

На правах рукописи

Зубова Анна Владимировна

**ЛИПОПРОТЕИНЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ И АКТИВНОСТЬ
МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ
ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА**

03.01.04 – биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент
доктор медицинских наук,
профессор

Потеряева Ольга Николаевна

Колпаков Аркадий Ростиславович

Официальные оппоненты:

Мичурина Светлана Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель группы экспериментальной фармакологии Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии - филиала федерального государственного бюджетного научного учреждения "Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук"

Акбашева Ольга Евгеньевна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» (г. Санкт-Петербург)

Защита диссертации состоится «___» _____ 2020 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.048.04 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (630117, Новосибирск, улица Тимакова, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (<https://frcftm.ru/>)

Автореферат разослан «_____» _____ 2020 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Русских Галина Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности избранной темы. При сахарном диабете 2 типа (СД 2 типа) нарушение липидного обмена и дислипидотеинемии могут быть как причиной, так и следствием этого заболевания. Сахарный диабет является одним из основных риск-факторов проявления атеросклероза в сосудах различных органов, включая и коронарные артерии (В.А. Нагорнев, А.Д. Денисенко, 2008). С другой стороны, повышение в крови содержания атерогенных форм липопротеинов при ишемической болезни сердца рассматривается как важнейший фактор риска СД 2 типа, что позволяет говорить о взаимообуславливаемой патологии (Л.Е. Панин и соавт., 2010). Многие патологические процессы сопровождаются нарушениями деградации межклеточного матрикса, в которых принимают участие матриксные металлопротеазы (ММП) (О.Н. Потеряева, 2010; Т.А. Короленко, 2012). Так, данные о дисбалансе в системе ММП у больных СД 2 типа, приведены в работе (S.W. Lee et al., 2005).

В НИИ биохимии ФИЦ ФТМ г. Новосибирска в течение ряда лет проводятся работы, начатые под руководством академика Л.Е. Панина, по изучению биологической роли сывороточных липопротеинов и их белковых компонентов в условиях нормы и патологии. В частности, было установлено, что апо-В-содержащие липопротеины (ЛПОНП и ЛПНП) обладают выраженными контринсулярными свойствами, блокируя рецепторы инсулина (Л.Е. Панин, Л.С. Останина, А.Р. Колпаков, 1995). Противоположный эффект был обнаружен у ЛПВП, которые усиливали секрецию инсулина клетками островков Лангерганса (О.Н. Потеряева, 2011). В этих же исследованиях ЛПВП повышали активность матриксных металлопротеиназ 2 и 7 типов (ММП-2 и ММП-7). Было высказано предположение, что эти ММП участвуют в протеолизе проинсулина с образованием активного инсулина. Данная работа является продолжением этих исследований.

Цель исследования: изучить роль липопротеинов в изменении активности матриксных металлопротеиназ при сахарном диабете 2 типа.

Задачи исследования

1. Определить показатели углеводного обмена (глюкоза, гликированный гемоглобин, С-пептид, фруктозамин, проинсулин, инсулин, индекс НОМА-IR) в сыворотке крови больных сахарным диабетом 2 (СД 2) типа и активность матриксных металлопротеиназ-2 и 7 (ММП-2 и ММП-7) в сыворотке крови больных СД 2 типа на разных стадиях компенсации заболевания. Определить концентрации тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ-1 и 2 в сыворотке крови больных СД 2 типа и оценить характер связи между значениями концентраций ТИМП-1, ТИМП-2 и активностью ММП-2 и ММП-7.

2. Исследовать показатели липидного обмена (концентрации ТГ, общий холестерин, ХС, ТГ ЛПВП, апо А-I, апо В, индекс атерогенности) в сыворотке крови больных СД 2 типа.

3. На выделенных островках Лангерганса поджелудочной железы крыс изучить влияние липопротеинов высокой и низкой плотности, их белковых компонентов (апо А-I и апо В) на секрецию инсулина и активность ММП-2 и ММП-7.

4. Исследовать влияние сывороток крови больных СД 2 типа при различных стадиях заболевания и сывороток крови больных с ожирением на секрецию инсулина островками Лангерганса поджелудочной железы крыс.

Научная новизна исследования

Впервые показано, что в стадии декомпенсации СД 2 типа снижение активности матриксных металлопротеиназ-2 и 7 и концентрации С-пептида сопровождалось увеличением концентрации проинсулина, а также тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1. Показано, что сыворотке крови больных сахарным диабетом 2 типа увеличивается не только концентрация триглицеридов, но концентрация триглицеридов в составе ЛПВП.

На поджелудочной железе крыс в условиях *in vitro* показано, что аполипопротеин А-I стимулировал секрецию инсулина и активность матриксных металлопротеиназ. Сыворотка крови больных сахарным диабетом 2 типа в стадии декомпенсации и сыворотка крови больных с ожирением вызывали снижение секреции инсулина островками Лангерганса *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследований раскрывают одну из возможных сторон антидиабетического действия ЛПВП и апо А-I через активацию ММП-2 и ММП-7. Оценка соотношений концентрации проинсулина и активности матриксных металлопротеиназ-2 и 7 в сыворотке крови больных СД 2 типа может служить в качестве критерия для прогнозирования стадии декомпенсации диабета и степени тяжести развития его осложнений.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У больных СД 2 типа в стадии декомпенсации снижена концентрация С-пептида и активность матриксных металлопротеиназ-2 и 7 (ММП-2 и ММП-7) и значительно повышена концентрация проинсулина по сравнению с показателями больных в стадии компенсации и субкомпенсации. В стадии декомпенсации у больных СД 2 типа повышена концентрация ТИМП-1.

2. В сыворотке крови больных сахарным диабетом 2 типа снижена концентрация ЛПВП и апо А-I, увеличена концентрация ТГ в сыворотке крови и в ЛПВП (ТГ ЛПВП).

3. *In vitro* ЛПВП плазмы крови и апо А-I стимулировали секрецию инсулина и активность ММП-2 и ММП-7 в островках Лангерганса. ЛПНП и апо В не оказывали влияния на секрецию инсулина и активность ММП-2 и ММП-7.

4. Сыворотка крови больных сахарным диабетом 2 типа в стадии декомпенсации СД 2 типа и сыворотка крови больных с ожирением снижают секрецию инсулина островками Лангерганса *in vitro*.

Степень достоверности результатов. Достоверность данных и обоснованность выводов базируется на достаточном количестве наблюдений и

методов статистического анализа полученного материала с использованием стандартного пакета программ Statistica for Windows, версия 6.

