© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.153.963.1-02:577.175.3]-078.33

*А. А. Булатов, А. Г. Киселева, Т. В. Горшкова, Н. Б. Акопова*

# ИММУНОАНАЛИЗ СВОБОДНОЙ α-СУБЪЕДИНИЦЫ ГЛИКОПРОТЕИНОВЫХ ГОРМОНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И ЕЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ С ГЛИКОПРОТЕИНОВЫМИ ГОРМОНАМИ ГИПОФИЗА

Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАМН И.И.Дедов) РАМН, Москва

Гормоны гипофиза — тиреотропный (ТТГ), лютеинизирующий (ЛГ) и фолликулостимулирующий (ФСГ) — являются гликопротеинами, построенными из двух различных субъединиц [2]. Они содержат в своем составе идентичную для всей группы α-субъединицу (АС) и специфичную для каждого гормона β-субъединицу. α-, β- Субъединицы кодируются различными генами, локализованными на разных хромосомах [2, 5]. Их биосинтез происходит раздельно. Зрелые биологически активные молекулы ТТГ, ЛГ и ФСГ, секретируемые в кровь, образуются в клетках гипофиза в результате нековалентной ассоциации АС с соответствующими β-субъединицами. Показано, что АС в виде свободной молекулы может секретироваться в кровь в очень небольшом количестве в нормальных условиях и в повышенном количестве при некоторых нарушениях функции клеток гипофиза [3]. Поэтому исследование самостоятельной секреции АС представляет определенный научный интерес и диагностическую ценность.

В связи с этим нами была разработана на основе АС, полученной путем диссоциации молекулы ТТГ человека, специальная радиоиммуногическая тест-система, позволяющая избирательно измерять уровень свободной АС в сыворотке крови человека.

В настоящей работе приведена характеристика ключевых реагентов, использованных для конструирования тест-системы, ее аналитических параметров, специфичности по отношению к гликопротеиновым гормонам, в состав которых она входит. Кроме того, с помощью разработанной тест-системы изучены взаимоотношения свободной АС и гликопротеиновых гормонов при различном уровне их секреции у больных с эндокринными нарушениями, содержание свободной АС в сыворотке крови у практически здоровых женщин и у женщин с клинически нефункционирующими опухолями гипофиза, когда секреция АС, по некоторым данным [3, 5], может повышаться.

## Материалы и методы

Все основные компоненты тест-системы — препарат АС, специфическая антисыворотка против нее, АС, меченная $^{125}$I, а также высокоочищенные ТТГ, ЛГ и ФСГ человека для исследования перекрестных реакций были получены в лаборатории.

ТТГ выделяли из постмортальных человеческих гипофизов методом [6], в котором в качестве ключевых этапов очистки использовали ионообменную хроматографию на КМ- и ДЭАЭ-целлюлозах и гель-фильтрацию на сефадексах. Иммунологическая активность препарата ТТГ на конечной стадии очистки в радиоиммунологической системе достигала 11 МЕ на 1 мг белка. Этот препарат являлся исходным для получения АС методом [4] с использованием 8 М мочевины и противоточного распределения в двухфазной системе, содержащей сульфат аммония, 0,2% дихлоруксусную кислоту, н-пропанол, этанол в соотношении 60:60:27:33. АС, находившуюся в нижней фазе, после удаления органических растворителей на роторном испарителе и солей посредством диализа освобождали от остатков недиссоциировавшего ТТГ гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-100.

Антисыворотку против АС получали иммунизацией кроликов путем множественных (20-30) внутрикожных и подкожных инъекций раствора АС. Первую иммунизацию проводили 130 мкг АС в полном адъюванте Фрейнда, повторную — через 1 мес 100 мкг АС также в полном адъюванте и две поддерживающие — по 20 мкг АС с интервалом 1 мес. Контроль за образованием антител и ростом их титра осуществляли в иммуноферментной системе и по реакции иммунопреципитации в агаре.

