

СУЛЕЙМАНОВА МАРЗИЯ ХАЖИЕВНА

**РАЗРАБОТКА АФФИННОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА**

03.00.23 – биотехнология

03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в Институте биологии и Институте органической химии Уфимского научного центра Российской академии наук

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
Басченко Игорь Анатольевич

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор
Зарудий Феликс Срульевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Башкатов Сергей Александрович

доктор биологических наук, профессор
Чемерис Алексей Викторович

Ведущая организация: Центр биоинженерии РАН, Москва

Защита состоится « 20 » декабря 2006 г. в 14:00 часов на заседании Регионального диссертационного совета КМ 002.136.01 при Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, Уфа, проспект Октября, 69.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, Уфа, проспект Октября, 69.

Автореферат разослан « 10 » ноября 2006 г.

Ученый секретарь

Регионального диссертационного совета,

кандидат биологических наук

_____ Р.В.Уразгильдин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований. Аффинные сорбенты с использованием иммобилизованной аминокислоты (АФБК) позволяют выделять биополимеры, содержащие *цис*-диольные группы, например, нуклеозиды, гликопротеины, нуклеиновые кислоты, моносахариды, биологически активные вещества [Остерман, 1985; Дин и др., 1988]. Монослой производного АФБК на ферментном электроде применяют для определения глюкозы [Zayats and Katz, 2002], как сенсор моносахаридов [Lee et al., 2002], для ингибирования липазы [Raghavendra, 2002]. Сорбент с иммобилизованной ФБК используется при испытании лекарственных средств на активность растворимой и связанной с мембраной дофамин- β -гидроксилазой [Markoglou, 2002], удалении кетоз из реакционной смеси, содержащей альдозы [Dukler и Freeman, 2001], стерическом блокировании адгезии клеток с биологическими тканями [Winblade et al., 2002], при экстракции нуклеозидов из мочи [Kim et al., 2001].

Преимущества использования аффинных сорбентов очевидны, поэтому их применение ежегодно расширяется. Однако, несмотря на широкий выбор носителей, реагентов для иммобилизации, проблема поиска, разработки и исследования новых аффинных сорбентов является одной из актуальных задач биотехнологии. В рамках национальной программы «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006-2015 г.г.» один из проектов направлен на совершенствование лабораторной диагностики в стране.

В настоящее время сахарный диабет является глобальной медико-социальной проблемой. По данным ВОЗ, сахарным диабетом страдает 2-5 % населения всего мира, т.е. более 150 млн. человек. Заболеваемость и общее число больных во всех странах мира ежегодно увеличивается на 5-10 % [Аметов, 2005; Kordonouri and Danne, 1999; King et al., 1998; Keen and Pickup, 1999; Stratton et al., 2006]. После сердечно-сосудистых (51 %) и онкологических заболеваний (17 %) сахарный диабет занимает третье место (6 %) по инвалидизации и смертности населения в мире. К числу наиболее тяжелых

последствий диабета относятся слепота, ампутация конечностей вследствие гангрены, поражение сердечно-сосудистой системы, почечная недостаточность, высокая перинатальная смертность и врожденные аномалии развития [Дедов и соавт., 2004; Балаболкин и соавт., 2006; Justin and McCrary, 2006].

Разработка методов ранней диагностики нарушений углеводного обмена сопряжена с поиском новых скринирующих биомаркеров, одним из которых является гликозилированный гемоглобин (HbA_{1C}). Величина HbA_{1C} представляет собой интегральный показатель уровня гликемии [Древаль, 2000; Дмитриев и соавт., 2005; Светликов и соавт., 2005] за период, определяемый временем полужизни эритроцита в кровотоке (90-120 дней), и не подвержен резким колебаниям в течение короткого промежутка времени, что характерно для уровня глюкозы в крови. В настоящее время интерес к применению показателя HbA_{1C} для диагностики диабета возрос [Жестовский и соавт., 2005; Моисеев, 2005; Недосугова, 2005], однако широкое использование этого надежного параметра в клиниках сдерживается из-за сложности методов его определения. Анализ существующих методов определения HbA_{1C} показывает, что аффинные методы являются одними из наиболее перспективных и разрабатываемых областей биотехнологии.

Цель работы. Создание аффинной тест-системы на основе высокомолекулярных соединений с иммобилизованной *мета*-аминофенилбороновой кислотой для многократного количественного определения гликозилированного гемоглобина.

Для достижения намеченной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Синтезировать сорбенты с использованием различных материалов в качестве матрицы (агарозы, макропористого стекла, полиакриламидного геля) с иммобилизованной *м*-АФБК и оценить их эффективность.
2. Определить оптимальные параметры синтеза аффинного сорбента с иммобилизованной *м*-АФБК на основе полиакриламидного геля.
3. Исследовать влияние температуры на сорбционную активность аффинного сорбента.

4. Разработать методику многократного количественного определения HbA_{1C} в крови человека аффинной тест системой.

5. Определить степень корреляции уровня гликозилированного гемоглобина с содержанием глюкозы в крови.

6. Испытать аффинную тест-систему по определению гликозилированного гемоглобина на образцах крови здоровых доноров, больных сахарным диабетом и онкологическими заболеваниями.

Научная новизна. Разработан новый метод иммобилизации *m*-АФБК на полиакриламидном сорбенте путем активации матрицы гидразин-гидратом с последующей обработкой глутаровым альдегидом. Синтезирован новый широкопористый аффинный сорбент с иммобилизованной *m*-АФБК, пригодный для многократного количественного определения HbA_{1C} . Разработана аффинная методика количественного определения HbA_{1C} , позволяющая выявлять ранние и латентные формы нарушений углеводного обмена у человека в микроколоночном исполнении.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработан метод синтеза широкопористого полиакриламидного аффинного сорбента с иммобилизованной *m*-АФБК путем активации его гидразин-гидратом с последующей обработкой глутаровым альдегидом.

2. Определены условия получения аффинного сорбента с достаточным содержанием лиганда для выделения гликозилированного гемоглобина.

3. Аффинный сорбент с иммобилизованной *m*-АФБК на основе ПААГ пригоден для многократного количественного определения HbA_{1C} в крови человека.

4. Разработана методика многократного количественного анализа HbA_{1C} .

5. Тест-система на основе модифицированного ПААГ с иммобилизованной *m*-АФБК пригодна для проведения массовых скрининговых исследований и обладает следующими преимуществами: 1) высокой специфической емкостью; 2) достаточной механической прочностью, необходимой для микроколоночного варианта проведения анализов; 3) биологической инертностью; 4) воспроизводимостью результатов.

