

*На правах рукописи*

ПЕРШИНА АЛЬБИНА САБИРЬЯНОВНА

**Биотехнологические аспекты разработки методов  
диагностики сахарного диабета типа I**

03.01.06. – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)  
14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология  
(биологические науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук**



Уфа – 2011

Работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии  
ГОУ ВПО Башкирский государственный университет

Научные руководители	доктор биологических наук, Гарипова Маргарита Ивановна доктор биологических наук, профессор Киреева Наиля Ахняфовна
Официальные оппоненты:	доктор биологических наук, профессор Вахитов Венер Абсатарович доктор биологических наук, профессор Цейликман Вадим Эдуардович
Ведущая организация	Институт биохимии и биофизики Казанского НЦ РАН

Защита диссертации состоится 17 июня 2011 г. в 14-00 часов на заседании Объединенного диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Учреждении Российской академии наук 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](mailto:ib@anrb.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Уфимского научного центра Российской академии наук и на официальном сайте <http://www.anrb.ru/inbio/dissovet/index/htm>

Автореферат разослан

«\_14\_» мая 2011 г.

Ученый секретарь Объединенного  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Р.В. Уразгильдин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** В 2000-х годах были уточнены механизмы транспорта гормонов в крови человека, в частности механизмы транспорта инсулина. Рядом авторов показано, что в транспорте инсулина принимают участие 2 системы транспорта: эритроцитарная и сывороточная (Касаткина, 1996, Сандуляк, 1972; Картун и др., 2000; Запорожан и др., 2001; Gerhard et. al., 2004; Гарипова, 2007). Установлено, что в сыворотке крови инсулин включается в транспортный комплекс, ядро которого формируют транспортные белки, имеющие достаточно широкую специфичность, за счет чего они способны осуществлять транспорт широкого спектра как гидрофобных, так и гидрофильных гормонов, в том числе таких белковых гормонов как инсулин, причем концентрация этого комплекса снижается в плазме крови больных сахарным диабетом (Гарипова, 2007). Показано, что при сахарном диабете типа I наблюдается достоверное увеличение вклада эритроцитарной системы в доставку инсулина к периферическим тканям и, соответственно снижение роли сывороточного транспорта гормона. Из новых данных вытекают новые диагностические возможности выявления нарушений транспорта инсулина при формировании сахарного диабета. Представляет интерес изучение возможности использования в качестве показателей, отражающих степень нарушений транспорта инсулина, концентрации связывающих инсулин белков крови и коэффициента распределения инсулина между плазмой и эритроном.

**Цель работы** – создание комплекса методов для эффективной диагностики сахарного диабета, включающего оценку степени нарушения транспорта инсулина в крови пациентов и определение интегрального уровня гликемии за длительный период, а также исследование особенностей биологического действия двух транспортных форм инсулина, присутствующих в крови человека.

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

1. Разработать метод синтеза аффинного сорбента для количественного определения гликозилированной формы гемоглобина, отличающийся от имеющихся аналогов повышенной стабильностью.

2. Оценить стабильность и применимость для диагностических целей эритроцитарных диагностических систем с ковалентным связыванием инсулина с поверхностью эритроцитов и возможность использования количества связывающих инсулин белков крови в качестве показателя нарушения транспорта инсулина.
3. Сравнить значения коэффициентов распределения инсулина между эритроном и плазмой крови в крови здоровых доноров и больных диабетом с различной степенью тяжести заболевания и сделать вывод о возможности использования этого показателя для диагностики нарушений транспорта инсулина.
4. Сравнить гипогликемические эффекты действия двух транспортных форм инсулина.
5. Изучить иммуномодулирующие свойства белков, формирующих комплекс с инсулином в норме и при сахарном диабете.

### ***Научная новизна***

Предложен комплекс методов для эффективной диагностики сахарного диабета. Комплекс включает определение концентрации гликозилированной формы гемоглобина и оценку нарушения транспорта инсулина в крови пациентов.

Показано, что определение концентрации связывающих инсулин белков крови и коэффициента распределения инсулина между плазмой крови и эритроном может быть использовано для диагностики нарушений транспорта гормонов кровью, происходящих при сахарном диабете. Установлены пределы нормальных значений предложенных показателей. Доказано, что определение коэффициента распределения инсулина между плазмой крови и эритроном является более информативным, так как позволяет дифференцировать компенсированное и декомпенсированное течение заболевания.

Показано, что транспортные формы гормона обладают особенностями биологического действия: инсулин, связанный с поверхностью эритроцитов вызывает более медленное снижение концентрации глюкозы в крови, по сравнению с гормоном,

введенным в той же дозе в присутствии белков плазмы крови. Экспериментально доказано, что транспортные белки крови, формирующие комплекс с инсулином в крови здоровых доноров, способны снижать интенсивность иммунного ответа к транспортируемому молекулам.