Йодирование АС осуществляли $^{125}$I с помощью йодогена. Отделение несвязанного йода проводили гель-фильтрацией реакционной смеси через колонку с сефадексом G-75. Техника определения АС соответствовала традиционной схеме радиоиммунологического анализа. Исследуемый образец сыворотки крови или стандарта АС инкубировали с моноспецифическими антителами к АС, выработанными у кролика, при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем в реакционную смесь добавляли меченую АС и после перемешивания инкубировали в течение 18 ч при комнатной температуре, после чего добавляли вторые антитела к иммуноглобулинам кролика, с помощью которых в присутствии полиэтиленгликоля иммунный комплекс АС с антителами к ней выпадал в осадок. После инкубации со вторыми антителами в течение 1 ч при комнатной температуре осадок собирали центрифугированием, отсасывали надосадочную жидкость с помощью водоструйного насоса и измеряли радиоактивность осадка на гамма-счетчике.

Содержание ТТГ, ЛГ и ФСГ в сыворотках крови определяли радиоиммунологическим методом с помощью тест-систем, разработанных в лаборатории на основе соответствующих высокоочищенных антигенов и моноспецифических антисывороток. В качестве рабочих стандартов при этом использовали высокоочищенные препараты гормонов, аттестованные по соответствующим международным стандартам, полученным из Национального института биологических стандартов и контроля (Лондон). Содержание гормонов, так же как и АС, выражали в нанограммах на 1 мл сыворотки крови.

## Результаты и их обсуждение

На рис. 1 можно видеть результат разделения ТТГ человека на субъединицы с помощью противоточного распределения в двухфазной системе. График отражает оптическую плотность в верхней и нижней фазах после 10 последовательных переносов фаз. Верхняя фаза содержала β-субъединицу. АС вместе с оставшейся недиссоциировавшей небольшой частью гормона находилась в нижней фазе. После освобождения от примеси голо-ТТГ путем гель-фильтрации полученная таким образом АС давала в радиоиммунологической тест-системе для ТТГ человека перекрестную реакцию менее 0,2%. Этот пре-

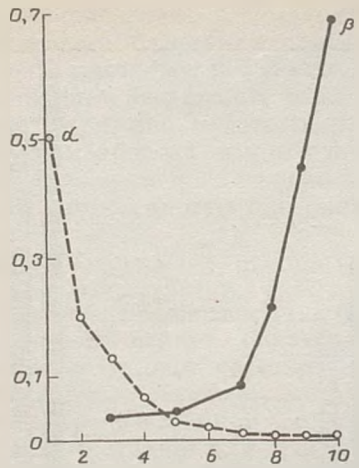


Рис. 1. Разделение ТТГ человека на субъединицы методом противоточного распределения в двухфазной системе. Условия см. в разделе "Материалы и методы".

По оси ординат — оптическая плотность при длине волны 280 нм; по оси абсцисс — номера пробирок.

парат АС использовали в качестве антигена для выработки специфических антител, для получения АС, меченной $^{125}I$, и в качестве стандарта для калибровочной кривой.

На основе высокоочищенного препарата АС, кроличьей антисыворотки против АС и радиоактивно меченного лиганда была сконструирована радиоиммунологическая тест-система для определения АС в сыворотке крови человека. Титр антител к АС, использованный в тест-системе, составлял 1:50 000. Типичная калибровочная кривая тест-системы для количественного определения АС представлена на рис. 2. Она включает 7 разведений препарата АС — от 0,4 до 50 нг/мл. Чувствительность тест-системы 0,15 нг/мл. Коэффициент вариаций результатов определения не превышал 7%.

При создании иммунохимической тест-системы для количественного анализа АС необходимо было учитывать, что АС является одинаковой для всей группы гликопротеиновых гормонов гипофиза — ТТГ, ЛГ и ФСГ и потому при использовании кроличьей антисыворотки против АС, полученной из молекулы ТТГ, возможно некоторое ее перекрестное взаимодействие со всеми этими гормонами.

