

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 2000

УДК 616.379-008.64-053.2-078.33

Н. Л. Вартанян, А. А. Соминина, В. В. Зарубаев, А. С. Стройкова, И. Н. Острецова, О. И. Киселев

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АУТОАНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ТИПА 1 И ДЕТЕЙ ИЗ ГРУПП РИСКА¹

Лаборатория биотехнологии диагностических препаратов (зав. — проф. А. А. Соминина) НИИ гриппа РАМН, Санкт-Петербург

Усовершенствованы и стандартизованы методические аспекты иммунофлюоресцентного обнаружения аутоантител к антигенам β -клеток островков Лангерганса (ICA) как маркера индикации ранних доклинических форм инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД).

Проведено определение частоты распределения и уровня ICA у больных с впервые диагностированным ИЗСД, у детей — родственников больных ИЗСД и детей с различными нарушениями углеводного обмена (всего у 298 человек). У больных с первично диагностированным ИЗСД ICA обнаружены в 83,3% случаев. ICA-позитивными оказались 15,4% клинически здоровых сиблингов больных ИЗСД, а также 8,3% детей, имеющих одного из родителей с ИЗСД. Достаточно высокий процент обнаружения ICA (до 16%) выявлен у детей с нарушениями углеводного обмена.

В результате проведенных исследований показано, что иммунофлюоресцентное обнаружение ICA является маркером высокого риска развития ИЗСД, а дети из групп риска нуждаются в мониторинговании процесса и назначении лечебно-профилактических средств, способных предотвратить прогрессирующее развитие диабета.

Methodological aspects of immunofluorescent detection of autoantibodies to Langerhans' islet β -cell antigens (ICA), a marker indicating early preclinical insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), have been modified and standardized. The distribution and levels of ICA were evaluated in patients with first diagnosed IDDM and their relatives (risk group) (total 298). In patients with newly diagnosed IDDM, ICA were detected in 83.3% cases. 15.4% clinically healthy siblings of IDDM patients and 8.3% children one of whose parents was a diabetic were ICA-positive. About 16% children with non-IDDM carbohydrate metabolism disorders were ICA-positive. Hence, immunofluorescent detection of ICA helps detect this IDDM marker; the process is to be monitored in high-risk children and they should be prescribed therapeutic and prophylactic agents preventing the progress of diabetes.

Разработка методов ранней диагностики доклинических форм инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД) является одной из важнейших проблем современной эндокринологии. Исследования последних лет показали, что снижение или полное прекращение секреции инсулина, являющееся причиной заболевания, обусловлено деструкцией β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы человека в результате аутоиммунного процесса [14]. Обнаружение аутоантител к различным белкам β -клеток является на сегодняшний день наиболее изученным иммунологическим феноменом, характерным для ИЗСД. Впервые антитела к антигенам клеток островков Лангерганса были обнаружены в 1974 г. G. Bottazzo и соавт. в сыворотках больных ИЗСД в комбинации с другими эндокринопатиями с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции (НИФ) на срезах поджелудочной железы [4]. Далее было показано, что антитела к антигенам поджелудочной железы, а точнее — к цитоплазматическим компонентам клеток островков Лангерганса (ICA — islet cell antibodies), являются высокоспецифичным маркером аутоиммунного

процесса при ИЗСД [3, 6, 7]. Метод определения ICA нашел широкое применение в клинической практике многих стран мира. Особенно перспективным оказалось использование ICA в качестве серологического маркера аутоиммунного процесса с целью выявления лиц с повышенным риском заболевания ИЗСД и их последующего мониторинга среди родственников больных ИЗСД, а также в некоторых других группах [2, 7, 11, 15]. В ходе многолетних исследований в рамках программ по изучению диабета, ведущихся в разных странах Европы и Америки, была доказана высокая значимость этого показателя в отношении прогноза ИЗСД. В России до последнего времени метод определения ICA не применялся. Целью настоящей работы явилось совершенствование методики и определение ICA в группах больных ИЗСД, среди родственников I степени родства больных ИЗСД (без клинической симптоматики) и лиц с нарушениями углеводного обмена.

