## Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

Інститут ендокринології та обміну речовин

ім. В.П. Комісаренка АМН України

**МЕЛЬНИЧЕНКО** **Світлана Вітаськівна**

УДК 616.379-008.64:616.153.96-07-097

**ВИДІЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІЛКОВИХ ЧИННИКІВ, ЩО ЗВ’ЯЗУЮТЬ ІНСУЛІН В КРОВІ ЛЮДЕЙ, ХВОРИХ**

**НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ**

14. 01. 14 – ендокринологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2008

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України

**Науковий керівник:** доктор медичних наук **Корпачев Вадим Валерійович,** Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України, завідувач відділу клінічної фармакології та експериментальної фармакотерапії ендокринних захворювань

**Офіційні опоненти:**

доктор медичних наук, старший науковий співробітник **Кравченко Віктор Іванович,** Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка АМН України, завідувач відділу епідеміології ендокринних захворювань

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник **Кучмеровська Тамара Муратівна,** Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, провідний науковий співробітник відділу біохімії коферментів

Захист відбудеться “\_\_\_\_\_” \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2008 р. о \_\_\_\_ год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.26.558.01 з ендокринології в Інституті ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України (04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 69)

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України (04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 69)

Автореферат розісланий “\_\_\_\_\_” \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2008 р.

**Вчений секретар**

**спеціалізованої вченої ради**

**доктор біологічних наук Калинська Л.М.**

# ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Відомо, що існують різні за властивостями типи білків сироватки крові, які зв’я­зу­ють інсулін (БЗІ) [И.С. Халилова и др., 1993; В.В. Корпачев и др., 1994; В.В. Корпачев и др., 1997; Ж.В. Іванова, 1997; F.K. Gorus et al., 1998; T. Sundsten et al., 2005]. Частина з них має аль­­бу­мі­нову природу (синальбумін) або по­діб­на до тран­с­фе­ри­ну, але переважній гру­пі таких білків притаманні влас­ти­вос­ті гло­бу­лінів і, в першу чергу, імуноглобулінів [Л.А. Ляпина и др., 1987; А.А. Жвирблене и др., 1988; Б.А. Кудряшов и др., 1989; M. Fuchtenbusch et al., 2000; P. Achenbach et al., 2004]. Деякі з них у ком­п­лек­сі з інсуліном набу­ва­ють гіперантигенних влас­ти­востей і викликають утворення цілого каскаду ідіотип-анти­і­ді­о­ти­п­них антитіл [R. Root-Bern­s­tel, C. Dobbelstein, 2001]. При лікуванні хворих на цукровий діабет (ЦД) не завжди вдається досягти компенсації порушень вуглеводного обмі­ну. Частково це можна пояснити присутністю в крові білкових чинників, які здатні блокувати дію гормону на початковому етапі спе­цифічного зв’язування його з мем­б­ран­ни­ми ре­цеп­то­ра­ми, що уне­мож­ливлює адекватну регуляцію глікемії та може призводити до інсулінорезистентності [K.F. Federlin, 1993; J. Lahtela N.C. et al., 1997; N.C. Schloot et al., 1997; Y. Yamanaka et al., 1997; M. Kellerer et al., 1999; J.W. Thomas В.В., 2001; Корпачев, 2001; N. Jeandidier et al., 2002; A. Lindholm et al., 2002]. Виділення та аналіз чинників, здатних блокувати фізіологічну дію інсуліну, має важливе значення при дослідженні окремих ланок патогенезу ЦД. Роботи в цьому напрямку проводилися й раніше, але отримані результати мали фрагментарний характер, що не дає змоги зробити обґрунтовані висновки як про природу білкових чинників, які блокують інсулін, так і про вміст їх у крові [Ю.А. Ярошевский и др., 1983; Н.А. Арутюнян и др., 1985; С.К. Вельбери и др., 1987; А.А. Жвирблене и др., 1988]. Останнім часом з’я­­ви­лись дані про те, що в крові но­во­на­роджених дітей виявлено білки невиз­на­че­ної природи, які зв’я­зу­ють інсулін і не належать до глобулінової фра­к­­ції [S.R. Wellik et al., 1995; U. Roll et al., 1996; J.R. Bilbao et al., 1997; B. Lindberg et al., 1999; M.S. Ronkainen, 2001].

Незважаючи на те, що найбільшу гру­пу з зазначених білків складають імуноглобуліни, однак дослідження щодо співвідношення їх з іншими БЗІ не проводились. Для цього необхідно не тільки виділити чинники, які мають властивості зв’я­зу­ва­тись з інсуліном, але й визначити вміст антитіл до екзогенного (ІА) та ендогенного (ІАА) інсуліну, що входять до складу одержаних фракцій. На сьогодні вміст ІА та ІАА зазвичай визначають комерційними імуноферментними (ІФА) або радіоімунними (РІА) тест-системами. Але виявилось, що на даний момент не існує єдиного загальноприйнятого уніфікованого критерію для оцінки вмісту ІА та ІАА. Оскільки кожний розробник вибирає власний спосіб інтерпретації отриманих даних, проблема полягає в тому, що результати, одержані при використанні різних комерційних тест-систем, важко порівняти між собою; більш того: ці результати не завжди співпадають [C.J. Greenbaum et al., 1992; C. Beaufort et al., 1993; P.Y. Bingley et al., 1997; H. Naserke et al., 1999; W. Woo et al., 2000; K.N. Potter et al., 2000; P.W. Mueller et al., 2002; M. Moxness et al., 2003; D. Devendra et al., 2003;]. В Україні подібні тест-системи не виробляються. Це спонукало нас провести виділення білкових чинників, надати їм характеристику та опрацювати власний метод імуноферментного аналізу для визначення антитіл до екзогенного та ендогенного інсулінів і ство­рити на його основі тест-систему “ІФА-АТ-інс”. Застосування такого методу матиме важливе значення при обстеженні людей, хворих на ЦД з частими спонтанними гіпоглікеміями, при визначенні інди­ві­дуа­ль­ної чутливості до препаратів інсуліну, оцінки їх антигенних властивостей, а також для обстеження широкого кола населення з метою ранньої діагностики та прогнозування розвитку ЦД.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація є фрагментом планових наукових досліджень, які проводились у відділі клінічної фармакології та експериментальної фармакотерапії ендокринних захворювань Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Ко­мі­са­рен­ка АМН України: “Вивчити ефективність нових засобів фармакотерапії цукрового діабету” (№ держреєстрації 0100U00916), “Оцінка без­печності пре­па­ратів інсуліну” (№ держреєстрації 0103U004099), “Вивчити особливості стану інсулінорезистентності та дослідити ефективність нових засобів фармакотерапії цукрового діабету” (№ держреєстрації 0104U003258), “Вивчити роль імунологічних факторів в розвитку цукрового діабету І типу з метою розробки патогенетичних схем лікування” (№ держ­реєстрації 0100U003757).

**Мета роботи:** Виділити і охарактеризувати чинники, що зв’язують інсулін в крові людей, та дослідити вміст найбільш важливого з них – ІА та ІАА в сироватках крові хворих на ЦД. Розробити метод гетерогенного твердофазного імуноферментного аналізу для виявлення ІА та ІАА і створити на його основі тест-систему “ІФА-АТ-інс”.

### Завдання дослідження:

1. Виділити білки, що зв’язують інсулін в сироватках крові донорів і хворих на ЦД людей, використовуючи поетапну афінну хроматографію, та провести аналіз отриманих фракцій методами ІФА та електрофорезу в поліакриламідному гелі.
2. Розробити власний метод гетерогенного твердофазного імуноферментного аналізу для визначення вмісту антитіл до екзогенного та ендогенного інсулінів у сироватках крові людей.
3. Визначити діагностичні характеристики опрацьованого імуноферментного методу (чутливість, специфічність, відтворюваність).
4. На основі розробленого методу створити імуноферментну тест-систему “ІФА-АТ-інс” для визначення ІА та ІАА в сироватці.
5. Провести порівняльне дослідження вмісту антитіл до ендогенного та екзогенного інсулінів у сироватках крові здорових людей та хворих на ЦД розробленим імуноферментним методом та комерційними імуноферментними та радіоімунними набо­рами.

*Об’єкт дослідження:* Білкові чинники, що зв’язують інсулін в крові людей.

*Предмет дослідження:*Вміст ІА та ІАА в сироватках крові здорових людей і хворих на ЦД та їх співвідношення з іншими БЗІ.

*Методи дослідження:*У роботівикористано методи афінної хроматографії, гетерогенного твердофазного імуноферментного аналізу, радіоімунного аналізу, електрофорезу в ПААГ та статистичні.