Апробация работы. Результаты исследования доложены и обсуждены на научно-практических конференциях Всероссийского и Международного уровней: 6-й Российской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Авиценна-2015» (Новосибирск, 2015), 17-й Всероссийской научной конференции студентов, молодых ученых и специалистов «Актуальные вопросы теоретической, экспериментальной и клинической медицины» (Ханты-Мансийск, 2015), 17-й Всероссийской научно-практической конференции с Международным участием (Оренбург, 2016), 5-м Съезде биохимиков России (Дагомыс, 2016), 8-й Международной научно-практической конференции «Science4health-2017» (Москва, 2017), 7-м Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения-2017» (Санкт-Петербург, 2017), 9-й Российской (итоговой) научно-практической конференции с Международным участием студентов и молодых ученых «Авиценна-2018» (Новосибирск, 2018), 2-м Объединенном научном форуме: VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Дагомыс, 2019).

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии; кафедры неотложной терапии с эндокринологией и профпатологией (ФПК и ППВ) ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, в том числе 6 статей в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, из них 3 статьи в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и систем цитирования (Scopus).

Объем и структура диссертации. Материал диссертации изложен на 122 страницах машинописного текста, иллюстрирован 15 рисунками, 7 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и списка иллюстративного материала. Список литературы состоит из 198 источников, из которых 63 в российских и 135 в зарубежных изданиях.

Личный вклад автора. Автор принимала непосредственное участие в планировании и проведении экспериментальных исследований, в сборе и систематизации клинического материала, анализе полученных данных, в подготовке публикаций и текста диссертации.

Автор выражает искреннюю благодарность научным руководителям д.м.н. О.Н. Потеряевой и д.м.н., проф. А.Р. Колпакову, сотрудникам НИИ биохимии: д.м.н., проф. Л.М. Полякову, д.б.н. И.Ф. Усынину, к.б.н. Г.С. Русских, Е.Н. Антиповой; заведующей клинико-диагностическим отделением

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Определение концентрации С-пептида (нг/мл) конкурентным методом ИФА (DRG, USA).

2. Определение концентрации ТИМП-1 (нг/мл) (ThermoFisher Scientific, Германия) и ТИМП-2 (нг/мл) (Bio-Techne, USA) «сэндвич»-методом ИФА.

3. Концентрацию инсулина определяли «сэндвич»-методом ИФА реактивами для определения инсулина человека ("Monobind Inc.", США) и крысиного инсулина (Shibayagi, Япония) в мкЕд/мл и в нг/мл соответственно.

4. Определение проинсулина (пмоль/л) методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови (BioVender, Чехия).

5. Биохимические показатели углеводного обмена (глюкоза, HbA_{1c}), липидного обмена (общий ХС, α -ХС, ТГ, ТГ ЛПВП) сыворотки крови, определяли на автоанализаторе «КОНЕЛАБ30i» (ТермоЛабСистем, США) в лаборатории клинико-диагностического отделения ФГБНУ НИИ экспериментальной и клинической медицины.

6. Активность матриксных металлопротеиназ-2 и 7 определяли флуориметрическим методом с использованием флуоресцентного субстрата MCA-Pro-Ley-Gly-Leu-DPA-Ala-Arg-NH₂ (ICN Biomedicals Inc., Calbiochem, USA). Активность выражали в мкмоль MCA/л в 1 ч.

7. Выделение островков Лангерганса из поджелудочной железы крыс седиментационным методом Р.Е. Lacy et al (1967); инкубация выделенных островков.

8. Выделение липопротеинов из сыворотки плазмы крови методом ультрацентрифугирования (F.T. Hatch, R.S. Lees, 1968).

9. Делипидирование липопротеинов проводили охлажденной смесью хлороформ-метанол (1:1) с промывкой смеси этанол-диэтиловый эфир.

10. Процентное содержание липопротеинов рассчитывали после элюирования фракций 0,25% раствором тритона X-100 (Л.М. Поляков, Л.Е. Панин, 1975).

11. Определение суммарной фракции ЛПНП и ЛПОНП в сыворотке крови выполняли турбидиметрическим методом после осаждения гепарином в присутствии двухвалентных катионов.

12. Апо А-I получали методом гель-фильтрации на Сефарозе 4В (Фармация, Швеция) в 0,01 М трис-HCl буфере, содержащим 6 М мочевины рН 8,6 и ионообменной хроматографии.

13. Апо В получали методом гель-фильтрации на Сефарозе 4В (Фармация, Швеция) в 0,05 М трис-HCl буфере, содержащим 0,05% ДС-Na, 0,01% азида натрия и 0,001 М фенилметансульфонилфторид.

14. Для идентификации антител к апо А-I и к апо В использовали метод двойной радиальной иммунодиффузии (O. Ouchterlony, 1958).

15. Степень чистоты апопротеинов определяли методом электрофореза по Laemmli (U.K. Laemmli, 1970).

16. Концентрации апо А-I и апо В (мг/дл) в плазме крови больных определяли иммунотурбидиметрическим методом на биохимическом анализаторе Beckman Coulter (США) с использованием реактивов (DiaSys, Germany).

17. Расчет индексов и соотношений:

индекс ИР = [инсулин (мкЕд/мл) × глюкоза (ммоль/л)]/22,5;

индекс Кетле или ИМТ ($\text{кг}/\text{м}^2$) = вес (кг) / рост (м^2)

индекс атерогенности (ИА) = (ОХ – ЛПВП)/ЛПВП,

где ОХ – концентрация общего холестерина;

ЛПВП – концентрация липопротеинов высокой плотности;

индекс Авогаро = апо А-I / апо В (Р. Avogaro, 1979);

соотношение проинсулин : ММП, где проинсулин – это концентрация проинсулина, ММП – активность ММП.

18. Статистический анализ результатов.

Сыворотка крови больных СД 2 типа в стадиях компенсации (6,0–6,5 % HbA_{1c}), субкомпенсации (6,6–7,0 % HbA_{1c}) и декомпенсации ($>7,0$ % HbA_{1c}), обследованных в клинике ФГБНУ НИИ экспериментальной и клинической медицины. В связи с тем, что СД 2 типа чаще развивается у больных с ожирением, были использованы в эксперименте сыворотки крови больных с избыточной массой тела (ИМТ > 30). Диагноз был поставлен на основании анамнеза заболевания, клинической картины и биохимического исследования в соответствии с критериями Комитета экспертов ВОЗ по сахарному диабету 1999 года.

Взятие крови производили натощак, процедуры сбора образцов крови проводили в соответствии с Хельсинской Декларацией прав человека после подписания информированного согласия пациентами. В качестве контрольных значений использовались показатели крови здоровых доноров, сопоставимых по возрасту и полу с больными СД 2 типа. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 70 от 18 декабря 2014 г.).

Экспериментальная часть работы была выполнена на 18 крысах-самцах линии Wistar массой 180–200 г из вивария ЦНИЛ Новосибирского государственного медицинского университета. Животные перед началом эксперимента содержались в условиях вивария в соответствии с «Правилами проведения работ и использования экспериментальных животных».