Материалы и методы

Определение ICA было проведено у 298 детей. В I-ю группу вошли дети с впервые диагностированным ИЗСД. Группа включала 36 детей в возрасте от 1 года до 13 лет (средний возраст 9,3 года), из них 36% мальчиков. Во 2-ю группу вошли сиблинги (родные братья и сестры) больных ИЗСД (104 ребенка от 2 до 17 лет, средний возраст 11,0 лет, из

¹Представленная работа выполнена в рамках Городской медико-социальной программы "Диабет" (Санкт-Петербург).

Авторы выражают благодарность сотрудникам Департамента педиатрии Университета г. Оулу (Финляндия) за помощь, оказанную в стандартизации средств и методов ICA-детекции, и предоставление международных референс-стандартов.

них 43% мальчиков), в 3-ю группу — дети, один из родителей которых болен ИЗСД (108 детей от 2 до 17 лет, средний возраст 9,7 года, 51% мальчиков). В 4-ю группу вошли 50 детей с нарушениями углеводного обмена, не имеющие близких родственников, страдающих ИЗСД, и состоящие на диспансерном учете у врача-эндокринолога в детских поликлиниках Санкт-Петербурга. Возраст детей в группе варьировал от 5 до 15 лет (в среднем 11,7 года; 60% мальчиков). У 42 детей отклонения от нормы были выявлены при проведении стандартной пробы на толерантность к глюкозе (СПТГ), из них 29 детям по результатам СПТГ и в соответствии с критериями, рекомендованными ВОЗ (1985), поставлен диагноз нарушения толерантности к глюкозе. У 13 детей при нормальном уровне глюкозы в крови натощак и через 2 ч после стандартной нагрузки было отмечено существенное (от 9 до 11,1 ммоль/л) повышение концентрации глюкозы в капиллярной крови через 1 ч после нагрузки. Как минимум однократное повышение концентрации глюкозы натощак ($> 5,6$ ммоль/л) было зафиксировано у 22 детей. У 6 детей этой группы СПТГ не проводили в связи с высокими показателями уровня глюкозы в крови натощак. Дневные колебания глюкозы в крови без специальной нагрузки находились у них в пределах нормы. У 2 детей повышение гликемии носило транзиторный характер, и СПТГ в период обследования соответствовала норме.

ИСА определяли методом НИФ на срезах поджелудочной железы [4]. Для приготовления криостатных срезов использовали образцы ткани хвостовой части поджелудочной железы человека 0(1) группы крови. Поджелудочную железу брали от лиц, погибших от тяжелой механической травмы, не совместимой с жизнью, в сроки от 40 мин до 22 ч с момента смерти. Возраст пострадавших колебался от 20 до 70 лет, макроскопические признаки патологии поджелудочной железы у них отсутствовали.

Для приготовления криостатных срезов использовали фрагменты поджелудочной железы размером $1 \times 1 \times 0,5$ см, толщина срезов составляла 4–5 мкм. Приготовленные срезы, прикрепленные к предметным стеклам, хранили при -20°C .

Для определения морфологической структуры и наличия островков Лангерганса по одному срезу от каждого образца ткани фиксировали в 10% забуференном формалине, отмывали дистиллированной водой и окрашивали гематоксилином и эозином.

Перед проведением НИФ криостатные срезы высушивали при комнатной температуре под струей воздуха в течение 1,5 ч. Затем на поверхность среза наносили исследуемую сыворотку в объеме 25 мкл и инкубировали во влажной камере при комнатной температуре в течение 30 мин. Далее стекла на 10 мин погружали в фосфатно-солевой буфер pH 7,3. После отмывания избыток влаги удаляли фильтровальной бумагой и на срезы наносили по 25 мкл раствора FITC-меченных антител к IgG человека (30 мин, комнатная температура). Для отработки наиболее чувствительного варианта НИФ проводили сравнительный анализ различных конъюгатов антивидовых антител. Использовали козы поликлональные FITC-меченные антитела к IgG человека, специфичные к Fab- или Fc-фрагментам — FITC-Fab и FITC-Fc соответственно ("Sigma"), а также кроличьи поликлональные FITC-меченные антитела к IgG человека, специфичные к γ -цепи —