Практическая значимость. Аффинный сорбент с иммобилизованной м-АФБК на основе модифицированного ПААГ может быть использован для контроля эффективности лечения сахарного диабета, в скрининге ранних и латентных форм сахарного диабета. Разработанная нами аффинная тест-система в форме диагностического набора микроколонок с сорбентом и комплекта буферов можно использовать в любой клинической лаборатории. Аффинная тест-система не уступает зарубежным аналогам (“Diagnostics Glycated Hemoglobin [HbA_{1c}]”, фирмы “Sigma”, США), но в то же время экономически более выгодна ввиду того, что каждая микроколонка позволяет произвести определение HbA_{1c} многократно (7 циклов).

Внедрение в практику результатов исследований осуществлено в работу эндокринологического отделения Республиканской клинической больницы, поликлиник №№ 8, 13, 21 г. Уфы, Уфимского НИИ глазных болезней, клинко-диагностической лаборатории Республиканского онкологического диспансера.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на II и III съездах биохимического общества РАН (Пушино, 1997), на симпозиуме «Биохимия – медицине» (Санкт-Петербург, 2002), на Российском научном форуме «Современные технологии лабораторной диагностики нового столетия» (Москва, 2002), 1-ой Всероссийской научной internet-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и механики многофункциональных систем» (Уфа, 2002), на конференциях биохимиков Урала, Поволжья и Западной Сибири «Актуальные проблемы прикладной биохимии и биотехнологии» (Уфа, 1998), биохимиков Урала, Поволжья и Западной Сибири «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии» (Челябинск, 1999), «Современные методы диагностики» (Барнаул, 1999), «И.П. Павлов и современные проблемы биологии и медицины» (Уфа, 1999), «Безопасность – 2000: проблемы прогнозирования, предотвращения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций» (Уфа, 2000), «Биология – наука 21-го века» (Пушино, 2002), «Актуальные проблемы технических, естественных и гуманитарных наук» (Уфа, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 18 работ, в т.ч. 1 статья в рецензируемом журнале, 1 статья в печати.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 135 страницах, содержит 24 таблицы, 18 рисунков, 6 схем. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 285 источника (137 отечественных и 148 зарубежных).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность проблемы исследований, сформулированы цели и задачи работы, показана научная новизна, теоретическая и практическая значимость проводимых исследований.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Содержит анализ литературы по методам диагностики нарушений углеводного обмена, социально-экономической значимости проблемы. Основной акцент сделан на методах аффинной хроматографии. Приводится историческая справка по применению методов диагностики сахарного диабета. Уделено внимание биохимии неферментативного гликозилирования протеинов, взаимосвязи диабета и рака. Изучение литературных источников показало, что, несмотря на широкий выбор реагентов для аффинной хроматографии, проблема поиска высокоэффективного аффинного сорбента для определения гликозилированного гемоглобина остается актуальной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При разработке АС для химической модификации матрицы сорбента использовали гранулированную агарозу (“Ferak”, Германия); реактивы фирмы “Reanal” (Венгрия): МПС-1500, «Акрилекс-350», акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, персульфат аммония, N,N,N,N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), глутаровый альдегид; *мета*-аминофенилбороновая кислота (“Sigma”, США), реактивы отечественного производства: эпихлоргидрин (х.ч.), этиловый спирт (96 %-ный), натрия боргидрид (NaBH₄), КОН, NaOH, соляная кислота концентрированная (х.ч.). Буферные системы были приготовлены из

отечественных реактивов марки «х.ч». Для идентификации активных групп были использованы реактив Несслера, реактив Шиффа (фуксинсернистая кислота), при определении степени замещенности в геле активных групп - 2,4,6-тринитробензолсульфонат натрия (ТНБС) («х.ч.»).

При разработке аффинной тест-системы для количественного определения HbA_{1c} было проведено исследование по содержанию среднесуточной глюкозы в крови и определений HbA_{1c} у более 300 человек, включая здоровых доноров, пациентов Уфимского НИИ глазных болезней, Республиканского онкологического диспансера, Республиканской детской клинической больницы.

Физико-химические методы. Определение pH растворов стеклянным электродом проводили на отечественном pH-метре «pH-340», измерение оптической плотности растворов осуществляли на спектроколориметрах “Spekol-11” фирмы Carl Zeiss Jena (Германия). Определение содержания эпокси групп в активированной агарозе проводили по реакции между оксирановым кольцом и тиосульфатом натрия [Туркова, 1980]. Альдегидные группы в смывах сорбента контролировали цветными реакциями с реактивом Несслера и реактивом Шиффа.

Биохимические методы. Определение содержания в крови глюкозы проведено общепринятыми методами в условиях клинических контрольно-диагностических лабораторий. Аффинное определение гликозилированного гемоглобина проводили на гемолизатах крови здоровых доноров, больных СД, раком. Гемолизат готовили из капиллярной крови, взятой из пальца (0,2 мл).

Математические методы. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием методов вариационной статистики пакета компьютерных программ “Statistica-5”, “Excel 8,0”. Достоверность различия определяли с помощью критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$ [Лакин, 1990].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

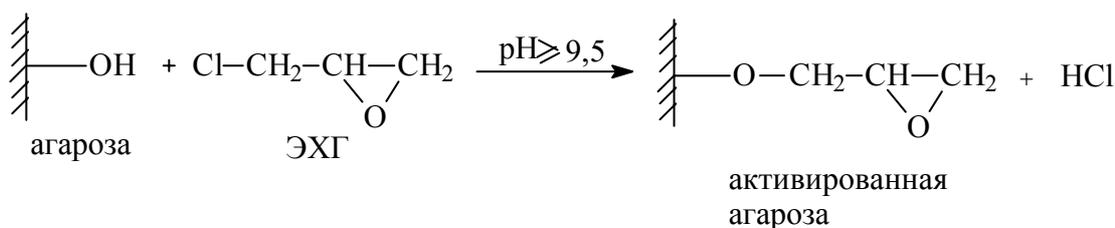
Проблема получения различных сорбентов для аффинной хроматографии

тесно связана с разработкой носителей аффинных сорбентов. Для придания материалу матрицы необходимых для хроматографии свойств его модифицируют.

1. Получение аффинного сорбента на основе модифицированной агарозы с иммобилизованной *m*-АФБК

Агароза является линейным полисахаридом. Ее элементарным звеном служит дисахарид агаробиоза [Остерман, 1985]. Агароза гидрофильный материал с крупными порами и весьма жесткой матрицей, что обеспечивает хорошую скорость потока. Синтез аффинного сорбента с дигидроксисборильными группами на основе агарозы, предназначенный для количественного определения HbA_{1C} в крови, включает две стадии (схема. 1).