Исследования сывороток крови разных групп больных СД 2 типа проходило в несколько этапов:

I. Биохимическое исследование сывороток крови:

1. Исследование основных показателей углеводного обмена, липидного обмена и активности ММП-2 и ММП-7 в сыворотке крови больных в зависимости от стадии компенсации СД 2 типа было проведено на 78 сыворотках больных СД 2 типа, среди которых 26 сывороток крови от больных в стадии компенсации, 11 сывороток – в стадии субкомпенсации и 41 сывороток крови в стадии декомпенсации СД 2 типа.
2. Следующим этапом стало сравнительное изучение активности ММП-2, ММП-7 и концентрации ТИМП-1 и ТИМП-2 в 72 сыворотках крови больных СД 2 типа, среди которых 24 сыворотки крови от больных в стадии компенсации, 10 сывороток – в стадии субкомпенсации и 38 сывороток крови в стадии декомпенсации СД 2 типа
3. В 82-х сыворотках крови определяли процентное содержание липопротеинов, концентрации аполипопротеинов А-I и В, холестерина, триглицеридов (ТГ), отдельно в составе ЛПВП – содержание ТГ.

II. Исследование *in vitro*:

- ✓ инкубация островков Лангерганса поджелудочной железы крыс с ЛПВП, ЛПНП, апо А-I, апо В с дальнейшим измерением активности ММП-2 и ММП-7, концентрации инсулина;
- ✓ инкубация островков Лангерганса поджелудочной железы крыс с сыворотками крови больных СД 2 типа в стадиях компенсации, декомпенсации СД 2 типа и с сыворотками крови больных с ожирением. Далее измеряли концентрацию крысиного инсулина.

Статистическую обработку результатов проводили, используя стандартный пакет программ Statistica for Windows, версия 6. Проверка на нормальность распределения проводилась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для нормально распределенных признаков вычисляли среднее значение $\pm$ стандартную ошибку. Для оценки различий нормально распределенных признаков применяли параметрический критерий Стьюдента и считали различия значимыми при $p < 0,05$. В случае непараметрического распределения значений: вычисляли нижний квартиль (25-й перцентиль), медиану, верхний квартиль (75-й перцентиль) и представляли в виде записи: [Q25; Me; Q75], статистическую значимость различий количественных признаков для двух независимых групп применяли критерий Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводился с расчетом коэффициента ранговой корреляции по Спирмену (r) (С. Гланц, 1998).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Основные показатели углеводного обмена и активность матриксных металлопротеиназ-2 и 7 в сыворотке крови больных в зависимости от стадии компенсации сахарного диабета 2 типа

Согласно критериям ВОЗ, выделяют три стадии СД 2 типа в зависимости от содержания в сыворотке крови HbA_{1c} . В связи с этим были обследованы три группы больных в зависимости от стадии компенсации СД 2 типа (таблица 1). Под наблюдением находились 78 человек, из них 33 мужчины и 45 женщин (средний возраст $63,0 \pm 4,3$ года). Различий по полу и возрасту в содержании проинсулина в сыворотке крови больных СД 2 типа не обнаружено.

У больных в стадиях компенсированного и субкомпенсированного СД 2 типа концентрация проинсулина сохранялась в пределах нормальных значений (см. табл. 1).

Таблица 1. Основные показатели углеводного обмена и суммарная активность матриксных металлопротеиназ-2 и 7 в сыворотке крови больных в зависимости от стадии компенсации СД 2 типа

Показатели	Здоровые n=25	Стадии компенсации СД 2 типа		
		компенсация I группа n = 26	субкомпенсация II группа n = 11	декомпенсация III группа n = 41
HbA_{1c} в %	$4,01 \pm 0,82$	$6,01 \pm 0,16$	$6,71 \pm 0,10$	$9,02 \pm 0,76^{**}$
Глюкоза натощак, ммоль/л	$4,20 \pm 0,41$	$5,8 \pm 0,20$	$7,5 \pm 0,40$	$10,0 \pm 1,2^{**}$
Фруктозамин, мкмоль/л	$246,5 \pm 12,0$	$260,7 \pm 28,4$	$249,0 \pm 24,8$	$316,3 \pm 36,6^*$
Инсулин, мкЕд/мл	$5,91 \pm 0,60$	$25,38 \pm 5,07$	$34,69 \pm 5,46$	$17,76 \pm 2,49^{**}$
С-пептид, нг/мл	$0,71 \pm 0,08$	$2,51 \pm 0,36$	$2,01 \pm 0,56$	$1,80 \pm 0,32^{**}$
Проинсулин, пмоль/л	$2,56 \pm 0,23$	$2,91 \pm 0,62$	$2,51 \pm 0,58$	$7,32 \pm 1,92^{**\#}$
НОМА-IR	$1,81 \pm 0,80$	$6,65 \pm 1,48$	$13,37 \pm 2,59$	$7,23 \pm 1,24^*$
Активность ММП-2 и 7, мкмоль МСА/л • ч	$258,3 \pm 12,1$	$152,5 \pm 34,6$	$119,9 \pm 46,2$	$93,0 \pm 21,8^*$
Соотношение Проинсулин : ММП	1 : 100	1 : 52	1 : 48	1 : 12 ^{**}
Примечание. * – $p < 0,05$ и ** – $p < 0,01$ по сравнению с I группой; # – $p < 0,01$ по сравнению со II группой				

В стадии декомпенсации концентрация проинсулина была выше в 2,5 и 2,9 раза по сравнению со стадиями субкомпенсации и компенсации. В группе больных на стадии декомпенсации была повышена концентрация глюкозы (в 1,7 раза) и фруктозамина (на 21%) по сравнению со стадией субкомпенсации.

Для оценки степени резистентности к инсулину использовали индекс

НОМА-IR (Homeostasis Model Assessment – НОМА, IR – инсулинорезистентность), разработанный D. Matthews (D.R. Matthews et al., 1985) в качестве параметра, характеризующего общую периферическую инсулинорезистентность. Индекс инсулинорезистентности (НОМА-IR) в группе больных превышал контрольные значения (см. табл. 1). В группе III (стадия декомпенсации) НОМА-IR был ниже в 1,8 раза по сравнению с группой II (стадия субкомпенсации), а концентрация инсулина в стадии декомпенсации была ниже в 1,95 по сравнению с группой II, что свидетельствует о снижении компенсаторной функции поджелудочной железы по выработке инсулина в ответ на длительную гипергликемию.

