

мированию зоба по аналогичным механизмам, т. е. за счет дефицита йодной ауторегуляции (вследствие врожденного дефицита йода и стимуляции ТТГ). Назначение этим больным йодистых препаратов нецелесообразно. Больным назначают терапию тиреоидными препаратами, если выявляют признаки гипотиреоза. Такое лечение проводится и при струмогенном зобе, так как пока нет других подходов к лечению таких больных.

Следует учитывать, что хороший терапевтический эффект при лечении узлового или многоузлового зоба может быть получен при назначении тиреоидных препаратов только больным при явном клиническом и субклиническом гипотиреозе. В других случаях такое лечение может оказаться неэффективным. Этим больным показано оперативное лечение прежде всего ввиду возможного развития злокачественного образования. Кроме того, показано, что при рецидиве узлового зоба его структура не всегда соответствует морфологической картине основного заболевания, так как мо-

жет возникать и новый вид патологии, в том числе рак щитовидной железы [1].

Таким образом, краткое изложение некоторых актуальных вопросов, касающихся структурных и функциональных изменений щитовидной железы при ее патологии в плане трактовки диагноза и подходов к лечению, несомненно, может вызвать желание специалистов принять участие в обсуждении этой сложной проблемы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акинчев А. Л., Романчишен А. Ф. Актуальные проблемы современной эндокринологии. — СПб., 2001. — С. 256.
2. Кандрор В. И. // Пробл. эндокринологии. — 2001. — Т. 47, № 5. — С. 3—10.
3. Касаткина Э. П. // Там же. — № 4. — С. 3—6.
4. Сингер П. // Эндокринология / Под ред. Н. Левина. — М., 1999. — С. 529—533.
5. Талаитов В. В. // Пробл. эндокринологии. — 1989. — Т. 39, № 4. — С. 43—45.
6. Algune F., Kosem M., Topa L. C. // 5-th European Congress of Endocrinology: Abstract Book. — Turin, 2001. — P. 747.
7. Stockigt J. R. // Thyroid Intern. — 2000. — N 2.

Поступила 21.09.01

◆ КЛИНИЧЕСКАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2002

УДК 616.379-008.64-092-078.33

Л. Е. Панин, О. Н. Потеряева, О. С. Воронова, О. П. Шевкопляс, Л. М. Поляков

ФРАГМЕНТ АПОЛИПОПРОТЕИНА В С ИНСУЛИНОПОДОБНОЙ ИММУНОРЕАКТИВНОСТЬЮ

Институт биохимии (дир. — акад. РАН Л. Е. Панин) СО РАН, Новосибирск

Целью данного исследования являлось иммунохимическое изучение фрагмента аполипопротеина В, обладающего инсулиноподобной иммунореактивностью. В статье его именовали как "пептид В". Пептид, выделенный методом электрофоретического элюирования, был использован для получения специфических антител. Антитела к пептиду В реагировали с аполипопротеином В-100, цельной сывороткой, сывороткой после осаждения β-липопротеинов и с супернатантом, полученным после удаления всех липопротеинов путем ультрацентрифугирования. Был оптимизирован метод ИФА для определения пептида В в сыворотке крови после осаждения β-липопротеинов. По сравнению со здоровыми донорами содержание пептида В в сыворотке крови больных СД типа 2 было достоверно выше. С увеличением индекса массы тела и длительности заболевания содержание пептида В возрастало.

The purpose of this study was immunochemical analysis of a fragment of apolipoprotein B with insulin-like immunoreactivity. We denoted it as peptide B. The peptide isolated by electrophoretic elution was used to obtain specific antibodies. Antibodies to peptide B reacted with apolipoprotein B-100, whole serum, serum after precipitation of β-lipoproteins, and with supernatant after removal of all lipoproteins by ultracentrifugation. Enzyme immunoassay was optimized for evaluation of serum peptide B after precipitation of β-lipoproteins. Serum concentrations of peptide B were increased in patients with type 2 diabetes mellitus in comparison with donors. The content of peptide B increased with increase of body weight index and disease duration.