I. Активация агарозы эпихлоргидрином



II. Иммобилизация лиганда на активированный агарозный гель:

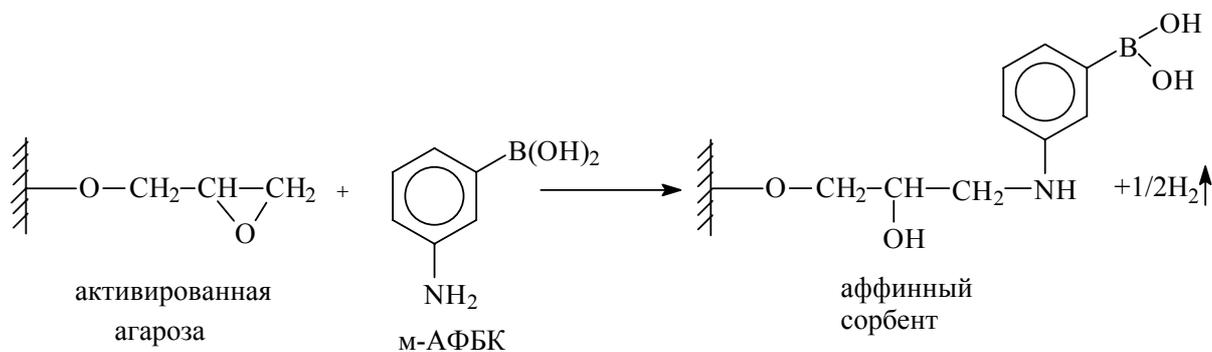


Схема. 1. Получение аффинного сорбента с иммобилизованной *m*-АФБК на основе агарозы.

Гранулированная агароза предварительно набухала в воде. К 10 см³ агарозного геля добавляли 20 мл раствора NaOH (1 М) и 2 мл эпихлоргидрина. Активированный полимер прогревали на водяной бане при температуре 60°С 2 ч., затем сорбент промывали 50 мл 1 М карбонатного буфера (рН 9,5) и доводили 0,1 н. раствором хлористоводородной кислоты до значения рН 7,0.

К активированному агарозному гелю немедленно добавляли 10 мл раствора *m*-АФБК (1%-ный) и оставляли на связывание при температуре 4°C на 24 ч. Затем отмывали полученный сорбент карбонатным буфером (10 мл), выдерживали 2 ч при комнатной температуре и ставили на 48 ч. в холодильник. Сорбент в дальнейшем использовали для определения $\text{HbA}_{1\text{C}}$.

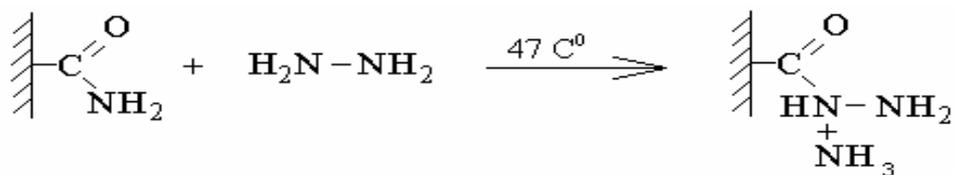
2. Синтез аффинного сорбента на основе полиакриламидного геля

Выбор ПААГ в качестве материала матрицы для нового аффинного сорбента обусловлен его свойствами: стабильностью в диапазоне pH 1-10; ПААГ не содержат заряженных групп, и поэтому ионообменные взаимодействия с хроматографируемыми веществами минимальны; биологически инертный и вследствие этого не подвержен микробной атаке. Синтез аффинного сорбента состоит из 4 стадий (схема 2).

Гидразидные производные ПААГ (**I**) были получены воздействием 6 М раствора гидразингидрата на ПААГ в течение 5-7 ч. при температуре 47°C (схема 2, а), затем их отмывали дистиллированной водой до отрицательной реакции в смывах на альдегиды и уравнивали 0,2 М натрий-фосфатным буфером (pH 7,4). Последующая активация **I** 25 %-ным раствором глутарового альдегида в течение 24 ч. при температуре 37°C способствовало тому, что в мягких условиях (pH 7,4-7,6) между **I** и молекулой глутарового альдегида образуется двойная связь, активированная соседством альдегидной группы (схема 2, б). Модифицированную матрицу, активированную глутаровым альдегидом, - (**II**), отмывали дистиллированной водой с последующим контролем смывов на отсутствие альдегидных групп. Затем **II** помещали в натрий-фосфатный буфер (pH 9,3).

Для иммобилизации лиганда на **II** (схема 2, в) предварительно готовили раствор: 820 мг *m*-АФБК растворяли в 1 мл 96 %-ного этилового спирта, 35 мл 0.1 н. карбонатного буфера (pH 9,3) и 5 мл 1 н. NaOH. Отбирали 40 мл из приготовленной смеси растворов и смешивали с 40 мл **II**, после сосуд с сорбентом ставили на инкубацию в темное место при температуре 20°C на 17 ч.