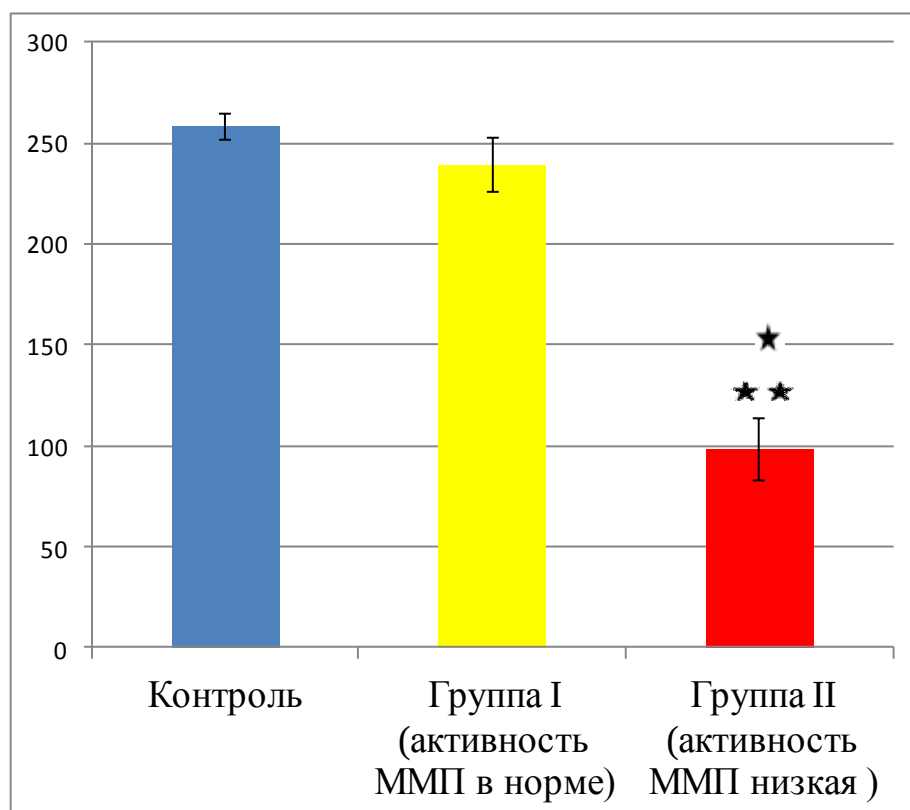
По сравнению со стадией компенсации активность ММП-2 и ММП-7 в стадии декомпенсации снижалась на 39%, концентрация С-пептида – на 28%.

При расчете отношения концентрации проинсулина к активности ММП-2 и ММП-7 оказалось, что на стадиях компенсации и субкомпенсации СД оно было примерно 1 : 50, в то время как на стадии декомпенсации – 1 : 12. Обнаружена обратная корреляция между снижением активности ММП-2 и ММП-7 и увеличением концентрации проинсулина ($r = -0,8$).

Ранее сотрудниками НИИ биохимии было высказано предположение, что ММП участвуют в деградации препроинсулина и проинсулина с образованием молекулы активного инсулина (О.Н. Потеряева, Г.С. Русских, Л.Е. Панин, 2011). Таким образом, выявленное снижение активности ММП-2 и 7 у больных СД 2 типа может являться показателем ухудшения течения диабета, развития стадии декомпенсации.

Активность ММП-2 и ММП-7 у больных сахарным диабетом 2 типа

На первом этапе исследований распределение больных по степени компенсации проводилось на основании принятых ВОЗ критериям содержания гликированного гемоглобина в крови. Однако и в группе пациентов, отнесённых по этим критериям к «субкомпенсации», встречались и больные со сниженной активностью ММП-2 и 7. Поэтому в последующем обследуемые пациенты были разделены на 2 группы (рисунок 1): с активностью ММП-2 и 7 в пределах нормы (22 человека) и со сниженной активностью (56 человек). Контрольную группу составили 25 условно здоровых людей, сопоставимых по возрасту и полу с больными СД 2 типа.



Примечание для рисунков 1, 2, 3: * – различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с группой I ($p < 0,01$).

Рисунок 1. Активность ММП-2 и ММП-7 (μmol MSA/L · ч) в сыворотке крови больных СД 2 типа

Концентрация С-пептида и проинсулина у больных сахарным диабетом 2 типа

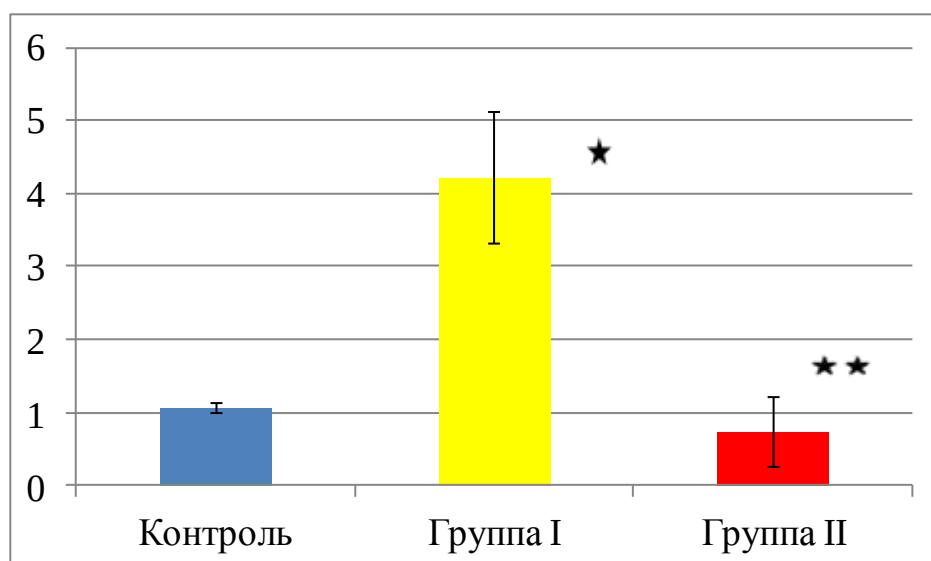


Рисунок 2. Концентрация С-пептида (нг/мл) в сыворотке крови больных СД 2 типа

Концентрация С-пептида составила $0,73 \pm 0,243$ нг/мл в группе II со значительным снижением активности ММП-2 и ММП-7. Это меньше в 6 раз по сравнению с группой I (см. рисунок 2).

Концентрация проинсулина была повышена в обеих группах (в группе I: $4,2 \pm 0,75$ пмоль/л и в группе II: $5,1 \pm 0,56$ пмоль/л) по сравнению с группой контроля ($2,56 \pm 0,23$ пмоль/л), но не было обнаружено статистически значимых различий между группами (рисунок 3).