### ***Практическая значимость работы***

Предложен новый метод синтеза аффинного сорбента с иммобилизованной м-аминофенилбороновой кислотой, отличающийся от известных аналогов повышенной стабильностью.

Разработан метод получения стабильного эритроцитарного диагностикума для определения связывающих инсулин белков плазмы крови.

Предложен метод оценки нарушений транспорта инсулина в крови человека, основанный на использовании двух показателей: концентрации связывающих инсулин белков крови и коэффициента распределения инсулина между плазмой крови и эритроном.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Использование в качестве матрицы аффинного сорбента для определения гликозилированной формы гемоглобина силикагеля, позволяет увеличить стабильность сорбента и повысить кратность его использования.
2. Для оценки нарушений транспорта инсулина более информативным является определение коэффициента распределения инсулина, позволяющее дифференцировать компенсированную и декомпенсированную стадии заболевания.
3. Две транспортные формы инсулина достоверно различаются по выраженности гипогликемического эффекта.
4. Белки плазмы крови, формирующие комплекс с инсулином в норме, обладают иммуносупрессорным действием.

### ***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).

**Публикации.** Основные материалы диссертации изложены в 13 печатных работах, в том числе в четырех статьях в журналах, рекомендованных ВАК.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 127 страницах, содержит 8 рисунков, 8 таблиц и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 354 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; за ценные консультации профессору, д.б.н. Станиславу Юрьевичу Веселову и всем моим коллегам, оказавшим неоценимую помощь в работе.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Формирование группы здоровых доноров, проводили на основании заключения эндокринолога об отсутствии отклонений от нормы в регуляции углеводного обмена и величины показателя, отражающего средний уровень гликемии за 2 месяца, предшествующие взятию пробы - процентного содержания гликозилированного гемоглобина (%Ггб) в капиллярной крови человека. Для определения коэффициента распределения инсулина, количественного определения белков, связывающих инсулин, в плазме крови и их аффинного выделения были отобраны пробы крови 100 здоровых добровольцев 20-25 лет с содержанием Ггб от 4 до 7,5%, что соответствует нормальному уровню гликемии.

В исследовании использованы пробы крови 100 больных сахарным диабетом типа I, находившихся на стационарном лечении в эндокринологических отделениях больниц г.Уфы, с процентным содержанием в капиллярной крови гликозилированной формы гемоглобина от 8 % до 18,6 %.

**Определение % Ггб** проводили с использованием аффинной диагностической системы, содержащей микроколоники с сорбентом, представляющим собой мета-аминофенилбороновую кислоту, иммобилизованную на модифицированном силикагеле, полученным по авторскому методу.

**Хроматографическое выделение связывающих инсулин белков** сыворотки человека проводили на сорбенте, представляющем собой инсулин, иммобилизованный на Поливиниле из расчета 5 мг/мл (Гарипова, 2005).

**Определение концентрации связывающих инсулин белков** проводили с использованием эритроцитарных диагностикумов с ковалентно иммобилизованным инсулином, полученных на основе формализированных эритроцитов барана авторским методом.

Для определения коэффициента распределения инсулина между поверхностью эритроцитов и плазмой крови ( $K_{э/пл}$ ) получен инсулин, меченный пероксидазой, по методу Fare и Nakane (Fare, Nakane, 1981). Принцип предложенного метода определения  $K_{э/пл}$ , заключается в определении соотношения пероксидазной активности, связанной с поверхностью эритроцитов, к активности пероксидазы в плазме крови

после инкубации с исследуемой пробой крови рабочего разведения конъюгата инсулина с пероксидазой, выполняющей роль маркерного фермента. Для приготовления конъюгата инсулина и пероксидазы использован генно-инженерный инсулин человека ХУМУЛИН Р производства фирмы Lilly France S.A. Для исследования использовались пробы крови без признаков гемолиза.