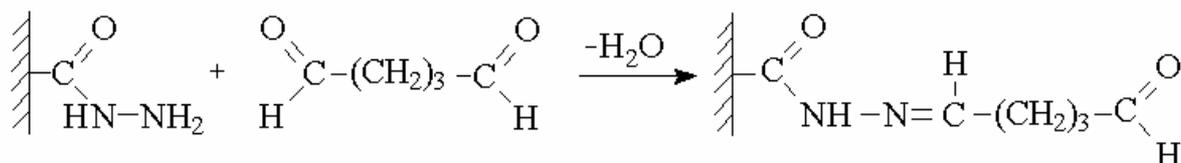
А



ПААГ Гидразингидрат

I

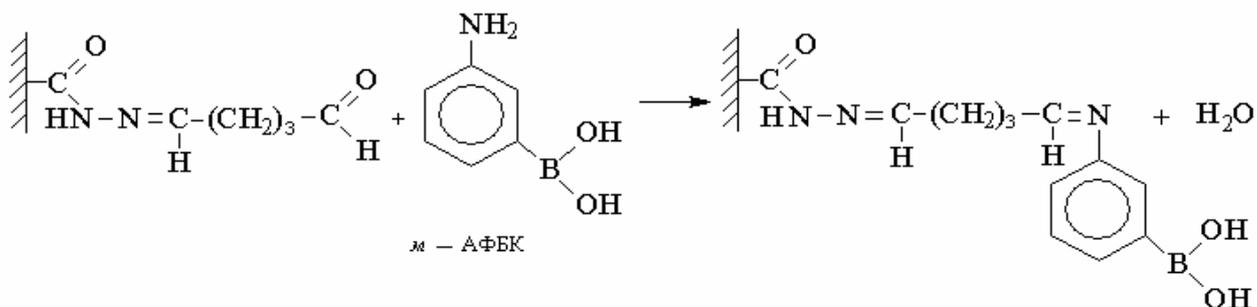
Б



I глутаровый альдегид

II

В



Г

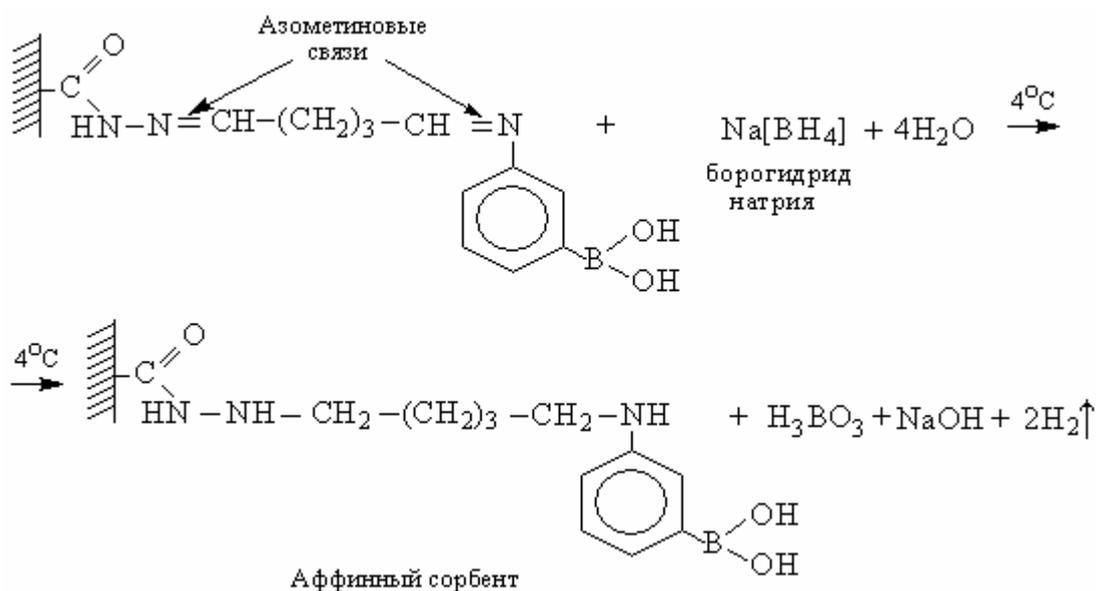


Схема 2. Стадии синтеза аффинного сорбента:

А – получение гидразидного производного ПААГ; Б – активация матрицы глутаровым альдегидом; В – иммобилизация лиганда; Г – стабилизация азометиновых связей в сорбенте.

Иммобилизацию лиганда завершали добавлением раствора борогидрида натрия (2 %) и выдержкой при температуре 4 °С в течение 2 ч для стабилизации азометиновых связей (схема 2, г). Сорбент готов.

3. Поиск оптимальных параметров синтеза и оценка эффективности аффинного сорбента на основе ПААГ

Исследована зависимость соотношений между количеством связавшегося с матрицей лиганда - *m*-АФБК, определенного методами элементного анализа (по бору) и ИК-спектроскопии, и значением рН буфера. Установлено, что оптимальным интервалом значений рН буферного раствора является рН 8,0-9,5 (рис.3).

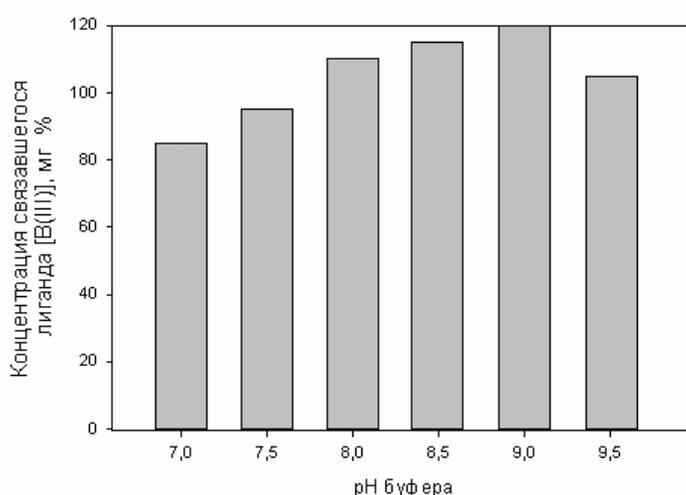


Рис. 3. Зависимость соотношений количества связавшегося с матрицей лиганда (по бору) от значения рН буфера.

В процессе иммобилизации *m*-АФБК на активированном ПААГ была определена зависимость соотношений между концентрацией *m*-АФБК в исходном растворе и количеством связавшегося лиганда в 1 см³ сорбента при рН 9,0 (рис. 4). Установлено, что увеличение концентрации *m*-АФБК больше 20 мг/мл в исходном растворе не приводит к росту количества иммобилизованного лиганда на 1 см³ сорбента.

Было установлено, что для количественного определения NbA_{1c} пригодны сорбенты с содержанием бора не менее 0,05 %. Ограниченное количество определений, которое может быть проведено на одной порции сорбента, вероятно, объясняется постепенным падением специфической емкости

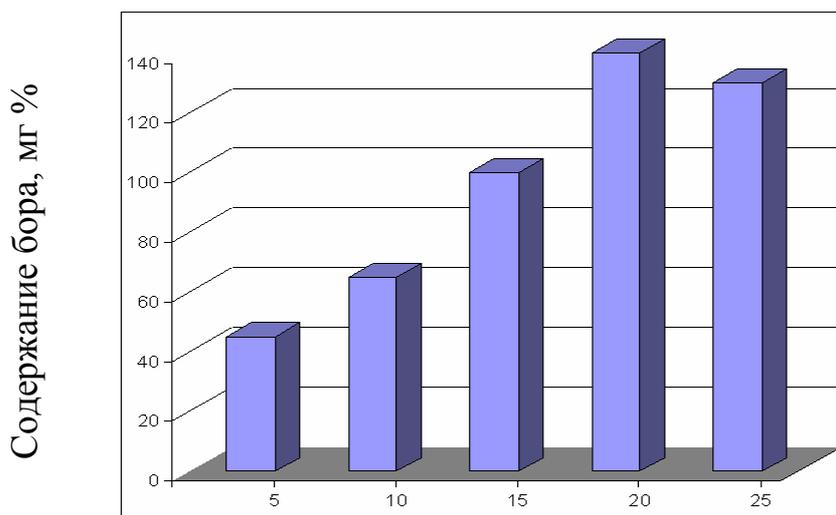


Рис. 4. Зависимость количества связавшейся м-АФБК от концентрации лиганда в исходном растворе при pH 9,0.