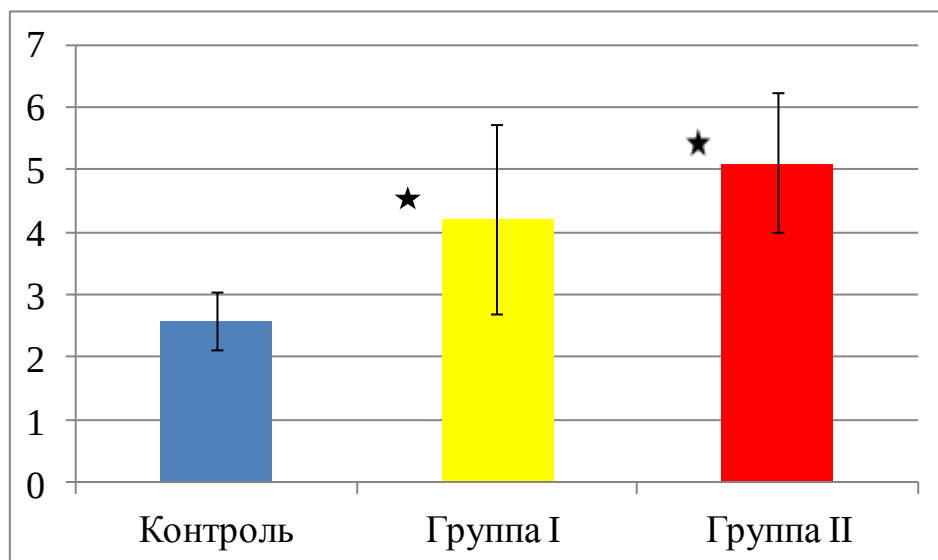


Рисунок 3. Концентрация проинсулина (пмоль/л) в сыворотке крови больных СД 2 типа

Таким образом, снижение активности ММП-2 и ММП-7 у больных СД 2 типа сопровождалось значительным уменьшением концентрации С-пептида и повышением уровня проинсулина в сыворотке крови.

Поскольку активность ММП зависит от их ингибиторов, было проведено определение концентраций ТИМП-1 и ТИМП-2 в новой группе сывороток крови 72 больных на разных стадиях компенсации СД 2 типа (рисунок 4). ТИМП-1 был выбран как ингибитор всех не мембраносвязанных матриксных металлопротеиназ, ТИМП-2 активен в отношении ММП-2 и 7 (А. Hrabia, 2018).

Статистически значимое повышение концентрации ТИМП-1 наблюдалось в сыворотке крови больных на всех стадиях компенсации СД 2 типа. Не найдено значимых отличий в изменении концентрации ТИМП-2 (рисунок 4). Между снижением активности ММП-2 и ММП-7 [78,72; 90,06; 105,88] и повышением концентрации ТИМП-1 [270,00; 296,25; 375,00] наблюдалась слабая обратная корреляционная связь ($r = -0,078$). Из этого следует, что какие-то другие активные соединения в большей степени также могут влиять на снижение активности ММП-2 и ММП-7.

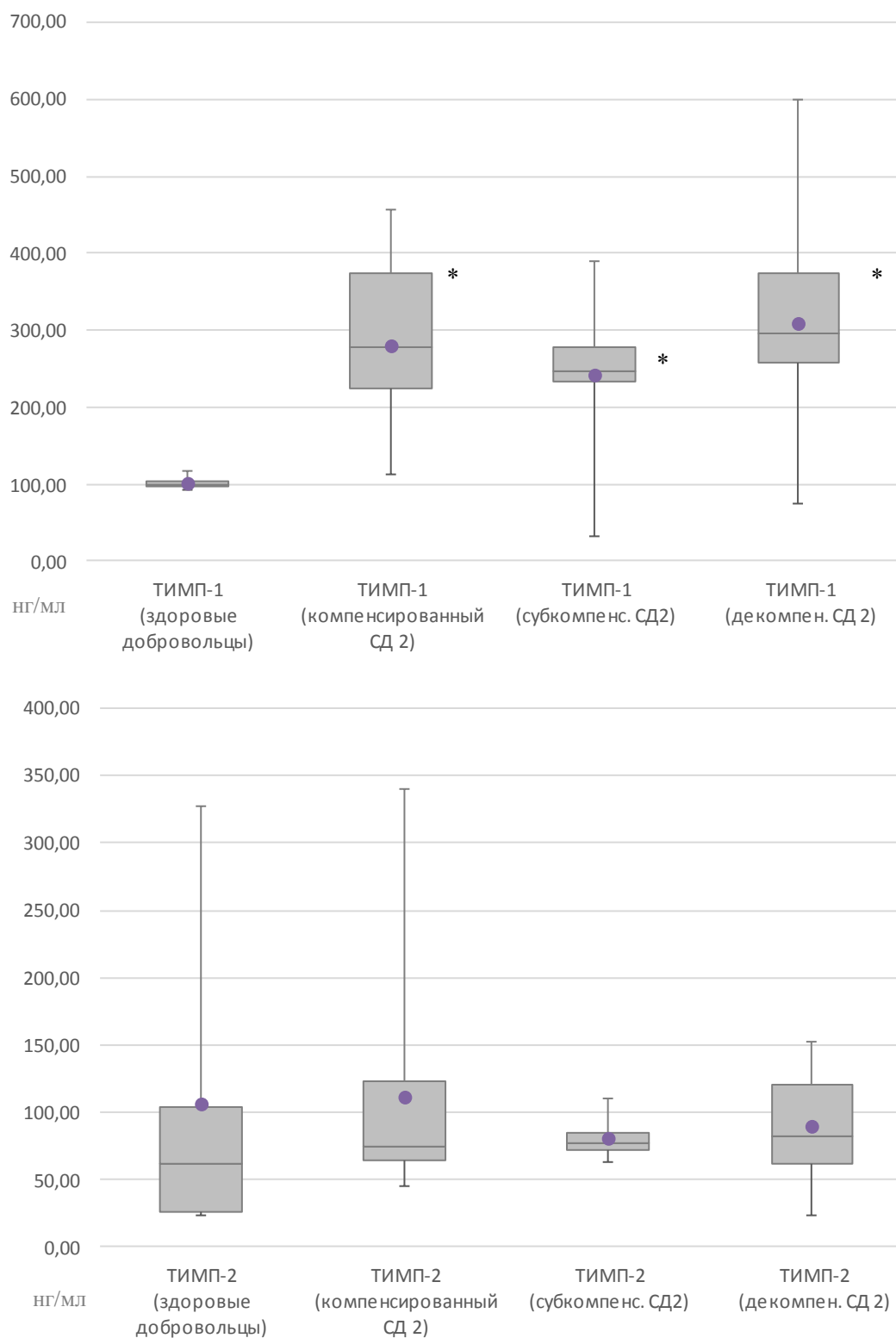
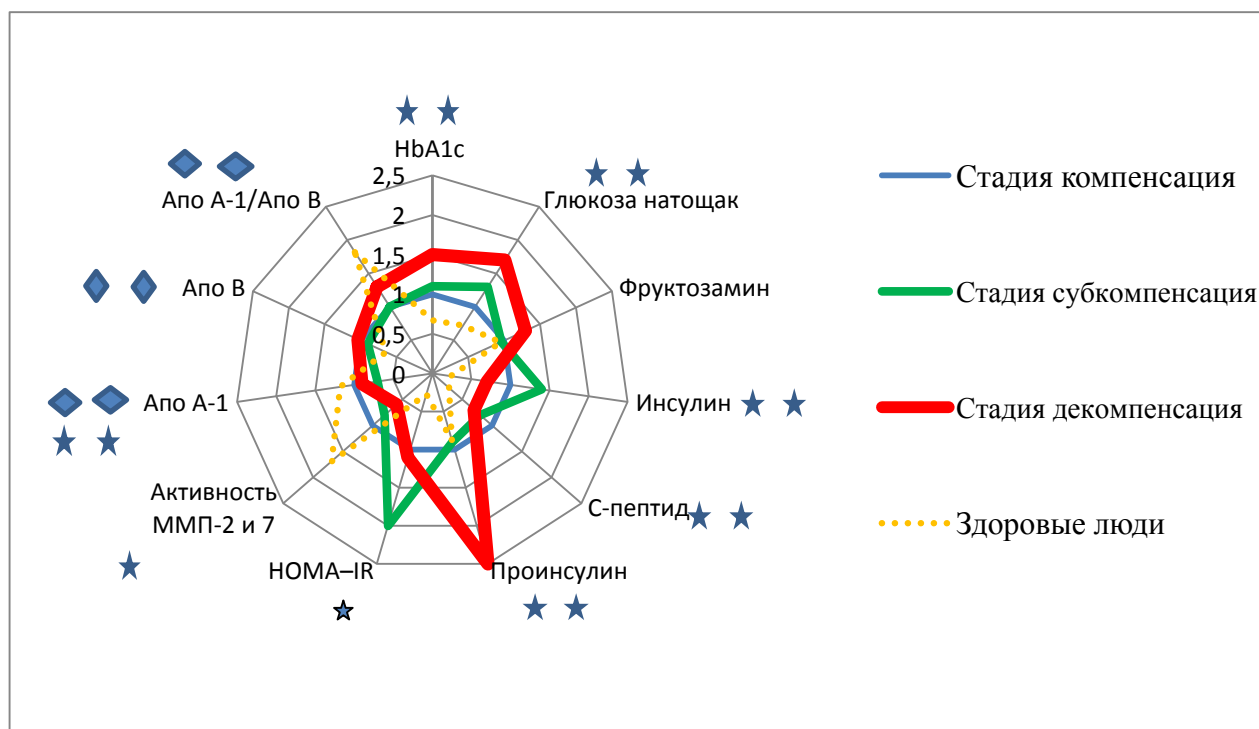