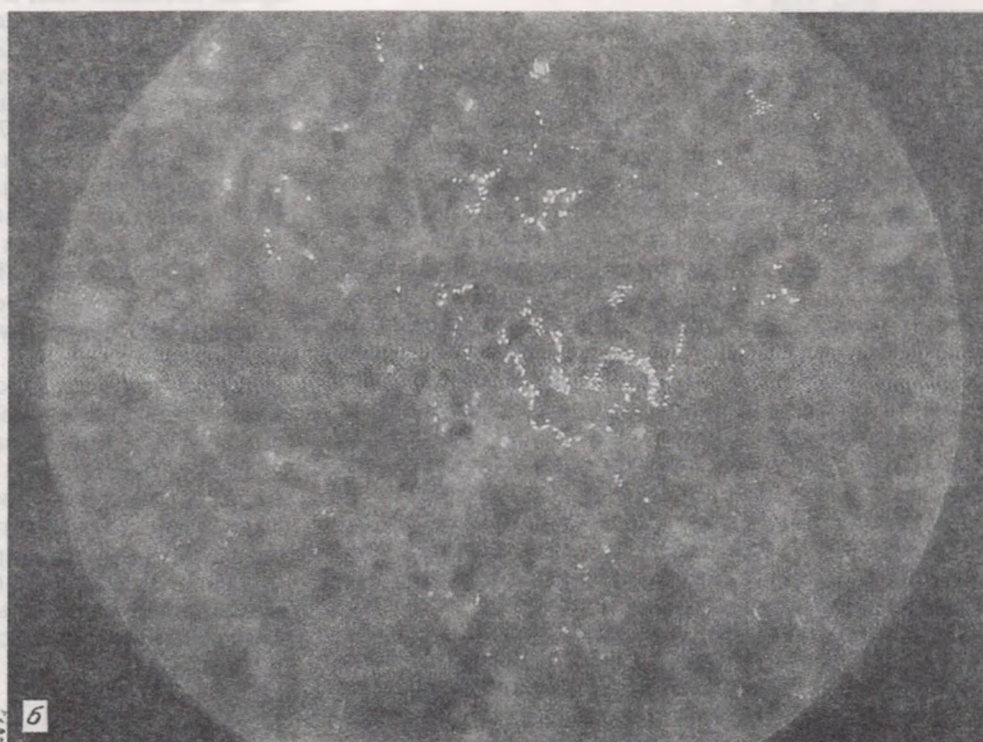
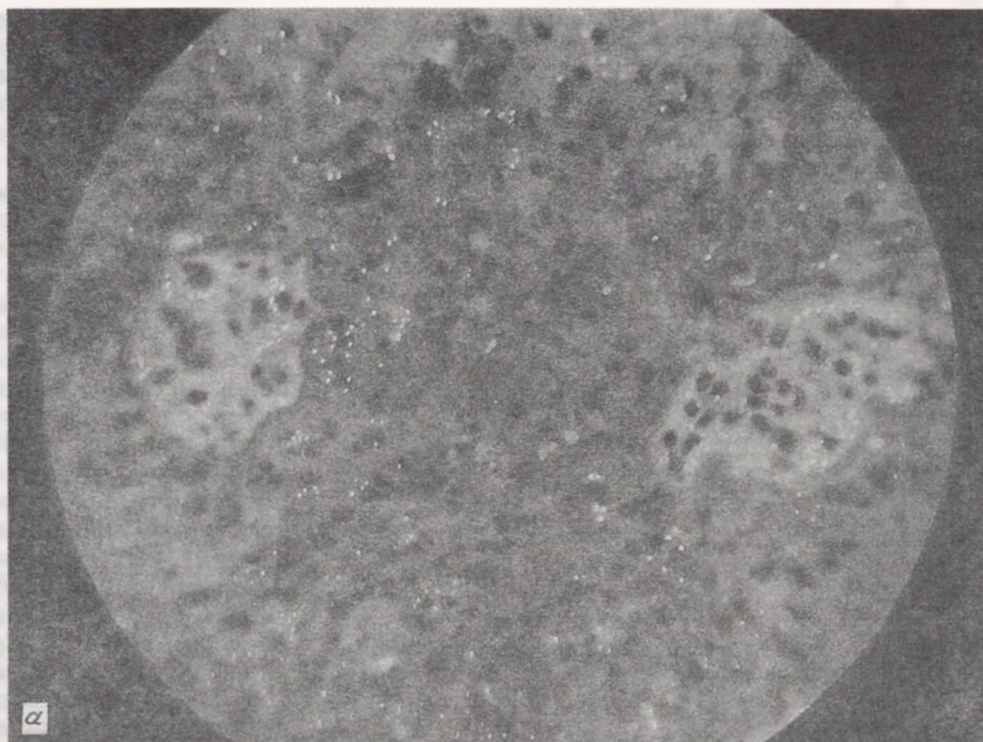
FITC- γ ("Dako"). По окончании инкубации срезы еще раз отмывали (10 мин, фосфатно-солевой буфер), накрывали покровными стеклами и учитывали результаты (люминесцентный микроскоп МЛ-2, Россия; ув. 200). Все исследуемые сыворотки при первичном анализе использовали в цельном виде и в разведении 1:2. Позитивные сыворотки анализировали повторно титрованием до 1:512 для определения уровня ИСА. В каждый опыт вводили референс-позитивные и референс-негативные сыворотки, любезно предоставленные сотрудниками Отделения педиатрии Университета г. Оулу (Финляндия), а также ряд сывороток от больных ИЗСД и родственников больных ИЗСД, откалиброванных в соответствии с международными референс-стандартами (Juvenile Diabetes Foundation Standard). Результаты титрования выражали в JDFU (Juvenile Diabetes Foundation Units) согласно рекомендациям [5].