**Исследование иммуномодулирующих свойств связывающих инсулин белков крови** проведено на модели иммунизации белых лабораторных мышей дифтерийным анатоксином. Проведена иммунизация трех групп белых лабораторных мышей: двух опытных и контрольной. Мышей всех групп трехкратно иммунизировали дифтерийным анатоксином. В опыте 1 мышей иммунизировали анатоксином с добавлением инсулинсвязывающих гликопротеидов, выделенных из сывороток крови здоровых доноров, в опыте 2 – при добавлении аналогичной фракции из крови больных сахарным диабетом. Иммунизацию проводили по 1мл анатоксина на каждую мышь в 4 точки подкожно вдоль позвоночника. Вторую иммунизацию проводили через 6 недель также подкожно в области позвоночника по 0,5 мл на мышь. Последнюю, третью иммунизацию, провели через 2 недели после предыдущей с использованием той же схемы и доз при введении анатоксина. Через 5 дней после 3-й иммунизации был проведен забор крови. Полученные антисыворотки к дифтерийному анатоксину были оттитрованы в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) с диагностикомом, представляющим собой формализированные эритроциты барана, сенсбилизированные дифтерийным анатоксином при помощи хлорида хрома (III), выявляющим антитела к дифтерийному анатоксину.

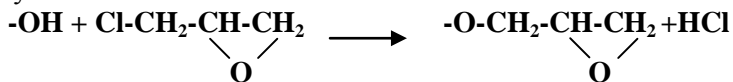
## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Разработка метода иммобилизации мета-аминофенилбороновой кислоты на силикагеле**

В данном исследовании для увеличения стабильности аффинного сорбента с иммобилизованной мета-аминофенилбороновой кислотой в качестве носителя использован пористый силикагель фирмы “Serva” марки SP-500, модифицированный глицерилпропилсиланом.

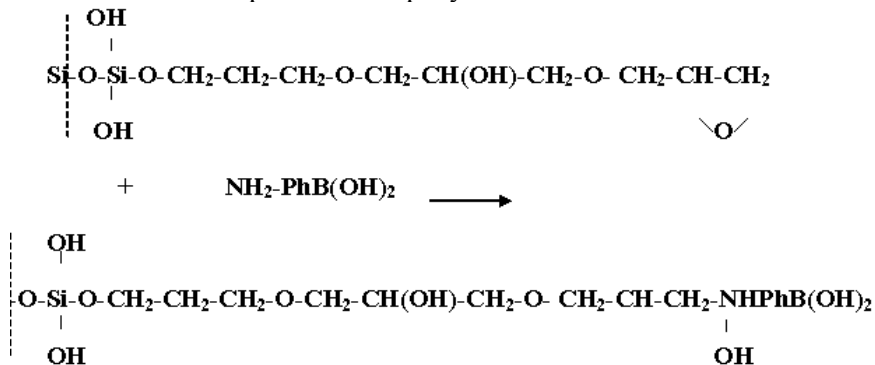


Активацию силикагеля, модифицированного глицилпропилсиланом, эпихлоргидрином проводили по известной методике (Дин и др., 1988). Схема активации приведена на рисунке 1.



**Рисунок 1** Активация силикагеля, модифицированного глицилпропилсиланом, эпихлоргидрином.

Затем активированный носитель промывали дистиллированной водой и 0,1 М карбонатным буфером связывания pH 9,5, добавляли м-АФБК из расчета 20 мг/мл носителя и встряхивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Схема реакции связывания приведена на рисунке 2.



**Рисунок 2.** Реакция связывания м-АФБК с активированным носителем.

Отмытый от избытка м-АФБК сорбент применен для количественного определения Ггб. Для иммобилизации использовали м-АФБК, синтезированную сотрудниками лаборатории стереорегулярных полимеров Института органической химии Уфимского научного центра РАН. Элементный анализ 20 проб полученного сорбента показал, что содержание бора в нем составляет  $0,16 \pm 0,08$  %. Микроколичественное определение бора и других элементов в сорбентах проведено в аналитической лаборатории Института органической химии Уфимского научного центра РАН.

Определен элементный состав полученного аффинного сорбента. Вычислено %: С-59,26; Н – 6,53%; В – 3,88%. Найдено %: С-58,76%; Н-6,87%; %, В – 0,12 %, что соответствует степени замещения 3,09%.

**Таблица 1**

**Оптимизация условий иммобилизации м-АФБК на ПВС-носителе**

<b>Концентрация м-АФБК</b>	<b>pH буфера</b>	<b>Среднее содержание бора в сорбенте (%)*</b>
<b>1</b>	<b>8,0</b>	<b>0,02±0,009</b>
<b>5</b>	<b>8,0</b>	<b>0,04±0,010</b>
<b>10</b>	<b>8,0</b>	<b>0,065±0,011</b>
<b>15</b>	<b>8,0</b>	<b>0,09±0,015</b>
<b>20</b>	<b>8,0</b>	<b>0,10±0,013</b>
<b>25</b>	<b>8,0</b>	<b>0,12±0,011</b>
<b>15</b>	<b>7,0</b>	<b>0,08±0,014</b>
<b>15</b>	<b>7,5</b>	<b>0,09±0,015</b>
<b>15</b>	<b>8,0</b>	<b>0,11±0,010</b>
<b>15</b>	<b>8,5</b>	<b>0,10±0,009</b>
<b>15</b>	<b>9,0</b>	<b>0,11±0,010</b>
<b>15</b>	<b>9,5</b>	<b>0,11±0,013</b>

- вычислено при четырехкратной повторности определения содержания бора в сорбенте и доверительной вероятности 95%.

