ильина) О.С.**, Буторина О. Л., .-Исследование особенностей сахароснижающего действия комплекса инсулина с хондроитинсульфатом.- Материалы студенческих научных конференций «Студент и наука».-Уфа РИЦ БашГУ.- 2011.-С.37-38.

Подписано в печать 20.02.12 г. Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Печать ризографическая. Тираж 100 экз. Заказ 626.
Гарнитура «TimesNewRoman». Отпечатано в типографии
«ПЕЧАТНЫЙ ДОМЪ» ИП ВЕРКО.
Объем 1 п.л. Уфа, Карла Маркса 12 корп. 4,
т/ф: 27-27-600, 27-29-123