**Наукова новизна.** Розроблено методичні підходи до виділення білкових чинників, здатних зв’язуватись з інсуліном в сироватках крові людей. Встановлено, що використання поетапної афінної хроматографії може бути ефективним для визначення співвідношень білків, які зв’язують інсулін, у крові хворих на ЦД, що дасть змогу диференційовано підходити до розуміння механізмів виникнення деяких випадків інсулінорезистентності. Показано, що при фракціонуванні сироваток крові здорових людей та хворих на ЦД методом поетапної афінної хроматографії виявляються аналогічні фракції БЗІ, які відрізняються кількісним вмістом білка. Встановлено, що до складу інсулінзв’язуючих білків, крім антитіл до інсуліну, входять також білки неімуноглобулінової природи. Показано, що в однакових об’ємах сироваток крові хворих на ЦД і донорів міститься не тільки різна кількість усіх БЗІ, але й різна кількість білків імуноглобулінової природи.

**Практичне значення одержаних результатів:** Розроблено гетерогенний твердофазний імуноферментний метод визначення ІА та ІАА в сироватках крові здорових людей та хворих на ЦД та на його основі ство­рено імуноферментну тест-систему “ІФА-АТ-інс” (**Патент № 57640 А**).

Створена тест-система може бути використана для діагностування інсулінорезистентності при інсулінотерапії, а також, разом з іншими маркерами аутоімунного процесу для прогнозування виникнення ЦД у здорових осіб, які мають близьких родичів, хворих на ЦД, або людей, яких за генетичними ознаками відносять до групи ризику виникнення цього захворювання.

Запропонований спосіб поетапної хроматографії може бути використаний як для визначення співвідношень білків, що зв’язують інсулін, у крові хворих з різними ускладненнями ЦД, так і для розуміння можливої природи цих ускладнень.

**Особистий внесок здобувача:** Автор самостійно провела патентно-інформаційний пошук та проаналізувала значний об’єм наукової літератури за темою дисертації, визначила мету та задачі дослідження. Дисертант самостійно виконала всі біохімічні і радіоімунні дослідження, здійснила статистичну обробку одержаних результатів, узагальнила і провела науковий аналіз отриманих даних, сформулювала основні положення і висновки для наукових публікацій, виступів на конференціях і оформлення дисертації.

Деякі друковані праці за темою дисертації опубліковано у співавторстві з науковим керівником та співробітниками АТЗТ НВК „Діапроф-Мед”.

**Апробація результатів дисертації.** Результати дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на: I з’їзді алергологів України (м. Київ, 2002 р.); VIII Українському біохімічному з’їз­ді (м. Чернівці, 2002 р.); І науково-практичній конференції молодих вчених-ендо­кри­но­логів “Актуальні проблеми клінічної та експериментальної ендокринології” (м. Київ, 2002 р.); ІІ конкурсі науково-технічних проектів “Інтелектуальний потенціал молодих вчених – місту Києву” (2002 р.); науково-прак­тич­ній конференції “Клінічна фармакологія ендокринних захворю­вань” (м. Київ, 2004 р.) та ІХ Українському біохімічному з’їз­ді (м. Харків, 2006 р.).

**Публікації:** Результати дисертації опубліковано в 6 статтях, 8 тезах та в 1 моно­г­ра­фії (1 розділ); отримано 1 деклараційний патент на винахід.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертацію викладено на 142 сторінках друкованого тексту. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, 6 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій. Роботу ілюстровано 27 таблицями та 11 рисунками. Список використаних джерел включає 237 найменувань, з них 59 кирилицею та 178 латиницею.

# ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали та методи дослідження**. У роботі використано сироватки крові людей, хворих на ЦД-1 та ЦД-2, які проходили курс лікування у відділеннях клінічної фармакології та клінічної діабетології Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка, а також сироватки крові здорових людей, що були отримані в Київському міському центрі крові.

Розробленим методом ІФА досліджено вміст ІА та ІАА в сироватці крові 438 хворих на цукровий діабет типу 1 (ЦД-1), 188 хворих на цукровий діабет типу 2 (ЦД-2), яких лікували препаратами інсулінів, та 104 хворих на ЦД-2, які не отримували інсулінів, а також 194 донорів. Крім того, досліджено вміст ІА та ІАА в сироватці крові 130 дітей віком від 5 до 16 років. 35 з них входили до групи ризику захворювання на ЦД-1, 30 дітей були хворі на ЦД-1 та 65 здорових.

Для відокремлення ІА та ІАА від інших білків, що зв’язують інсулін в крові людей проводили поетапну афінну хроматографію сироваток спочатку на сорбентах з напівсинтетичним (“Ho­echst”) або рекомбінантним людським інсуліном (“Eli Lilly), а потім – на сорбентах з білком А (або G). Як тверду фазу використовували АН-агарозу 4В та BrCN-се­фа­ро­зу 4В. Інсуліновий сорбент з BrCN-сефарозою 4В готували за методом [Я. Туркова, 1980]. Ці дослідження проведені в “ручному” режимі та на хроматографі “BioRad” (“Biologic LP”). Отримані хроматографічні фракції досліджували методом електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) [U. Laemmli, 1970] і визначали вміст ІА та ІАА опрацьованим методом ІФА.

Принцип розробленого методу ІФА полягає в тому, що ІА та ІАА з сиро­ватки крові зв’я­зу­ю­ть­ся з інсуліном, фіксованим на полісти­ро­ловому планшеті. З утвореним комплексом антиген-антитіло взаємодіє кон’югат – моноклональні антитіла (МКА) до імуноглобулінів G лю­дини, мічені перок­сидазою хрону. Після вилучення незв’я­за­но­го кон’югату в лунки планшета вносять прояв­ник – розчин, який містить субстрат та один із хромогенів *о*-фе­ні­лен­ді­а­мін (ОФД) або тетраметилбензидин (ТМБ). Оптичну густину (ОГ) кінцевих продуктів субстратно-ферментативної реакції визначали за допомогою ридера “Multiskan EX” (Фінляндія) у двохвильовому режимі: для ОФД – при 492 нм та 620 нм, а дляТМБ – 450 нм та 620 нм. Верхню границю норми – граничне значення (ГЗ) – визначали як середнє значення ве­ли­чин ОГ для сироваток практично здорових людей плюс п’ять зна­чень середньо­квадратичного відхилення. Сироватки, для яких значення ОГ перевищували показник ГЗ, виз­на­чали як позитивні. Враховуючи рекомендації ВООЗ, результати дослідів представляли також у вигляді співвідношення значень ОГ зразків сироваток до ГЗ в системі (ОГ/ГЗ).

Специфічність розробленого імуноферментного методу розраховували за формулою: С = Н / Н+ХП х 100 %, де С – специфічність, Н – кількість негативних результатів ІФА, ХП – кількість хибно-позитивних результатів ІФА [D. Schochetman, S. George, 1992].

Чутливість розробленого імуноферментного методу розраховували за формулою: Ч = П / П+ХН х 100 %, де Ч – чутливість, П – кількість позитивних результатів ІФА, ХН – кількість хибно-негативних результатів ІФА [D. Schochetman, S. George, 1992].

Коефіцієнт варіації (КВ) між результатами визначення ОГ після постановки ІФА в лунках одного планшета та між різними планшетами обчислюють за формулою: КВ = σ / Хсер. x 100 %, де σ – середньоквадратичне відхилення, Хсер. – середнє арифметичне значення ОГ всіх досліджуваних зразків [В.В. Меншиков,1997].

Тест-систему “ІФА-АТ-інс” порівнювали з комерційними наборами для визначення ІА (ІАА): імуноферментним – “Anti-insulin ORG-520” (“ORGen­­tech”, Німеч­чина) та радіоімунним – “IA-AIA CIS biointernational” (Фран­­­ція).

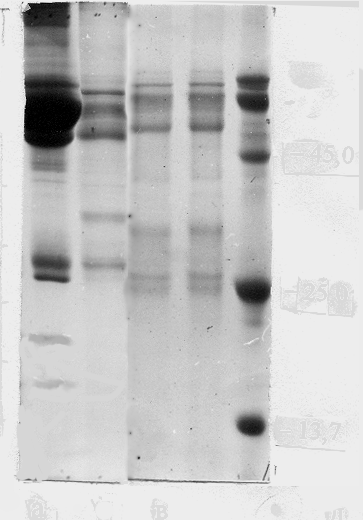
При статистичній обробці одержаних даних використано значення середньої арифметичної, стандартної похибки, середньоквадратичного відхилення. Вірогідність визначали за непараметричним методом статистики з використання критерію χ2 [Бабич П.Н., 2004].