сорбента из-за отщепления бора по связи В–С. Это подтверждается данными элементного анализа: в сорбенте с исходным содержанием бора 0,09 % после 12 циклов использования содержание бора в нем падало до 0,01 %. Одновременно

Таблица 1

Воспроизводимость показателей HbA_{1c} на одной порции сорбента*

№ п/п	HbA _{1c} , % (M±m)	p	Цикл использования сорбента	Гемолизат
1	4,26 ± 1,03	<0,01	1	А (здоровый донор)
2	4,24 ± 0,65		4	
3	4,22 ± 1,22		6	
4	4,19 ± 1,40		7	
5	4,17 ± 1,28		9	
6	2,76 ± 1,14	>0,05	11	Б (больной СД)
7	12,54 ± 0,17	<0,01	2	
8	12,50 ± 1,25		3	
9	12,23 ± 1,15		5	
10	12,15 ± 2,16		8	
11	11,85 ± 1,75		10	
12	7,32 ± 2,15	>0,05	12	

*Исходное количество содержания бора в сорбенте 0,08 %.

происходило снижение специфической емкости АС, определяемой по связыванию HbA_{1c} в условиях максимального насыщения сорбента. Увеличение

количества циклов определения снижает емкость сорбента (исходное содержание бора от 0,05 до 0,12 %).

Исследования по воспроизводимости результатов определения HbA_{1c} на одной колонке тест-системы показали, что при проведении более 10 циклов определения HbA_{1c} на одной микроколонке происходит занижение результатов определения (табл. 1), в связи с чем падает статистическая достоверность определения процента HbA_{1c} . При данных условиях нами был сделан выбор на отметке 7 циклов определения HbA_{1c} на одной колонке без риска искажений результатов определения.

Таблица 2

Вариабельность показателя HbA_{1c} при определении на одной микроколонке аффинной тест-системы на основе ПААГ с иммобилизованной *m*-АФБК

Гемолизат крови	Цикл работы	Содержание HbA_{1c} , %	Статистическая обработка
Больной П.	1	19,4	$\bar{x} = 19,1 \%$ $s = 0,61$ $V = 3,2 \%$
	2	19,8	
	3	19,6	
	4	19,5	
	5	18,8	
	6	18,5	
	7	18,2	
Больной Р.	1	13,2	$\bar{x} = 13,5 \%$ $s = 0,60$ $V = 4,4 \%$
	2	14,0	
	3	13,8	
	4	14,3	
	5	13,6	
	6	13,0	
	7	12,6	
Больной С.	1	9,8	$\bar{x} = 9,6 \%$ $s = 0,47$ $V = 4,8 \%$
	2	10,2	
	3	10,0	
	4	9,6	
	5	9,5	
	6	9,3	
	7	8,8	

Примечания: \bar{x} – ср. арифметическое, s – стандартное, отклонение от генеральной совокупности, V – коэффициент вариации.

Наряду с изучением воспроизводимости результатов определения было проведено исследование вариабельности показателя HbA_{1c} , полученного при использовании одной колонки тест-системы на протяжении 7 циклов (табл. 2).

Результаты исследований показали, что использование сорбента на одной микроколонке эффективно на протяжении 7 циклов определения HbA_{1c} , т.к. показатели определения HbA_{1c} в одних и тех же пробах различаются между собой с коэффициентом вариабельности не более 5 %, что говорит о хорошей стабильности сорбента.

Исследования по изучению максимальной емкости сорбента на основе ПААГ при изменении нагрузки гемоглобином позволили установить, что оптимальный объем гемолизата, наносимый на колонку, равен 0,2 мл (рис. 5).

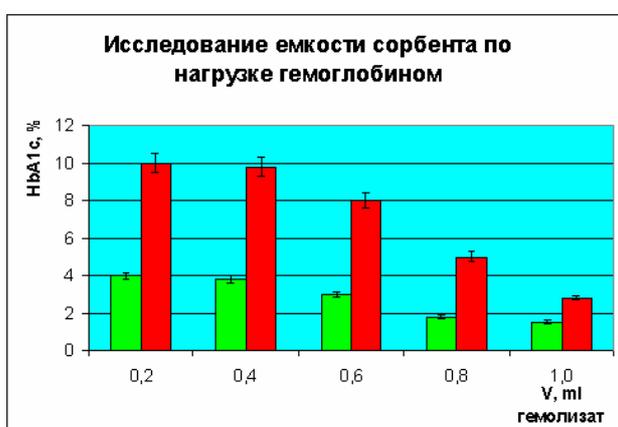


Рис. 5. Определение максимальной емкости сорбента по нагрузке гемоглобином.

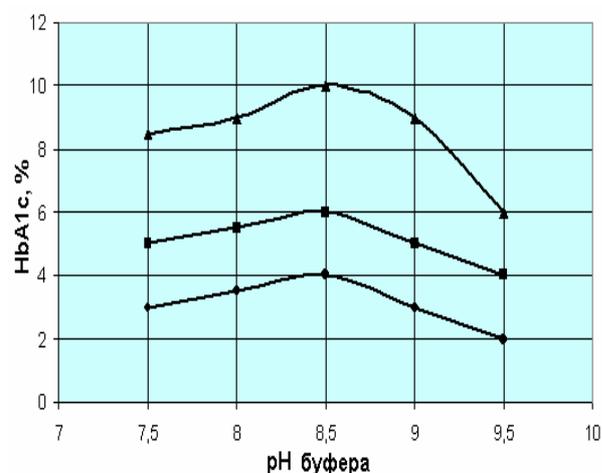


Рис. 6. Зависимость емкости сорбента по HbA_{1c} от pH буфера.

В работе исследовалась зависимость соотношений емкости сорбента по нагрузке HbA_{1c} от значения pH буфера (рис.6) на примере образцов гемолизата крови здорового человека, т.е. не страдающего нарушением углеводного обмена, и больных СД. Установлено, что максимальная сорбция HbA_{1c} осуществляется в буфере при pH 8,5.

Исследования влияния температуры на сорбционную активность при нагрузке HbA_{1c} , показали, что аффинная тест-система на основе ПААГ работает стабильно в широком температурном диапазоне - от 18 до 28 °C (рис.7), в отличие от сорбента типа катионообменника.