Получено 8 серий аффинного сорбента с иммобилизованной мета-аминофенилбороновой кислотой с содержанием бора от 0,01 до 0,2%. Сорбенты использованы для количественного определения гликогемоглобина в капиллярной крови пациентов. Использована методика определения, рекомендованная фирмой Pierce Chemical Company с некоторыми изменениями. Установлено, что для количественного определения гликогемоглобина в пробах пригодны сорбенты с содержанием бора не менее 0,05%, что согласуется с данными более ранних исследований (Гарипова и др., 2002, Гарипова и др., 2004). Показано, что количество определений Ггб, которое может быть проведено на одной порции сорбента, составляет 20 при содержании бора в сорбенте не менее 0,1%, что превышает число

определений, рекомендованных фирмой Pierce Chemical Company на сорбенте Glyco-Gel. Таким образом, результаты лабораторных исследований свидетельствуют о том, что предложенный аффинный сорбент с иммобилизованной м-АФБК обладает высокой стабильностью и достаточной специфической емкостью для использования в аналитических целях.

### **Разработка диагностических систем, использующих эритроциты, сенсibilизированные ковалентно связанным инсулином**

На первом этапе исследований для постановки РПГА использовали классический метод получения эритроцитарного диагностикума, в котором связывание лиганда, в нашем случае инсулина, с поверхностью стабилизированных формалином эритроцитов осуществляется через ионы трехвалентного хрома (Weinbach, 1958). Однако, из-за небольшой стабильности время использования диагностикума, полученного этим методом не превышает 10 дней, а задачи нашего исследования требовали получения результатов в течение более длительного периода времени. В связи с этим, для предотвращения отщепления инсулина от поверхности эритроцитов было предложено использовать метод ковалентного связывания инсулина с альдегидными группами углеводов поверхности эритроцитов (Гарипова и соавторы, 2005). Альдегидные группы формировали за счет окисления гетерополисахаридов поверхности эритроцитов солями перйодной кислоты. В качестве прототипа метода ковалентного связывания инсулина с поверхностью эритроцитов использован метод получения конъюгата пероксидазы с иммуноглобулинами по Fare и Nakane (1983). Реакцию связывания инсулина с поверхностью эритроцитов проводили за счет реакции между альдегидными группами поверхности эритроцитов и аминокгруппами инсулина. Образовавшиеся основания Шиффа восстанавливали добавлением боргидрида натрия при комнатной температуре. Полученную 2% взвесь эритроцитов, сенсibilизированных инсулином из расчета 0,4 мг инсулина на 1 мл эритроцитов, использовали для количественного определения связывающих инсулин белков крови человека в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА).

Таблица 2

**Вариабельность определения связывающих инсулин  
белков в РПГА в диагностических системах, полученных  
разными методами**

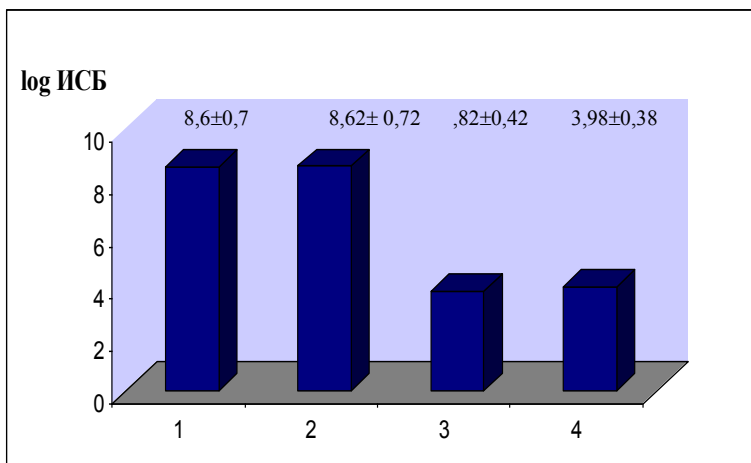
День определен ия	логарифм концентрации ИСБ при четырёхкратной повторности	
	диагностикум 1	диагностикум 2
1	8,5	9,25
3	9,25	10,25
5	8,75	9,75
7	9,25	9,25
9	8,5	9,5
11	4,75	10,25
13	4,5	9,75
15	4,0	9,25
17	3,75	10,25
19	-	10,5
21	-	10,25
23	-	10,0
25		10,25
27		9,75
29		11,25
<b>Среднее значение</b>	<b>6,8±1,27</b>	<b>9,96±0,46</b>

\*диагностикум 1- сенсбилизация эритроцитов с использованием хлорида хрома (III); \*\*диагностикум 2 – сенсбилизация за счет ковалентной иммобилизации инсулина

На основании приведенных в таблице 2 данных сделан вывод о том, что достоверное количественное определение ИСБ в реакции РПГА в системе с ковалентной пришивкой эритроцитов возможно более длительное время, чем при использовании классического диагностикума.

