

© А. Б. Полетаев, 2013
УДК 616-097.3-071:616.379-008.64

А. Б. Полетаев

ДОКТ. МЕД. НАУК

МИЦ «Иммункулус», НИИ нормальной физиологии им. П. К. Анохина РАМН, Москва

Аутоантитела к инсулиновым рецепторам как биомаркеры-предвестники сахарного диабета 2-го типа

В сыворотке крови лиц, страдающих метаболическим синдромом и недавно диагностированным сахарным диабетом 2-го типа, выявляется относительно повышенное содержание аутоантител к инсулиновым рецепторам. По мере развития болезни (свыше трёх лет) частота выявления таких аутоантител снижается, но нарастает частота случаев повышенного содержания аутоантител к инсулину. Обсуждается возможность использования подобных аутоантител-маркеров для раннего выявления изменений, ведущих к сахарному диабету 2-го типа, и мониторинга за динамикой развития патологического процесса. Отмечается повышенная информационная ценность и надежность регистрации и анализа изменений профилей множества аутоантител в сравнении с анализом сывороточного содержания отдельных аутоантител.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, аутоантитела к инсулиновым рецепторам, аутоантитела к инсулину

Иммунология последнего десятилетия отмечена парадоксами, вступающими в противоречие с привычными взглядами многих клиницистов. В частности, это касается ситуации с естественными аутоантителами (ауто-АТ). Если ранее ауто-АТ ассоциировались исключительно с аутоиммунными болезнями, то с конца прошлого века известно, что продукция ауто-АТ класса *IgG* и *IgM* самой разной специфичности типична для любого здорового человека и продолжается на протяжении всей жизни [1, 2]. Более того, установлено, что вторичное повышение продукции и сывороточного содержания ауто-АТ определенной тканевой специфичности в обязательном порядке следует за тканевыми повреждениями любого генеза и является универсальным признаком формирующихся или уже имеющих нарушения [3]. Иными словами, признаком патологии является не наличие ауто-АТ как таковых, а первичные (то есть не индуцированные тканевым повреждением) и продолжительные аномальные подъемы их сывороточного содержания [2]. Симптоматично, что сегодня стало привычным говорить о патологическом подъеме уровней определенных

ауто-АТ как о маркерном признаке болезней и патологических состояний, не относимых к когорте аутоиммунных болезней, таких как инсульты, онкологические заболевания, инфаркт миокарда, осложненное течение беременности и др. [2].

В настоящей работе проанализированы изменения в сывороточном содержании ауто-АТ класса *IgG*, направленных к инсулиновым рецепторам (Инс-Рц), у лиц группы риска по развитию сахарного диабета 2-го типа (СД-2) и пациентов, уже страдающих данным заболеванием.

Материалы и методы

Всего нами была проанализирована иммунореактивность 31 образца сывороток крови, полученных от лиц обоего пола ($m=18$, $ж=13$) 48–65 лет с признаками метаболического синдрома ($n=16$) или страдающих СД-2 (стаж заболевания 1–2 года, $n=7$; стаж заболевания более 3 лет, $n=8$). Пациенты не имели выраженных признаков диабетической ангиопатии, нейропатии, нефропатии или ретинопатии. Пациенты с выраженными признаками каких-либо соматических, эндокринных, онкологических, неврологических или инфекционных заболеваний из исследования исключались. Для исследования использовали свежеполученные образцы сывороток крови, хранившиеся не более 2 сут, при $t=+1...+4^{\circ}\text{C}$.