**Результати досліджень, аналіз їх та узагальнення.** Білки, одержані після хроматографії на колонці з інсулін-сефарозним сорбентом сироваток крові донорів і хворих на ЦД-1 та ЦД-2, досліджували методом електрофорезу в 15 % ПААГ за умов відновлення.

На рис. 1 подано типову картину електрофоретичного розподілу білків, що зв’язують інсулін в сироватці крові хворих на ЦД та донорів.

Рис. 1. **Електрофореграма біл­ків сироваток крові в 15 % ПААГ після афінної хрома­то­гра­фії їх на інсулін-сефарозному сорбенті**

Примітки: а – білки, що не сорбуються на інсулін-сефарозному сорбенті; б - білки, отримані з сироватки крові здорових людей; в, г – білки, отримані з сироваток крові хворих на ЦД; д – стандартна суміш білків з різними молекулярними масами: трансферин – 75,0 кДа, альбумін бика – 67,0 кДа, овальбумін – 45,0 кДа, хемотрипсиноген – 25,0 кДа, рибонуклеаза – 13,7 кДа.



- 75,0 - 67,0

- 45,0

- 25,0

- 13,7

г

б

в

д

а

Аналіз електрофореграм дає змогу зробити висновок, що інсулін-сефарозний сорбент вилучає з сироваток крові значну кількість білків, що мають різну молекулярну масу. В результаті проведення поетапної афінної хроматографії сироваток крові хворих на ЦД та донорів показано, що кількість білкових фракцій в елюатах (як від донорських сироваток, так і від хворих на ЦД) коливається від 8 до 10. Проте, слід зазначити, що електрофоретична рухливість окремих білкових фракцій, отриманих з сироваток крові людей, хворих на ЦД, дещо відрізняється від рухомості аналогічних фракцій, виділених з сироваток крові донорів.

Для детальнішого дослідження БЗІ в сироватках крові здорових людей і хворих на ЦД застосовували поетапну афінну хроматографію таких сироваток на сорбентах з інсуліном та білком А (виділяють з Staphylococcus aureus) або білком G (отримують з Streptococcus sp.). Білки А та G мають властивість зв’язуватись з Fc-фрагментом IgG людини, тому використання останніх сорбентів спрямовано на відокремлення білків імуноглобулінової природи від інших БЗІ.

Хроматографічне фракціонування сироваток крові на афінних сорбентах з інсуліном і білком А (або G), показало, що в однакових об’ємах сироваток крові хворих на ЦД і донорів міститься не тільки різна кількість БЗІ, але й різна кількість білків імуноглобулінової природи.

Так, в одному з експериментів з 5 мл сироватки крові від 10 хворих на ЦД-1 на колонці з інсуліном (h = 3 см, d = 1 см) виділено 5,87 мг білків, що зв’язують інсулін, а при розподілі їх на сорбенті з білком А (h = 1,5 см, d = 1 см) – 1,036 мг білків імуноглобулінової природи. У другому дос­ліді, за таких же умов, отримано 5,384 і 0,753 мг білка, відповідно. При дос­лідженні у такий же спосіб 5 мл сироваток крові від 10 донорів одержали 1,83 мг БЗІ, з яких на частку антиінсулінових IgG припадало лише 0,182 мг, тобто майже в 5 разів менше, ніж при виділенні обох типів досліджуваних білків з сироваток крові хворих на ЦД-1.

Цими дослідами показано, що вміст білка в окремих фракціях БЗІ, за умов однотипної постановки хроматографічних та електрофоретичних дос­лід­жень, різний, в залежності від того, одержали їх з сироваток крові здорових людей, чи з сироваток хворих на ЦД.

Подальша робота з розподілу білків сироватки крові від 65 донорів (V=100 мл) та 27 хворих на ЦД-1 (V=25 мл) зазначеним вище методом поетапної хроматографії проводилась з використанням рідинного хроматографа “BioRad”. На рис. 2 представлено профілі елюції білків, що зв’язуються з інсулін-сефа­ро­зою (пік 2 на обох графіках), та рехроматографія їх на сорбенті з білок G-сефарозою (піки 3, 4 на графіках А і В).

При хроматографічному розподілі БЗІ на сорбенті з білок G-сефарозою вдалося відокремити білки, які за молекулярною масою можуть бути окремими ланцюгами IgG (пік 4), від інших БЗІ (пік 3). Після порівняння обох графіків дійшли висновку, що розподіл білків сироваток крові здорових людей і хворих на ЦД-1 на цих сорбентах дуже схожий і відрізняється тільки кількісним вмістом білка в кожній фракції; такий результат може бути обумовлений особливостями вихідного матеріалу.

Рис. 2. **Розподіл білків сироваток крові донорів** (А) **та хворих на ЦД-1** (В) **методом афін­ної хроматографії на хроматографі “Bio Rad”**

# Примітки:

# 1. Білки, які не зв’язалися з інсуліновим сорбентом ;

# 2. Білки, які зв’язалися з інсуліновим сорбентом (елюати з інсулінового сорбенту);

3. Елюати з інсулінового сорбенту, які не зв’язались з білком G;

4. Білки, елюйовані з сорбенту білок G-сефа­ро­за 4В (антитіла до інсуліну)

Всі отримані фракції аналізували методом електрофорезу в 15 % ПААГ (рис. 3).

Рис. 3. **Електрофореграма білків сироваток крові хворих на ЦД-1 в 15 % ПААГ після поетапної афінної хроматографії їх на приладі “Bio Rad” з використанням сорбентів інсулін-сефарози та білок G-сефарози**

Примітки: a – білки, елюйовані з інсулінового сорбенту; б – білки, не сорбовані на білок G-сефарозі; в – білки, сорбовані на білок G-сефарозі; г – стандартна суміш білків з різною молекулярною масою: овотрансферин – 78,0 kDa, альбумін бика – 66,0 kDa, овальбумін – 43,0 kDa, карбоангідраза – 30,0 kDa, 17,0 kDa, цитохром С – 12,0 kDa.



**- 78,0**

**- 66,0**

**- 43,0**

**- 30,0**

**- 17,0**

**- 12,0**

г

в

б

а

З даних електрофореграм видно, що застосування білок G-сефарози дає змогу розподілити БЗІ, отримані з інсулінового сорбенту, на дві фракції. Одна з них, за всіма ознаками, належить до білків імуноглобулінової природи – важких і легких ланцюгів IgG, з молекулярною масою близько 60 та 30 kДa. До складу другої фракції входять інші БЗІ. Електрофореграми білків, здатних зв’язуватись з інсуліном, але не реагувати з білком G (який має властивість з’єднуватись з Fc-фрагментом IgG), налічує значну кількість смуг, найвиразніша з яких розташована в зоні білків з молекулярною масою, притаманною альбумінам (66 kДa). Ще одна смуга, розташована над альбуміновою зоною, відповідає зоні трансферину (78 kДa). З даних літератури відомо, що у хворих на ЦД саме ці білки зазнають змін у кількісному відношенні [T. Sundsten et al., 2005]. Можна також припустити, що окрему групу БЗІ складають фрагменти α-субодиниць інсулінового рецептора з молекулярною масою біля 70 кДа. Що стосується інших БЗІ, які не сорбуються на білок G-сефарозі, то їх ідентифікація потребує подальших досліджень, оскільки для висновку щодо належності окремих смуг у всіх представлених електрофореграмах до певного типу білків необхідні додаткові дослідження їх і перш за все – імуноблотинг з використанням, наприклад МКА до альбуміну, трансферину, окремих фрагментів імуноглобулінів (Fc, Fab) та до інших білків.

Враховуючи те, що значна частина виділених БЗІ за всіма ознаками належить до імуноглобулінів, які відіграють суттєву роль при різноманітних патофізіологічних станах, ми вважали за доцільне дослідити їх детальніше. Це спонукало нас до опрацювання власного методу ІФА для визначення ІА та ІАА в сироватках крові людей. У подальшому цей метод планувалось використати для визначення їх вмісту в усіх білкових фракціях, виділених методом поетапної афінної хроматографії з сироваток крові здорових людей та хворих на ЦД.

При відпрацюванні початкового етапу – зв’язування антигену з твердою фазою, були апробовані планшети типів “PoliSorp”, “MediSorp” та “MaxiSorp” виробництва фірм “Dynatech” і “Nunc”. Ми дійшли вис­новку, що для нашої мети найбільш придатні планшети типу “MediSorp” і всю подальшу роботу проводили з використанням саме цих носіїв.

Для розведення сироваток та блокування неспецифічного зв’язування сироваткових білків із вільними від інсуліну місцями на планшеті використовували розчин знежиреного молока в 0,1 М фосфатно-сольовому буферному розчині з додаванням твіну 20.