**С использованием предложенного диагностикума исследована зависимость концентрации связывающих инсулин**

**белков крови от степени тяжести течения сахарного диабета типа I.** Обследовано четыре группы добровольцев: 1 группа 30 здоровых доноров 25-35 лет, 2 группа пациентов (30 человек), не страдающих сахарным диабетом (находились на стационарном лечении с другими диагнозами), 3 группа больных сахарным диабетом, с удовлетворительной компенсацией нарушений углеводного обмена (значения гликемии не превышают 8,0 ммоль/л), 4. группа больных сахарным диабетом в стадии декомпенсации. Показано, что среднее значение  $\log_2$  ИСБ в первых двух группах практически совпадает и составляет соответственно  $8,60 \pm 0,7$  и  $8,62 \pm 0,72$ , в то время как в 3 и 4 группах значение показателя было достоверно ниже:  $3,82 \pm 0,42$  в группе с удовлетворительной компенсацией диабета и  $3,98 \pm 0,38$  в группе больных в стадии декомпенсации (рисунок 3).



**Рисунок 3.** Концентрации связывающих инсулин белков крови 1- в группе 30 здоровых доноров 25-35 лет; 2 – в группе пациентов (30 человек), не страдающих сахарным диабетом; 3 - в группе больных сахарным диабетом, с удовлетворительной компенсацией нарушений углеводного обмена; 4 - в группе больных сахарным диабетом в стадии декомпенсации.

Обращает на себя отсутствие различий в концентрации ИСБ в группах больных диабетом с разной степенью тяжести заболевания. Вероятно, это объясняется невозможностью восстановления

нормального транспорта инсулина за счет обычной заместительной терапии.

Методом корреляционного анализа показано отсутствие достоверной зависимости между концентрацией связывающих инсулин белков и %ГГб ( $r = 0,21$ ,  $p < 0,05$ ). Вероятно, отсутствие этой взаимосвязи является результатом нормализующего действия на углеводный обмен терапии инсулином, снижающей средний уровень гликемии независимо от длительности заболевания и эффективности доставки инсулина к тканям.

Методом корреляционного анализа (программа Statistica for Windows 5,5) установлена достоверная обратная зависимость ( $r = -0,58$ ,  $p < 0,05$ ) между количеством связывающих инсулин компонентов и сроком заболевания сахарным диабетом. Достоверной зависимости между титром ИСФ и возрастом обследованных не выявлено ( $r = 0,15$ ,  $p < 0,05$ ).

Таким образом, инсулинсвязывающая активность сыворотки больных сахарным диабетом первого типа достоверно ниже этого показателя у здоровых доноров, причем количество связывающих инсулин белков (ИСБ) продолжает снижаться при увеличении срока заболевания. Установлены пределы нормальных значений логарифма концентрации связывающих белков крови. Минимальное значение показателя в крови здоровых доноров составило 5,2 максимальное – 11. Вероятно, что эти значения могут быть рекомендованы в качестве пределов нормальных значений концентрации связывающих инсулин белков в крови человека при использовании предложенного метода определения. Достоверного различия показателя в группах больных диабетом с разной степенью тяжести заболевания не выявлено, следовательно, метод не может быть использован в качестве дополнительного при оценке степени тяжести течения сахарного диабета.

**Ранее было показано** (Гарипова и др. 2009), что одно из нарушений транспорта инсулина при сахарном диабете заключается в изменении соотношения вклада в транспорт гормона двух транспортных систем: эритроцитарной и сывороточной, было установлено, что роль эритроцитарного транспорта возрастает. Мы предположили, что в качестве дополнительного показателя, отражающего степень нарушения транспорта инсулина при сахарном диабете типа I, может быть рекомендован метод определения

коэффициента распределения инсулина между плазмой крови и эритроном.

