

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 1999

УДК 616.379-008.64-078.33

Я. С. Зверева, И. В. Дубинкин, А. В. Зылов, Н. Таклас, Л. П. Алексеев

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПРЕДИКЦИИ ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Лаборатория иммуногенетики Государственного научного центра "Институт иммунологии" Минздрава РФ, кафедры эндокринологии Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова

Обследовано 150 больных с различными нарушениями углеводного обмена: инсулинзависимым сахарным диабетом — ИЗСД (58 больных), нарушением толерантности к легкоусвояемым углеводам (14), инсулиннезависимым сахарным диабетом (11); группа риска (сibs) состояла из 67 обследуемых, здоровых доноров было 50 человек.

Исследовали ряд подходов к определению аутоантител к островковым клеткам (ICA) поджелудочной железы. Применяли 2 метода исследования: реакцию непрямой иммунофлюоресценции с использованием криосрезов поджелудочной железы человека, иммуноферментный метод с использованием наборов фирмы "Biomerica" под торговой маркой "Isletest". Показано, что выявляемость ICA у больных ИЗСД с длительностью заболевания до 2 лет на криосрезе поджелудочной железы человека составила 66,7%, в "Isletest" — 50%. Имеется общая тенденция к снижению выявляемости ICA с увеличением длительности заболевания. Полученные двумя методами результаты неконкордантны. Аутоантитела к инсулину при этой патологии найдены в 37,5% случаев, что свидетельствует о необходимости комплексного подхода к иммунодиагностике доклинических стадий ИЗСД.

A total of 150 patients with carbohydrate metabolism disorders were examined: 58 with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), 14 with impaired tolerance of easily assimilable carbohydrates, 67 subjects at risk of these conditions (sibs), 11 patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM), and 50 donors. Autoantibodies to pancreatic islet cells (ISA) were tested by two methods: indirect immunofluorescence with cryosections of human pancreas and enzyme immunoassay with the Isletest kits (Biomerica). In IDDM patients with the disease duration of up to 2 years, ISA were detected in 66.7% cases on cryosections of human pancreas and in 50% cases by the Isletest. There was a general tendency to a lower rate of ISA detection with a longer duration of the disease. The results of the two methods did not agree. Autoantibodies to insulin (IAA) were detected in 37.5% of these patients, which indicates the need in a comprehensive approach to immunodiagnosis of the preclinical stages of IDDM.

Известно, что в основе патогенеза инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД) лежит аутоиммунная деструкция бета-клеток поджелудочной железы [1]. Дальнейшее изучение ИЗСД показало, что продромальной стадии данного заболевания соответствует период постепенно развивающегося аутоиммунного воспаления островков (инсулина) и деструкции инсулинпродуцирующих бета-клеток, не сопровождающийся в течение длительного времени клиническими признаками ИЗСД [2].

В 1975 г. G. Botazzo и соавт. впервые выявили у больных ИЗСД циркулирующие аутоантитела к цитоплазматическим антигенам островковых клеток (ICA) [9], а N. Maclaren и S. Huang — аутоантитела к поверхностным антигенам островковых клеток [5]. Palmer в 1983 г. обнаружил в сыворотке больных с впервые выявленным ИЗСД аутоантитела к инсулину (IAA). Описаны случаи выявления ICA и IAA за 8 лет и более до появления клинических признаков ИЗСД [10]. Таким образом, по определению циркулирующих специфических аутоантител у пациентов появилась возможность реально предсказывать развитие клинических признаков ИЗСД. В большинстве случаев у лиц с ИЗСД выявлялись аутоантитела к бета-клеткам островков Лангерганса поджелудочной железы (ICA) и аутоантитела к инсулину (IAA) [6]. У больных с впервые выявленным ИЗСД ICA встречаются в 70% случаев [6], IAA — в 20–50% [12]. У пациентов с наличием ICA наблюдается прогрессирующее сниже-

ние функциональной активности бета-клеток, что проявляется в нарушении ранней фазы секреции инсулина [4]. При деструкции 80% инсулинпродуцирующих клеток появляются клинические признаки ИЗСД.