При визначенні оптимальної концентрації інсуліну, необхідної для сорбції на твердій фазі, використовували кристалічний напівсинтетичний інсулін людини виробництва фірми “Hoechst”. Показано, що застосування розчину інсуліну з концентрацією 25 мкг / мл є найбільш вдалим, оскільки в цьому випадку співвідношення ОГ всіх позитивних за вмістом ІА сироваток (0,423) до ОГ всіх негативних (0,051) – найкраще (табл. 1). Збільшення концентрації інсуліну в розчинах для сорбції (50 мкг / мл) не призводило до суттєвого поліпшення результатів. Проте, використання інсуліну в високих концентраціях може призвести до нашарування молекул гормону, які під час відмивання зсуваються й частково видаляються разом із промивним розчином (0,1 М фосфатно-сольовий буферний розчин з 0,05 % тритоном Х-100).

Незважаючи на те, що при використанні розчинів з меншим вмістом інсуліну реєструються вищі значення ОГ, іс­нує можливість отримати хибно-позитивні результати за рахунок сорбції ІgG сироватки крові з “вільними” місцями в лунках планшетів (див. результати визначення вмісту ІА в сироватках № 482 і № 468).

Таблиця 1

**Результати визначення антиінсулінових антитіл у сироватках крові здорових людей та хворих на цукровий діабет при використанні різних концентрацій напівсинтетичного інсуліну людини (“Hoechst”) у розчині для сенсибілізації планшетів “Dynatech”**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Сироватки №№ | | Концентрація інсуліну (мкг/мл) | | | | | |
| 0,5 | 1,0 | 5,0 | 10,0 | 25,0 | 50,0 |
| Здорові люди | 7 | 0,058 | 0,037 | 0,022 | 0,022 | 0,021 | 0,022 |
| 185 | 0,321 | 0,290 | 0,157 | 0,101 | 0,052 | 0,046 |
| 482 | **0,769** | **0,774** | 0,182 | 0,099 | 0,068 | 0,061 |
| 468 | **0,476** | **0,499** | 0,135 | 0,078 | 0,063 | 0,061 |
| М ± m | **0,406 ± 0,15** | **0,400** ± 0,16 | 0,164 ± 0,04 | 0,075 ± 0,02 | 0,051 ± 0,01 | 0,048 ± 0,01 |
| Хворі на ЦД | 10 | 0,203 | 0,206 | *0,266* | **0,326** | **0,449** | **0,536** |
| 14 | **0,642** | **0,595** | *0,285* | *0,286* | *0,286* | *0,288* |
| 171 | 0,120 | 0,095 | *0,281* | **0,352** | **0,508** | **0,508** |
| 423 | **0,320** | **0,389** | **0,469** | **0,501** | **0,455** | **0,445** |
| М ± m | **0,321 ± 0,23** | **0,321 ± 0,22** | **0,325 ± 0,10** | **0,366 ± 0,09** | **0,423 ± 0,10** | **0,444 ± 0,11** |
| Тло | | 0,014 | 0,010 | 0,013 | 0,011 | 0,010 | 0,012 |

Примітки: тло – проба без сироватки; жирним шрифтом позначено ОГ, що перевищує граничне значення; курсивом позначено ОГ, що знаходиться в межах граничних значень; результати представлено в одиниця ОГ.

При опрацюванні методу проводились екс­пери­менти, мета яких полягала у з’ясуванні можливості використання інсулінів різного похо­д­ження та виробництва різних фірм для сенсибілізації твердої фази. Це мало суто практичний інтерес, бо дає змогу, у разі потреби, замінити інсулін людини фірми “Hoechst”, на інший – з таким же ефектом. Для цього відібрали кристалічні інсуліни людини та свині, лікарські форми інсулінів, а для порівняння – А21-монодезамідоінсулін (табл. 2).

Як видно з табл. 2, при визначенні вмісту ІА в одних і тих самих сироватках, отримано подібні результати (ОГ/ГЗ негативних зразків від 0,021 до 0,028; ОГ/ГЗ позитивних зразків від 2,61 до 3,61) при використанні всіх інсулінів, крім А21-мо­но­дез­амідоінсуліну (ОГ/ГЗ негативних зразків 0,013, а позитивних – 0,99), що можна пояснити наявністю в нього спе­цифічних антигенних детермінант.

Таблиця 2

**Вміст антитіл до інсуліну у відібраних позитивних та негативних сироватках крові людей за умов сенсибілізації планшетів різними інсулінами**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Зразки | ІНСУЛІНИ (25 мкг/мл) | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| В-к | 0,09 | 0,10 | 0,09 | 0,11 | 0,06 | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 0,06 |
| М-ко | 0,11 | 0,09 | 0,08 | 0,06 | 0,10 | 0,08 | 0,12 | 0,12 | 0,51 | 0,06 |
| 46 | 0,55 | 0,66 | 0,61 | 0,63 | 0,53 | 0,48 | 0,53 | 0,60 | 0,50 | 0,33 |
| 449 | 0,17 | 0,23 | 0,24 | 0,14 | 0,21 | 0,25 | 0,19 | 0,19 | 0,16 | 0,10 |
| 470 | 0,19 | 0,16 | 0,21 | 0,16 | 0,21 | 0,20 | 0,18 | 0,21 | 0,16 | 0,13 |
| 79 | 0,23 | 0,22 | 0,24 | 0,18 | 0,25 | 0,21 | 0,25 | 0,33 | 0,28 | 0,11 |
| М ± m | 0,22 ±  0,07 | 0,24 ± 0,09 | 0,25 ± 0,08 | 0,21 ± 0,09 | 0,23 ± 0,07 | 0,22 ± 0,06 | 0,23 ± 0,06 | 0,26 ± 0,08 | 0,28 ± 0,07 | 0,13 ± 0,04 |
| 102 | **1,63** | **1,43** | **1,60** | **1,24** | **1,70** | **1,52** | **1,36** | **1,67** | **1,82** | 0,27 |
| 151 | **3,32** | **3,08** | **3,35** | **2,99** | **2,95** | **3,45** | **4,02** | **3,15** | **4,30** | **1,03** |
| 171 | **2,93** | **2,96** | **2,86** | **2,99** | **3,02** | **4,33** | **3,93** | **3,25** | **3,95** | **1,07** |
| 423 | **2,63** | **1,86** | **2,05** | **1,71** | **2,24** | **2,81** | **2,90** | **2,87** | **1,66** | 0,62 |
| 506 | **1,23** | **1,23** | **1,37** | **1,30** | **1,22** | **1,91** | **1,85** | **1,71** | **1,37** | 0,38 |
| 554 | **6,74** | **5,96** | **6,76** | **5,45** | **5,64** | **7,34** | **6,88** | **7,57** | **8,53** | **2,57** |
| М ± m | 3,08 ± 0,80 | 2,75 ± 0,71 | 3,00 ± 0,81 | 2,61 ± 0,65 | 2,80 ± 0,64 | 3,56 ± 0,86 | 3,49 ± 0,81 | 3,37 ± 0,89 | 3,61 ± 1,11 | 0,99 ± 0,34 |

Примітки:

1. Результати представлені як співвідношення ОГ/ГЗ, де ОГ – оптична густина проби, ГЗ – граничне значення в системі.
2. Жирним шрифтом виділено значення, які перевищують граничні.
3. Сироватки: В-к, М-ко, 46 – здорових людей; 449, 470, 79 – хворих на ЦД (негативні за вмістом антитіл до інсуліну); 102, 151, 171, 423, 506, 554 – хворих на ЦД (позитивні за вмістом антитіл до інсуліну).
4. Використані інсуліни: біосинтетичний кристалічний інсулін лю­­­дини: 1 – “Lil­ly” (США), 2 –“No­­vo Nordisk” (Данія); напівсинтетичний кристалічний інсулін лю­­дини “Hoe­chst” (Німеччина) – 3; біосинтетичний інсулін людини “Актрапід НМ” (“Novo Nordisk”) – 4; напівсинтетичний інсулін людини “Інсуман Рапід” (“Ін­дар”, Україна); інсулін свині кристалічний (“Hoechst”) – 6; інсулін свині “Актрапід МС” (“Novo Nordisk”) – 7, “Моноінсулін МК” (“Індар”) – 8; аналог інсуліну людини “No­vo­Ra­pid” (“Novo Nordisk”) – 9; кристалічний A21-монодезамідоінсулін лю­ди­ни (“Novo Nordisk”) – 10.

Важлива умова успішного проведення ІФА – підбір ко­н’югату вторинних антитіл до Іg людини з ферментом та його концентрації, оскільки при високій концентра­ції кон’югату спостерігається надлишкове неспецифічне зв’язування його з носієм, а при низьких концентраціях – чутливість аналізу мо­же знижуватись в результаті уповільненого перетворення субстрату на продукт ферментативної реакції. До такого ж висновку дійшли й інші дослідники [А.В. Масяго, 2002; Н.В. Іванська, 2003].