Результаты и их обсуждение

Приготовление срезов поджелудочной железы с неповрежденной структурой белковых молекул, служащих мишенями для аутоантител при ИЗСД, является принципиальным моментом для ИСА-детекции. Ранее было показано, что использование стандартных приемов фиксации ткани с помощью этанола, метанола, формальдегида и ацетона нецелесообразно, так как эти реагенты изменяют конформацию крайне лабильных молекул-мишеней, в результате чего они утрачивают способность к взаимодействию с антителами. В настоящее время для определения ИСА рекомендуется использование нефиксированных криостатных срезов поджелудочной железы [1, 10]. В результате исследования режимов замораживания и хранения ткани поджелудочной железы было показано, что для приготовления срезов требуемого качества необходимо использовать материал, замороженный в жидком азоте (-196°C) немедленно после извлечения. Хранение ткани перед замораживанием при 4°C в течение 2–4 ч приводило к ее деструкции в результате аутолиза, что делало невозможным приготовление срезов или приводило к полной потере чувствительности теста НИФ в результате инактивации антигенов β -клеток. Срезы, приготовленные из немедленно замороженных образцов, отличались высоким качеством с точки зрения морфологии. Чувствительность НИФ снижалась также при использовании железы от пожилых людей или в случае длительного периода посмертной ишемии ткани. Таким образом, качество срезов, используемых для ИСА-детекции, зависит от способа замораживания образцов, возраста донора и времени ишемии ткани, что согласуется с ранее представленными данными [10].

С целью выбора оптимальной для НИФ чувствительности мы провели сравнительный анализ трех вариантов антивидовых флюоресцирующих антител (см. раздел "Материалы и методы"). Все антитела были исследованы параллельно с 8 образцами негативных (K-) и 8 образцами позитивных контрольных сывороток (K+). Ложноположительные результаты в реакции с K- отсутствовали при использовании всех трех видов антител. Антитела FITC-Fc и FITC- γ дали положительную реакцию со всеми образцами K+, однако интенсивность окраски антителами FITC-Fc была несколько выше (см. рисунок). В реакции с антителами FITC-Fab

Типичная иммунофлюоресценция клеток островков Лангерганса при обработке срезов поджелудочной железы человека 0(1) группы крови: а — сывороткой от больного ИЗСД с последующей окраской антивидовым FITC-конъюгатом к Fc-фрагменту IgG человека; б — сывороткой здорового ребенка. Ув. 200.



было выявлено только 3 из 8 К+. Полученные результаты вполне удовлетворительно можно объяснить большей доступностью Fc-фрагмента молекул ICA к взаимодействию с FITC-конъюгатами по сравнению с Fab-фрагментами, задействованными на этапе специфического взаимодействия с антигенами β -клеток. Таким образом, для дальнейшей работы по детекции ICA рекомендовано использование антител к Fc-фрагменту или γ -цепи молекулы IgG.

