Диагностическая значимость неинвазивного определения уровня ИСЙ при узловом зобе

При узловом зобе неинвазивное определение уровня ИСЙ имеет большое значение. Анализ ИСЙ в узловом образовании может быть проведен тогда, когда оно четко пальпируется и диаметр его составляет не менее 8 мм. В этом случае снижение концентрации стабильного йода в очаге поражения менее 200 мкг/г свидетельствует о необходимости биопсии и/или оперативного вмешательства, так как резкое уменьшение уровня ИСЙ встречается и при аденомах, и при раке ЩЖ, имеющих неблагоприятный прогноз. Это связано с тем, что в клетках указанных выше образований ЩЖ снижается активность полирибосом (или они полностью отсутствуют, как, например, при злокачественных новообразованиях), синтезирующих тироглобулин, содержащий 80% ИСЙ. При коллоидном узловом зобе, имеющем доброкачественное течение, концентрация стабильного йода в очаге поражения составляет 400—850 мкг/г (см. табл. 1).

Следует подчеркнуть, что неинвазивная технология определения уровня ИСЙ имеет приоритетное значение при диагностике аутоиммунных процессов и дефицита йода в ЩЖ. Большое значение эта методика приобретет при контроле лечения йодидами и тироксином. В настоящее время разрабатываются подходы к использованию указанного метода для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных образований ЩЖ.

ЛИТЕРАТУРА, РЕКОМЕНДУЕМАЯ ПО ДАННОМУ ВОПРОСУ

1. *Бронштейн М. Э.* // Проб. эндокринол. — 1991. — № 2. — С. 6—10.
2. *Томашевский И. О., Томашевский Д. И.* // Мед. радиол. — 1991. — № 6. — С. 17—20.
3. The Thyroid and Tissues / Eds J. Orgazzi, J, Leclere, U. Hostalek. — Stuttgart, 1994.
4. X-ray Fluorescent Scanning of the Thyroid / Eds M. H. Jonckheer, F. Deconinck. — Boston, 1983.

Поступила 23.11.95

♦ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© Е. А. ЛЕБЕДЕВА, 1996

УДК 616.379-008.64.07:616.153.96-092.4

Е. А. Лебедева

ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ НА ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА

Кафедра эндокринологии (зав. — проф. Н. И. Вербовая) Самарского государственного медицинского университета

Гликозилирование белков — это неферментативный процесс присоединения глюкозы к аминогруппам белка [3, 5], неспецифическая реакция, в которую вовлекаются белки сыворотки крови, структурные белки базальных мембран (коллаген, эластин, тубулин), белки мембран эритроцитов и др. Гликозилирование изменяет физико-химические и физиологические свойства белка. По современным представлениям, гликозилирование является пусковым механизмом в формировании диабетических ангиопатий [1, 7, 15]. На процесс гликозилирования влияют концентрация глюкозы и время экспозиции (наиболее значительно через 20 и более дней после начавшегося повышения концентрации глюкозы крови).

Белки плазмы крови подвергаются интенсивному гликозилированию при сахарном диабете [6, 9]. Сумма гликозилированных белков плазмы называется фруктозамином. Среди них доминирует альбумин, который составляет более 60% от всех сывороточных белков [2].

Реакция гликозилирования может успешно протекать не только в организме, но и в пробирке. Описаны методики гликозилирования сывороточного альбумина человека (САЧ) в термостате при 37°С, где образование фруктозамина наблюдали уже через 7 дней [14]. Гликозилирование может происходить и при инкубации среды, содержащей глюкозу и белок, при 1—2°С [12]. Инкубация САЧ в присутствии глюкозы в опытах in vitro позволяет определить степень гликозилирования путем изучения концентрации конечного продукта — фруктозамина.

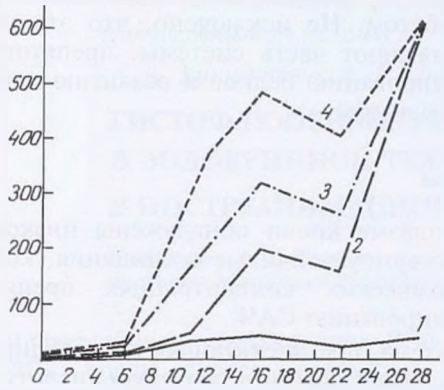
Целью работы было изучение влияния на процесс гликозилирования веществ, содержащихся в нативной плазме крови человека.