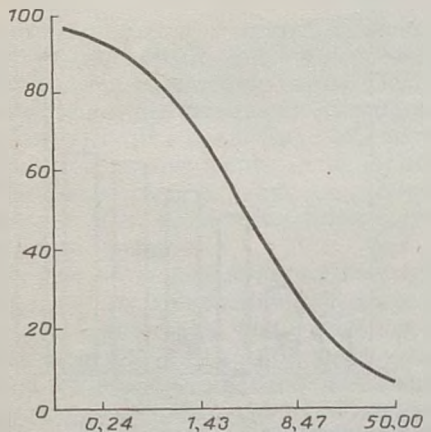


Рис. 2. Калибровочная кривая тест-системы для определения свободной АС гликопротеиновых гормонов гипофиза.

По оси ординат — $B/B_0 \cdot 100$ (в %); по оси абсцисс — концентрация свободной АС в стандартных пробах (в нг/мл; логарифмическая шкала).

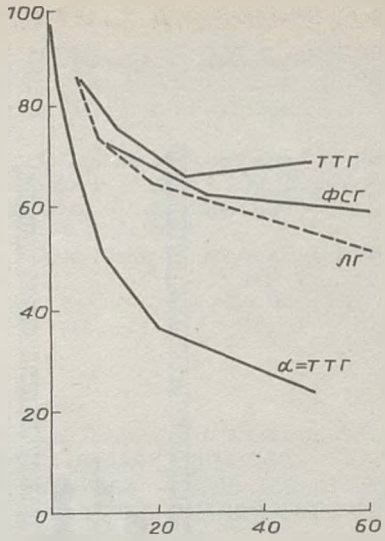


Рис. 3. Исследование перекрестных реакций ТТГ, ФСГ и ЛГ в тест-системе для определения АС человека.

По оси ординат — $B/B_0$ 100 (в %); по оси абсцисс — концентрация свободной АС или ТТГ, ЛГ, ФСГ (в нг/мл).

Исследование специфичности антисыворотки против свободной АС, использованной в разработанной тест-системе, а также возможных перекрестных реакций гликопротеиновых гормонов в этой системе было осуществлено с помощью высокоочищенных препаратов ТТГ, ЛГ и ФСГ человека, полученных в лаборатории и аттестованных по соответствующим международным стандартам ВОЗ. Интервалы концентраций, в пределах которых были исследованы перекрестные взаимодействия, составляли для ТТГ 3-400 нг/мл, для ЛГ 0,3—390 нг/мл, для ФСГ 3,7-480 нг/мл. Максимальные величины этих концентраций превышали наибольшую дозу калибровочной кривой в радиоиммунологической системе для определения свободной АС в 8-9 раз. Результаты исследования перекрестных реакций при использовании тех же доз, что и для АС, представлены на рис. 3. В пересчете на массу препаратов гликопротеиновых гормонов перекрестная реакция в разработанной тест-системе для определения свободной АС составляла в случае ТТГ 3,7%, ФСГ 10%, ЛГ 16 %.

С целью изучения взаимоотношений между определяемыми радиоиммунологическим методом гликопротеиновыми гормонами и свободной АС в крови нами был проведен одновременный их количественный анализ в сыворотках крови случайной выборки больных — 14 женщин с разным эндокринным статусом и различным уровнем гликопротеиновых гормонов, особенно ФСГ и ЛГ. Анализ полученных при этом данных (рис. 4) свидетельствует об отсутствии обязательной корреляции между уровнями свободной АС и гликопротеиновых гормонов в крови. У некоторых пациенток при резко повышенном содержании ФСГ определяемый уровень свободной АС был невысоким (например, сыворотки *3*, *5*, *6* на рис. 4). Вместе с тем у других больных, имевших достаточно высокое содержание АС в сыворотке крови (сыворотки *7-14*), величины содержания гликопротеиновых гормонов были более низкими и не могли с учетом выявленной перекрестной иммунореактивности объяснить столь вы-