**Таблица 3**

**Значения коэффициентов распределения инсулина между плазмой крови и эритроном**

<b>Группа обследованных</b>	<b>Поверхность эритроцитов</b>	<b>Плазма</b>	<b>Коэффициент распределения эритроциты/ плазма</b>
Здоровые доноры (n=30)	<b>33,03±1,66%</b>	<b>66,97±1,56%</b>	<b>0,49±0,0132</b>
Больные диабетом в стадии компенсации заболевания (n=30)	<b>35,80±1,25%*</b>	<b>65,17±1,56%*</b>	<b>0,54±0.0159</b>
Больные диабетом в стадии декомпенсации заболевания (n=30)	<b>41,96±1,84% *</b>	<b>58,04 ±1,42%*</b>	<b>0,73±0,0165</b>

Проведено экспериментальное сравнение коэффициентов распределения инсулина между плазмой крови и эритроном в крови здоровых доноров и больных диабетом в стадиях компенсации и декомпенсации. Среднее значение коэффициента распределения инсулина между эритроном и плазмой в пробах крови больных диабетом составило  $0,73 \pm 0,0065$ , то есть было достоверно выше аналогичного показателя, определенного в пробах крови здоровых доноров (таблица 1,  $t=2,176$ ,  $p=0,036$ ). С поверхностью эритроцитов было связано в норме от 25% до 34% инсулина, что соответствует критериям нормы для коэффициента распределения от 33% до 51%. Заслуживает внимания факт достоверного различия средних значений показателя в группах с компенсированным (I) и декомпенсированным (II) заболеванием (таблица 3). На основании

сравнения использования для оценки нарушений транспорта инсулина при помощи двух показателей – концентрации связывающих инсулин белков и коэффициентов распределения инсулина, был сделан вывод о большей информативности второго показателя. Возможно, полученный результат объясняется более медленным падением концентрации ИСБ по сравнению с процессом изменения состава белков транспортирующего инсулин комплекса, зависящим от присутствия в крови пациента белков острой фазы воспалительной реакции, которые с большей долей вероятности присутствуют в крови пациентов с некомпенсированным заболеванием, при котором часты различные осложнения, сопровождающиеся развитием воспалительной реакции. Ранее установлено (Гарипова и др., 2009), что транспортирующие инсулин белки плазмы крови при физиологических значениях рН формируют транспортный комплекс, ядро которого в норме формируют альбумин,  $\alpha$ - фетопротейн и трансферин. Показано, что при сахарном диабете первого типа альбумин и  $\alpha$ - фетопротейн замещаются в транспортирующем инсулин комплексе сыворотки крови белком острой фазы воспалительной реакции кислым  $\alpha_1$ - гликопротеином. Возможно, при компенсации сахарного диабета в связи со снижением риска развития воспалительных процессов снижается концентрация  $\alpha_1$ - гликопротеина в сыворотке крови, что приводит к нормализации состава транспортных белков в инсулинтранспортирующем комплексе и восстановлению нормального значения коэффициента распределения инсулина между плазмой крови и эритроном. Причем это восстановление происходит ранее восстановления нормальных концентраций инсулинтранспортирующего комплекса сыворотки крови (по данным, приведенным выше, концентрация связывающих инсулин белков достоверно не различается при разных степенях тяжести течения сахарного диабета типа I).

### **Оценка иммуномодулирующих свойств компонентов сыворотки, связывающих инсулин**

Выявление в составе связывающих инсулин белков  $\alpha$ - фетопротейна и орозомукоида (Гарипова и др., 2008) послужило основанием для изучения иммуномодулирующих свойств



Таблица 4

Концентрации противодифтерийных антител в опытной и контрольной группах мышей

Результат титрования в РПГА		
Контроль ( $\log_2$ )	Опыт 1( $\log_2$ )	Опыт 2( $\log_2$ )
5	3	5
6	3	5
6	3	5
7	3	5
8	3	5
6	3	5
7	3	5
8	3	5
6	4	8
7	4	7
7	4	6
8	4	6
6	4	7
7	4	5
7	4	6
7	4	6
6	4	7
5	4	8
5	5	7
8	5	6
7	5	6
6	5	5
6,44±0,39	3,76±0,31	6,20±0,34
$t_1 = 10,55, \quad p < 0,05$		$t_2 = 1,43 \quad P = 0,159$

$t_1$  - значение критерия Стьюдента при сравнении контроля и опыта 1;

$t_2$  – величина критерия Стьюдента при сравнении контроля и опыта 2

связывающих инсулин белков здоровых доноров и больных сахарным диабетом.