Александр Борисович Полетаев
e-mail: a-b-poletaev@yandex.ru

Иммунохимический анализ проводили с помощью метода ЭЛИ-Висцеро-Тест, используя одноименные тест-наборы (производства компании «Иммункулус», Москва) [2]. При этом в образцах сыворотки крови выявляли и анализировали индивидуальные сывороточные профили (относительное содержание) ауто-АТ класса *IgG*, направленных к 24 антигенам основных органов и систем тела человека, в том числе к Инс-Рц. Отметим, что с помощью метода ЭЛИ-Висцеро-Тест определяют сывороточные профили ауто-АТ, взаимодействующих со следующими специфическими антигенами: нативная ДНК (*DNA*), *Fc*-фрагмент иммуноглобулинов *IgG*, бета2-гликопротеин I (β 2-*GPI*), *CoM* — мембранные антигены клеток миокарда, миокардиальные β 1-адренорецепторы, *TrM* — мембранные антигены тромбоцитов, *ANCA* — анионные белки эндотелия сосудов, *KiS* — цитоплазматические антигены почечной ткани, *KiM* — мембранные антигены почечной ткани, *LuM* — мембранные антигены легочной ткани, *LuS* — цитоплазматические антигены легочной ткани, *GaM* — мембранные антигены клеток слизистой оболочки желудка, *ItM* — мембранные антигены клеток слизистой оболочки тонкой кишки, *HeS* — цитоплазматические антигены ткани печени, *HMMP* — антигены митохондрий клеток печени, тиреоглобулин (*TG*), рецепторы ТТГ (*Rc-TSH*), инсулин (*Ins*), инсулиновые рецепторы (*Ins-Rc*), *AdrM* — мембранные антигены клеток надпочечников, *Spr* — мембранные антигены клеток простаты и сперматозоидов, белки *S100*, *GFAP* — белок промежуточных филаментов астроцитов, *MBP* — основной белок миелина.

Постановки реакций проводили согласно инструкции производителя с помощью стандартных процедур твердофазного иммуноферментного анализа. Уровень оптической плотности иммуноферментной реакции контрольной сыворотки (КС, стандарт) с каждым из антигенов принимали за 100%, а интенсивность реакции сывороток пациентов с теми же антигенами рассчитывали по отношению к реакции КС [5]. Затем рассчитывали средний индивидуальный уровень иммунореактивности исследуемых образцов сыворотки крови с каждым из антигенов в сравнении с реакцией КС по формулам:

$$\text{СИР} = \left(\frac{R(\text{ag1}) \cdot 100}{R(k1)} - 100 + \frac{R(\text{ag2}) \cdot 100}{R(k2)} - 100 + \dots + \frac{R(\text{ag24}) \cdot 100}{R(k24)} - 100 \right) : 24,$$

где СИР — средний индивидуальный уровень иммунореактивности сыворотки индивидуального пациента по отношению ко всем используемым антигенам, выраженный в долях от среднего уровня иммунореактивности КС с теми же антигенами; $R(\text{ag1}, 2, \dots, 24)$ — реактивность (в единицах оптической плотности) сыворотки исследуемого пациента с антигенами -1, -2, ... -24; $R(k1, k2, \dots, 24)$ — реактивность (в единицах оптической плотности) КС с антигенами -1, -2, ... -24.

Также рассчитывали отклонение (в долях от индивидуального среднего нормализованного уровня реакции) сыворотки исследуемого пациента с каждым из используемых антигенов, используя формулы:

$$R(\text{nrM}) \text{ag1} = \left(\frac{OD(\text{ag1}) \cdot 100}{OD(k1)} \right) - 100 - \text{СИР};$$

$$R(\text{nrM}) \text{ag2} = \left(\frac{OD(\text{ag2}) \cdot 100}{OD(k2)} \right) - 100 - \text{СИР};$$

.....

$$R(\text{nrM}) \text{ag24} = \left(\frac{OD(\text{ag24}) \cdot 100}{OD(k24)} \right) - 100 - \text{СИР};$$

где $R(\text{nrM}) \text{ag1}, \text{ag2}, \dots, \text{ag24}$ — отклонение (в долях от индивидуального среднего нормализованного уровня реакции) сыворотки исследуемого пациента с каждым из используемых антигенов -1, -2, ... -24; $OD(\text{ag1}, \text{ag2}, \dots, \text{ag24})$ — оптическая плотность реакции сыворотки индивидуального пациента с каждым из используемых антигенов -1, -2, ... -24; $OD(k1, k2, \dots, k24)$ — оптическая плотность реакции КС с каждым из используемых антигенов -1, -2, ... -24.