У процесі роботи ми випробували не тільки МКА до ІgG лю­ди­ни, мічені пероксидазою хрону, але й поліклональні антитіла (ПКА) до всіх класів імуноглобулінів, одер­жані шля­хом імунізації кіз (Всеросійський інститут сіль­сь­кого­спо­дар­сь­ких технологій, Москва). Розведення кон’югату з МКА становило 1: 100 000, з ПКА – 1:10 000 (табл. 3).

Таблиця 3

**Вміст ІА та ІАА в сироватках крові хворих на цукровий діабет**

**з використанням різних кон’югатів**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Досліджувані зразки | Кон’югат | |
| МКА-Пх | ПКА-Пх |
| Тло | 0,035 | 0,043 |
| 34 | **1,627** | **0,895** |
| 38 | **0,230** | **0,947** |
| 42 | **0,566** | **0,409** |
| 99 | **0,612** | **1,188** |
| 482 | **0,904** | **1,144** |
| 6 | **0,687** | **0,496** |
| 10 | **0,815** | **0,513** |
| 14 | **0,732** | **0,698** |
| 423 | **0,633** | **0,435** |

Примітки:

1. Тло – проба без внесення сироватки.
2. МКА-Пх – моноклональні антитіла до імуноглобулінів людини класу G, мічені пероксидазою хрону.
3. ПКА-Пх – поліклональні антитіла до імуноглобулінів людини класу G, мічені пероксидазою хрону.

Як видно з представлених даних, реакція деяких сироваток (34, 42, 6, 10, 423) в ІФА була інтенсивніша з МКА, ніж з ПКА; з іншими сироватками (38, 99, 482) отримано протилежні результати. Пояснення цьому може полягати як в гетерогенності ІА та ІАА в цих зразках щодо їхньої спорідненості, так і в належності їх до різних підкласів IgG. ПКА, навіть проти од­нієї – єдиної антигенної детермінанти, гетерогенні як за структурою активного цент­ра, так і за фізико-хімічними властивостями. У тому випадку, коли антиген полівалентний, як наприклад інсулін, в сироватці крові утворюються антитіла, які направлені проти кожної окремої детермінанти (епітопа); це призводить до ще більшого урізноманітнення антитіл. Усі ці фактори впливають на гетерогенність антитіл та обумовлюють певні труднощі при дослідженні їх структури та визначенні вмісту в крові [А.М. Егоров, 1991].

На початкових етапах розробки імуноферментного методу як хромоген використовували ОФД, який потребує дотримання особли­вих умов безпеки, пов’язаних з канцерогенними властивостями цієї речовини. Хоча ОФД і досі включають у деякі комерційні імуноферментні набори, та все ж останнім часом більш безпечним хромогеном вважають ТМБ, оскільки він сам та його метаболіти не проявляють мутагенної та канцерогенної дії [Н.В. Іванська, 2003]. З даних порівняльного аналізу хромогенів ОФД та ТМБ випливає, що при використанні обох хромогенів різниці в отриманих результатах практично немає, тому в подальшому застосувували ТМБ.

Розроблений імуноферментний метод використано для обстеження дорослих хворих на ЦД та донорів (табл. 4). Отримані результати значною мірою збігаються з даними, які наводяться в літературних джерелах [Ueno H. et al., 1994; Schloot N.C. et al., 1997; Zigler A.G. et al., 1999;].

Таблиця 4

**Результати виявлення антитіл до інсуліну в сироватках крові дорослих людей опрацьованим імуноферментним методом**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Групи людей | Кіль-кість  осіб | Співвід-но­­ше­ння чо­ло­віки / жін­ки | Середній вік (від і до), ро­ки | Середня три­ва­лість за­хво­­рю-  ва­ння (від і до), ро­ки | Середня три­ва­лість ін­су­­ліно­те­рапії (від і до), ро­ки | % осіб, у сироватках кро­ві яких ви­явлено ІА або ІАА |
| Донори | 194 | - | 18 - 52 | - | - | 0,52 |
| Хворі на ЦД-1 | 438 | 152/286 | 36,47±0,61  (17-68) | 13,61±0,49  (0,5-42) | 13,61±0,49  (0,5-42) | 10,96\* |
| Хворі на ЦД-2  (+Iнс.) | 188 | 83/105 | 59,36±0,64  (37-83) | 14,20±0,62  (0,5-43) | 5,40 ± 1,17  (0,5-27) | 4,26\* |
| Хворі на ЦД-2  (-Iнс.) | 104 | 41/63 | 60,01±0,82  (38-81) | 9,13±0,73  (0,5-36) | - | 1,92 |

Примітки: 1) +Iнс. – хворі на ЦД-2, які отримували препарати інсуліну; 2) -Iнс. – хворі на ЦД-2, які не отримували препарати інсуліну; \* – достовірно стосовно групи донорів (за критерієм χ 2).

Опрацьований метод використали також для визначення вмісту ІА та ІАА в сироватках крові різних груп дітей. У жодної здорової дитини не було виявлено ІАА, в той час як у групі ризику захворювання на ЦД-1 ІАА були наявні в 5,71 % дітей. Серед дітей, хворих на ЦД-1, ІА та ІАА знайдено в 16,67 % осіб. Таким чином, показано, що розроблений імуноферментний метод придатний для визначення ІА та ІАА в сироватках крові дорослих і дітей.

Основні діагностичні характеристики будь-якого методу, які свід­чать про його надійність – це чут­ли­вість, специфічність та відтворю­ваність от­ри­му­ваних результатів.

Встановлено, що специфічність розробленого імуноферментного методу становить 90,9 %, а чутливість – 82,4 %; внутрішньосерійний коефіцієнт варіації складає 9,09 % для негативних зразків і 3,53 % для по­зитивних, а міжсерійний – 4,34 % для негативних зразків і 5,5 % для позитивних.

На основі розробленого твердофазного імуноферментного методу для визначення вмісту антитіл до ендогенного або екзогенного інсулінів у співавторстві з працівниками НВК “Діапроф-Мед” було створено тест-систему, яку назвали “ІФА-АТ-інс”.

Розроблену систему “ІФА-АТ-інс” порівнювали з комерційною імуноферментною тест-сис­те­мою “ORG-520” (“ORGen­­tech”, Німеч­чина). Деяка різниця в результатах визначення ІА обома методами може бути зумовлена різними способами оцінки граничної зони та особливостями застосованих ко­н’ю­га­тів (рис. 4).

Рис. 4. **Співвідношення позитивних, негативних та сумнівних за вмістом ІА зразків сироваток крові людей при застосуванні імуноферментних тест-систем “ІФА-АТ-інс” та “ORG-520”**

Підсумовуючи отримані результати, можна зробити висновок, що тест-система “ІФА-АТ-інс” подібна до іму­но­фер­мент­ної комерційної “Anti-insulin ORG-520”, відповідає ви­мо­гам, поставленим до тест-систем на основі ІФА для визначення ІА та ІАА і може бути використа­на для ви­яв­лення їх у сироватках крові людей.

Тест-систему “ІФА-АТ-інс” порівнювали також з комерційним радіоімунним набором “IA-AIA CIS biointernational” (Фран­­­ція). При цьому проведено дві серії досліджень. Для першої серії експериментів відібрали сироватки крові 10 донорів та 79 хворих на ЦД, серед яких 48 хворих на ЦД-1 і 31 – на ЦД-2. Для другої серії відібрали сироватки від 92 хворих на ЦД-1 та ЦД-2.

У першій серії експериментів при дослідженні 48 сироваток крові від хворих на ЦД-1 методом ІФА зафіксовано 14 позитивних сироваток, 32 негативні і два сумнівних зразки. Аналіз тих же сироваток методом РІА виявив 11 позитивних та 20 негативних зразків, у 15 сироватках зв’язування міченого інсуліну з ІА становило або було менше за 20 %, тобто ІА містились в низьких титрах. З 31 сироватки крові від хворих на ЦД-2методом ІФА визначено 2 позитивних і 29 негативних зразків,а методом РІА – 2 і 27 сироваток, відповідно. Останнім методом виявлено також 2 сироватки з низькими титрами ІА. При дослідженні донорських сироваток розбіжностей між отриманими результатами не виявлено.

Постановка другої серії експериментів принципово не відрізнялась від першої. Після визначення ІА у сироватках крові хворих на ЦД невідповідні результати отримано в 5 зразках.