Материалы и методы

Содержание фруктозамина в плазме крови или в искусственной среде определяли методом, основанным на способности фруктозамина восстанавливать тетразолий нитросиний в щелочной среде [5]. 0,1 мл исследуемой жидкости вносили в среду, содержащую 57 мкмоль тетразолия нитросинего, и добавляли карбонатный буфер pH 10,35. Смесь инкубировали в течение 10 мин на водяной бане при 37°С, а затем измеряли плотность с помощью фотоэлектроколориметра при длине волны 530 нм. В качестве стандарта были взяты образцы САЧ, которые инкубировали с глюкозой в концентрации 44 ммоль/л в течение 30 дней при 1—2°С. При этом САЧ был полностью гликозилирован, а содержание фруктозамина — максимальным. В качестве исходного реагента был взят САЧ фирмы "Reanal". Из смеси нескольких образцов полностью гликозилированного САЧ были сделаны разведения и построен калибровочный график, который позволял выразить степень гликозилирования белка в микромолях полностью гликозилированного САЧ. График предусматривал, что содержание фруктозамина в нативном неинкубированном САЧ равно нулю.

Среда для инкубации в холодильнике при 1—2°С содержала 1 мл% САЧ, глюкозу в конечной концентрации 44 ммоль/л или в ряде опытов в концентрации 11, 22, 88 ммоль/л. Смесь была приготовлена на фосфатном 0,05 М буфере и находилась в холодильнике. Ее анализировали на содержание фруктозамина на 5, 10, 15 и 20-й день от начала инкубации.

В среду инкубации в отдельных опытах добавляли аминокислоты, мочевину, мочевую кислоту, креатинин в концентрации 10^{-3} М. Вначале проводили скрининговые опыты, позволяющие приблизительно оценить влияние этих соединений на процесс гликозилирования и выбрать из них наиболее эффективные, а затем ставили опыты с большим числом наблюдений для статистической обработки результатов. Сначала для всех изучаемых веществ применяли концентрацию 10^{-3} М, она позволяла сравнительно оценить влияние всех соединений на гликозилирование. Однако в заключительных иссле-



Гликозилирование 5% САЧ при различных концентрациях глюкозы в среде в течение 28 дней.

По оси ординат — концентрация полностью гликозилированного САЧ (в мкмоль/л); по оси абсцисс — время от начала инкубации (в сут). *1* — концентрация глюкозы 11 ммоль/л, *2* — 22 ммоль/л, *3* — 44 ммоль/л, *4* — 88 ммоль/л.

дованиях были использованы те концентрации, в которых эти вещества находятся в плазме крови.

Результаты и их обсуждение

В I серии опытов изучали гликозилирование САЧ различными концентрациями глюкозы. Из рисунка видно, что при концентрации глюкозы 11 ммоль/л происходит образование незначительного количества полностью гликозилированного САЧ в среде. Концентрации глюкозы 22, 44, 88 ммоль/л к 28-му дню инкубации значительно повышают содержание гликозилированного САЧ, причем чем больше концентрация глюкозы, тем быстрее наступает гликозилирование. Данные отдельных опытов, приведенные на рисунке, позволили судить о выраженности процесса гликозилирования при концентрации глюкозы в среде 44 ммоль/л, которая и была взята в последующих опытах как эталон для дальнейших экспериментов.

Во II серии опытов в среду инкубации, содержащую 5% САЧ и 44 ммоль/л глюкозы, была добавлена плазма крови здорового человека и плазма больного диабетомв стадии декомпенсации заболевания в количестве 50% от объема инкубационной среды. Инкубацию проводили в течение 14 дней в холодильнике.

Из табл. 1 следует, что процесс гликозилирования идет во всех трех пробах по сравнению с инкубированным САЧ. В среде с добавлением к САЧ глюкозы процесс гликозилирования значителен (273,3 ± 6,6 мкмоль/л), в то время как при добавлении плазмы здорового человека величина гликозилирования снижается и составляет лишь 19,0 ± 1,3 мкмоль/л ($p_2 < 0{,}001$), так же, как и при добавлении плазмы больного диабетом — 22,6 ± 0,57 мкмоль/л ($p_2 < 0{,}001$). Таким образом, и плазма здорового человека, и плазма больного диабетом снижают степень гликозилирования, что было показано нами в предыдущей публикации [4].