Рисунок 4. Концентрация ТИМП-1 и ТИМП-2 в образцах крови больных СД 2 типа на разных стадиях компенсации СД 2 типа и здоровых добровольцев

* - различия между значениями ТИМП-1 по критерию Манна-Уитни ($p < 0,01$)

Наряду с изменениями показателей углеводного обмена, у больных СД 2 типа отмечены значительные нарушения липидного обмена (рисунок 5).



Примечание: $\blacklozenge$ – $p < 0,05$, $\blacklozenge\blacklozenge$ – $p < 0,01$ при сравнении стадии декомпенсации со здоровыми людьми. $\star$ – $p < 0,05$, $\star\star$ – $p < 0,01$ при сравнении стадий декомпенсации и компенсации

Рисунок 5. Основные показатели углеводного и липидного обмена, суммарная активность матриксных металлопротеиназ-2 и 7 в сыворотке крови больных в зависимости от стадии компенсации СД 2 типа

На рисунке 5 значения показателей на стадии компенсации приняты за единицу, на диаграмме показаны соотношения показателей углеводного и липидного обмена у больных СД 2 типа на разных стадиях компенсации. Из диаграммы следует, что на стадии декомпенсации концентрация проинсулина выше, а С-пептида ниже, чем при компенсированном диабете.

Обнаружено увеличение содержания триглицеридов в сыворотке крови и в составе ЛПВП (ТГ ЛПВП) в 2,7 и 4,0 раза, соответственно (таблица 2). Высокое содержание триглицеридов в составе ЛПВП может оказывать негативное влияние на функции ЛПВП, связанные с транспортом холестерина из периферических тканей в печень. Кроме того, активация процессов окисления и гликирования при развитии метаболического синдрома и СД 2 типа сопровождается структурными изменениями в ЛПВП, приводящими к появлению у них провоспалительных и проатеросклеротических свойств (S. Ebtehaj, 2017).

Таблица 2. Изменение показателей липидного обмена в сыворотке крови больных СД 2 типа

Показатели	Содержание показателей липидного обмена в	
	Контрольная группа (n=30)	Больные СД 2 типа (n=82)
Триглицериды, ммоль/л	0,90±0,08	2,41±0,26**
Общий холестерин, ммоль/л	5,47±0,21	6,20±0,28
α-Холестерин, ммоль/л	1,44±0,13	1,23±0,06
ТГ ЛПВП, ммоль/л	0,20±0,04	0,81±0,11**
Индекс атерогенности	2,3±0,2	4,1±0,4**
Апо А-I, мг/дл	106,0±10,1	79,1±6,5*
Апо В, мг/дл	84,6±7,4	102,1±5,5*
Отношение апо А-I/апо В	1,3±0,1	0,7±0,1**

Примечание: * - $p < 0,01$ и ** - $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой

Биохимический анализ сыворотки крови, проведенный нами, выявил у больных СД 2 типа отклонения от нормы по содержанию липопротеинов и их белковых компонентов. Причем доля атерогенной фракции липопротеинов возрастала, а антиатерогенных липопротеинов снижалась. По содержанию общего холестерина в сыворотке крови и холестерина в ЛПВП (α-холестерин) статистически значимых различий между группами не обнаружено.

Согласно современным представлениям, существенный вклад в нарушение липидного обмена при различных патологиях вносят белковые компоненты липопротеинов. Наиболее информативными маркерами атеросклероза являются аполипопротеины, в частности, отношение апо А-I/апо В (Р. Avogaro et al., 1979). У больных СД 2 типа по сравнению со здоровыми лицами концентрация апо В была выше на 21%, а концентрация апо А-I, напротив, ниже на 26%. Возможно, снижение концентрации апо А-I в крови объясняется его избыточной экскрецией с мочой у больных СД 2 типа. В исследованиях, проведенных в НИИ биохимии, было показано увеличение концентрации апо А-I в моче больных СД 2 типа в 52 раза выше, чем в моче здоровых людей (Л.Е. Панин, О.Н. Потеряева, О.П. Шевкопляс, 2001). Концентрация апо А-I была определена твердофазным иммуноферментным анализом аполипопротеинов, разработанным сотрудниками НИИ биохимии (Л. М. Поляков, О.Н. Потеряева, Л.Е. Панин, 1999).

Еще более выраженные различия получены при расчете индекса Авогаро (отношение апо А-I/апо В). Значение данного показателя у больных СД 2 типа было в 1,85 раза ниже по сравнению с контрольной группой (см. табл. 2). Однако индекс атерогенности в группе больных СД 2 типа возрастал по сравнению с контролем в 1,8 раза (см. табл. 2), что может быть связано со

значительным снижением содержания фракций ЛПВП₂ и ЛПВП₃ в сыворотке крови больных (таблица 3).