Определение ICA в различных группах детей дало следующие результаты. Большинство больных детей (83,3%) с впервые клинически установлен-

ным диагнозом ИЗСД (1-я группа) оказались ICA-позитивными (см. таблицу), что коррелирует с ранее опубликованными данными, согласно которым ICA определяются у 60—85% больных ИЗСД в раннем периоде заболевания [2, 3, 15]. Уровень ICA у больных 1-й группы варьировал от 5 до 436 JDFU, составляя в среднем 55 JDFU. У части больных (16,7%) ICA не были выявлены. Ранее было высказано предположение о том, что отсутствие ICA у больных ИЗСД может быть обусловлено либо тем, что к моменту клинического проявления заболевания у некоторых индивидуумов они уже исчезают,

Определение ICA у больных ИЗСД, родственников больных ИЗСД и лиц с нарушениями углеводного обмена

Группа обследованных	Число обследованных	Количество положительных реакций, %	Уровень антител (JDFU)
Больные ИЗСД	36	83,3	55* (5—436)
Родственники I степени родства больных ИЗСД:			
сиблинги	104	15,4	12 (3—110)
дети	108	8,3	13 (5—110)
Лица с нарушениями углеводного обмена:			
общая группа	50	16,0	19 (8—28)
дети с повышенным уровнем глюкозы в крови натощак	22	22,7	11 (8—28)
дети с нормальным уровнем глюкозы в крови натощак	28	10,7	8

Примечание. * — указан средний геометрический титр; в скобках — диапазон колебаний титров.

либо наличием форм ИЗСД, протекающих без появления ICA [15].

У здоровых индивидуумов ICA встречаются только в 0,2—4% случаев [3, 5]. Более высокая встречаемость ICA (в пределах 5—8%) была зарегистрирована у родственников I степени родства больных ИЗСД [2, 6, 7, 15]. Длительные наблюдения показали, что риск развития ИЗСД у этой категории лиц составляет 40—50% в течение ближайших 10 лет и зависит от возраста индивидуума и уровня ICA [2, 3, 7].

Согласно результатам наших исследований, ICA-позитивными оказались 15,4% сиблингов больных ИЗСД и 8,3% детей, имеющих одного из родителей, больных ИЗСД, т. е. встречаемость антител среди родных братьев и сестер больных диабетом в 2 раза превысила результаты, полученные в группе детей от больных родителей. Более частое появление ICA у сиблингов, чем у других родственников I степени родства больных ИЗСД, уже отмечалось ранее в ходе анализа результатов семейных исследований [12]. Средний уровень ICA в группах был практически одинаков, составляя 12 (сиблинги) и 13 (дети) JDFU и достигая у некоторых детей весьма высоких значений, свидетельствующих о высоком риске развития у них диабета. Вызывает интерес тот факт, что в обеих группах встречаемость ICA превышает аналогичные показатели, полученные в других странах. Необходимо отметить, что, согласно опубликованным данным по некоторым странам Европы, ИЗСД развивается в зависимости от длительности периода наблюдений в среднем у 6—9% родственников I степени родства больных диабетом типа I [9], т. е. процент заболевших примерно соответствует уровню ICA-позитивности. В Санкт-Петербурге подобной статистики до последнего времени не велось. В общей же популяции детей в течение последних лет отмечается устойчивая тенденция к росту заболеваемости ИЗСД. Так, за последние 2 года (1997 и 1998 гг.) в возрастной группе от 0 до 15 лет она повысилась с 10,6 до 12,3 случая на 100 000 населения соответствующего возраста. Не исключено, что высокая частота обнару-

жения аутоантител в группе родственников больных ИЗСД в исследуемом регионе может косвенно указывать либо на усиление действия диabetогенных факторов, либо на увеличение в популяции лиц с генетически высокой предрасположенностью к этому заболеванию.