Для определения аутоантител наиболее часто используют метод иммунофлюоресценции и иммуноферментный анализ. Разработаны методы обнаружения в сыворотке больных циркулирующих аутоантител к антигенам островковых клеток с использованием срезов поджелудочной железы или культуры островковых клеток человека или грызунов [9, 11]. Референс-методом определения ICA до сих пор остается метод иммунофлюоресцентного окрашивания криосрезов поджелудочной железы человека I(0) группы крови, однако данный метод трудоемок и плохо поддается стандартизации [7]. В последние годы были идентифицированы конкретные молекулы бета-клеток, в отношении которых развивается аутоиммунный ответ и появляются аутоантитела при ИЗСД. Это прежде всего глутаматдекарбоксилаза [6] или антиген с мол. массой 64 кД — р64, а также тирозинфосфатаза — IA-2 (ICA-512) и инсулин [8]. Иммуноферментный метод определения аутоантител к этим структурам бета-клеток поджелудочной железы имеет ряд преимуществ перед иммунофлюоресцентным методом на криосрезе, так как менее трудоемок, более чувствителен и легко стандартизуем. В настоящее время появились коммерческие наборы ряда фирм

("Biomerica", "IMMCO Diagnostics" и др.) для определения циркулирующих аутоантител к островковым клеткам.

Выявление доклинической стадии ИЗСД позволит остановить или отсрочить развитие явного ИЗСД с нарушением показателей углеводного обмена [3]. Проблема изучения ранних стадий заболевания представляется актуальной в связи с возможностью активного воздействия на механизмы, способствующие развитию сахарного диабета.

Цель нашего исследования заключалась в изучении эффективности ряда подходов к определению аутоантител к островковым клеткам поджелудочной железы в клинической практике у больных с различными нарушениями углеводного обмена: ИЗСД, инсулиннезависимым сахарным диабетом (ИНСД), нарушением толерантности к легкоусвояемым углеводам, а также в группе риска различными методами.

Материалы и методы

Обследовано 150 больных в возрасте от 10 до 60 лет с длительностью заболевания от 1 мес до 15 лет. ИЗСД отмечен у 58 больных (в том числе у 24 впервые выявлен), ИНСД — у 11, группа риска состояла из 67 сибсов, нарушение толерантности к легкоусвояемым углеводам наблюдалось у 14 пациентов. Контрольную группу составили 50 здоровых доноров.

Для определения аутоантител к цитоплазматическим структурам бета-клеток (ICA) в сыворотках крови пациентов и здоровых доноров использовали вариант реакции непрямой иммунофлюоресценции с использованием криосрезов поджелудочной железы донора с неотягощенным эндокринологическим анамнезом в возрасте 45 лет, группа крови I (0). Кусочки ткани замораживали в жидком азоте. С помощью криотома "LEITZ" на предметных стеклах готовили криосрезы толщиной 3 мкм с последующей фиксацией в ацетоне при 4°C (2 мин). Срезы служили в качестве антигена для тестирования исследуемых сывороток на присутствие специфических аутоантител. Исследуемые сыворотки больных разводили в соотношении 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40 в физиологическом растворе, забуференном фосфатами pH 7,2 (PBS), и инкубировали во влажной камере с соответствующими разведениями сывороток 1 ч при комнатной температуре. Срезы 5 раз промывали PBS и наносили FITC-меченную антисыворотку кролика против иммуноглобулинов G человека (RaH-FITC) "Dako". Инкубировали во влажной камере 30 мин при комнатной температуре, 5 раз промывали PBS, заключали в смесь глицерин: PBS (1 : 1) и накрывали покровными стеклами. Учет реакции иммунофлюоресценции проводили с помощью флюоресцентного микроскопа Axioskop ("Opton"). В качестве отрицательного контроля реакции использовали сыворотку крови здорового донора, не содержащую аутоантител, в качестве положительного контроля — сыворотку, содержащую ICA у больного с впервые выявленным ИЗСД. Параллельно определяли ICA и IAA иммуноферментным методом с использованием наборов фирмы "Biomerica" под торговой маркой "Isletest" в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования уровня ICA в сыворотках пациентов с различными вариантами нарушений углеводного обмена, а также у лиц группы риска представлены в табл. 1.