Подавляющее большинство больных сахарным диабетом — СД (около 85%) страдают СД типа 2. В настоящее время полагают, что в патогенезе СД типа 2 основную роль играет не нарушение образования инсулина, а нарушение контроля инсулиновой секреции при действии естественных стимуляторов освобождения гормона [1]. Некоторые инсулиннезависимые формы диабета прямо связаны с преобладанием в крови веществ с контринсулярным эффектом [6]. Многие из этих веществ до сих

пор не идентифицированы и природа их остается неизвестной. Недавно нами было показано, что атерогенные фракции липопротеинов (ЛП) плазмы крови дают контринсулярный эффект, связанный со снижением поглощения глюкозы периферическими тканями, в первую очередь мышцами [3]. Показано, что ЛП низкой (ЛПНП) и очень низкой (ЛПОНП) плотности могут снижать продукцию инсулина β-клетками островков Лангерганса поджелудочной железы [2]. Носителем контринсуляр-

ного эффекта оказался апопротеин В (апоВ), входящий в состав ЛПНП и ЛПОНП.

Целью данного исследования являлось изучение фрагмента аполипопротеина В, обладающего инсулиноподобной иммунореактивностью, поскольку ранее было показано, что он является продуктом лимитированного протеолиза апоВ [2, 3].

Материалы и методы

В контрольную группу вошли 17 человек в возрасте 40—61 года с показателями углеводного и липидного обменов в пределах возрастной нормы. Больные СД типа 2 находились на лечении в клинике Научного центра клинической и экспериментальной медицины: всего обследовано 40 человек в возрасте 45—71 года (средний возраст $54,9 \pm 5,4$ года), из них 16 женщин и 24 мужчины. Относительную массу тела оценивали по индексу Кетле, который рассчитывали по формуле: масса тела (в кг)/рост (в м)².

Ранее методами иммунохимического анализа было выявлено присутствие общих антигенных детерминант в молекулах апоВ-100 и инсулина [2]. После этого был выбран один из пептидов (продуктов лимитированного протеолиза апоВ), обладающий инсулиноподобной иммунореактивностью. Мы обозначили его как "пептид В". Инсулиноподобная иммунореактивность была идентифицирована при электрофорезе апоВ в ПААГ с последующим иммуноблоттингом с антителами к инсулину [2, 3]. В нашей работе неокрашенные участки геля, содержащие исследуемый пептид, измельчали в гомогенизаторе в 0,15 М NaCl и использовали для иммунизации животных. С целью получения специфических поликлональных антител кроликов иммунизировали по схеме, описанной нами ранее [5]. Пептид В, выделенный методом электрофоретического элюирования, использовали также в дальнейшей работе при проведении твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА). Концентрацию белка определяли по Лоури, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта [10].

Иммуноглобулины из сыворотки крови выделяли осаждением с помощью сульфата аммония. Осадок отделяли центрифугированием. Операцию повторяли 3—4 раза. Полученный препарат диализовали против 0,01 М фосфатного буфера pH 7,4. Заключительную очистку IgG проводили с помощью хроматографии на анионообменнике DEAE-Toyopearl 650 M"TSK" (Япония). Для идентификации антител к пептиду В использовали реакцию двойной радиальной иммунодиффузии по Оухтерлони [11].

Для ТИФА использовали аполипопротеины В-100 и В-48. С этой целью ЛПОНП и ЛПНП выделяли методом препаративного ультрацентрифугирования [8] в растворах KBr в центрифуге "Beckman L5-75" (США). Делипидирование проводили охлажденной смесью хлороформ—метанол (1:1) с последующей многократной отмывкой эфиром. Аполипопротеины разделяли методом гель-фильтрации на Сефарозе CL-6B [5]. Чистоту аполипопротеинов исследовали методом диск-электрофореза [9].

Для получения сыворотки крови, не содержащей ЛП, последние удаляли методом ультрацентрифугирования, а также путем осаждения ЛПОНП и ЛПНП гепарином в присутствии CaCl₂ по Бурштейну [7].

Иммуноферментный анализ на твердой фазе проводили в полистироловых планшетах "Nunk" (Дания). Пептид В в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (ФСБ) pH 7,4 в концентрации 10 мкг/мл наносили на планшет по 100 мкл в лунку и инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации планшеты трижды отмывали 0,01 М ФСБ, содержащим 0,05% твин-20 (ФСБТ). Незанятые места сорбции блокировали 10% нормальной лошадиной сывороткой, содержащей 0,05% раствор лактальбумина. В подготовленные таким образом планшеты добавляли по 100 мкл специфических антител при последовательном двукратном разведении ФСБТ, начиная с разведения 1:100. Продолжительность инкубации антител с пептидом В составляла 1 ч при 37°C. Избыток антител удаляли трехкратным промыванием ФСБТ. Для насыщения связанных антител использовали козьи антитела к IgG кролика (вторые антитела), меченные пероксидазой хрена ("Sigma", США). По 100 мкл раствора вторых антител добавляли в каждую ячейку в разведении 1:1000. Планшеты инкубировали 1 ч при 37°C. После 5-кратного промывания ФСБТ проводили ферментативную реакцию. Для этого в ячейки вносили по 200 мкл свежеприготовленного субстрата — ортофенилендиамина ("Merck", ФРГ) в концентрации 20 мг на 100 мл 0,1 М фосфат-цитратного буфера pH 5,0, содержащего 0,006% раствора перекиси водорода. Через 15 мин ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1N H₂SO₄. В качестве контрольных использовали ячейки, в которых вместо антигена добавляли по 100 мкл ФСБ.