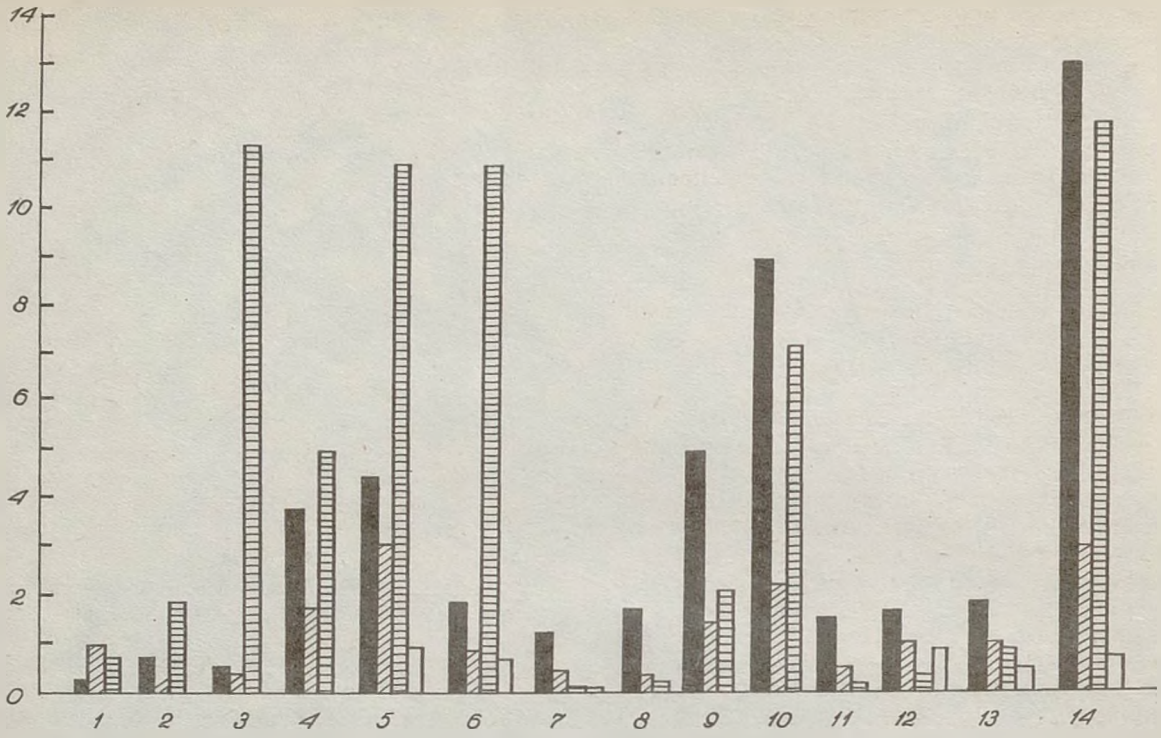


Рис. 4. Содержание (в нг/мл - по оси ординат) АС (темные столбики), ЛГ (столбики с косой штриховкой), ФСГ (столбики с горизонтальной штриховкой) и ТТГ (светлые столбики) в сыворотках крови 14 женщин с различным эндокринным статусом (по оси абсцисс).

сокий уровень иммунореактивности АС в этих сыворотках.

Таким образом, полученные данные указывают, с одной стороны, на специфичность разработанной нами тест-системы для свободной АС, а с другой — подтверждают возможность независимой секреции гипофизом свободной АС в кровь.

Необходимо отметить, что в сыворотках крови 5 женщин с крайне высоким уровнем гонадотропинов в сыворотке крови (более 30 ЕД/л) вследствие развития посткастрационного синдрома после гонадэктомии нами с помощью разработанной тест-системы были обнаружены высокие величины содержания иммунореактивной АС (2,94-13,6 нг/мл). Однако в таких случаях сочетания высокого уровня гонадотропинов и АС судить об истинном содержании последней в сыворотке крови, учитывая существование определенной перекрестной иммунореактивности между этими близкими антигенами, можно было бы только после предварительного разделения фракций свободной АС и гонадотропинов, например путем гель-фильтрации сыворотки крови.