В связи с вышеизложенным большой интерес вызывает поиск групп риска развития ИЗСД среди лиц, не имеющих близких родственников, страдающих этим заболеванием. В настоящее время в мире активно ведется поиск четких критериев оценки риска развития ИЗСД в общей популяции. Несмотря на то что, как было установлено, прогностическая ценность определения ICA в общей популяции имеет более ограниченное значение, чем для родственников больных ИЗСД, однако в сочетании с оценкой параметров углеводного обмена и выявлением генетической предрасположенности дает определенную информацию о риске развития заболевания [13]. В наших исследованиях высокий процент встречаемости (16%) антител был обнаружен у детей с различными нарушениями углеводного обмена (см. таблицу). Средняя величина ICA составила у них 10 JDFU, варьируя в пределах от 8 до 28 JDFU. При этом исследуемые антитела чаще выявлялись у детей с повышенным уровнем сахара в крови натощак. Так, в группе из 22 детей с уровнем глюкозы в цельной капиллярной крови в среднем $6,7 \pm 0,32$ ммоль/л ICA выявлены в 22,7% случаев, а в группе детей, у которых повышение уровня сахара в крови натощак не было зафиксировано (28 человек), — только в 10,7% случаев. При этом уровень ICA в группах составил в среднем 11 и 8 JDFU соответственно (см. таблицу). Для адекватной оценки полученных нами данных необходимо дальнейшее наблюдение за детьми и проведение ряда дополнительных обследований.

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлены группы лиц, имеющих высокий риск развития ИЗСД. Необходимо осуществление мониторинга динамики аутоиммунного процесса у этих детей, определение генетических маркеров риска ИЗСД (для повышения точности прогноза), а также применение лечебно-профилактических средств, таких как никотинамид, малые дозы инсулина и др., препятствующих прогрессирующему развитию диабета, широко изучаемых в рамках специальных международных программ [11]. Кроме того, необходимо выяснить причины высокой частоты обнаружения ICA у родственников больных ИЗСД в Санкт-Петербурге.

Выводы

1. Выявлен ряд критических параметров, определяющих результативность определения ICA (возраст донора ткани поджелудочной железы, условия ее хранения, эпителиальная направленность антивидовых конъюгатов).
2. ICA обнаружены у большинства больных детей с впервые диагностированным ИЗСД.
3. Установлено, что частота регистрации ICA среди родственников I степени родства больных ИЗСД в Санкт-Петербурге превышает аналогичные показатели по высокоразвитым странам в 1,5—2 раза.
4. Среди детей с нарушениями углеводного обмена выявлена группа ICA-позитивных лиц.

5. На основании проведенных исследований выявлена группа лиц, имеющих высокий риск развития ИЗСД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bonifacio E., Boitard C., Gleichman H. et al. // Diabetologia. — 1990. — Vol. 33, N 12. — P. 731—736.
2. Bonifacio E., Genovese S., Braghi S. et al. // Ibid. — 1995. — Vol. 38, N 7. — P. 816—822.
3. Bonifacio E., Bingley P. J. // Acta Diabetol. — 1997. — Vol. 34, N 3. — P. 185—193.
4. Bottazzo G. F., Florin-Christensen A., Doniach D. // Lancet. — 1974. — Vol. 2, N 7892. — P. 1279—1282.
5. Karjalainen J. K. // Diabetes. — 1990. — Vol. 39, N 9. — P. 1144—1150.
6. Knip M., Vähäsalo P., Karjalainen J. et al. // Diabetologia. — 1994. — Vol. 37, N 4. — P. 388—393.
7. Kulmala P., Savola K., Petersen J. S. et al. // J. Clin. Invest. — 1998. — Vol. 101, N 2. — P. 327—336.
8. Lernmark Å., Molenaar I. L., van Beers W. A. M. et al. // Diabetologia. — 1991. — Vol. 34, N 7. — P. 534—535.
9. Lorenzen T., Pociot F., Hougaard P., Nerup J. // Ibid. — 1994. — Vol. 37, N 3. — P. 321—327.
10. Marner B., Lernmark Å., Nerup J. et al. // Ibid. — 1983. — Vol. 25, N 2. — P. 93—96.
11. Pozzilli P. // Diabet. Metab. Rev. — 1998. — Vol. 14, N 1. — P. 69—84.
12. Riley W. J., Maclaren N. K., Krischer J. et al. // N. Engl. J. Med. — 1990. — Vol. 323, N 17. — P. 1167—1172.
13. Schatz D., Krischer J., Horne G. et al. // J. Clin. Invest. — 1994. — Vol. 93, N 10. — P. 2403—2407.
14. Schranz D. B., Lernmark Å. // Diabet. Metab. Rev. — 1998. — Vol. 14, N 1. — P. 3—29.
15. Vähäsalo P., Knip M., Karjalainen J. // Eur. J. Endocrinol. — 1996. — Vol. 135, N 6. — P. 689—695.