Результаты и их обсуждение

Полученные кроличьи антитела к пептиду В были охарактеризованы с помощью двойной радиальной иммунодиффузии. На рис. 1 видно, что антитела давали одну полосу преципитации с пептидом В (1—4, титр 1:32). С ЛПОНП, ЛПНП и сывороткой крови антитела не реагировали, вероятно, в связи с тем, что метод Оухтерлони позволяет выявлять достаточно большие количества антигена. Кроме того, соответствующие антигенные детерминанты в ЛПОНП и ЛПНП могут быть экранированы липидной фазой.

В дальнейшем изучение антител к пептиду В проводили с помощью непрямого ТИФА, который отличается высокой по сравнению с двойной ради-

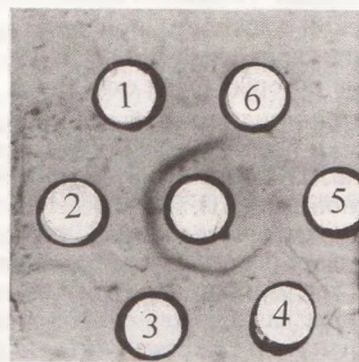


Рис. 1. Определение специфичности антител к пептиду В с помощью двойной радиальной иммунодиффузии. В центре — антитела к пептиду В; 1, 2, 3, 4, 5, 6 — пептид В.

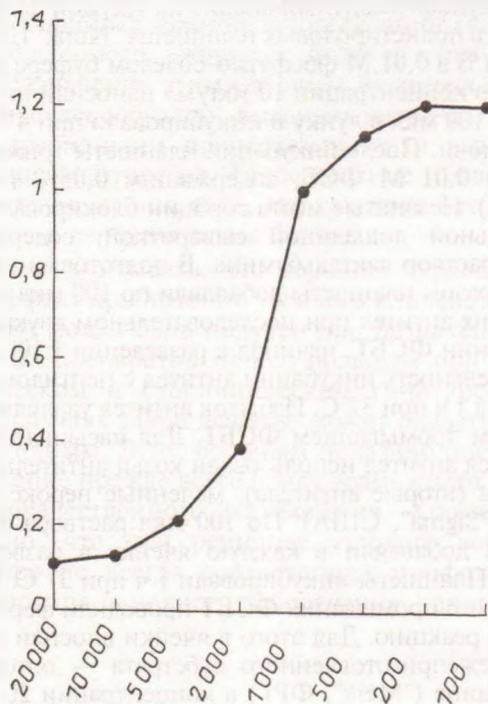


Рис. 2. Кривая титрования антител к пептиду В. По оси ординат здесь и на рис. 3, 4 — оптическая плотность при 492 нм; по оси абсцисс — разведения антител.

альной иммунодиффузией разрешающей способностью (до 50 пг). Для установления оптимального разведения антител на планшеты сорбировали избыточное количество пептида В (1 мкг/100 мкл в ФСБ). Образцы антител раститровывали при последовательном двукратном разведении буфером, содержащим 0,05% твин-20. Далее методику проводили по схеме (см. раздел "Материалы и методы"). Конечный титр антител составил 1:20 000. На рис. 2 представлена кривая титрования антител к пептиду В. В наших условиях было найдено оптимальное разведение антител — 1:1000.

Для установления рабочего режима метода планшеты инкубировали с растворами различных антигенов (пептид В, апоВ-100 и апоВ-48) в концентрации 1, 2, 5, 10, 20, 50 и 100 нг/100 мкл в ФСБ. Вид калибровочной кривой зависел от выбранного антигена (рис. 3). Интенсивность ферментативной реакции в случае с апоВ-48 значительно уступала значениям оптической плотности при использовании в качестве антигенов пептида В и апоВ-100, калибровочные кривые которых были сходными.