Для расчетов использовали специализированную компьютерную программу, поставляемую вместе с наборами. Согласно инструкции к наборам, значение *среднего индивидуального уровня иммунореактивности (в сравнении с контрольной группой)* у здоровых взрослых лиц находится в диапазоне -20... +5% от среднего уровня реакции КС с любым из используемых антигенов. Если средний индивидуальный уровень иммунореактивности исследуемой сыворотки превышал +5% от уровня реакции КС с используемыми антигенами, это рассматривали как указание на поликлональную активацию иммунной системы обследуемого. Если средний индивидуальный уровень иммунореактивности исследуемой сыворотки был ниже -20% от уровня реакции КС, это рассматривали как указание на поликлональную иммуносупрессию. Ранее было показано, что патологические

изменения, происходящие в отдельных органах, отражаются в росте уровня сывороточной концентрации отдельных видов аутоантител и росте уровня сывороточной иммунореактивности в реакции с соответствующими антигенами [2]. Избирательный подъем уровня относительной иммунореактивности с теми или иными антигенами выше +20 % от индивидуального среднего уровня рассматривали как возможный индикатор имеющихся или формирующихся нарушений в соответствующих органах и системах конкретного пациента.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием методов непараметрической статистики (критерий *U* Вилкоксона–Манна–Уитни).

Результаты и обсуждение

При анализе результатов исследования обращают на себя внимание, в первую очередь, следующие данные:

1) аномально повышенный уровень ауто-АТ к Инс-Рц (наличие соответствующих пиков на профилях иммунореактивности выше +20 % от индивидуального среднего уровня) отмечали у 15 из 16 лиц (94 %), имеющих признаки метаболического синдрома;

2) аномально повышенный уровень ауто-АТ к Инс-Рц отмечали у всех 7 лиц (100 %) с диагностированным СД-2 при стаже заболевания до 2 лет;

3) аномально повышенный уровень ауто-АТ к Инс-Рц отмечали у 4 из 8 лиц (50 %) с диагностированным СД-2 при стаже заболевания более 3 лет;

4) повышенный уровень ауто-АТ к инсулину был выявлен у 4 из 16 лиц (25 %) с метаболическим синдромом, у 2 из 7 лиц (28 %) с диагностированным СД-2 при стаже заболевания до 2 лет и у 3 из 8 лиц (38 %) при стаже заболевания свыше 3 лет (табл. 1)

Таблица 1

Частота встречаемости случаев аномально повышенного содержания сывороточных ауто-АТ к инсулиновым рецепторам и инсулину у обследованных лиц (появление соответствующих пиков на профилях иммунореактивности)

Характеристика болезни	Повышение ауто-АТ, %	
	к Инс-РЦ	к инсулину
Метаболический синдром	94	25
СД-2 до 2 лет	100	28
СД-2 свыше 3 лет	50	38

Среди обследованных лиц с метаболическим синдромом и больных СД-2 случаев аномально повышенной общей активности иммунной системы (превышения среднего популяционного уровня иммунореактивности на 5 % или более) не отмечали. У 5 из 31 (16 %) обследованного был выявлен нормальный уровень активности иммунной системы (нормореактивность). И наконец, у 26 обследованных лиц (84 %) имелись признаки иммуносупрессии.

Таким образом, ни в одном случае признаков системного аутоиммунного процесса выявлено не было. Напротив, в подавляющем большинстве случаев (84 %) типичной ситуацией было снижение активности иммунной системы обследуемых разной степени выраженности. На фоне общей иммуносупрессии, то есть в условиях снижения сывороточного содержания разных ауто-АТ (в сравнении с КС), в большинстве таких случаев было невозможно выявить относительное повышение содержания ауто-АТ к инсулиновым рецепторам и инсулину. В то же время, анализ профилей иммунореактивности разных ауто-АТ позволял легко обнаружить соответствующие характерные изменения (табл. 2). Напротив, оценка содержания отдельных ауто-АТ на фоне общей иммуноактивации, например при индуцированной вирусной инфекции, может вести к ложным заключениям, чего не случается при анализе профилей иммунореактивности [4]. В результате, информационная ценность и надежность регистрации и анализа изменений профилей множества ауто-АТ оказываются существенно выше, нежели анализ сывороточного содержания отдельных ауто-АТ.

Известно, что в силу комбинированной негативной и позитивной селекции все исходные клоны лимфоцитов являются умеренно аутореактивными. Это является основой постоянной продукции некоторого количества ауто-АТ разной специфичности, участвующих в клиренсе организма [2].