Поскольку в литературе имеются сведения о возможности повышения секреции свободной АС в кровь при гормонально-неактивных, клинически не функционирующих опухолях гипофиза [3], мы изучали содержание свободной АС в сыворотке крови 24 женщин в возрасте 18-36 лет (находившихся на обследовании в Институте клинической эндокринологии ЭНЦ РАМН) с диагнозом нефункционирующей опухоли гипофиза. Наличие опухоли гипофиза было диагностировано на основании данных компьютерной или магнитно-резонансной томографии области турецкого седла.

Для контроля содержание свободной АС определяли также у 12 женщин 17-30 лет без признаков эндокринных заболеваний. У этой группы женщин базальный уровень АС в сыворотке крови был довольно низким и составлял в среднем 0,9±0,22 нг/мл ($M\pm\sigma$), что практически не отличалось от "нормального" содержания АС в сыворотке крови женщин до наступления менопаузы, установленного аналогичным радиоиммунологическим методом другими авторами [1, 3]. Однако у 15 из 24 пациенток с нефункционирующей опухолью гипофиза он превышал среднее содержание в контрольной группе более чем на величину 2σ, а у некоторых больных — в 2-2,5 раза. При этом уровень гликопротеиновых гормонов гипофиза в сыворотке крови был в пределах нормы. На рис. 5 можно видеть, что воз-

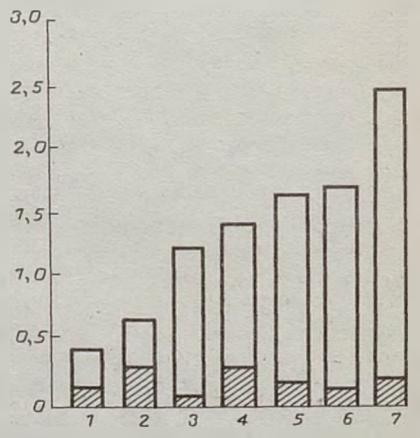


Рис. 5. Возможный суммарный вклад ТТГ, ЛГ и ФСГ (заштрихованная часть столбиков) в определяемый уровень АС в сыворотке крови за счет перекрестных реакций.

По оси ординат — содержание АС (в нг/мл); по оси абсцисс — сыворотки крови 7 больных с нефункционирующими аденомами гипофиза.

можный суммарный вклад гликопротеиновых гормонов в определяемый уровень свободной АС в сыворотке крови 7 женщин с нефункционирующими опухолями гипофиза был крайне незначителен.

Таким образом, можно заключить, что наличие у этих больных в сыворотке крови иммунореактивной АС является истинным и не зависит от секреции гипофизом гликопротеиновых гормонов.

## Выводы

1. Сконструирована радиоиммунологическая тест-система для количественного определения свободной АС гликопротеиновых гормонов в сыворотке крови человека с чувствительностью 0,15 нг/мл.

2. С помощью разработанной тест-системы установлено отсутствие прямой корреляции между уровнем свободной АС и содержанием гликопротеиновых гормонов в сыворотке крови у обследованных женщин с различным эндокринным статусом, что свидетельствует, с одной стороны, о специфичности тест-системы, а с другой — подтверждает возможность независимой секреции гипофизом свободной АС в кровь.

3. Базальное содержание свободной АС в сыворотке крови практически здоровых людей находится на низком уровне: у женщин в возрасте 17-30 лет оно составляет в среднем 0,9 нг/мл.

4. Выявлено повышение уровня секреции свободной АС в крови у значительной части больных с нефункционирующими опухолями гипофиза, что указывает на диагностическое значение определения свободной АС в качестве маркера этих опухолей.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Assadian H., Shimatsu A., Koshiyama H.* et al. // Acta endocr. (Kbh.). — 1990. — Vol. 122. — P. 729—734.
2. *Hartree A.S., Renwick A.G.C.* // Biochem. J. — 1992. — Vol. 287. — P. 665— 679.
3. *Oppenheim D.S., Kana A.R., Sangha J.S., Klibanski A.* // J. clin. Endocr. Metab. — 1990. — Vol. 70, N 4. — P. 859—864.
4. *Papkoff H., Samy T.S.A.* // Biochim. biophys. Acta. — 1967. — Vol. 147. — P. 175—177.
5. *Persani L., Beck-Peccoz P., Medri G.* et al. // Neuroendocrinology. — 1991. — Vol. 53. — P. 411—415.
6. *Sairam M.R., Li C.H.* // Canad. J. Biochem. — 1977. — Vol. 55. — P. 747—752.