Кривые титрования цельной человеческой сыворотки, сыворотки после осаждения суммарной фракции ЛПОНП и ЛПНП по Бурштейну, а также сыворотки, лишенной всех ЛП в процессе ультрацентрифугирования, представлены на рис. 4. В связи с тем что цельная сыворотка содержала большое количество антигенных детерминант для исследуемых антител, в последней точке калибровочного графика (разведение 1:100 000) значение экстинкции было достаточно высоким. Для получения графика стандартной формы требовалось еще большее разведение сыворотки, что, несомненно, приводило бы к потере достоверности результатов. Калибровочные кривые сыворотки

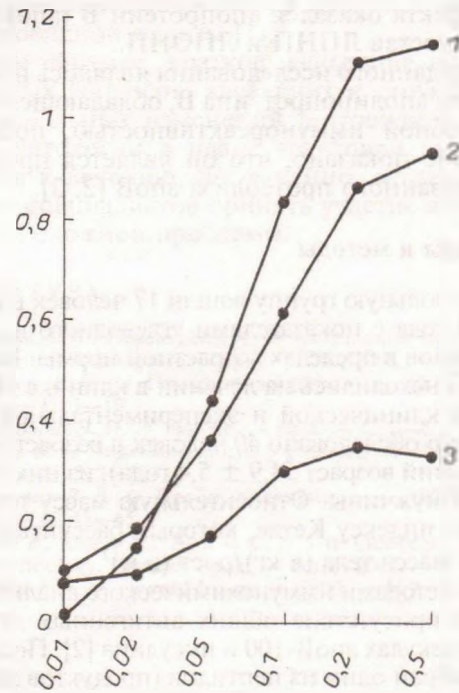


Рис. 3. Кривые титрования различных антигенов антителами к пептиду В. 1 — в качестве антигена использовали пептид В; 2 — апоВ-100; 3 — апоВ-48. По оси абсцисс — концентрация антигена (в нг/100 мкл).

без суммарной фракции ЛПОНП и ЛПНП, а также сыворотки, лишенной всех ЛП, повторяли друг друга и имели более привычный вид. Таким образом, было решено в дальнейшем использовать для исследований сыворотку, лишенную суммарной фракции апоВ-содержащих ЛП (осаждение по Бурштейну), по причине простоты получения данного материала. Рабочее разведение материала составило 1:8000.

При исследовании сыворотки крови на содержание пептида В оказалось, что его содержание в сыворотке больных СД типа 2 было достоверно выше по сравнению с таковым у здоровых доноров. Среднее значение в контрольной группе составило $1,83 \pm 0,32$ ммоль/л, а у больных СД типа 2 — $2,26 \pm 0,35$ ммоль/л ($p < 0,05$). С увеличением индекса массы тела содержание пептида В в сыворотке крови еще немного возрастало ($2,33 \pm 0,22$ ммоль/л; $p < 0,05$). При длительности заболевания более 6 лет содержание пептида В увеличивалось, особенно у женщин ($2,47 \pm 0,42$ ммоль/л; $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой).

Ранее нами было показано, что наличие перекрестной иммунореактивности между инсулином и аполипопротеином В обусловлено наличием в структуре обоих соединений общего эпитопа. В инсулине он располагается в рецепторно-значимой области [4]. В аполипопротеине В он находится в N-терминальном конце, однако точная локализация его не установлена. Именно их общий эпитоп определяет наличие конкурентных взаимоотношений между инсулином и аполипопротеином В в борьбе за инсулиновый рецептор. Пептид В — это фрагмент аполипопротеина В, содержащий данный эпитоп. Мы предполагаем, что выделенный нами пептид В и апоВ-содержащие ЛП, обладающие инсулинопо-

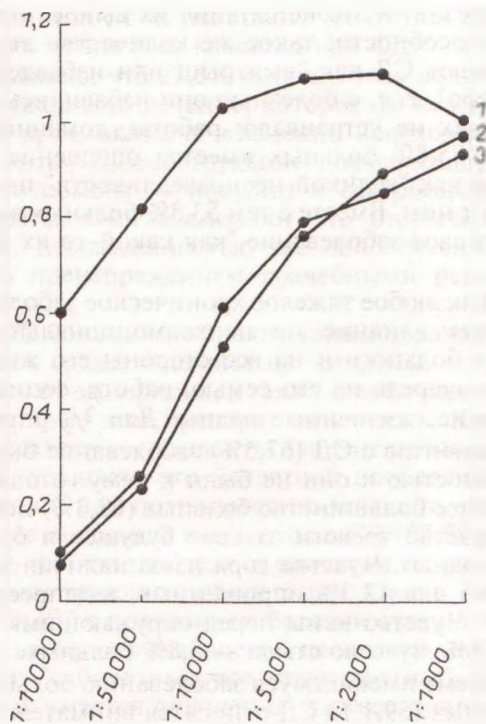


Рис. 4 Кривые титрования цельной сыворотки, сыворотки после осаждения суммарной фракции ЛПНП и ЛПОНП, сыворотки без ЛП антителами к пептиду В.