Как видно из данных, приведенных в табл. 1, определение ICA на криосрезах у 150 больных с помощью иммунофлюоресцентного метода показало высокую выявляемость в группах больных с ИЗСД с длительностью заболевания до 2 лет и более 2 лет: ICA выявлены в 67 и 62% случаев соответственно, а в группе лиц с нарушением толерантности к углеводам — в 35,7% случаев. В группе риска ICA выявлены в 19,4% случаев, в группе доноров ICA не определялись. У больных с первичным диагнозом ИНСД ICA выявлены в 9% случаев. "Isletest" использовали при обследовании этих же больных. В результате обследования максимальная частота выявляемости ICA зафиксирована в группе лиц с ИЗСД длительностью до 2 лет (50) и более 2 лет (37%). Более низкий уровень выявляемости ICA отмечен у пациентов с нарушением толерантности к легкоусвояемым углеводам (28,6%), больных ИНСД (18%), сибсов (10%), здоровых доноров (4%) (см. табл. 1). При выявлении аутоантител к инсулину (IAA) максимальная частота выявления (46%) зарегистрирована в группе больных ИЗСД с длительностью заболевания до 2 лет; при длительности заболевания более 2 лет IAA выявлены в 35% случаев, при нарушении толерантности к легкоусвояемым углеводам — в 14%, при ИНСД — в 9%, в группе риска — в 22,5%, в группе здоровых доноров — в 2% случаев (см. табл. 1).

Полученные результаты подтверждают высокую специфичность ICA и IAA для больных ИЗСД (особенно при впервые выявленном заболевании). Кроме того, имеется общая тенденция к уменьшению частоты выявления ICA обоими методами с

Таблица 1

Выявляемость ICA и IAA у больных с различными нарушениями углеводного обмена

Диагноз	Реакция непрямой иммунофлюоресценции		Иммуноферментный метод			
	ICA на криосрезах		"Isletest"			
	положительные ICA		положительные ICA		положительные IAA	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
ИЗСД длительностью до 2 лет (n = 24)	16	66,7	12	50	11	46
ИЗСД длительностью более 2 лет (n = 34)	21	61,8	13	37*	12	35
Нарушение толерантности к легкоусвояемым углеводам (n = 14)	5	35,7	4	28,6	2	14
ИНСД (n = 11)	1	9	2	18	1	9
Группа риска (сибсы) (n = 67)	13	19,4	7	10	15	22,5
Здоровые доноры (n = 50)	0	0	2	4	1	2

* Для больных ИЗСД длительностью более 2 лет выявляемость ICA первым методом (на криосрезах) значительно выше (61,8%), чем вторым методом "Isletest" (37%) (p < 0,05).

Таблица 2

Выявляемость ИСА и ИАА у больных ИЗСД в зависимости от длительности заболевания

Длительность заболевания, годы	ИСА на криосрезях		"Isletest"			
			ИСА		ИАА	
	положительные ИСА	частота выявления признака, %	положительные ИСА	частота выявления признака, %	положительные ИСА	частота выявления признака, %
Менее 1 (n = 24)	16	66,7*	10	41,6	9	37,5
1—5 лет (n = 16)	10	62,5	7	29	5	31,2
Более 5 (n = 28)	11	35,7*	9	37,5	7	25

* Для больных ИЗСД с длительностью заболевания менее 1 года выявляемость ИСА на криосрезях составила 66,7%, более 5 лет — 35,7% ($p < 0,05$).