Поступила 06.06.94

*A.A.Bulatov, A.G.Kiselyova, T.V.Gorshkova, N.B.Akopova* — IMMUNOANALYSIS OF FREE A-SUBUNITS OF GLYCOPROTEIN HORMONES IN HUMAN BLOOD SERUM AND ITS RELATIONSHIPS WITH THE PITUITARY GLYCOPROTEIN HORMONES


S u m m a r y. A radioimmunoassay test system has been designed for measurements of free α-subunit (AS) of glycoprotein hormones in human blood serum with a sensitivity of 0.15 ng/ml. This test system revealed the absence of a direct correlation between the levels of free AS and levels of glycoprotein hormones in the blood sera of women with various endocrine profile, this being indicative of the specificity of this test system, on the one hand, and, on the other, confirmming the possibility of independent secretion by the pituitary of free AS into the blood. Basal blood serum level of free AS in normal subjects is low: 0,9 ng/ml in women aged 17 to 30. The level of free AS secretion in the blood of many patients with nonfunctioning tumors of the pituitary was found increased, this demonsrating the diagnostic significance of measuring free AS as a marker of such tumors.


© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.547.551.525.211.1.].015.44:616.37-018.1].07

*В. Н. Бабичев, М. П. Савельева, М. И. Балаболкин*

# ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЦЕПТОРОВ β-КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, СВЯЗЫВАЮЩИХ СУЛЬФАНИЛАМИДНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Лаборатория физиологии эндокринной системы (зав. — проф. В.Н.Бабичев) Института экспериментальной эндокринологии (дир. — акад. РАМН И.Г.Акмаев) Эндокринологического научного центра (дир. — акад. РАМН И.И. Дедов), Москва

Сульфаниламидные препараты, являясь сильными гипогликемическими веществами, широко используются в лечении диабета II типа. Подобно глюкозе сульфаниламиды вызывают изменения электрической активности в β-клетках островков поджелудочной железы, конвергируя главным образом на уровне АТФ-зависимых $K^+$-каналов, не исключается их действие и на различные другие типы $Ca^{2+}$-чувствительных каналов.

Вместе с тем в последнее время на мембране β-клеток обнаружены и идентифицированы высокоспецифические рецепторы для сульфаниламидных препаратов. Большие возможности сульфаниламидных препаратов второй генерации связываются с их возможностью запускать выделение инсулина в наномолярных концентрациях за счет высокой степени их сродства и прочного лигандно-рецепторного взаимодействия с рецепторными образованиями.

Имеющиеся в литературе данные по оценке связывающих способностей сульфаниламидных препаратов с β-клетками весьма ограничены [2, 12]. В связи с этим нами была проведена работа по анализу рецепторного связывания глибенкламида, гликлазида и глипизида с β-клетками.

## Материалы и методы

Работа проводилась на культивируемых β-клетках поджелудочной железы. Выделение и культивирование β-клеток проводилось по методу S.Misler и соавт. [9]. Островки β-клеток, полученные после переваривания коллагеназой мелко изрезанной поджелудочной железы самцов крыс линии Спрей Даули, высевались небольшими группами и подвергались инкубации с ферментом dispase [8]. Клетки, полученные таким путем, увеличивали секреторную активность инсулина в 3 раза в среде, содержащей 10 мМ глюкозы. В дальнейшем эти клетки размещались в чашки Петри и культивировались в среде, содержащей 10% инактивированной сыворотки телят, 0,5% пенициллина и 0,5% стрептомицина в смеси 5% $CO_2$/95% воздуха, в течение 1—10 дней при 37°С. Культивируемые клетки переносились механическим путем в среду, содержащую 140 мМ N-метилглюкамид,