Поступила 29.07.99

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2000

УДК 616.379-008.64-053.2-092:612.017.1]-078.33

Е. В. Крюкова, А. А. Савченко, В. Т. Манчук, И. В. Осокина

ОСОБЕННОСТИ ИММУНИТЕТА У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА ТИПА 1

Институт медицинских проблем Севера (дир. — проф. В. Т. Манчук) СО РАМН, Красноярск

Цель данного исследования состояла в изучении показателей клеточного и гуморального иммунитета у детей и подростков с разной продолжительностью инсулинозависимого сахарного диабета (ИЗСД). В связи с этим обследовано 55 детей и подростков с ИЗСД, которых по длительности заболевания разделили на 3 группы: болеющие ИЗСД до 1 года, 1–5 лет и более 5 лет. С помощью метода непрямой иммунофлуоресценции исследован популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови. Концентрацию основных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови определяли методом радиальной иммунодиффузии. Доказано, что на стадии начального диабета у больных детей и подростков состояние системы иммунореактивности выражается в депрессии Т-клеточного звена иммунной системы и активации гуморального иммунитета. С увеличением продолжительности заболевания депрессия клеточного звена становится более выраженной. У больных ИЗСД независимо от продолжительности заболевания отмечается увеличение концентрации в крови CD16⁺-клеток. Содержание HLA-DR⁺-лимфоцитов, повышенное на стадии начального диабета, в более поздний период ИЗСД снижается до диапазона нормы. В наблюдаемый период заболевания не установлено определенной динамики изменения концентраций сывороточных иммуноглобулинов, однако в разные периоды ИЗСД уровни IgA и IgM достоверно увеличены.

Cellular and humoral immunity parameters were studied in 55 children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). The patients were divided into 3 groups with different duration of disease: up to 1 year, 1–5 years, and more than 5 years. Population and subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes was studied by indirect immunofluorescence. Serum concentrations of the main immunoglobulin classes were measured by radial immunodiffusion. At the initial stage of diabetes the immunoreactivity status in children and adolescents manifested by depression of T-cellular component of the immune system and activation of humoral immunity, this depression progressing with disease. The concentration of CD16⁺ cells was increased in all patients, irrespective of disease duration. The content of HLA-DR⁺ lymphocytes was increased at the stage of initial diabetes and decreased to the norm later. No definite patterns in changes of serum immunoglobulin concentrations could be distinguished during the observed period of disease; however the levels of IgA and IgM were significantly increased during various periods of IDDM.

Инсулинозависимый сахарный диабет (ИЗСД) является одним из наиболее распространенных эндокринных заболеваний в детском возрасте. Из-за сложности компенсации и лабильности течения в детском и подростковом возрасте происходит раннее развитие осложнений, приводящих в последующем к инвалидизации больных. По данным литературы, ежегодно число больных увеличивается на 5–7%, а каждые 12–15 лет удваивается [1]. В настоящее время установлено, что в развитии заболевания и его осложнений ведущую роль играют аутоиммунные процессы [2, 8, 10].

Вместе с тем в литературе имеются достаточно противоречивые данные о роли клеточного звена иммунной системы в этиологии и патогенезе

ИЗСД. В большинстве случаев на всех этапах заболевания выявляются дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов, а также изменение их функциональной активности [5, 7]. В связи с этим в лечении ИЗСД все чаще стали рассматривать возможность применения иммуотропных средств [4, 9]. Однако для успешного применения иммуномодуляторов необходимы знания состояния параметров иммунной системы не только при впервые выявленном заболевании, но и в динамике патологического процесса. Целью данного исследования явилось изучение показателей клеточного и гуморального иммунитета у детей и подростков с разной продолжительностью ИЗСД.