Таблица 3

Выявляемость ИСА и ИАА у больных ИЗСД в различных возрастных группах

Возраст больных, годы	ИСА на криосрезях		"Isletest"			
			ИСА		ИАА	
	положительные ИСА	частота выявления признака, %	положительные ИСА	частота выявления признака, %	положительные ИАА	частота выявления признака, %
Младше 16 (n = 10)	10	100*	4	40	4	40
16—40 лет (n = 27)	18	66,7	12	44	9	33,3
Старше 40 (n = 21)	9	40*	11	52,3	6	28,5

* Наблюдается достоверно значимое различие в выявляемости ИСА у больных ИЗСД для 2 возрастных групп — младше 16 лет (100%) и старше 40 лет (40%) ($p < 0,05$).

увеличением длительности заболевания. С увеличением возраста пациентов отмечена тенденция к увеличению выявляемости ИСА в "Isletest" (хотя различие недостоверно из-за ограниченности выборки). Выявляемость же ИСА на криосрезях с помощью иммунофлуоресцентного метода при увеличении возраста пациентов достоверно уменьшается (табл. 2, 3).

Частота выявления ИАА также снижается с увеличением длительности ИЗСД и возраста пациента (см. табл. 2, 3). Различий в выявляемости аутоантител у больных ИЗСД в зависимости от пола не обнаружено (рис. 1).

Метод определения ИСА на криосрезях поджелудочной железы человека показал достаточно высокую специфичность у больных с ИЗСД длительностью до 2 лет (67%).

По данным литературы [9] и согласно инструкции, специфичность "Isletest" позволяет выявить до 75% лиц с дебютом ИЗСД. Однако при определении ИСА этим методом в нашем исследовании только в 50% случаев получены положительные результаты у больных с впервые выявленным ИЗСД. Нами обнаружена неконкордантность групп больных, выявленных двумя методами определения ИСА. Она была характерна для всех групп исследуемых пациентов. При ИЗСД длительностью до 2 лет

выявляемость ИСА при суммировании результатов обоих способов определения достигает 100%, более 2 лет — 79,4% (рис. 2). Таким образом, одновременное определение ИСА двумя описанными методами позволяет увеличить чувствительность определения ранних стадий ИЗСД.

Вместе с тем клинический диагноз ИЗСД не может базироваться исключительно на результатах иммунодиагностики, а должен опираться также на совокупность клинических, анамнестических и генетических факторов. Дальнейшее применение методов определения ИСА и ИАА позволит разработать скрининговые программы для тестирования групп лиц с повышенным риском развития ИЗСД, прежде всего в семьях, где болен один из родителей или детей. Эффективная доклиническая диагностика ИЗСД имеет большое практическое значение и необходима для своевременного начала наблюдения за пациентами и принятия ряда терапевтических мер с целью превенции или отсрочки клинической манифестации ИЗСД при относительно сохранной функции бета-клеток.

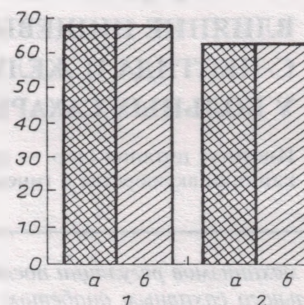


Рис. 1. Зависимость уровня выявляемости (в %) ИСА от пола больных ИЗСД.

1 — длительность ИЗСД до 2 лет; 2 — длительность ИЗСД более 2 лет. а — лица мужского пола; б — лица женского пола.

