

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПРОИНСУЛИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

[А. В. Зубова¹](#), [О. Н. Потеряева^{1,2}](#), [Г. С. Русских²](#), [М. М. Геворгян³](#)

¹ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава
России (г. Новосибирск)

²ФГБУ «Научно-исследовательский институт биохимии» СО РАМН (г. Новосибирск)

³ФГБУ «Научный центр клинической и экспериментальной медицины» СО РАМН
(г. Новосибирск)

Нарушение конверсии проинсулина в инсулин при сахарном диабете 2 типа является одной из причин нарушения углеводного обмена различной степени выраженности. Целью исследования являлись оптимизация метода определения проинсулина в сыворотке крови и определение концентрации проинсулина у больных сахарным диабетом 2 типа. Изучали взаимосвязи между концентрацией проинсулина и уровнями глюкозы, гликозилированного гемоглобина в зависимости от стадии компенсации углеводного обмена при сахарном диабете 2 типа. У больных в стадии декомпенсированного диабета наблюдали повышение концентрации проинсулина и глюкозы по сравнению с аналогичными показателями больных в стадии компенсированного диабета. Измерение концентрации проинсулина может являться важным диагностическим критерием, который позволяет судить о степени компенсированности диабета.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, проинсулин.

Зубова Анна Владимировна — старший преподаватель, аспирант кафедры медицинской химии ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: Annaf07@list.ru

Потеряева Ольга Николаевна — доктор медицинских наук, профессор кафедры медицинской химии ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБУ «Научно-исследовательский институт биохимии», г. Новосибирск, e-mail: Olga_Poteryaeva@mail.ru

Русских Галина Сергеевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии ФГБУ «Научно-исследовательский институт биохимии», г. Новосибирск, e-mail: Russkikh_g@soramn.ru

Геворгян Маргарита Маиловна — кандидат биологических наук, заведующий клинико-биохимической лабораторией ФГБУ «Научный центр клинической и экспериментальной медицины», г. Новосибирск, e-mail: Olga_Poteryaeva@mail.ru

Введение. Биосинтез инсулина является многоступенчатым процессом [1]. Первый шаг — биосинтез препроинсулина (11,5 kDa, 110 аминокислотных остатков), следующий шаг — синтез проинсулина (ПИ), который образуется на микросомах в β -клетках островков Лангерганса в течение 1-2 мин. Полипептидная цепь ПИ включает 86 аминокислотных остатков (9,39 kDa) [2]. В молекуле ПИ пептидные цепи А и В соединены линейным пептидом, так называемым С-пептидом, состоящим из 33-х аминокислот и расположенным между карбоксильным концом В-цепи и аминокислотным концом А-цепи. С-пептид способствует спиральному свертыванию молекулы и приближению обеих линейных цепей для облегчения образования бисульфидных связей. Это происходит в элементах комплекса Гольджи, где инсулин «свертывается» в гранулы и до поступления в кровь накапливается β -клетками в виде цинкосодержащего гексамера [1, 3]. Превращение ПИ в инсулин происходит непосредственно в момент секреции β -клетками под действием протеолитических ферментов. ПИ теряет С-терминальный фрагмент от А-цепи и существует в промежуточной форме (интермедиат — I) и от В-цепи (интермедиат — II). При полном отщеплении С-пептида ПИ конвертируется в инсулин, который одновременно с С-пептидом в эквимолярном количестве попадает в кровь [2, 4]. Процесс ферментативного отщепления С-пептида от ПИ может продолжаться от 30 мин до 1 ч [5].

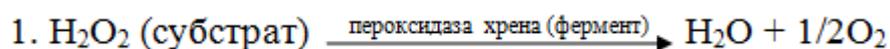
Содержание ПИ в гранулах может составлять 2-6 % от содержания инсулина и С-пептида, в крови человека ПИ циркулирует в очень низких концентрациях [1]. В случае нарушения конверсии ПИ в инсулин (недостаточность соответствующих протеаз) в циркуляцию будет поступать большое количество ПИ, что может сопровождаться нарушением углеводного обмена различной степени выраженности [6].

Целью исследования являлись оптимизация метода определения ПИ в сыворотке крови и исследование концентрации ПИ у больных сахарным диабетом 2 типа (СД 2 типа).

