

УДК 616.379-008.64  
© Коллектив авторов

## УРОВЕНЬ ПРОИНСУЛИНА В КРОВИ ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ

*Н.Ю. Лотов<sup>1\*</sup>, А.А. Селищева<sup>1,5</sup>, С.А. Надоров<sup>1</sup>, Б.А. Бадыйтов<sup>3</sup>,  
И.Э. Волков<sup>4</sup>, С.В. Савельев<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Автономная некоммерческая организация “Институт биомедицинских проблем”, Москва, Новоданиловская наб., 4а; тел./факс: 8(495) 490-03-42;  
эл. почта: almostvelvet@rambler.ru

<sup>2</sup>НИИ морфологии человека РАМН, Москва

<sup>3</sup>Центральная клиническая больница гражданской авиации, Москва

<sup>4</sup>ФГУ Российская детская клиническая больница Минздравсоцразвития, Москва

<sup>5</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

Измеряли содержание проинсулина в сыворотке крови детей (82 чел.) в возрасте от 3 до 14 лет, больных сахарным диабетом 1-го типа различной продолжительности. Выявлены 3 группы больных с низким (54%), нормальным (42%) и высоким (4%) уровнями этого прогормона. Не обнаружено зависимости содержания проинсулина от продолжительности заболевания. Высказано предположение о возможности использования содержания проинсулина в крови в качестве параметра, уточняющего патогенез сахарного диабета 1 типа.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 1-го типа, проинсулин.

**ВВЕДЕНИЕ.** Согласно общепринятым представлениям, снижение уровня инсулина, являющееся характерным признаком сахарного диабета I типа (СД1), обусловлено аутоиммунной гибелью  $\beta$ -клеток островков Лангерганса. Однако недавно в литературе появились работы, результаты которых не вполне согласуются с указанными представлениями. Так, Vauhkonen с соавт. показали, что у больных данным заболеванием уровень проинсулина в крови был не только не снижен, как можно было бы ожидать, учитывая, что этот гормон является предшественником синтеза инсулина, но и, напротив, оказался выше принятой нормы [1]. Сходные результаты получены и другими авторами при изучении составивших группу риска родственников больных СД1 [2, 3]. Это позволило ряду исследователей высказать мнение об этиологической и патогенетической гетерогенности заболевания [1, 4].

Учитывая, что СД1 болезнь преимущественно молодого возраста, целью настоящего исследования явилось изучение содержания проинсулина в крови детей, страдающих СД1 различной продолжительности, и выявление корреляции этого показателя с содержанием С-пептида.

**МЕТОДИКА.** Обследуемый контингент составили дети в возрасте от 3 до 14 лет с впервые выявленным ( $n=10$ ), а также продолжительностью менее ( $n=15$ ) и свыше 1 года ( $n=57$ ) инсулин-зависимым сахарным диабетом. Диагноз “СД1” был поставлен клинически и подтверждён данными

\* - адресат для переписки

## ПРОИНСУЛИН В КРОВИ ДЕТЕЙ ПРИ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА

лабораторных исследований (клинический и биохимический анализы крови, гликемический профиль, процент гликированного гемоглобина).

Группу здоровых людей (19 мужчин, 39 женщин в возрасте от 20 до 40 лет) составили лица, проходящие ежегодное диспансерное обследование, и по данным лабораторного обследования (клинический и расширенный биохимический анализ крови, клинический анализ мочи) признанные “практически здоровыми”. Для биохимических исследований кровь из локтевой вены собирали натощак в пробирки с ускорителем свёртывания (“Sarstedt”, Германия) и центрифугировали 15 мин при 1000 г. Сыворотку хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Клинические анализы крови и мочи здоровых добровольцев выполняли с использованием, соответственно, гематологического анализатора “Cell Dyn 3700” и реактивов фирмы “Abbott” (США), анализатора мочи “Aution Jet 4270” и полосок “Aution sticks” фирмы “Arkray” (Япония). Содержание глюкозы, триглицеридов, холестерина, ALT, AST, билирубина, гликированного гемоглобина, инсулина, С-пептида, а также антител к инсулину, GAD и  $\beta$ -клеткам островков Лангерганса исследовали с помощью биохимического анализатора “KoneLab-30” (Швеция), ИФА-анализатора “Multiscan EX” фирмы “Labsystem” (Финляндия) и наборов реактивов “BioSystems” (Испания), “Monobind” (США) и “Biomerica” (США).