Исследование проведено на модели иммунизации белых лабораторных мышей дифтерийным анатоксином. Проведена иммунизация трех групп белых лабораторных мышей: двух опытных и контрольной. Мышей всех групп трехкратно иммунизировали дифтерийным анатоксином. В опыте 1 мышей иммунизировали анатоксином с добавлением инсулинсвязывающих гликопротеидов, выделенных из сывороток крови здоровых доноров, в опыте 2 – при добавлении аналогичной фракции из крови больных сахарным диабетом. Полученные антисыворотки к дифтерийному анатоксину оттитрованы в реакции пассивной гемагглютинации с эритроцитарным диагностикумом, выявляющим антитела к дифтерийному анатоксину. Результаты представлены в таблице 4. Как следует из приведенных данных, среднее значение титра антител к дифтерийному токсину в опыте 1 достоверно ниже этого показателя, определенного в контроле.

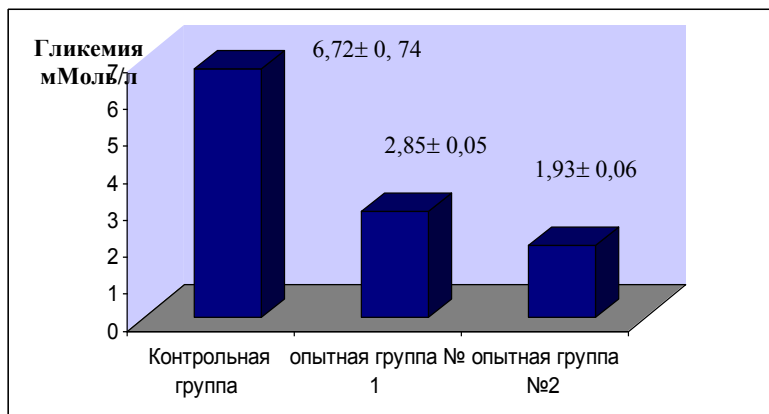
Среднее значение титра в опыте 1 составило  $3,76 \pm 0,31$ , в контроле -  $6,44 \pm 0,39$  (различие достоверно с  $p < 0,05$ ,  $t = 10,55$ ). Можно предположить, что состав транспортных молекул, формирующих комплекс с гормоном в плазме крови, определяет реакцию иммунной системы на инсулин и определяет вероятность развития аутоиммунной реакции на этот гормон. Доступность инсулина для связывания с клеточными рецепторами клеточных мишеней и длительность его присутствия в сыворотке, очевидно, также могут определяться свойствами гликопротеидов, входящих в состав транспортного комплекса. Концентрация противодифтерийных антител в опыте 2 составила  $6,20 \pm 0,34$  по сравнению с  $6,44 \pm 0,39$  в контроле ( $t_2 = 1,43$ ,  $p = 0,159$ ). Следовательно, достоверного влияния связывающих инсулин белков крови больных сахарным диабетом на концентрацию антител к дифтерийному анатоксину не выявлено. На основании экспериментальных данных сделан вывод об отсутствии у связывающих инсулин белков крови больных сахарным диабетом способности подавлять иммунный ответ к транспортируемым гормонам. Однако, вопрос о наличии у ИСБ больных сахарным диабетом свойств, влияющих на поведение гормона в процессе его транспорта в крови и представления чувствительным клеткам, заслуживает дальнейшего изучения.

Полученные данные позволяют предположить, что в норме транспортные белки выполняют функцию защиты инсулина от распознавания клетками иммунной системы и контролируют его взаимодействие с клетками-мишенями, что предотвращает развитие аутоиммунных реакций на инсулин.

### **Исследование гипогликемических эффектов двух транспортных форм инсулина**

В связи с существованием двух транспортных форм инсулина: гормона, транспортируемого в составе сывороточного комплекса транспортных белков и гормона, связанного с рецепторами поверхности эритроцитов, представляет интерес исследование вопроса о степени выраженности гипогликемического эффекта, вызываемого инсулином в каждой из указанных фракций.

Проведено экспериментальное сравнение действия инсулина в каждой из транспортных форм на уровень гликемии белых лабораторных мышей. Исследование проводили на трех группах животных, в каждую из которых входило по 50 мышей весом 20-25 г. Определены значения концентрации глюкозы в венозной крови контрольной группы животных, не получавших инъекцию инсулина, и двух опытных групп. В опытной группе №1 животным вводили по 1 единице инсулина (человеческий генно-инженерный инсулин ХУМУЛИН Р производства фирмы Lilly France S.A.), в 0,5 мл 50% взвеси мышинных эритроцитов, в опытной группе №2 – такую же дозу инсулина в комплексе с белками 0,5 мл гепаринизированной плазмы мышинной крови. Взятие крови и определение глюкозы проводили через 30 минут после инъекции. В контрольной группе мышей среднее значение гликемии составило  $6,72 \pm 0,74$  ммоль/л. Концентрация глюкозы в крови мышей, получавших инсулин в комплексе с эритроцитами, составила  $2,85 \pm 0,057$  ммоль/л, в группе мышей, получавших инсулин в комплексе с белками мышинной плазмы –  $1,93 \pm 0,064$  ммоль/л (рисунок 4).