Материалы и методы. Сыворотка крови была получена у больных СД 2 типа, которые проходили лечение в клинике Научного центра клинической и экспериментальной медицины СО РАМН. Диагноз был поставлен в соответствии с критериями Комитета экспертов ВОЗ по сахарному диабету (1999). Контрольную группу составили 16 условно здоровых человек. Исследование проведено в соответствии с этическими нормами Хельсинской декларации (2000). У всех пациентов получено письменное информированное согласие на проведение обследования.

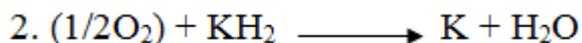
Для определения концентрации ПИ в образцах сыворотки крови использовали наборы иммуноферментного анализа (ИФА) для определения интактного ПИ человека (BioVender, Чехия). ИФА проводился «сэндвич»-методом (рис 1). В качестве индикаторного фермента использовалась пероксидаза хрена.

При работе фермента осуществляется пара сопряженных реакций:



Собственно ферментативная реакция протекает без видимых проявлений. Под действием кислорода происходит 2-я стадия окислительного превращения красителя

из восстановленной формы (KH_2) в окисленную (К) и окрашенную:



Визуализация ферментативной реакции проводилась красителем (3,3', 5,5'-тетраметилбензидин — ТМВ). Цветные продукты реакции измеряли на микропланшетном фотометре для ИФА Stat Fax 2100 (Awareness technology Inc, США) при длине волны 450 нм.

Ход определения: к моноклональным антителам (АТ) к ПИ человека, иммобилизованным на 96-луночном планшете (рис. 1А), добавляли по 100 мкл стандартных растворов (калибровочных растворов) с известным содержанием ПИ (1,0; 2,5; 8,0; 15,0; 40,0; 100 пмоль/л), контрольных сывороток с низким и высоким содержанием ПИ и исследуемых образцов (рис. 1Б). В качестве контрольной пробы использовали раствор блокирующего буфера. Планшет с пробами инкубировали в течение 30 мин при 25 °С с использованием шейкера. Несвязавшиеся компоненты удаляли трехкратным отмыванием в растворе (Wash Solution — WS), pH 7,2-7,4. Затем к комплексу АТ—АГ (антитело-антиген) (рис. 1Б) добавляли по 100 мкл моноклональных АТ к ПИ меченых ферментом (рис. 1В). Пробы инкубировали в течение 1 часа при 25 °С, не связавшиеся компоненты трижды отмывали в растворе WS. Далее к комплексу добавляли по 200 мкл субстратного буфера, содержащего раствор ТМВ (рис. 1Г) и перекись водорода. Смесь инкубировали 15 мин в темном месте при комнатной температуре с использованием шейкера. Для остановки ферментативной реакции использовали 100 мкл Stop Solution. Цветные продукты реакции (рис. 1Г) измеряли на микропланшетном фотометре для ИФА Stat Fax 2100 (Awareness technology Inc, США) при длине волны 450 нм.