Таким чином, після дослідження сироваток крові хворих на ЦД тест-сис­те­мою “ІФА-АТ-інс” та “IA-AIA CIS biointernational” виявилось, що у деяких випадках отримані результати не співпадають. Подібні розбіжності спостерігали й інші дослідники [L.Nell et al., 1989; K.F. Federlin, 1993; D. Devendra et al., 2003, 2004]. Пояснення цього може полягати в тому, що визначення антитіл проведено методами, які суттєво відрізняються один від одного. При застосуванні РІА, в якому використовують поліетиленгліколь, крім ІА та ІАА можуть осаджуватись й інші БЗІ, і тим самим призводити до завищення вмісту визначених ІА та ІАА. Цим можна пояснити і значну кількість сироваток з невеликим (7-20) відсотком зв’язування з 125І-інсуліном, які, згідно з інструкцією, слід відносити до позитивних.

Існують певні труднощі в інтерпретації результатів визначення ІА та ІАА у людей з ЦД. Вони полягають у тому, що в цієї категорії хворих, в залежності від віку, тривалості інсулінотерапії, типу ЦД, а також особливостей імунного стату­су організму, утворюються ПКА з високою або низькою афінністю проти різних епітопів ін­суліну. Слід також брати до уваги, що ендогенний або екзогенний інсулін, який міститься в сироватці хворих, здатен зв’язуватись з ІА та ІАА, утворюючи комплекси інсулін-антитіло, і тим самим змінювати кількість ІА або ІАА при визначені різними методами.

Оскільки при порівнянні тест-системи “ІФА-АТ-інс” з комерційною радіоімунною “Cis bio­in­ter­na­tio­nal” результати визначення ІА та ІАА у частині зразків крові хворих на ЦД не співпадали, то для з’ясування можливих причин розбіжності та для більш детального дослідження БЗІ застосовували поетапну афінну хроматографію таких сироваток на сорбентах з інсуліном та білком G.

Методом поетапної афінної хроматографії з сироваток крові різних хворих на ЦД і здорових людей було виділено білкові фракції, що мають властивість зв’язуватись з інсуліном. Для цього були проаналізовані зразки сироваток крові хворих на ЦД, де кількість ІА та ІАА, визначених методами ІФА та РІА, суттєво відрізнялась (табл. 5).

#### **Таблиця 5**

**Кількість білка, виділеного методом поетапної афінної хроматографії**

**з 1 мл сироватки крові хворих на ЦД та донорів**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Сироватки кро­ві хворих на ЦД-1 | Кількість біл­ка (мг), ви­ді­ле­ного з інсу­лі­ново­го сорбенту | Кількість білка (мг), виділеного на сорбентах з білками А або G |
| 1) Ф-в | 0,686 | 0,086 |
| 2) Т-ч | 1,210 | 0,203 |
| 3) М-я | 0,079 | Н/д |
| 4) Б-в | 0,017 | Н/д |
| 5) Т-в | 0,028 | Н/д |

Примітка: Н/д – не досліджувалось

Загальна особливість перших трьох таких сироваток (Ф-в, Т-ч, М-я) така, що при дослідженні вмісту ІА та ІАА методом ІФА вони визначені як негативні, а при використанні РІА – як позитивні. З певною пересторогою можна вважати за контрольні дві інші сироватки хворих на ЦД-1 (Б-в, Т-в), в яких не знайшли ІА та ІАА обома застосованими методами.

З одержаних даних витікає, що в досліджених зразках крові міститься різна кількість БЗІ, проте не всі вони належать до білків імуноглобулінової природи.

Однак ці результати свідчили тільки про різницю в кількості білків, виділених на обох типах сорбентів з сироваток крові хворих на ЦД та донорів; фракції, вимиті з названих сорбентів, не були досліджені на вміст ІА. Ми вважали за доцільне провести аналогічні дослідження окремих сироваток, в яких при проведенні РІА і ІФА була розбіжність щодо вмісту ІА. Використання поетапної афінної хроматографії для таких зразків з подальшим аналізом отриманих фракцій методом ІФА дало можливість обґрунтованіше стверджувати про наявність або відсутність ІА та ІАА у нативних сироватках. Результати проведених досліджень наведено в табл. 6.

Таблиця 6

**Вміст ІА у фракціях, одержаних після поетапного розподілу методом афінної хроматографії сироваток крові хворих на ЦД-1 на сорбентах інсулін-сефароза та білок G-сефароза**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Сироват-ки крові хворих на ЦД-1 | % зв’я­зу­вання 125І-Iнс. з БЗІ (метод РІА) | Оцінка позитив-ності | | Сорбенти | ОГ фракцій (λ=280 нм) | V  фрак­цій (мкл), в ІФА | ОГ фрак­цій в ІФА |
| РІА | ІФА |
| 1. П-ко | 35,7 - 49,0 | + | + | Інсулін-агароза  Білок G-сефароза | 0,370  0,085 | 50  50 | 2,819  1,214 |
| 2. С-н | 8,4 – 16,1 | + | + | Інсулін-агароза | 0,085 | 25 | 1,590 |
| 3. Ф-в | 18,0 – 40,3 | + | ± | Інсулін-агароза  Білок G-сефароза | 0,270  Н/д | 50  50 | 0,076  0,072 |
| 4. М-я | 79,7 – 80,7 | + | - | Інсулін-агароза | 0,390 | 25 | 0,034 |
| 5. Т-ч | 12,4 – 24,1 | + | - | Інсулін-агароза  Білок G-сефароза | 0,970  0,360 | 50  40 | 0,022  0,086 |
| 6. Гр.-й | 1,6 – 5,3 | - | - | Інсулін-агароза  Білок G-сефароза | 0,380  0,290 | 15  50 | 0,018  0,029 |
| 7. Б-в | 1,8 – 6,8 | - | - | Інсулін-агароза | 0,135 | 50 | 0,020 |

Примітка: Iнс. – інсулін, + – позитивний зразок; ± – сумнівний зразок; - – негативний зразок за вмістом ІА, визначених даними методами.

Отримані дані можна проаналізувати таким чином. Якщо у разі визначення ІА та ІАА в сироватках крові людей методами РІА та ІФА результати визначення вмісту цих антитіл збігаються (сироватки від хворих П-ко, Гр-й, Б-в, С-н), то після розподілу сироваток крові на зазначених сорбентах та визначенні в них ІА та ІАА цей висновок залишається незмінним. В іншому ж випадку, коли нефракціоновані сироватки, за даними РІА, вважались позитивними (сироватки Т-ч, М-я), а за методом ІФА – негативними, то визначення вмісту ІА та ІАА в окремих фракціях, елюйованих з обох типів сорбентів, дало змогу впевненіше стверджувати про відсутність їх в таких сироватках крові. Так, у фракціях сироваток крові хворих Т-ч та М-я навіть при досить значному вмісті білка, ІА не були виявлені (для порівняння див. дані хроматографії сироватки хворого П-ко).

Заслуговують на увагу також результати хроматографічного розподілу білків сироватки крові хворого С-н. При дослідженні такої нефракціонованої сироватки методом РІА зв’язування її білків з 125І-інсуліном було незначне (8,4-16,1 %), а при дослідженні методом ІФА вона вважалась позитивною. Останнє підтвердилось ре­зуль­татами поетапної хроматографії цієї сироватки крові: при незначній кількості білка в елюаті з інсулін-агарози (ОГ при λ = 280 нм становила 0,085) у зразку чітко визначались ІА. Ці результати ще раз підтвердили, що при використанні методу РІА, враховуючи його особливості, існує ймовірність осадити разом з антитілами всі БЗІ, для виділення та дослідження яких слід застосувати спеціальні методичні підходи.

Таким чином, в результаті проведеної роботи з’ясовано, що використовуючи метод поетапної афінної хроматографії на сорбентах з інсуліном і білками А або G з сироваток крові донорів і хворих на ЦД можна виділити і дослідити низку білків, які мають властивість зв’язуватись з інсуліном. Запропонований спосіб може бути використаний для визначення співвідношень білків, що зв’язують інсулін у крові хворих на ЦД; та разом з визначенням ІА та ІАА опрацьованим імуноферментним методом це сприятиме глибшому розумінню можливої природи різних ускладнень, що виникають у хворих на ЦД в процесі лікування препаратами інсуліну.