1 — цельная сыворотка, 2 — сыворотка после осаждения ЛПОНП и ЛПНП, 3 — сыворотка после удаления всех ЛП путем ультрацентрифугирования. По оси абсцисс — разведения сыворотки.

добной иммунореактивностью и контринсулярным эффектом, являются одной из возможных причин развития СД типа 2. Кроме того, обладая способностью снижать продукцию инсулина β -клетками ост-

ровков Лангерганса, апоВ-содержащие ЛП усугубляют течение инсулинзависимого диабета [2].

Выводы

1. Получены специфические антитела к фрагменту аполипопротеина В (пептид В), обладающие иммуноподобной иммунореактивностью.

2. Антитела к пептиду В в ИФА реагировали с аполипопротеином В-100, цельной сывороткой, сывороткой после осаждения суммарной фракции — ЛПНП и ЛПОНП и с сывороткой после удаления всех ЛП путем ультрацентрифугирования.

3. По сравнению со здоровыми донорами содержание пептида В в сыворотке крови больных СД типа 2 было достоверно выше. С увеличением длительности заболевания содержание пептида В возрастало.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов И. И., Фадеев В. В. Введение в диабетологию. — М., 1998.
2. Панин Л. Е., Остапина Л. С., Атучина Н. В. // Бюл. эксп. биол. — 1994. — № 9. — С. 258–261.
3. Панин Л. Е., Остапина Л. С., Колпаков А. Р. // Вопр. мед. химии. — 1995. — Т. 41, № 6. — С. 12–16.
4. Панин Л. Е., Сабиров А. Н., Максюттов А. З. и др. // Молекул. биол. — 1997. — Т. 31, № 2. — С. 366–372.
5. Поляков Л. М., Потеряева О. Н., Панин Л. Е. // Лаб. дело. — 1991. — № 9. — С. 24–26.
6. Рендел А. Диабет / Под ред. Р. Уильямс. — М., 1964.
7. Burstein M., Samaille J. // Clin. Chim. Acta. — 1960. — Vol. 71, N 5. — P. 609–615.
8. Hatch F. T., Lees R. S. // Adv. Lipid Res. — 1968. — Vol. 6. — P. 2–11.
9. Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randal R. J. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.
11. Ouchterlony O. // Progr. Allergy. — 1958. — Vol. 5. — P. 1–77.

Поступила 07.12.2000

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2002

УДК 616.379-008.64-058-07

П. И. Сидоров, А. Г. Соловьев, И. А. Новикова

СОЦИАЛЬНО-ПСИХОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КАЧЕСТВА ЖИЗНИ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Медицинская академия, Архангельск

С целью изучения внутренней картины болезни — изменений, произошедших в социально-психологической сфере под влиянием эндокринологического заболевания, проведен опрос 120 больных сахарным диабетом по разработанной авторами методике с использованием специального опросника, включающего в себя 85 вопросов, посвященных различным аспектам жизни пациентов. Результаты исследования выявили наличие у респондентов выраженных переживаний и личностных проблем во всех социально значимых областях, снижающих качество жизни. Для большинства опрошенных характерна искаженная картина болезни с фиксацией на "уход в заболевание". Выявление особенностей переживаний пациентов относительно их недуга, раскрытие внутренней картины болезни при сахарном диабете направлено на целостное представление об адаптивных возможностях, ценностно-мотивационной системе и защитных механизмах больных для разработки более адекватных психотерапевтических подходов.

In order to evaluate the inner picture of the disease and the changes in socio-psychological sphere under the effect of endocrinological disease, 120 diabetics were interviewed using a special questionnaire including 85 questions on different aspects of patients' life. The results showed pronounced emotional and personal problems in all socially significant spheres, which deteriorated the quality of life. A distorted picture of the disease with fixation on "escape into disease" was characteristic of the majority of respondents. The detection of patients' emotions concerning their suffering and revelation of the inner picture of disease in diabetics are aimed at evaluation of the adaptive potential, value motivation system, and defense mechanisms for development of more adequate psychotherapeutic approaches.