Таблица 3. Процентное содержание липопротеинов различных классов в сыворотке крови больных СД 2 типа

Показатель	ЛПОНП	ЛПНП	ЛПВП ₂	ЛПВП ₃	ЛПНП+ЛПОНП
	%				мг%
Больные n=82	22,4 ± 3,6	53,2 ± 4,0	10,4 ± 2,4	13,9 ± 2,2	877 ± 80
Контрольная группа n=30	12,9 ± 2,10	44,6 ± 3,6	24,5 ± 4,0	18,0 ± 2,8	496 ± 58
Уровень значимости	p < 0,001	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,05	p < 0,001

Исходя из того, что одним из важных регуляторных факторов крови, изменяющих функциональную активность клеток, являются липопротеины плазмы крови, нами было исследовано влияние разных классов липопротеинов на секрецию инсулина изолированными островками Лангерганса (рисунок 6 А). При добавлении в инкубационную среду ЛПВП секреция инсулина возрастала в 3,4 раза. Подобный эффект обнаружен в присутствии апо А-I, который является основным белковым компонентом ЛПВП. Примечательно, что добавление к островкам ЛПНП и их белкового компонента апо В не оказывало статистически значимого влияния на секрецию гормона (рисунок 6 А). Вероятно, контринсулярный эффект ЛПНП, описанный Л.Е.Паниным с соавт (Л.Е.Панин, Л.С. Останина, А.Р. Колпаков, 1995), связан с блокирующим действием апо В на рецепторы к инсулину периферических тканей.

В морфогенезе островков Лангерганса важную роль играют матриксные металлопротеиназы. Эти внеклеточные протеолитические ферменты участвуют во многих физиологических процессах, таких как клеточная миграция, дифференцировка, пролиферация и апоптоз (G. Christoffersson et al., 2015). С учетом этого, нами было исследовано влияние липопротеинов (ЛПВП, ЛПНП) и аполипопротеинов (апо А-I, апо В) на секрецию ММП-2 и ММП-7 островками Лангерганса (рисунок 6 Б).

Установлено, что при инкубации островков спонтанная секреция ММП-2 и ММП-7 составляла $5,2 \pm 0,5$ мкмоль МСА/л · ч. При добавлении в инкубационную среду ЛПВП секреторная активность возрастала в 4 раза и достигала $20,0 \pm 0,99$ мкмоль МСА/л · ч.

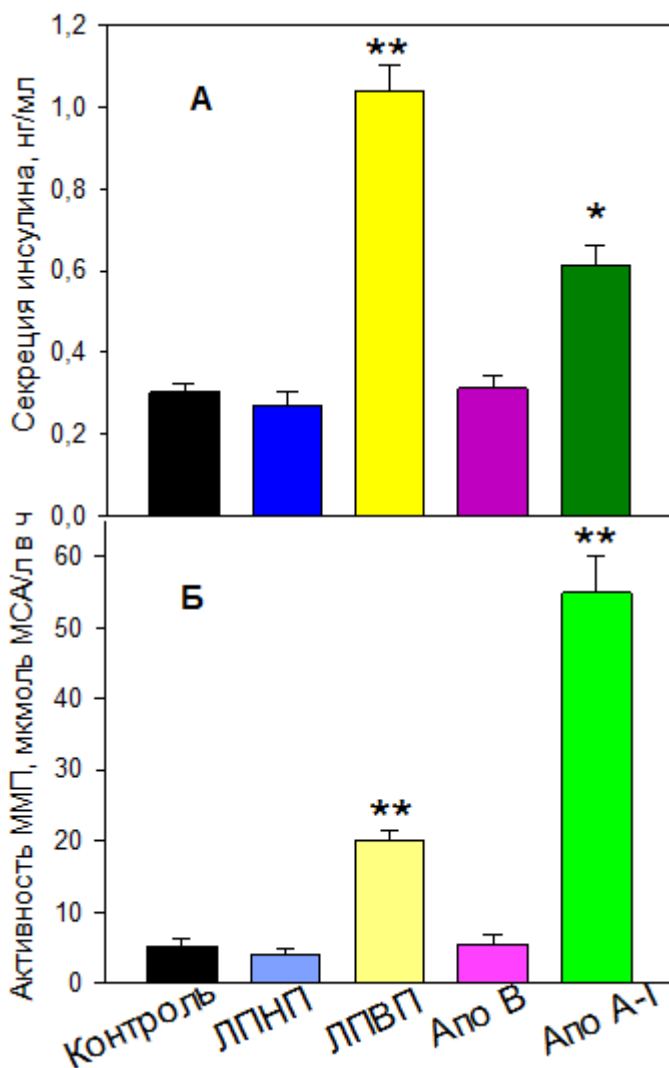


Рисунок 6. Влияние липопротеинов плазмы крови и аполипопротеинов (апо А-I, апо В) на секрецию инсулина (А) и активность матриксных металлопротеиназ-2 и 7 (Б) изолированными островками Лангерганса

Примечание: * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем (без добавок).

Еще более выраженный прирост (в 10 раз) активности ММП-2 и ММП-7 в инкубационной среде выявлен в присутствии апо А-I. При добавлении к островкам ЛПНП или апо В активность фермента в среде не отличалась от контрольных значений.

Полученные результаты позволяют предполагать, что повышение уровня ЛПВП и апо А-I с помощью фармакологических препаратов или введения в организм рекомбинантного апо А-I может оказывать стимулирующее действие на островковый аппарат поджелудочной железы. Действительно, при внутривенном введении больным СД 2 типа реконструированных ЛПВП обнаружено снижение концентрации глюкозы в крови, что, по мнению авторов, связано с повышением продукции инсулина (B.G. Drew et al., 2012).

Учитывая обнаруженные метаболические изменения у больных СД 2 типа, мы исследовали влияние сыворотки крови на секрецию инсулина изолированными островками Лангерганса (рисунок 7). При инкубации островков в бессывороточной среде секреция инсулина составляла $0,185 \pm 0,01$ нг/мл. Добавление в инкубационную среду сыворотки крови здоровых людей приводило к возрастанию секреции инсулина в 4,7 раза. По сравнению с

эффектом сыворотки крови здоровых людей, сыворотка больных СД 2 типа в стадии декомпенсации, вызывала снижение секреции гормона в 5,0 раз.