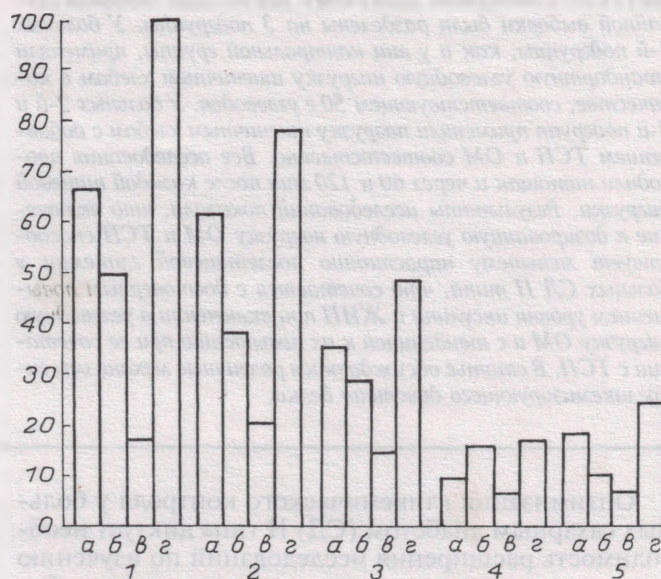


Рис. 2. Зависимость уровня выявляемости (в %) ИСА от метода исследования.

1 — ИЗСД (длительность до 2 лет); 2 — ИЗСД (длительность более 2 лет); 3 — нарушение толерантности к легкоусвояемым углеводам; 4 — ИНСД; 5 — группа риска (спбсы). а — ИСА на криосрезях; б — ИСА в "Isletest"; в — ИСА на криосрезях и ИСА в "Isletest" одновременно; г — ИСА на криосрезях или ИСА в "Isletest".

Выводы

1. Группы больных ИЗСД, выявляемые двумя методами определения ИСА, неконкордантны.
2. Совместное применение двух методов определения ИСА, а также определение ИАА позволяет с большой точностью и чувствительностью диагностировать ИЗСД.
3. С увеличением длительности ИЗСД имеется тенденция к снижению выявляемости ИСА на криосрезах иммунофлюоресцентным и иммуноферментным методом "Isletest". С увеличением длительности заболевания и возраста пациентов частота выявления ИАА снижается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вельбри С. К. // Иммунологическая диагностика заболеваний поджелудочной железы. — М., 1985. — С. 134.
2. Полторак В. В., Бриндак О. И., Ладозубец Е. В. // Проблемы эндокринологии. — 1986. — № 3. — С. 81—87.

3. Шальнев Б. И., Петросова В. Н., Сускова В. С. // Мед. генетика и иммунология. — 1988. — № 2. — С. 1—72.
4. Argulla E., Stender F. // Immunology of Islet Cells — Diabetic Pancreas. — New York, 1985. — P. 493—512.
5. Atkinson M. A., Maclaren N. K., Reley W. J. et al. // Diabetes. — 1986. — Vol. 35. — P. 894.
6. Baekkeskov S., Aanstoot H. J., Christgau S. // Nature. — 1990. — Vol. 347. — P. 151—156.
7. Boitard C., Bonifacio E., Botazzo G. F. et al. // Diabetologia. — 1988. — Vol. 31. — P. 451—452.
8. Bonifacio E., Wilkin T., Palmer J. et al. // Ibid. — 1987. — Vol. 30. — P. 676.
9. Botazzo G. F., Florin-Christensen A., Doniach D. // Lancet. — 1974. — Vol. 2. — P. 1279—1282.
10. Botazzo G. F., Gliemann H. // Diabetologia. — 1986. — Vol. 29. — P. 125.
11. Karlsen A. E., Miharelsen B. K., Pedersen J. K. // Diabet. Nutr. Metab. — 1992. — Vol. 5, Suppl. 1. — P. 151—154.
12. Roll U., Ziegler A. G. // Exp. clin. Endocrinol. Diabetes. — 1997. — Vol. 105. — P. 1—14.
13. Soeldner J. S., Tuttleman M., Eisenbarth G. S. et al. // New Engl. J. Med. — 1985. — Vol. 313. — P. 893—900.