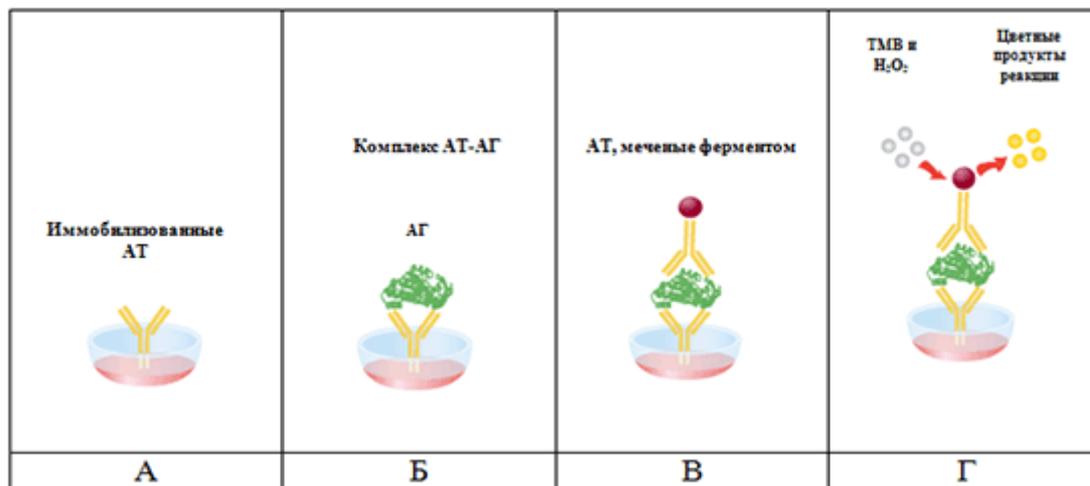


Рис. 1. Твердофазный ИФА, «сэндвич»-метод

Биохимические показатели крови (глюкоза, гликозилированный гемоглобин) измеряли на автоанализаторе КОНЕЛАБ (ТермоЛабСистем, США).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ STATISTICA (ver. 6.0). Различия между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента и считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение. Калибровочные кривые для ПИ представлены на рис. 2. Рабочий режим метода приходился на линейный участок кривой от 2,0 до 6,0 пмоль/л. ПИ человека не имеет перекрестной реакции с ПИ и инсулином сыворотки крови млекопитающих (быков, собак, кошек, козлов, хомяков, лошадей,

обезьян, мышей, кроликов, овец), кроме ПИ свиньи [7].

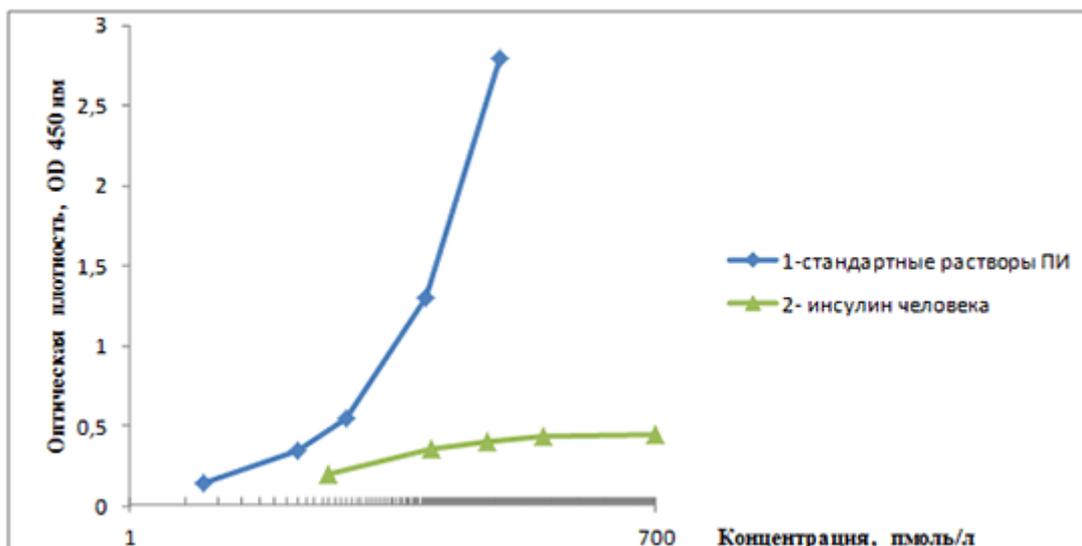


Рис. 2. Калибровочный график для проинсулина человека

В сыворотке крови здоровых лиц ($n = 16$) концентрация ПИ находилась на нижней границе нормы. В группе больных СД 2 типа ($n = 75$) значения ПИ были выше контрольного уровня в 2 раза (табл. 1). Среди больных были выделены 2 основные группы: I группа — 37 человек, у которых концентрация ПИ превышала норму в 3 раза; II группа — 38 человек с концентрацией ПИ в пределах нормы. У больных СД 2 типа I группы наблюдалось достоверное ($P < 0,05$) повышение концентрации ПИ по сравнению со II группой (табл. 1).

Таблица 1

Содержание ПИ в сыворотке крови больных СД 2 типа

Контрольная группа, $n = 16$	Высокий ПИ I группа, $n = 37$	Низкий ПИ II группа, $n = 38$	Общая группа (I и II группы), $n = 75$
$2,56 \pm 1,28$	$7,889 \pm 0,696^*$	$2,253 \pm 0,09^{**}$	$5,033 \pm 0,47$

Примечание: * — $P < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; ** — $P < 0,05$ по сравнению с I и II группами

Кроме того, все больные СД 2 типа были разделены на 3 группы в зависимости от стадии компенсации углеводного обмена при СД 2 типа (табл. 2). Согласно критериям ВОЗ [8], выделяют компенсированный диабет (6,0–6,5 % HbA1c), субкомпенсированный диабет (6,6–7,0 % HbA1c) и декомпенсированный диабет ($> 7,0$ % HbA1c). У больных в стадиях компенсированного и субкомпенсированного диабета сохранялась низкая концентрация ПИ (была в пределах нормальных значений). В стадии декомпенсированного диабета концентрация ПИ была выше нормы в 2,8 раза, в этой же группе (группа III) возрастала концентрация глюкозы по сравнению с группой I в 1,6 раза (табл. 2).