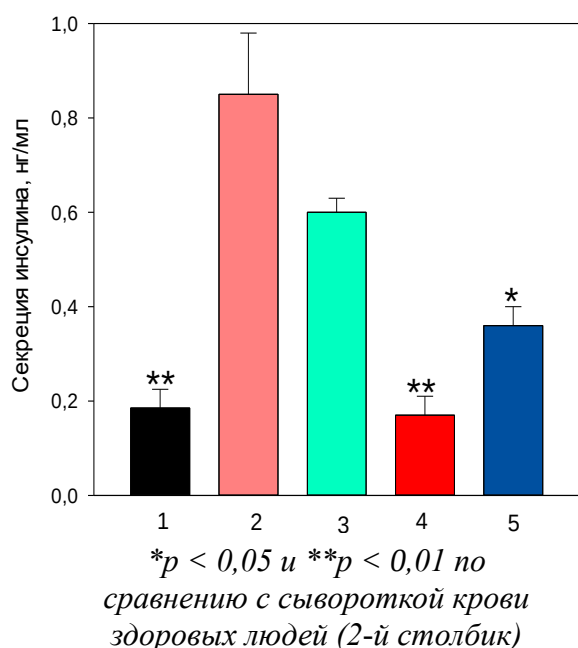


Рисунок 7. Влияние сыворотки крови здоровых людей, больных СД 2 типа и больных с ожирением на секрецию инсулина изолированными островками Лангерганса: 1 – инкубация без добавления сывороток, 2 – сыворотка крови здоровых людей, 3 – сыворотка крови больных СД 2 типа в стадии компенсации, 4 – сыворотка крови больных СД 2 типа в стадии декомпенсации, 5 – сыворотка крови больных с ожирением.

Ингибирующий эффект на секрецию инсулина обнаружен и при добавлении в инкубационную среду к островкам Лангерганса сыворотки крови больных с ожирением. Содержание ЛПВП и, соответственно, апо А-I в сыворотке крови таких больных снижено, и это может объяснять схожий с сывороткой больных СД 2 эффект на секрецию инсулина. Но возможен и более сложный механизм. В крови больных с нарушениями липидного обмена липопротеины всех классов подвергаются количественным и качественным изменениям, что приводит к нарушению их функций. В связи с этим ингибирующий эффект сыворотки крови больных в стадии декомпенсации на секрецию инсулина требует дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Стадия декомпенсации сахарного диабета 2 типа характеризуется низкой активностью ММП-2 и ММП-7, сниженным содержанием С-пептида и высоким содержанием проинсулина. Повышение концентрации ТИМП-1 наблюдалось в сыворотке крови больных на всех стадиях компенсации СД 2 типа.
2. Концентрация ЛПВП, апо А-I снижена в сыворотке крови больных СД 2 типа. Концентрация ТГ в сыворотке крови и в составе ЛПВП (ТГ ЛПВП) увеличены в 2,7 и 4,0 раза по сравнению со здоровыми донорами, соответственно.
3. ЛПВП и аполипопротеин А-I усиливают в 3,4 раза и в 2 раза, соответственно, секрецию инсулина в островках Лангерганса поджелудочной железы крыс *in vitro*. При этом секреторная активность ММП-2 и ММП-7 повышалась в 4 и 10 раз, соответственно. ЛПНП и апо В не оказывали статистически значимого влияния на секрецию инсулина и активность матриксных металлопротеиназ.
4. Инкубация островков Лангерганса в присутствии сыворотки крови больных сахарным диабетом 2 типа в стадии декомпенсации приводила к снижению секреции инсулина в 5 раз, в присутствии сыворотки крови больных с ожирением – в 2, 4 раза по сравнению с сывороткой крови здоровых людей.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Усынин И. Ф. Аполипопротеин А-I стимулирует секрецию инсулина и матриксных металлопротеиназ островками Лангерганса поджелудочной железы / И. Ф. Усынин, О. Н. Потеряева, Г. С. Русских, **А. В. Зубова**, К. Ю. Бойко, Л. М. Поляков // **Биомедицинская химия**. – 2018. – Т. 64, вып. 2. – С. 195–200.
2. Потеряева О.Н. Изменение активности матриксных металлопротеиназ, концентрации проинсулина и С-пептида в сыворотке крови в зависимости от стадии компенсации сахарного диабета 2-го типа / О. Н. Потеряева, Г. С. Русских, **А. В. Зубова**, М. М. Геворгян, И. Ф. Усынин // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2017. – Т. 164, № 12. – С. 697–700.
3. Потеряева О.Н. Проинсулин – диагностический биохимический маркер декомпенсированного сахарного диабета 2-го типа / О.Н. Потеряева, Г.С. Русских, **А. В. Зубова**, М.М. Геворгян // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2017. — 62 (5). – С. 278–282.
4. **Зубова А. В.** Иммуноферментный анализ проинсулина в сыворотке крови больных сахарным диабетом 2 типа / А. В. Зубова, О. Н. Потеряева, Г. С. Русских, М. М. Геворгян // **Медицина и образование в Сибири**. – 2015. – № 1. http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1656.
5. **Зубова А. В.** Изменение содержания проинсулина и биохимических показателей крови в зависимости от стадии компенсации сахарного диабета 2

типа / А. В. Зубова, О. Н. Потеряева, Г. С. Русских, М. М. Геворгян, Л. М. Поляков // **Современные проблемы науки и образования**. – 2015. – № 5.

6. **Зубова А. В.** Содержание проинсулина и гликозилированного гемоглобина в зависимости от стадии компенсации сахарного диабета / А. В. Зубова, О. Н. Потеряева, Г. С. Русских, М. М. Геворгян // **Медицина и образование в Сибири**. – 2015. – № 3. http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1812

7. **Зубова А. В.** Некоторые аспекты патогенеза сахарного диабета 2 типа / А. В. Зубова, О. Н. Потеряева, Г. С. Русских, Л. М. Поляков // Научные труды 6-го Съезда физиологов СНГ, 6-го Съезда биохимиков России, IX Российского симпозиума «Белки и пептиды». - **АСТА NATURAE: СПЕЦВЫПУСК: Том 2** - 2019. - С. 198.

8. **Зубова А. В.** Влияние сыворотки больных с ожирением и больных сахарным диабетом 2-го типа на продукцию инсулина островками Лангерганса поджелудочной железы крыс / А. В. Зубова, Г. С. Русских, М. В. Битхаева, И. П. Жураковский, О. Н. Потеряева // Научные труды 5-го Съезда физиологов СНГ, 5-го Съезда биохимиков России, конференции ADFLIM. – **АСТА NATURAE | СПЕЦВЫПУСК: Том 2**.– 2016. – С. 186.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Апо А-I	– аполипопротеин А-I
Апо В	– аполипопротеин В
ИМТ	– индекс массы тела, индекс Кетле
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПНП	– липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	– липопротеины очень низкой плотности
ММП-2	– матриксная металлопротеиназа-2
ММП-7	– матриксная металлопротеиназа-7
МСА	– methyl cumaril amid – амид метилкумарила
СД 2 типа	– сахарный диабет 2 типа
ТГ	– триглицериды
ТИМП-1	– тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ-1
ТИМП-2	– тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ-2
ХС	– холестерин
HbA _{1c}	– гликированный гемоглобин
НОМА-IR	– индекс инсулинорезистентности