# ВИСНОВКИ

1. Вперше застосовано метод поетапної афінної хроматографії на сорбентах з інсуліном та білком А (або G) і продемонстровано його придатність для відокремлення антитіл до інсуліну від інших білків, що зв’язують інсулін в сироватках крові хворих на ЦД та здорових людей. Показано, що вміст білкових чинників, причетних до зв’язування інсуліну, в сироватках хворих на ЦД в 2,5 – 3 рази вищий, ніж у здорових людей.
2. Вперше в Україні розроблено метод гетерогенного твердофазного імуноферментного аналізу для визначення вмісту антитіл до ендогенного та екзогенного інсулінів у крові людей. Доведено його ефективність для виявлення ІА та ІАА, як в цільній сироватці крові людей, так і у складі білкових фракцій, виділених методом поетапної афінної хроматографії з цих сироваток.
3. Встановлено, що специфічність розробленого імуноферментного методу становить 90,9 %, а чутливість – 82,4 %; внутрішньосерійний коефіцієнт варіації складає 9,09 % для негативних зразків і 3,53 % для позитивних, а міжсерійний – 4,34 % для негативних зразків і 5,5 % для позитивних.
4. На основі розробленого методу створено вітчизняну імуноферментну тест-систему “ІФА-АТ-інс” та показано її придатність для виявлення ІА та ІАА при обстеженні здорових людей та хворих на ЦД.
5. За допомогою розробленої тест-системи проведено визначення антитіл до ендогенного та екзогенного інсулінів в сироватках крові здорових людей, та хворих на ЦД-1 і ЦД-2, які приймали таблетовані цукрознижуючі препарати, ін’єкції інсуліну або його аналогів. Відсоток осіб, у крові яких виявлено ІА або ІАА, у групі хворих на ЦД-1 дорівнював 10,96; у хворих на ЦД-2, лікованих інсуліном – 4,26; хворих на ЦД-2, які не отримували інсулін – 1,92. Серед донорів ІАА виявлено у однієї особи (0,52 % від загальної кількості обстежених).
6. Проведене порівняльне дослідження тест-системи “ІФА-АТ-інс” з імуноферментною комерційною системою “Anti-insulin ORG-520” виробництва фірми “ORGentech” (Німеччина), засвідчило її ефективність при визначенні антитіл до екзогенного (або ендогенного) інсуліну.

# СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

**Статті в наукових спеціалізованих виданнях**

1. В.В. Корпачев, **С.В. Мельниченко**, Р.Г. Лукашова, Н.В. Іванська, Г.Є. Раєвська. Опрацювання методу імунофентного аналізу для визначення антитіл до інсуліну у сироватці крові здорових людей та хворих на цукровий діабет // Ендокринологія, 2003, Т. **8**, №1, С.24-30 (Автором самостійно здійснювався аналіз літератури, підбір хворих, експериментальні дослідження (підбір оптимальних умов проведення імуноферментного аналізу), статистична обробка та узагальнення матеріалів, написання статті).
2. В.В. Корпачев, **С.В. Мельниченко**, П.М. Карабун, Р.Г. Лукашова, Н.В. Іванська. Порівняння розробленої імуноферментної тест-системи (“ІФА-АТ-інс”) з комерційними наборами для виявлення антиінсулінових антитіл у сироватках крові людей // Ендокринологія, 2003, Т. **8**, №2, С.158-168 (Автор самостійно здійснювала аналіз літератури, проводила порівняльні дослідження розробленої імуноферментної тест-системи „ІФА-АТ-інс” з комерційними наборами: імуноферментною тест-системою “Anti-insulin ORG-520” та радіоімунною – “Cis bio­in­ter­na­tio­nal”).
3. В.В. Корпачев, Н.М. Гуріна, **С.В. Мельниченко**, Р.Г. Лукашова, А.А. Шуп­ро­вич. Білки, що зв’язують інсулін, та контррецепторні білки сироватки крові хворих на цукровий діабет і здорових людей // Ендокринологія. - 2004.-Т.9.-№2.-С.221-235 (Автором здійснювалось написання фрагменту статті на підставі власних експериментальних досліджень сироваткових чинників, що блокують дію інсуліну (афінна хроматографія, електрофорез в поліакриламідному гелі).
4. В.В. Корпачев, **С.В. Мельниченко**, Р.Г. Лукашова, П.М. Карабун, Н.В. Іванська. Антигенність інсуліну та методи визначення антитіл до нього в сироватках крові здорових людей та хворих на цукровий діабет // Ендокринологія. - 2005.-Т.10.-№2.-С.206-223 (Автором самостійно здійснювався пошук літератури за темою, експериментальні дослідження (імуноферментне визначення вмісту антитіл), статистична обробка та узагальнення матеріалів, написання статті. ).

**Статті в наукових виданнях**

1. Р.Г. Лукашова, **С.В. Мельниченко**. Методы определения антител к инсулину. // В кн. В.В Корпачева: Инсулин и инсулинотерапия.- Киев, РИА «Триумф», 2001.- С.309-322 (Пошук літератури та її аналіз, оформлення).
2. В.В. Корпачев, **С.В. Мельниченко**, Р.Г. Лукашова, П.М. Карабун, Н.В. Іванська. Дослідження цукрознижувальної та антигенної властивостей Новорапіду – аналога людського інсуліну ультракороткої дії // Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія, 2004, №3 (8), С.46-52 (Автором здійснювались: аналіз літератури, експериментальні дослідження (визначення вмісту антитіл до інсуліну), участь у написанні статті).
3. **С.В. Мельниченко**, Н.В. Іванська, В.В. Корпачев. Патогенетичне значення ан­ти­тіл до ендогенного та екзогенного інсулінів // Сімейна медицина. – 2005.- №3.- С.45-47 (Аналіз літератури, написання статті).

**Тези доповідей на наукових конференціях і з’їздах**

1. **С.В. Мельниченко**, В.В. Корпачев, Р.Г. Лукашова, О.А. Шевчук, Н.В. Іванська. Розробка методу визначення антитіл до інсуліну в сироватці крові людей на основі твердофазного імуноферментного аналізу // Ендокринологія, 2001, Т.6 (додаток), С. 194.
2. В.В. Корпачев, **С.В. Мельниченко**, Н.В. Иванская, Г.А. Раевская, Р.Г. Лукашова. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления антител к инсулину в сыворотках крови людей // Материалы I съезда аллергологов Украины, 2002, С. 79.
3. В.В. Корпачев, Н.В. Иванская, **С.В. Мельниченко**, Р.Г. Лукашова, Г.Е. Раевская. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления антител к инсулину // Укр. біохім. ж., 2002, 74, 4а (додаток 1), С.101-102.
4. **С.В. Мельниченко**. Розробка тест-системи для визначення антитіл до інсу­лі­ну в сироватці крові людей на основі твердофазного імуноферментного ана­лізу // Ендокринологія, 2002, Т. **7**, №1, С.142.
5. В.В. Корпачев, Н.М. Гурина, **С.В. Мельниченко**. Нарушение толерантности к глюкозе у крыс после введения инсулинсвязывающих белков из сыворотки кро­ви интактных животных // Укр. біохім. журнал.- 2002.- Т.74, №4а (до­да­ток 1).- С.147.
6. **С.В. Мельниченко**. Выделение и анализ инсулинсвязывающих белков сывороток крови больных сахарным диабетом // Укр. биохим. журнал.- 2006.- Т.2, (спец.выпуск).- С.88.
7. В.В. Корпачев, Н.В. Іванська, Р.Г. Лукашова, **С.В. Мельниченко**. Розробка та апробація імуноферментної тест-системи для виявлення антитіл до інсуліну // Вісник Вінницького держ. Мед. університету.- 2003.- №1-2.- с.57.
8. В.В. Корпачев, Р.Г. Лукашова, **С.В. Мельниченко**, П.М. Карабун. Визначення вмісту антитіл до інсуліну та дослідження інших інсулінзв’язуючих білків в сироватці крові хворих на цукровий діабет // Ендокринологія. - 2007.-Т.12 (додаток).-С.122.

**Патент**

1. В.В. Корпачев, Р.Г. Лукашова, **С.В. Мельниченко**, О.А. Шевчук, Н.В. Іванська, Г.Є. Раєвська, В.Г.Пилипенко. “Тест-система для виявлення аутоантитіл до ендогенного або антитіл до екзогенного інсулінів в сироватках та плазмі крові людей (ІФА-АТ-інс)” // Деклараційний патент на винахід 57640 А “Тест-система для виявлення аутоантитіл до ендогенного або антитіл до екзогенного інсулінів в сироватках та плазмі крові людей (ІФА-АТ-інс)” 16.06.2003.- бюл. №6.

**АНОТАЦІЯ**

**Мельниченко С.В. Виділення та характеристика білкових чинників, що зв’язують інсулін в крові людей, хворих на цукровий діабет. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю14. 01. 14 – ендокринологія. – Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України, Київ, 2007 р.

Дисертаційну роботу присвячено дослідженню білкових чинників (БЗІ), які здатні зв’язувати інсулін в крові людей, хворих на цукровий діабет, і визначенню антитіл до ендогенного (ІА) або екзогенного (ІАА) інсулінів у складі цих білків.