Для того чтобы выяснить, какие вещества плазмы обладают способностью подавлять гликозилирование САЧ, мы провели термическую обработку плазмы при 100°С в течение 2 мин. Оказалось, что жидкость, отделенная центрифугированием от коагулированных белков плазмы, способна в такой же степени угнетать гликозилирование САЧ. Так, после 14 дней инкубации образование гликозилированного САЧ в его 5% растворе составило 273 ± 6,6 мкмоль/л, в то время как после добавления жидкой части коагулированной плазмы — 13,44 ± 0,87 мкмоль/л ($p < 0{,}001$). Таким образом, можно предположить, что вещества, подавляющие гликозилирование, не относятся к термолабильным соединениям. Они, очевидно, не могут быть отнесены и к белкам. Мы предположили, что этими соединениями являются низкомолекулярные вещества плазмы, оказывающие конкурентное влияние на реакцию гликозилирования. Хорошо известно, что гликозилирование является следствием взаимодействия глюкозы с аминогруппами аминокислот белка. Не исключено, что такими веществами, конкурентно угнетающими процессы гликозилирования, могут быть соединения, содержащие аминогруппу: аминокислоты, мочевина, мочевая кислота, креатинин и др.

Были проведены скрининговые опыты с целью хотя бы ориентировочно выявить соединения, способные в принятой нами концентрации 10^{-3} М вызывать снижение гликозилирования. Были изучены следующие вещества: глутаминовая кислота, лейцин, лизин, гистидин, цистеин, аргинин, а также мочевина, мочевая кислота, креатинин. По результатам ориентировочного исследования 3 соединения обнаружили тенденцию к подавлению процесса гликозилирования. Поэтому в последующем они были более тщательно исследованы в сериях опытов, позволяющих провести статистическую обработку данных. Аргинин статистически достоверно угнетал процесс гликозилирования САЧ — с 151 ± 18,6 до 31,3 ± 7,9 мкмоль/л ($p < 0{,}001$), мочевая кислота — до 1,7 ± 1,7 мкмоль/л ($p < 0{,}001$), однако снижение, вызываемое креатинином, было статистически недостоверно.

Таким образом, далеко не все вещества, содержащие аминогруппы, способны вызывать снижение гликозилирования, но 2 из них дают статистически достоверный эффект в концентрации 10^{-3} М. В последующем мы изучили действие мочевой кислоты и аргинина на гликозилирование при более низкой концентрации глюкозы (17 ммоль/л), которая часто регистрируется у больных сахарным диабетом (табл. 2).

Таблица 1

Влияние плазмы здорового человека и плазмы больного сахарным диабетом на гликозилирование САЧ при концентрации глюкозы в среде 44 ммоль/л в течение 14 дней

Статистический показатель	Концентрация полностью гликозилированного САЧ (в мкмоль/л) в среде, содержащей			
	САЧ	САЧ и глюкозу	САЧ, глюкозу и плазму здорового человека	САЧ, глюкозу и плазму больного диабетом
$M \pm m$	0	273,3 ± 6,6	19,0 ± 1,3	22,6 ± 0,57
n	9	9	9	9
p_1		<0,001	<0,001	<0,001
p_2			<0,001	<0,001

Примечание. p_1 — достоверность различий со средой, содержащей один САЧ; p_2 — со средой, содержащей один САЧ и глюкозу.

Таблица 2

Влияние мочевой кислоты, креатинина, аргинина в концентрации 10^{-3} М на гликозилирование САЧ при концентрации глюкозы в среде 17 ммоль/л в течение 14 дней

Статистический показатель	Концентрация полностью гликозилированного САЧ (в мкмоль/л)			
	контроль	мочевая кислота	креатинин	аргинин
$M \pm m$	45,0 ± 5,88	8,25 ± 6,07	33,66 ± 5,78	0
n	9	9	9	9
p		<0,001	>0,05	<0,001

При более низкой концентрации глюкозы в крови мочевая кислота и аргинин (но не креатинин) статистически достоверно подавляют процесс гликозилирования, причем аргинин действует даже более сильно, чем мочевая кислота, что отличает данную серию опытов от предыдущей.

Наконец, решено было создать в инкубационной среде такие концентрации всех трех изучаемых нами веществ, которые в норме присутствуют в плазме крови, и выяснить, может ли такая среда тормозить гликозилирование САЧ. Содержание САЧ в среде составило 5%, глюкозы — 17 ммоль/л, аргинина — 3 мг/100 мл, креатинина — 2 мг/100 мл, мочевой кислоты — 10 мг/100 мл.

В контроле на 14-й день инкубации содержание полностью гликозилированного САЧ было 38,8 ± 5,88 мкмоль/л, а при инкубации с физиологическими концентрациями всех трех веществ — 12,88 ± 5,29 мкмоль/л ($p < 0,01$).