Таблица 2

Содержание ПИ и глюкозы в сыворотке крови больных в зависимости от стадии компенсации углеводного обмена при СД 2 типа

Стадии компенсации углеводного обмена при СД 2 типа	ПИ, пмоль/л	НbA1c, %	Глюкоза, ммоль/л
I группа — компенсированный диабет, n = 25	2,9 ± 0,3*	6,0 ± 0,08**	5,8 ± 0,18***
II группа — субкомпенсированный диабет, n = 10	2,51 ± 0,29	6,71 ± 0,05	7,5 ± 0,26
III группа — декомпенсированный диабет, n = 40	7,0 ± 0,74*	9,0 ± 0,38**	10,0 ± 0,6***

Примечание: * — отличие III группы от I группы достоверно при $P < 0,05$; ** — отличие III группы от I группы достоверно при $P < 0,05$; *** — отличие III группы от I группы достоверно при $P < 0,05$

Ранее нами было сделано предположение, что снижение активности матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови больных СД 2 типа приводит к нарушению отщепления С-пептида от ПИ [9]. Возможно, повышенная концентрация ПИ означает снижение активности инсулина в сыворотке крови, приводящее к высокому уровню глюкозы и повышению процентного содержания гликозилированного гемоглобина (табл. 2). Ранее была установлена отрицательная корреляция между уровнем НbA1c плазмы крови и величиной глюкозостимулированной секреции инсулина [10].

Таким образом, измерение концентрации ПИ является важным диагностическим критерием, который позволяет судить о степени компенсированности диабета. Повышение концентрации ПИ, возможно, свидетельствует о переходе СД 2 типа в СД 1 типа.

Список литературы

- Севергина Э. С. Инсулинзависимый сахарный диабет — взгляд морфолога : монография / Э. С. Севергина. — М.: Видар-М, 2002. — 152 с.
- Инсулин : от открытия до эволюции / О. Е. Ваизова [и др.] // Инсулин инсулинотерапия : учеб. пособие. — Томск: Печатная мануфактура, 2009. — Гл. 1. — С. 2-23.
- Кольман Я. Наглядная биохимия: справочное изд. : пер. с нем. / Я. Кольман, К.-Г. Рем. — 2-е изд. — М.: Мир, 2004. — 469 с.
- Lessons Learned From Molecular Biology of Insulin-Gene Mutations / D. F. Steiner [et al.] // *Diabetes Care*. — 1990. — Vol. 13. — P. 600-609.
- Homeostasis model assessment : insulin resistance and -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man / D. R. Matthews [et al.] // *Diabetologia*. — 1985. — Vol. 28. — P. 412-419.
- Балаболкин М. И. Эндокринология : учебник / М. И. Балаболкин. — 2-е изд., перераб. и доп. — М. : Универсум паблишинг, 1998. — 416 с.
- Мазовецкий А. Г. Сахарный диабет / А. Г. Мазовецкий, В. К. Беликов. — М. : Медицина, 1987. — 285 с.
- Значение индивидуальных целевых показателей НbA1c для оценки гликемического контроля у больных СД2 / И. В. Мисникова, А. В. Древаль [и др.]. // *Сахарный диабет*. — 2014. — № 2. — С. 4-9.
- Потеряева О. Н. Анализ активности матриксных металлопротеиназ и α -1-протеиназного ингибитора в сыворотке крови больных сахарным диабетом 2 типа / О. Н. Потеряева, Г. С. Русских, Л. Е. Панин // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. — 2011. — Т. 152, № 11. — С. 509-510.
- Шаройко В. В. Метаболические и сигнальные пути, контролирующие секрецию

инсулина β -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы, и их роль в норме и при сахарном диабете : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / В. В. Шаройко. — СПб. : СПбГУ, 2011. — 33 с.