**Рисунок 4.** Влияние двух транспортных форм инсулина на уровень гликемии.

Таким образом, уровень гликемии в группе мышей, получавших ту же дозу инсулина в комплексе с эритроцитами, был достоверно выше ( $p=0,034$ ), чем у мышей, получавших инсулин с белками плазмы мышинной крови. Возможно, это связано с более медленным освобождением инсулина из эритроцитарного депо. Вероятно, более выраженная гликемия в группе №2 может объясняться также меньшей емкостью сывороточного депо, приводящей к более высокой концентрации свободного гормона при инъекции.

\*\*\*\*\*

Предложен комплекс методов диагностики сахарного диабета, позволяющий наряду с определением интегральных уровней глюкозы за длительный период выявить также нарушение транспорта инсулина в крови пациентов. Этот комплекс включает определение процентного содержания гликозилированной формы гемоглобина на сорбенте с иммобилизованной мета-аминофенилбороновой кислотой с повышенной, по сравнению с аналогами, стабильностью, а также определение концентрации инсулинсвязывающих белков сыворотки крови и коэффициента распределения инсулина между плазмой крови и поверхностью эритроцитов. Новая модификация аффинного метода определения гликозилированной формы гемоглобина позволяет снизить себестоимость определения этого показателя за счет увеличения кратности

использования порции аффинного сорбента. Методы оценки состояния системы транспорта инсулина в крови обследуемых применимы как при первичной постановке диагноза, так и при определении риска возможных осложнений, обусловленных нарушениями доставки инсулина к периферическим тканям. Таким образом, методы определения концентрации связывающих инсулин белков плазмы крови и определения коэффициента распределения инсулина между плазмой и эритроном наряду с определением гликозилированной формы гемоглобина предоставляют лечащему врачу дополнительную информацию, позволяющую оптимизировать лечение пациентов и ускорить постановку первичного диагноза.

### **ВЫВОДЫ**

1. Разработан метод синтеза аффинного сорбента для количественного определения гликозилированной формы гемоглобина на основе силикагеля, отличающийся от сорбентов на основе Сефарозы, полиакриламида и поливинилового спирта повышенной стабильностью.
2. Показано, что эритроцитарные диагностикумы с ковалентной пришивкой инсулина позволяют достоверно определять концентрацию связывающих инсулин белков крови в течение 30 дней, и могут быть рекомендованы для использования в клинических лабораториях.
3. Установлены, пределы нормальных значений концентрации связывающих инсулин белков в крови человека (при использовании метода РПГА – от  $\log_2 5$  до 11), достоверного различия показателя в группах больных диабетом с разной степенью компенсации заболевания не выявлено.
4. Показано, что значения коэффициентов распределения инсулина между эритроном и плазмой крови достоверно различаются как при сопоставлении значений в крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом, так и при сопоставлении больных в стадии компенсации и декомпенсации. Установлены пределы нормальных значений предложенного показателя (31% - 51%).
5. Показано, что гипогликемическое действие инсулина менее выражено при его введении лабораторным животным в

комплексе с эритроцитами, по сравнению с применением гормона в комплексе с белками плазмы, что, вероятно свидетельствует о значительной буферной емкости эритроцитарного депо инсулина.

6. Установлено, что белки, формирующие комплекс с инсулином в крови здоровых доноров оказывают иммуносупрессорное действие.

## **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. М.И. Гарипова, Т.В. Моругова, Н.А. Киреева, Р.И. Ибрагимов, А.С.Першина, О.С. Елисеева, М.В. Баранова. Аффинное выделение и изучение состава связывающих инсулин белков сыворотки крови человека. Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2010. - № 8. - С.40-44.
4. 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.

### **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., Першина А.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 пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». -Пушино.-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 пушкинская 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. О.С. Елисеева, А.С. Першина. Инсулинтранспортрующие 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.-2009.-с.69-72.

**ПЕРШИНА Альбина Сабирьяновна**

**Биотехнологические аспекты разработки методов  
диагностики сахарного диабета типа I**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

*Лицензия на издательскую деятельность  
ЛР № 021319 от 05.01.99 г.*

Подписано в печать 13.05.2011 г. Формат 60x84/16.  
Усл. печ. л. 1,38. Уч.-изд. л. 1,44.  
Тираж 100 экз. Заказ 283.

*Редакционно-издательский центр  
Башкирского государственного университета  
450074, РБ, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32.*

*Отпечатано на множительном участке  
Башкирского государственного университета  
450074, РБ, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32.*