Білки, що зв’язують інсулін в сироватках крові людей, виділяли методом афінної хроматографії на сорбенті інсулін-сефароза 4В. Отриманий матеріал в подальшому фракціонували на сорбенті білок G-сефароза 4В, відокремлюючи при цьому ІА та ІАА від інших білків, що блокують дію інсуліну. Всі отримані білкові фракції досліджували методом електрофорезу в поліакриламідному гелі. Вміст ІА та ІАА, як в нативних сироватках, так і в отриманих фракціях, визначали розробленим гетерогенним твердофазним імуноферментним методом. В результаті проведення поетапної афінної хроматографії сироваток крові хворих на ЦД та донорів показано, що кількість білкових фракцій в елюатах (як від донорських сироваток, так і від хворих на ЦД) коливається від 8 до 10. Співвідношення білків в окремих зразках різні, але кількість фракцій не залежить від того, з яких сироваток – від здорових людей чи від хворих на ЦД – виділено ці білки.

На основі опрацьованого гетерогенного твердофазного імуноферментного методу визначення ІА та ІАА створено тест-систему “ІФА-АТ-інс”. Проведено порівняльне дослідження тест-системи “ІФА-АТ-інс” з імуноферментною комерційною системою “Anti-insulin ORG-520” виробництва фірми “ORGentech” (Німеччина) засвідчило її ефективність при виявленні антитіл до екзогенного (або ендогенного) інсуліну як у нативних сироватках, так і в складі білкових фракцій, виділених методом поетапної афінної хроматографії з сироваток крові людей. Використання методу поетапної афінної хроматографії і дослідження вмісту ІА та ІАА в отриманих елюатах дозволило пояснити розбіжності в результатах визначення цих антитіл методами імуноферментного та радіоімунного (РІА) аналізів. Причиною такого явища може бути те, що в РІА, для вилучення комплексів 125І-інсуліну з ІА або ІАА використовують поліетиленгліколь. Останній, крім антитіл до інсуліну, здатен осаджувати також й інші БЗІ і тим самим, призводити до завищення результатів визначення ІА та ІАА.

**Ключові слова:** цукровий діабет, інсулін, антитіла до інсуліну; білки, що зв’язують інсулін, імуноферментний аналіз.

**АННОтация**

**Мельниченко С.В. Выделение и характеристика белковых факторов, связывающих инсулин в крови людей, больных сахарным диабетом. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14. 01. 14 – эндокринология. – Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко АМН Украины, Киев, 2007 г.

Диссертационная работа посвящена выделению и исследованию белков, связывающих инсулин в крови больных сахарным диабетом и доноров, а также определению содержания антител к эндогенному (ИА) или экзогенному (ИАА) инсулину, входящих в состав этих белков.

Одной из причин снижения эффективности инсулинотерапии при лечении больных сахарным диабетом (СД) может быть блокирование связывания инсулина с его рецептором веществами, имеющими сродство к инсулину. Наиболее известны среди них ИА и ИАА. Роль других факторов, участвующих в этом процессе, изучена недостаточно. В работе предложен методический подход, обеспечивающий извлечение из сывороток крови людей различных фракций инсулинсвязывающих белков и анализ этих белков.

Исследуемые белки выделяли методом поэтапной аффинной хроматографии сывороток крови на сорбенте, содержащем инсулин-сефарозу 4В, с последующим фракционированием полученного материала на сорбенте белок G-сефарозе 4В. Применение последнего направлено на отделение ИА и ИАА от других белков, блокирующих действие инсулина в крови людей. Все выделенные белковые фракции исследовали методом электрофореза в полиакриламидном геле. Содержание ИА и ИАА как в полученных фракциях, так и в цельных сыворотках, определяли разработанным методом гетерогенного твердофазного иммуноферментного анализа. Показано, что количество белковых фракций в элюатах полученных с инсулинового сорбента колеблется (8-10) и, что существует разница в количественном соотношении белков в отдельных образцах.

На основе разработанного иммуноферментного метода определения ИА и ИАА создана тест-система “ИФА-АТ-инс”. Сравнение ее с иммуноферментной коммерческой тест-системой “Anti-insulin ORG-520” производства фирмы “ORGentech” (Германия) показало ее эффективность.

Использование метода поэтапной аффинной хроматографии и определения содержания ИА и ИАА в полученных элюатах позволило объяснить несоответствия при определении содержания антител к инсулину в отдельных сыворотках крови больных СД при исследовании их методами иммуноферментного и радиоиммунного анализов. Причиной этого, может быть то, что в радиоимунных наборах, для извлечения комплексов 125І-инсулина с ИА и ИАА используют полиэтиленгликоль. Последний, кроме антител к инсулину, способен осаждать также и другие инсулинсвязывающие белки и тем самым, приводить к завышению результатов определения ИА и ИАА.

Тест-система “ИФА-АТ-инс” использована для определения содержания ИА и ИАА в сыворотках крови 438 больных СД типа 1 (СД-1), 188 больных СД типа 2 (СД-2), леченных инсулином, 104 больных СД-2, не получавших инсулин, и 194 доноров. В группе больных СД-1 ИА и ИАА выявлены у 10,96 % лиц; среди больных СД-2, леченных инсулином – 4,26 %; у больных СД-2, не получавших инсулин – 1,92 %. В группе доноров ИАА выявлены у одного человека (0,52 % от общего количества обследованных). Кроме того, тест-систему “ИФА-АТ-инс” использовали для обследования 110 детей в возрасте от 5 до 18 лет. Среди них 35 детей входили в группу риска заболевания СД-1 (СД у них болели ближайшие родственники), 30 детей болели СД-1 и 65 здоровых детей, соответствующего возраста. ИАА выявлены у 5,71 % детей, входящих в группу риска, ИА – у 16,67 % детей, болеющих СД-1. У здоровых детей ИАА не выявлены.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, инсулин, антитела к инсулину, инсулинсвязывающие белки, иммуноферментный анализ.

**SUMMARY**

Melnychenko S. V. – **Isolation and characterization of insulin-binding protein factors in blood of diabetic patients.** – **Manuscript.**

The thesis for scientific degree of the Candidate of Biological Sciences in specialty 14.01.14 **−** endocrinology. **−** V.Р. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine, 2007.

The thesis deals devoted to studying of serum factors participating in insulin binding process in blood of diabetic patients as well as the investigating of antibody levels against endogenous (IA) and exogenous (IAA) insulin which is present among these factors.

Insulin-binding proteins (IBP) of human blood serum were obtained by using an affine chromatography approach. Sepharose 4B-insulin was used as a sorbent. Preparations from this sorbent were then fractioned on protein G-Sepharose sorbent which permitted to separate the IAA from other insulin-blocking proteins. Both IAA levels as native serum as obtained fractions were evaluated by a heterogenic solid-phase enzyme-linked immunoassay approach (ELISA) elaborated by the author. The results of step-by-step chromatography of blood serum from diabetic patients and donors showed that the quantity of fractions in both groups was the same (8-10), but ratios of insulin-binding components in these fractions were different in these preparations.

A new ELISA-based IAA-evaluating test-system – “IFA-AT-ins” – was elaborated. The author performed a comparative study of the “IFA-AT-ins” and a popular commercial test-kit “Anti-insulin ORG-520” (ORGentech, Germany). The results obtained without any doubt that demonstrate the “IFA-AT-ins” has a high effectiveness for estimation of both IA and IAA levels in native human serum as well as in protein fractions isolated by using the step-by-step chromatography. The last approach permitted to explain the absence of concordance in blood serum samples of patients with diabetes IA and IAA levels estimation of some in following study of the same samples using the ELISA and radioimmune assay.

**Key words:** diabetes mellitus, insulin, insulin-binding proteins, insulin antibodies, insulin autoantibodies, ELISA, radioimmune assay.

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

|  |  |
| --- | --- |
| **БЗІ** | білки, що зв’язують інсулін; |
| **ГЗ** | граничне значення в системі; |
| **ІА** | антитіла до екзогенного інсуліну; |
| **ІАА** | антитіла до ендогенного інсуліну; |
| **Iнс.** | інсулін; |
| **ІФА** | імуноферментний аналіз; |
| **КВ** | коефіцієнт варіації. |
| **МКА** | моноклональні антитіла; |
| **ОГ** | оптична густина; |
| **ОФД** | *о*-фенілендіамін; |
| **ПААГ** | поліакриламідний гель; |
| **ПКА** | поліклональні антитіла; |
| **РІА** | радіоімунний аналіз; |
| **ТМБ** | 3,3’,5,5’-тетра­метил­бен­зидин; |
| **ЦД** | цукровий діабет; |
| **ЦД-1** | цукровий діабет 1-го типу; |
| **ЦД-2** | цукровий діабет 2-го типу; |

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>