IMMUNOFERMENTAL ANALYSIS OF PRO-INSULIN IN BLOOD SERUM AT PATIENTS WITH DIABETES 2 TYPE

A. V. Zubova¹, O. N. Poteryaeva^{1,2}, S. G. Russkikh², M. M. Gevorgyan³

¹SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University» of Ministry of Health (Novosibirsk c.)

²FSBE «SRI of biological chemistry» SB RAMS (Novosibirsk c.)

³FSBE «Scientific center of clinical and experimental medicine» SB RAMS (Novosibirsk c.)

Violation of conversion of pro-insulin into insulin at diabetes 2 types is one of reasons of infringement of carbohydrate exchange of various degree. The objective of research was optimization of a method of definition of pro-insulin in blood serum and determination of concentration of pro-insulin at patients with diabetes 2 types. Interrelations between concentration of pro-insulin and levels of glucose, glycated hemoglobin depending on a stage of compensation of carbohydrate exchange at diabetes 2 types were studied. At patients in a stage of decompensated diabetes observed increase of concentration of pro-insulin and glucose in comparison with similar indicators of patients in a stage of the compensated diabetes. Measurement of concentration of pro-insulin can be important diagnostic criterion which allows to judge upon diabetes compensating degree.

Keywords: diabetes 2 types, pro-insulin.

About authors:

Zubova Anna Vladimirovna — senior teacher, post-graduate student of medical chemistry chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», e-mail: Annaf07@list.ru

Poteryaeva Olga Nikolaevna — doctor of medical science, professor of medical chemistry chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», senior research associate of laboratory of molecular biology at FSBE «SRI of biological chemistry» SB RAMS, e-mail: olga_poteryaeva@mail.ru

Russkikh Galina Sergeevna — candidate of biological science, senior research associate of medical biotechnological laboratory at FSBE «SRI of biological chemistry» SB RAMS, e-mail: Russkikh_g@soramn.ru

Gevorgyan Margarita Mailovna — candidate of biological science, head of clinical biochemical laboratory at FSBE «Scientific center of clinical and experimental medicine» SB RAMS, e-mail: Olga_Poteryaeva@mail.ru

List of the Literature:

1. Severgin E. S. Insulin dependent diabetes — a look of the morphologist: monograph / E. S. Severgina. — M.: Vidar-M, 2002. — 152 P.
2. Insulin: from opening before evolution / O. E. Vaizova [etc.] // Insulin therapy: guidance. — Tomsk: Printing manufactory, 2009. — P. 1. — P. 2-23.

3. Kolman Y. Evident biochemistry: guidance.: translation from Germ. / Y. Kolman, K.-G. Rem. — 2nd iss. — M.: World, 2004. — 469 P.
4. Lessons Learned From Molecular Biology of Insulin-Gene Mutations / D. F. Steiner [et al.] // *Diabetes Care*. — 1990. — Vol. 13. — P. 600-609.
5. Homeostasis model assessment : insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man / D. R. Matthews [et al.] // *Diabetologia*. — 1985. — Vol. 28. — P. 412-419.
6. Balabolkin M. I. Endocrinology: textbook / M. I. Balabolkin. — 2nd prod., rev. and additional — M.: Universum publishing, 1998. — 416 P.
7. Mazovetsky A. G. Diabetes / A. G. Mazovetsky, V. K. Belikov. — M.: Medicine, 1987. — 285 P.
8. Value of individual target indicators of HbA1c for an assessment of glycemic control at patients with diabetes / I. V. Misnikova, A. V. Dreval [etc.]. // *Diabetes*. — 2014. — № 2. — P. 4-9.
9. Poteryaeva O. N. The analysis of activity the matrix metalproteinases and α -1- proteinase inhibitor in blood serum of patients with 2 type diabetes / O. N. Poteryaeva, G. S. Russkikh, L. E. Panin // *Bulletin of exper. biology and medicine*. — 2011. — V. 152, № 11. — P. 509-510.
10. Sharoyko V. V. The metabolic and alarm ways controlling insulin secretion β -cells of Langergans's islands of pancreas and their role in norm and at diabetes: theses. ... *Dr.Sci.Biol.* ? V. V. Sharoyko. — SPb.: SPbSU, 2011. — 33 P.