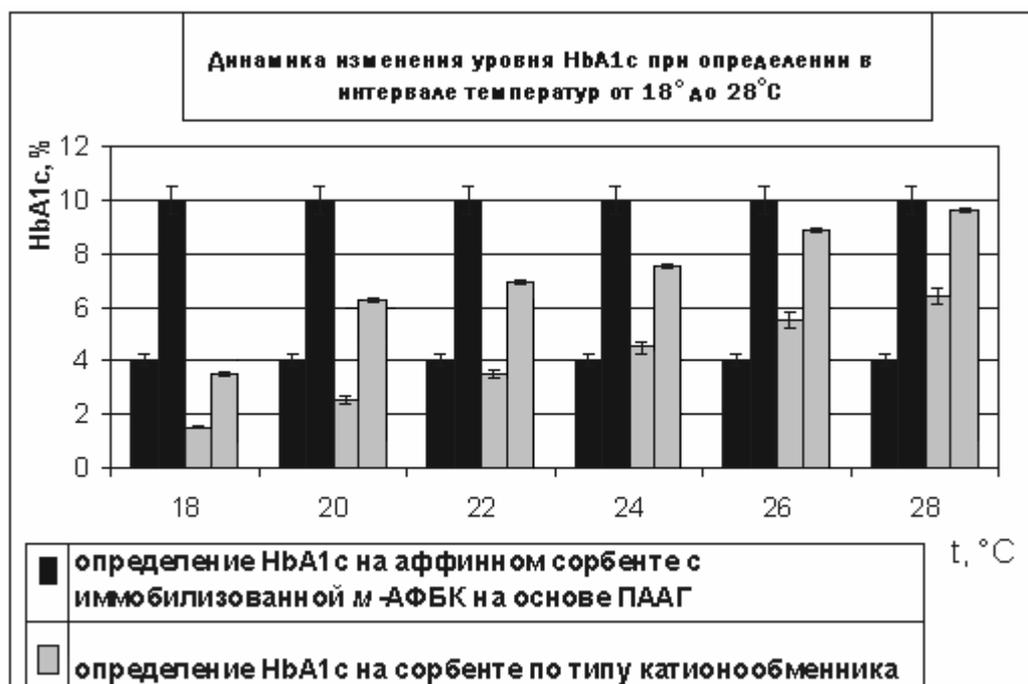


Рис.7. Влияние температуры на сорбционную активность при нагрузке HbA_{1c} сорбента на основе ПААГ с иммобилизованной м-АФБК и сорбента по типу катионообменника.

4. Разработка методики многократного количественного определения HbA_{1c} тест-системой на основе ПААГ с иммобилизованной м-АФБК

1. Приготовление гемолизата. Эритроциты 200 мкл капиллярной крови троекратно отмывали физиологическим раствором на центрифуге в режиме 3000 g по 10 мин. Добавляли 800 мкл дистиллированной воды. Через 5 минут гемолизат центрифугировали (3000 g) 15 мин. для очистки от стромы эритроцитов. Надосадок отбирали в эппендорф.

2. Хроматографическое выделение фракций гемоглобина и гликозилированного гемоглобина. На колонку, содержащую 2 мл АС, уравновешенного 0,025 М натрий-фосфатным буфером при рН 8,5 (буфер А), наносили 0,2 мл гемолизата. После вхождения гемолизата в слой сорбента ток буфера останавливали на 15 минут для аффинного связывания сорбента с HbA_{1c}. Затем на сорбент подавали буфер А и собирали фракцию гемоглобина, не содержащую глюкозных остатков (фракция 1) в количестве 25 мл. На рис.8 представлен хроматографический профиль выделения HbA_{1c}. Для выделения

фракции HbA_{1c} элюировали 25 мл буфера Б, в составе которого содержится конкурирующий с глюкозой сахар – сорбитол.

3. Спектрофотометрическая детекция проводилась в области максимума поглощения гемоглобина, т.е. при 414 нм, благодаря чему присутствие других белков во фракциях не сказывалось на результатах.

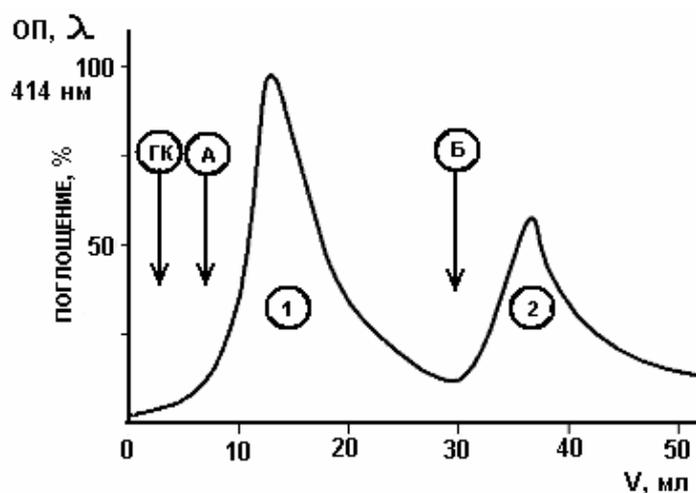


Рис. 8. Хроматограмма выделения гликозилированного гемоглобина
ОП – оптическая плотность, V – объём, ГК – гемолизат крови, А, Б – буферные растворы, 1 – фракция гемоглобина, не содержащая глюкозных остатков, 2 – фракция гликозилированного гемоглобина.

4. Расчет содержания гликозилированного гемоглобина в крови человека.
Процент HbA_{1c} в пробе по отношению к общему содержанию гемоглобина определяли по формуле:

$$\%HbA_{1c} = \frac{ОП_{414}(2) * V(2)}{ОП_{414}(1) * V(1) + ОП_{414}(2) * V(2)} * 100,$$

где: ОП₄₁₄(1) и ОП₄₁₄(2) – оптическая плотность фракций 1 и 2;

V(1) и V(2) – объемы первой и второй фракций.

5. Регенерация колонки тест-системы проводится после каждого цикла определения HbA_{1c}, после 7 цикла колонка утилизируется.

5. Экспериментально-клинические исследования тест-системы для определения HbA_{1c}

5.1. Определение гликемического статуса пациентов поликлиники.

В поликлинике УНЦ РАН исследовали по аффинной методике 100 человек во время прохождения ежегодных медицинских осмотров (табл. 3). Из

них 19 имеют диагноз «сахарный диабет». Причем, у 6 больных значение гликогемиоглобина находилось в пределах нормы. Вероятно, это связано с компенсационной формой сахарного диабета. В то же время среди здорового контингента у 17 человек было обнаружено повышенное содержание HbA_{1c}, тогда как содержание глюкозы в крови находилось в пределах нормы, что расценивается как ранняя диагностика нарушений углеводного обмена. У 4 лиц обнаружено, что и показатель HbA_{1c}, и содержание глюкозы в крови выше нормы, что было выявлено впервые. Таким образом, определение HbA_{1c} с использованием разработанного нами сорбента позволяет провести массовые исследования населения для скрининга ранних нарушений углеводного обмена и контроля гликемии у больных СД для эффективной фармакотерапии.

Таблица 3

Определение уровня HbA_{1c} и содержания глюкозы в крови человека

Здоровый контингент				Больные сахарным диабетом			
Показатели гликемического статуса		Количество обследованных		Показатели гликемического статуса		Количество обследованных	
HbA _{1c} (%)	Глюкоза (мм/л)	n	%	HbA _{1c} (%)	Глюкоза (мм/л)	n	%
		51	62			0	0
		9	11			6	32
		17	22			0	0
		4	5			13	68
Всего обследованных		81	100	Всего обследованных		19	100

Примечание:

-  - норма
-  - выше нормы.