СД-2 не является аутоиммунным заболеванием (по крайней мере, в большинстве случаев). Как же можно объяснить относительное повышение продукции ауто-АТ к Инс-Рц и инсулину при этом заболевании и предшествующем ему метаболическом синдроме?

На ранних (доклинических) этапах развития любой хронической болезни, как правило, отмечают два типа событий молекулярно-клеточного уровня, а именно:

1) стойкие биохимические девиации молекулярного (антигенного) состава в определенных

популяциях клеток, прямо связанные с изменениями экспрессии, постсинтетических модификаций и/или деградации определенных молекул;

2) интенсификация отмирания определенных типов специализированных клеток посредством апоптоза, некроза или их вариантов.

Оба события являются триггером для вторичного повышения продукции ауто-АТ к соответствующим антигенам [1, 2]. Такого рода вторичный подъем продукции и секреции ауто-АТ, направленных к антигенам повреждаемых клеток, является не побочным эффектом, но отражает активность одной из наиболее важных функций иммунной системы, а именно ее активность в обеспечении процессов аутоклиренса, и не имеет отношения к аутодеструктивным процессам [2].

Клиренсовые функции естественных ауто-АТ (реализуемые совместно с макрофагами) впервые были предположены Р. Grabar более полувека назад [5]. Эта идея получила дальнейшее развитие в концепции иммунохимического гомеостаза И. Е. Ковалева [6]. В соответствии с основным положением концепции Ковалева, уровни продукции естественных ауто-АТ регулируются по принципу обратных связей количеством/доступностью молекул соответствующих антигенов [6]. В силу того, что уровни экспрессии, секреции и/или поступления во внеклеточное пространство любых цитоплазматических, мембранных, ядерных и других антигенов специализированных клеток у всех здоровых лиц приблизительно равны, весьма мало будут различаться и сывороточные уровни ауто-АТ соответствующей антигенной направленности. Однако при развитии любой патологии картина заметно меняется. Дело в том, что множество разных заболеваний (обычно хронических) прямо связано с активацией гибели специализированных клеток по механизмам апоптоза или некроза либо же с аномалиями в экспрессии и/или секреции определенных антигенов, что неизбежно должно сопровождаться количественными сдвигами в содержании ауто-АТ соответствующей специфичности [6].

Иллюстративным примером является повышение продукции ауто-АТ к хорионическому гонадотропину человека (ХГЧ) после процедуры экстракорпорального оплодотворения, в ходе подготовки к которой женщины получают фармакологические дозы ХГЧ для стимуляции овуляции (препараты «Прегнил», «Хорагон» или сходные). В результате, до 60% таких женщин

Таблица 2

Реакции сыворотки пациента Р. М. (СД-2 около 1 года) с 24 антигенами тест-набора ЭЛИ-Висцero-Тест

Антиген	% от реакции контрольной сыворотки	% от индивидуальной средней реакции («профиль иммунореактивности»)
DNA	-26	2
$\beta 2$ -GPI	-21	9
Fc	-21	9
CoM	-33	-8
$\beta 1$ -AR	-27	1
TrM	-30	-4
ANCA	-25	3
KiM	-22	8
KiS	-35	-10
LuM	-32	-6
LuS	-26	2
GaM	-42	-20
ItM	-35	-10
HeS	-34	-9
HMMP	-27	1
Ins	-15	17
Ins-Rc	-4	32
TG	-23	6
Rc-TSN	-29	-2
AdrM	-32	-6
Spr	-22	8
S100	-39	-16
GFAP	-30	-4
MBP	-29	-2

Примечание. Цифры обозначают отклонения в долях от уровня реакции контрольной сыворотки (КС) с теми же антигенами; уровни реакции КС с каждым из соответствующих антигенов принимали за 100%

Комментарий. Обращает на себя внимание, что у обследуемого имелась выраженная иммуносупрессия и уровни реакций его сыворотки с любыми из антигенов были ниже реакций КС с теми же антигенами. Его средняя индивидуальная иммунореактивность (СИР), рассчитанная по уровням реакции сыворотки с каждым из 24 антигенов, была существенно ниже, чем СИР КС (на -27,5% от СИР КС). При этом уровни реакции сыворотки пациента с инсулином и инсулиновыми рецепторами (выделено полужирным) также были ниже реакции КС с теми же антигенами, но существенно превышали СИР пациента, что наглядно отражалось характерными «пиками» на профилях индивидуальной иммунореактивности

обнаруживает повышенную продукцию ауто-АТ к ХГЧ спустя полгода и более [2].