Поступила 15.01.99

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1999

УДК 616.379-008.64-07:616.153.45-02:613.21

Х. Х. Шарфетдинов, В. А. Мещерякова, О. А. Плотникова, Г. Ю. Мальцев, Е. П. Гутель ВЛИЯНИЕ ПИЩЕВЫХ НАГРУЗОК НА ГЛИКЕМИЮ, УРОВНИ ИНСУЛИНА, С-ПЕПТИДА И ЖЕЛУДОЧНО-ИНГИБИТОРНЫЙ ПОЛИПЕПТИД У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ II ТИПА

Институт питания (дир. — акад. РАМН М. Н. Волгарев) РАМН, клинико-диагностическая лаборатория клиники акушерства и гинекологии (дир. — проф. Н. М. Побединский) ММА им. И. М. Сеченова

С целью изучения механизмов регуляции послеоперационной гликемии у 21 больного сахарным диабетом (СД) II типа исследована динамика гликемии, уровня инсулина, С-пептида и желудочно-ингибиторного полипептида (ЖИП) в плазме крови под влиянием углеводсодержащих нагрузок (50 г углеводов) с включением различных источников растительного и животного белка: текстурированного соевого продукта (ТСП) и отварного мяса (ОМ). Все больные методом случайной выборки были разделены на 3 подгруппы. У больных 1-й подгруппы, как и у лиц контрольной группы, применяли стандартную углеводную нагрузку пшеничным хлебом в количестве, соответствующем 50 г углеводов. У больных 2-й и 3-й подгрупп применяли нагрузку пшеничным хлебом с добавлением ТСП и ОМ соответственно. Все исследования проводили натощак и через 60 и 120 мин после каждой пищевой нагрузки. Результаты исследований показали, что включение в дозированную углеводную нагрузку ОМ и ТСП способствует меньшему нарастанию послепищевой гликемии у больных СД II типа, что сочетается с достоверным повышением уровня инсулина и ЖИП при включении в углеводную нагрузку ОМ и с тенденцией к их повышению при ее сочетании с ТСП. В статье обсуждаются различные механизмы гипогликемизирующего действия белка.

The mechanisms regulating post-meals glycemia were studied by evaluating the time course of glycemia and plasma levels of insulin, C peptide, and gastric inhibitory polypeptide (GIP) in 21 diabetics with type 2 condition after carbohydrate loading (50 g) with various sources of vegetable and animal protein (textured soybean product (TSP) and boiled meat (BM)). The patients were distributed into 3 groups by random sampling. In group 1 and in the controls, standard carbohydrate test meals (wheat bread, 50 g carbohydrates) were used. In groups 2 and 3, wheat bread was supplemented with TSP and BM, respectively. All studies were carried out on an empty stomach and 60 and 120 min after test meals. Addition of BM and TSP to dosed carbohydrate meals promoted a lesser increment in the post-meals glycemia in diabetics with type 2 condition, which was associated with a significant increase in the levels of insulin and GIP after meals including BM and a tendency to their decrease after meals including TSP. The mechanisms of hypoglycemic effect of protein are discussed.

Оптимизация гликемического контроля у больных сахарным диабетом (СД) II типа диктует необходимость расширения исследований по изучению влияния отдельных пищевых веществ и их комбинаций на выраженность послепищевой гликемической реакции у этой категории больных. Среди различных факторов, влияющих на послепищевой гликемический ответ, значительный эффект дает содержащийся в пище белок (как количество, так и

качественный его состав). В ранее опубликованных работах продемонстрировано, что добавление белка к дозированной углеводной нагрузке или смешанной пище в количестве 16—50 г сопровождается снижением послепищевой гликемии у здоровых лиц и больных СД II типа [2, 10, 12, 16, 17]. Степень снижения послепищевой гликемии в определенной мере зависит от источника потребляемого белка. Так, наименьшее нарастание послепищевой глике-