Критерии нормы: HbA_{1c} ≤ 6,0 %; содержание глюкозы в крови 3,33-5,55 мм/л.

5.2. Исследования гликемического статуса больных СД типа 1

Испытания сорбента по определению HbA_{1c} были проведены на образцах

гемолизата крови больных СД типа 1 в стадии компенсации (n=10), больных СД с диабетической ангиоретинопатией и другой офтальмологической патологией (n=20), в том числе в стадии декомпенсации (n=13), в стадии субкомпенсации (n=7), а также группы здоровых людей, т.е. без диагноза СД, (n=10). Для определения HbA_{1c} использовали разработанную нами аффинную тест-систему на основе ПААГ с иммобилизованной м-АФБК, а в качестве контроля применяли тест-систему фирмы “Sigma” (США) (табл. 4).

Таблица 4

Показатели уровня HbA_{1c}, полученные аффинной тест-системой на основе ПААГ, тест-системой фирмы “Sigma” (США), среднесуточной гликемии в крови больных СД в стадии декомпенсации, больных СД в стадии компенсации и здоровых доноров

п/п	контингент обследования	Число обследованных	Среднесуточный показатель гликемии, мм/л	HbA _{1c} , %		
				Тест-система на основе ПААГ	Тест-система на основе агарозы	Тест-система ‘SIGMA’ (США)
1	СД + ДАРП, стадия декомпенсации	13	16,7 ± 2,5*	17,50 ± 1,73*	17,80 ± 1,35*	17,20 ± 1,27*
2	СД + ДАРП, стадия субкомпенсации	7	9,0 ± 1,2	12,30 ± 1,10	13,40 ± 1,50	12,75 ± 1,60
3	СД, стадия компенсации	10	7,2 ± 1,7**	10,65 ± 1,25**	10,15 ± 1,45**	10,28 ± 0,40**
4	Контрольная группа	10	4,5 ± 1,2	4,50 ± 1,36	4,00 ± 1,20	4,72 ± 0,59

Примечания:

* - отличие от группы больных СД в стадии компенсации ($P < 0,01$);

** отличие от группы контроля ($P < 0,01$).

Исследована связь уровня гипергликемии со степенью выраженности и прогрессированием сосудистых поражений органов зрения у пациентов с диагнозом «сахарный диабет» в стадии декомпенсации. Найдена

положительная корреляция уровня HbA_{1c} с содержанием глюкозы в крови: r=+0,96; p<0,001.

5.3. Исследование гликемического статуса у пациентов онкологического диспансера.

Было исследовано 133 образца гемолизатов крови онкобольных с различной нозологией, локализацией и стадией заболевания (Табл. 5). Причем у 10 (7,5 %) пациентов имелось сопутствующее заболевание СД типа 1 в стадии декомпенсации. Всего среди онкобольных имели повышенный уровень HbA_{1c} 14,3 %. Отмечено, что у 30,1 % пациентов показатель HbA_{1c} находится ниже физиологической нормы, в основном, они являются больными с поражением органов кроветворной системы. Показано, что лишь у 55,6 % обследованных пациентов уровень HbA_{1c} находится в пределах физиологической нормы.

Таким образом, при определении уровня HbA_{1c} обнаружено, что весьма существенный контингент (44,4 %) онкобольных имеют нарушение углеводного обмена. При проведении массовых исследований уровень HbA_{1c} ниже нормы может быть рассмотрен как один из сигналов к более глубокому обследованию для профилактики онкозаболеваний.

Таблица 5

Общая картина гликемического статуса онкобольных (n=133)

№ группы	Гликемический статус			Число обследованных		Локализация онкологической патологии
	Уровень	HbA _{1c} , %	Глюкоза, мМ/л	n	%	
1	Выше нормы	6,1-10,0	5,6-10,8	19	14,3	Рак молочной железы, гинекология
2	В пределах нормы	4,0-6,0	3,3-5,5	74	55,6	Рак печени, органов желудочно-кишечного тракта
3	Ниже нормы	2,5-3,9	3,0-3,2	40	30,1	Рак почек, кожи, органов кроветворения

Заключение

Конструирование и использование сорбционных систем на основе

полимерных гидрогелей, способных обратимо реагировать на незначительные изменения внешней среды представляет большой теоретический и практический интерес. Аффинный сорбент, полученный на основе МПС, ввиду высокой неспецифической сорбции, нами был отклонен от клинических испытаний. Аффинный сорбент на основе активированной эпихлоргидрином агарозы может использоваться для определения HbA_{1c} . Однако легкая сжимаемость, приводящая к уменьшению объема сорбента, вызванная особенностью вторичной структуры агарозы, характеризующейся наличием линейных полисахаридных цепей без ковалентной поперечной сшивки, приводит к существенным и необратимым изменениям структуры, что препятствует к созданию сорбента для многократного количественного определения HbA_{1c} . Аффинная тест-система на основе модифицированного ПААГ пригодна для многократного количественного определения HbA_{1c} . Простота синтеза, доступность реагентов позволяют использовать аффинную тест-систему на основе модифицированного ПААГ с иммобилизованной *m*-АФБК для проведения массовых исследований для скрининга таких заболеваний как сахарный диабет и рак.

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод синтеза аффинного сорбента с иммобилизованной *m*-АФБК на основе широкопористого ПААГ путем активации его гидразин-гидратом с последующей обработкой глутаровым альдегидом для количественного определения HbA_{1c} .

Показано, что новый аффинный сорбент на основе модифицированного ПААГ обладает большей эффективностью, чем сорбент с иммобилизованной *m*-АФБК на основе агарозы, следующими преимуществами: 1) высокой специфической емкостью; 2) стабильностью объема вследствие механической прочности структуры полимера; 3) биологической инертностью; 4) простотой синтеза, 5) воспроизводимостью результатов.

2. Оптимальными параметрами синтеза аффинного сорбента с

иммобилизованной *m*-АФБК на основе ПААГ с достаточным содержанием лиганда для выделения гликозилированного гемоглобина являются:

- концентрация *m*-АФБК в исходном растворе при иммобилизации составляет 20 мг/мл на 1 см³ модифицированного ПААГ;

- диапазон буфера при иммобилизации лиганда составляет pH 8 -9,5.

3. Разработана методика многократного количественного анализа HbA_{1C}. Показано, что на одной микроколонке можно произвести до 7 циклов определения HbA_{1C} при содержании бора в сорбенте не менее 0,05 %.

4. Аффинная тест-система для количественного определения HbA_{1C} на основе модифицированного ПААГ работает в широком температурном диапазоне – от 18 до 28 °С.

5. Показано, что уровень HbA_{1C} коррелирует с содержанием глюкозы в крови ($r=0,96$; $p<0,001$).