Для донозологических стадий развития и начального клинического периода СД-2 типична повышенная экспрессия скелетными мышцами Инс-Рц, отражающая своего рода компенсаторную реакцию на нарастающую функциональную недостаточность рецепторов [4]. Метафорически выражаясь, организм «пытается» компенсировать ухудшающееся качество рецепторов их количеством. В свою очередь, это ведет к вторичному повышению продукции и сывороточного уровня ауто-АТ к Инс-Рц [4]. Характерно, что повышенная продукция таких ауто-АТ не имеет прямого отношения к патогенезу болезни (по крайней мере, в большинстве случаев), но, в полном соответствии с правилом Ковалева [6], отражает аномальное повышение экспрессии рецепторов. Характерно, что повышенная продукция ауто-АТ к Инс-Рц, встречающаяся почти в 100 % случаев метаболического синдрома и недавно (до 2 лет) диагностированного СД-2, у лиц, страдающих СД-2 более трех лет, отмечается лишь в половине случаев (см.

табл. 1). Вероятно, это связано с постепенным прекращением избыточной экспрессии Инс-Рц у лиц, длительно болеющих СД-2.

Повышение относительного содержания ауто-АТ к инсулину, отмеченное у 25 % пациентов с метаболическим синдромом, у 28 % больных СД-2 с недавно поставленным диагнозом и у 38 % больных СД-2 со стажем (см. табл. 1, 2), по-видимому, отражает сходные закономерности, а именно — компенсаторную, прогрессивно нарастающую секрецию инсулина по мере формирования и клинического развития СД-2.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют об оправданности использования феномена «иммунного отражения» изменений в молекулярно-клеточном состоянии органов для практических нужд, а именно — для создания новых лабораторных инструментов раннего выявления изменений, ведущих к СД-2, мониторинга за динамикой развития патологического процесса, а также для разработки индивидуализованных методов превенции развития этой болезни.

Литература

1. Lacroix-Desmazes S., Kaveri S. V., Mouthon L. et al. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals // *J. Immunol. Methods*. 1998. Vol. 216. P. 117–137.
2. Поletaев А. Б. Физиологическая иммунология: естественные аутоантитела и проблемы наномедицины. М.: Миклош, 2010.
3. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self // *Science*. 2002. Vol. 296. P. 301–305.
4. Poletaev A., Boura P. The immune system, natural autoantibodies and general homeostasis in health and disease // *Hippokratia*. 2011. Vol. 15. P. 295–298.
5. Grabar P. About Autoantibodies // In: *Problems of Reactivity in Pathology* / A. D. Ado, (Ed.) M.: Meditsina, 1968. P. 35–52.
6. Ковалев И. Е., Полевая О. Ю. Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям. М.: Наука, 1985.

А. В. Поletaев

Medical Research Centre «Immunculus»; P. K. Anokhin Institute of Normal Physiology, RAMS, Moscow

Autoantibodies to the insulin receptors as a biomarker of the precursor of diabetes mellitus type 2

Relative elevated serum content of autoantibodies against insulin receptors is typical for persons with metabolic syndrome and patients with recently diagnosed diabetes mellitus type 2. Frequency of abnormal elevation of such antibodies has decreased significantly if duration of the disease is more than 3 years. In opposite frequency of elevated serum content of autoantibodies against insulin rise progressively if diabetes type II was diagnosed more than 3 years before. Possible using of autoantibodies-markers for early revealing of pre-diabetes changes and for laboratory monitoring of the disease development has discussed. It was noted: an autoantibody profile does seem to offer more diagnostic and prognostic power than the determination of single autoantibody specificity.

Key words: type 2 diabetes, autoantibodies to insulin receptor, autoantibodies to insulin