Таким образом, содержащиеся в плазме крови низкомолекулярные соединения — мочевая кислота, аргинин и, возможно, некоторые другие — способны тормозить процесс гликозилирования САЧ при повышении концентрации глюкозы в крови. Не исключено, что аргинин соединяется с глюкозой, такое взаимодействие может быть конкурентным по отношению реакции связывания глюкозы с аминогруппами белка. Известно, что аргинин в части своей формулы похож на аминогуанидин — вещество, которое известно как эффективный блокатор гликозилирования белка [13, 16]. Аминогуанидин не препятствует образованию первичных продуктов гликозилирования, к которым относится фруктозамин. Аминогуанидин блокирует дальнейшее превращение этих соединений, так как образует с ними неактивные комплексы, не способные к дальнейшим модификациям и образованию ковалентных связей между молекулами. Длительное применение аминогуанидина препятствует формированию диабетических ангиопатий [8, 10, 11].

Механизм действия мочевой кислоты не совсем ясен. Не исключено, что она может изменить структуру белка так, что аминогруппы становятся менее доступны для соединения с глюкозой.

Очень важно, что аргинин, мочевая кислота и креатинин способны предотвращать гликозилирование в тех концентрациях, в которых они содержатся в плазме крови, и при действии концентраций глюкозы, которые могут наблюдаться у больных диабетом. Не исключено, что эти соединения составляют часть системы, препятствующей гликозилированию белков и развитию диабетических ангиопатий.

Выводы

1. В плазме крови обнаружены низкомолекулярные, термоустойчивые соединения, которые в физиологических концентрациях препятствуют гликозилированию САЧ.

2. Система, препятствующая гликозилированию САЧ, включает аргинин, мочевую кислоту и в небольшой степени креатинин. Возможно и наличие других содержащих аминогруппы соединений, угнетающих процесс гликозилирования белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Балаболкин М. И.* Сахарный диабет. — М., 1994.
2. *Викторова Л. Н., Наводный О. А., Городецкий В. К.* // Лаб. дело. — 1990. — № 7.— С. 14—16.
3. *Денисенко Т. В.* // Вопр. мед. химии. — 1990. — № 2. — С. 5—10.
4. *Лебедева Е. А.* // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической фармакологии. — Смоленск, 1994. — С. 70—71.
5. *Свистунова О. И., Титов В. Н.* // Клин. лаб. диагност. — 1992. — № 11—12. — С. 22—30.
6. *Arbuster D. A.* // Clin. Chem. — 1987. — Vol. 33, N 12. — P. 2153—2163.
7. *Brownlee M., Cerami A., Vlassara H.* // N. Engl. J. Med. — 1988. — Vol. 318, N 20. — P. 1315—1321.
8. *Cameron N. E., Cotter M. A.* // Diabet. Metab. Rev. — 1994. — Vol. 10, N 3. — P. 189—224.
9. *Guthrow C. E., Morris M. A., Day J. B.* et al. // Proc. natl. Acad. Sci USA. — 1979. — VOl. 76. — P. 4258—4261.
10. *Hammes H. P., Uhlmann M., Weis A., Federlin K.* // Europaen Association for the Study of Diabetes. Annual Meeting, 29-th: Abstracts. — Istanbul. 1993. — P. A50.
11. *Huijberts M. S. P., Wolttenhuttel B. H. R., Grijns F. R. J.* // J. Amer. Diabet. Assoc. — 1993. — Vol. 42, Suppl. 1. — P. 96A.
12. *Moldrem J., Robinson P., Wong Z.* et al. // Ibid. — P. 4A.
13. *Odetti P. R., Borgoglio A., Pascale A.* et al. // Diabetes. — 1989. — Vol. 39, N 7. — P. 796—802.
14. *Tarsio J., Reger L. A., Furcht L. T.* // Ibid. — 1988. — Vol. 37, N 5. — P. 532—539.
15. *Vlassara H.* // Diabet. Care. — 1990. — Vol. 13, N 11. — Suppl. 4. — P. 1180—1185.
16. *Williamson J. R., Chang K., Ido Y.* et al. // Diabet. Metab. — 1990. — Vol. 16, N 4. — P. 369—370.

Поступила 12.07.95

Ye.A. Lebedeva - EFFECT OF BLOOD PLASMA COMPONENTS ON HUMAN SERUM ALBUMIN GLYCOSYLATION

Summary. Glycosylation of human serum albumin (HSA) with ascending glucose concentrations was studied. The incubation medium contained 5% HSA and glucose in concentrations 11, 22, 44, and 88 mmol/liter. The degree of glycosylation was assessed by the end product, fructosamine. A linear correlation between glucose concentration and fructosamine was detected. Addition to incubation medium of human native plasma of a normal subject or diabetic with type I disease (50% of the initial volume) reliably inhibited glycosylation. Thermostable low-molecular substances were identified, which cause a delay of glycosylation: creatinine, uric acid, and arginine. Addition of these compounds in physiological concentrations reliably reduced glycosylation of HSA. Hence, we found the components of blood plasma defense system which prevent the formation of fructosamine in hyperglycemia.