6. Анализ результатов клинико-экспериментальных исследований гликемического статуса у здоровых (контроль), больных сахарным диабетом и онкологической патологией показал:

1). В группе контроля (здоровые по СД) у 5 % ($n=4$) впервые выявлен повышенный показатель как уровня HbA_{1C}, так и содержания глюкозы в крови;

2). В группе больных СД установлена связь уровня HbA_{1C} со степенью выраженности и прогрессированием сосудистых поражений органов зрения.

3). Среди онкобольных ($n=133$) выявлено нарушение углеводного обмена у 44,4 % ($n=59$) пациентов: уровень HbA_{1C} ниже физиологической нормы зафиксирован у 30,1 % ($n=40$); повышенный показатель уровня HbA_{1C} - у 14,3 % ($n=19$); в пределах нормы - лишь у 55,6 % ($n=74$).

7. Аффинная тест-система для количественного определения HbA_{1C} обладает следующими преимуществами перед тест-системой фирмы “Sigma” (США): высокая воспроизводимость результатов ($p<0,01$), большая кратность использования колонки (7 циклов), коэффициент вариабельности не превышает 5 %.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Басченко И.А., Гарипова М.И., Сулейманова М.Х., Монаков Ю.Б., Зарудий Ф.С., Давлетов Э.Г. Разработка аффинного метода определения гликозилированного гемоглобина в крови человека. //Здравоохранение Башкортостана, № 6, 1997. С. 54-56.
2. Басченко И.А., Сулейманова М.Х., Зарудий Ф.С. Монаков Ю.Б., Сафарова В.Г. Аффинный метод определения гликозилированного гемоглобина в крови человека на полиакриламидном сорбенте с иммобилизованной м-аминофенилбороновой кислотой.//Мат. стендовых сообщений 2 съезда биохимического общества РАН. Пущино, 1997, ч.2. - С. 403.
3. Сулейманова М.Х., Басченко И.А., Зарудий Ф.С., Давлетов Э.Г., Монаков Ю.Б. Изучение свойств сорбента с иммобилизованной м-аминофенилбороновой кислотой, предназначенного для определения гликозилированного гемоглобина в крови человека //Материалы Конференции биохимиков Урала, Поволжья и Западной Сибири «Актуальные проблемы прикладной биохимии и биотехнологии». - Уфа,1998. - С. 240-242.
4. Басченко И.А., Сулейманова М.Х., Вавилова О.В., Даутова З.А. Определение гликогемоглобина аффинным методом у больных инсулинзависимым сахарным диабетом и с офтальмологической патологией //Материалы конференции биохимиков Урала, Поволжья и Западной Сибири, посвященной 70-летию со дня рождения Р.И. Лифшица «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии». Челябинск, 1999. С. 10-12.
5. Басченко И.А., Сулейманова М.Х., Зарудий Ф.С. Сравнительный анализ аффинного и колориметрического методов определения гликозилированного гемоглобина в крови человека //Сб. по материалам Всероссийской научно-практической конференции «Современные методы диагностики». Барнаул, 1999. С. 195-196.
6. Басченко И.А., Сулейманова М.Х., Сафарова В.Г., Монаков Ю.Б. Аффинный метод определения гликозилированного гемоглобина //Республиканская научная конференция «И.П. Павлов и современные проблемы биологии и медицины». Уфа, 1999. С. 59.
7. Сулейманова М.Х., Басченко И.А., Монаков Ю.Б., Зарудий Ф.С., Сафарова В.Г., Зайдуллин И.С. Аффинный метод определения гликозилированного гемоглобина в системе мер по защите населения от чрезвычайных ситуаций и их последствий. //Материалы Всероссийской научно-технической конференции «Безопасность – 2000. Проблемы прогнозирования, предотвращения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций». Уфа, 2000. С. 44-46.
8. Басченко К.И., Сулейманова М.Х. Аффинный метод определения гликозилированного гемоглобина в крови человека. – В сборнике тезисов по материалам 6-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука 21-го века». Пущино, 2002. - С. 50.

9. Сулейманова М.Х., Басченко И.А. Определение гликозилированного гемоглобина аффинным методом - В сборнике тезисов докладов по материалам симпозиума «Биохимия – медицине» на 3 съезде биохимического общества. Санкт-Петербург, 2002, с. 137-138.
10. Сафаргалеева Р.З., Сафарова В.Г., Сулейманова М.Х. Аффинный и колориметрический методы определения гликогемоглобина. – В сборнике докладов Межвузовской научной студенческой конференции УГНТУ. Уфа, 2002, с. 10-12.
11. Сулейманова М.Х., Басченко И.А., Ганцев Ш.Х. Определение содержания гликозилированного гемоглобина в крови онкобольных. //В сб. тезисов по материалам Российского научного форума «Современные технологии лабораторной диагностики нового столетия». Москва, 2002, с. 177.
12. Сафаргалеева Р.З., Сафарова В.Г., Сулейманова М.Х., Басченко И.А. Разработка методов определения гликозилированного гемоглобина в крови человека. – Материалы 1-ой Всероссийской научной INTERNET-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и механики многофазных систем». Секция «Био и органическая химия, биотехнология». Уфа, 2002. <http://www.conf/rusoil.net/publika-zii.htm> № 15.
13. Сулейманова М.Х., Басченко И.А., Сафарова В.Г., Хасанова Э.Р. Случаи пониженного содержания гликозилированного гемоглобина в крови онкобольных. – Там же, № 17.
14. Сулейманова М.Х., Басченко И.А., Давыдович М.Г., Зайдуллин И.С. Скрининг гликемического статуса больных сахарным диабетом, отягощенных офтальмологической патологией, методом количественного определения гликозилированного гемоглобина на аффинном сорбенте. – Сборник материалов Межвузовской научно-технической конференции «Актуальные проблемы технических, естественных и гуманитарных наук», УГНТУ, Уфа, 2006, с. 367-369.
15. Сулейманова М.Х., Басченко И.А., Давыдович М.Г., Сафарова В.Г. Применение аффинного сорбента на основе агарозы с иммобилизованной м-аминофенилбороновой кислотой для скрининга ранних и скрытых форм нарушений углеводного обмена. – Там же, с. 366-367.
16. Сулейманова М.Х., Басченко И.А., Зарудий Ф.С., Монаков Ю.Б. Новый аффинный сорбент для определения гликозилированного гемоглобина в ранней диагностике нарушений углеводного обмена. //Химико-фармацевтический журнал. - 2006, т. 40, № 7, с. 41-44.
17. Сулейманова М.Х., Басченко И.А., Монаков Ю.Б. Влияние температуры на сорбционную активность аффинного сорбента с иммобилизованной м-аминофенилбороновой кислотой. //Башкирский химический журнал. 2006, т. 13, № 4.