Содержание проинсулина и С-пептида в сыворотке крови детей определяли методом ИФА с использованием стандартных наборов реактивов фирм “Biovendor” (Чехия) и “Monobind Inc.” (США), соответственно при помощи ИФА-анализатора “Anthos 2010” (Австрия). От добровольцев и родителей детей было получено информированное согласие на участие в исследованиях.

Проводили гистологическое и иммуногистохимическое исследование аутопсийного материала поджелудочной железы 2-х погибших от сепсиса мальчиков, один из которых (3 года и 9 мес) страдал СД1, а другой (4 года и 9 мес.) не имел нарушений углеводного обмена. Депарафинированные гидратированные срезы обрабатывали, как описано ранее [5]. В работе использовали мышиные моноклональные антитела к инсулину фирмы “Sigma” (США) и визуализирующую систему “Ultra vision one detection system” фирмы “Labvision” (США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ STATISTICA 8.0 (“StatSoft”, США). Различия между группами считали статистически достоверными при уровне значимости  $p=0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Учитывая рекомендации фирм-производителей на необходимость установления внутрилабораторных нормальных границ измеряемого показателя, на первом этапе исследования определяли содержание проинсулина в сыворотке крови людей без лабораторных признаков нарушения углеводно-липидного обмена. Средние значения уровня проинсулина для мужчин и женщин составили  $0,0045 \pm 0,0019$  и  $0,0041 \pm 0,0015$  нмоль/л соответственно и оказались внутри нормального интервала, предлагаемого фирмой-изготовителем ( $0,0020-0,0060$ ) нмоль/л. Поскольку статистически значимых половых различий не обнаружено, для определения внутрилабораторных нормальных границ использовали объединенную выборку ( $n=58$ ), для которой среднее значение содержания проинсулина в сыворотке крови составило  $0,0042 \pm 0,0016$  нмоль/л. Таким образом, используемый в дальнейшем внутрилабораторный интервал нормальных значений содержания проинсулина (вычисляемый по формуле  $X \pm 2\sigma$ , где  $X$  – среднее значение показателя,  $\sigma$  – среднее квадратическое отклонение) оказался равным ( $0,0010-0,0074$ ) нмоль/л, что согласуется

с литературными данными о содержании проинсулина в крови взрослых и детей [6] и свидетельствует о корректности постановки методики.

При измерении содержания проинсулина в крови больных детей не обнаружено, как и у взрослых, различий по полу (U-критерий Манна-Уитни). Кроме того, показано, что средняя величина данного показателя по целой выборке ( $0,0018 \pm 0,0025$  нмоль/л) не выходит за пределы принятых внутрилабораторных границ. Аналогичный результат был получен и при распределении контингента по трём группам, различающимся между собой по продолжительности заболевания: впервые выявленные ( $0,0016 \pm 0,0019$  нмоль/л), болеющие СД1 менее года ( $0,0020 \pm 0,0021$  нмоль/л) и болеющие от одного года до 12 лет ( $0,0020 \pm 0,0036$  нмоль/л). Также не обнаружено зависимости уровня проинсулина от “стажа” СД1 (тест Краскела-Уоллиса (ANOVA)).

В тоже время вычисленные значения дисперсий средних величин содержания проинсулина в крови позволяют предположить неоднородность по данному показателю как целой выборки, так и различающихся по продолжительности заболевания групп.

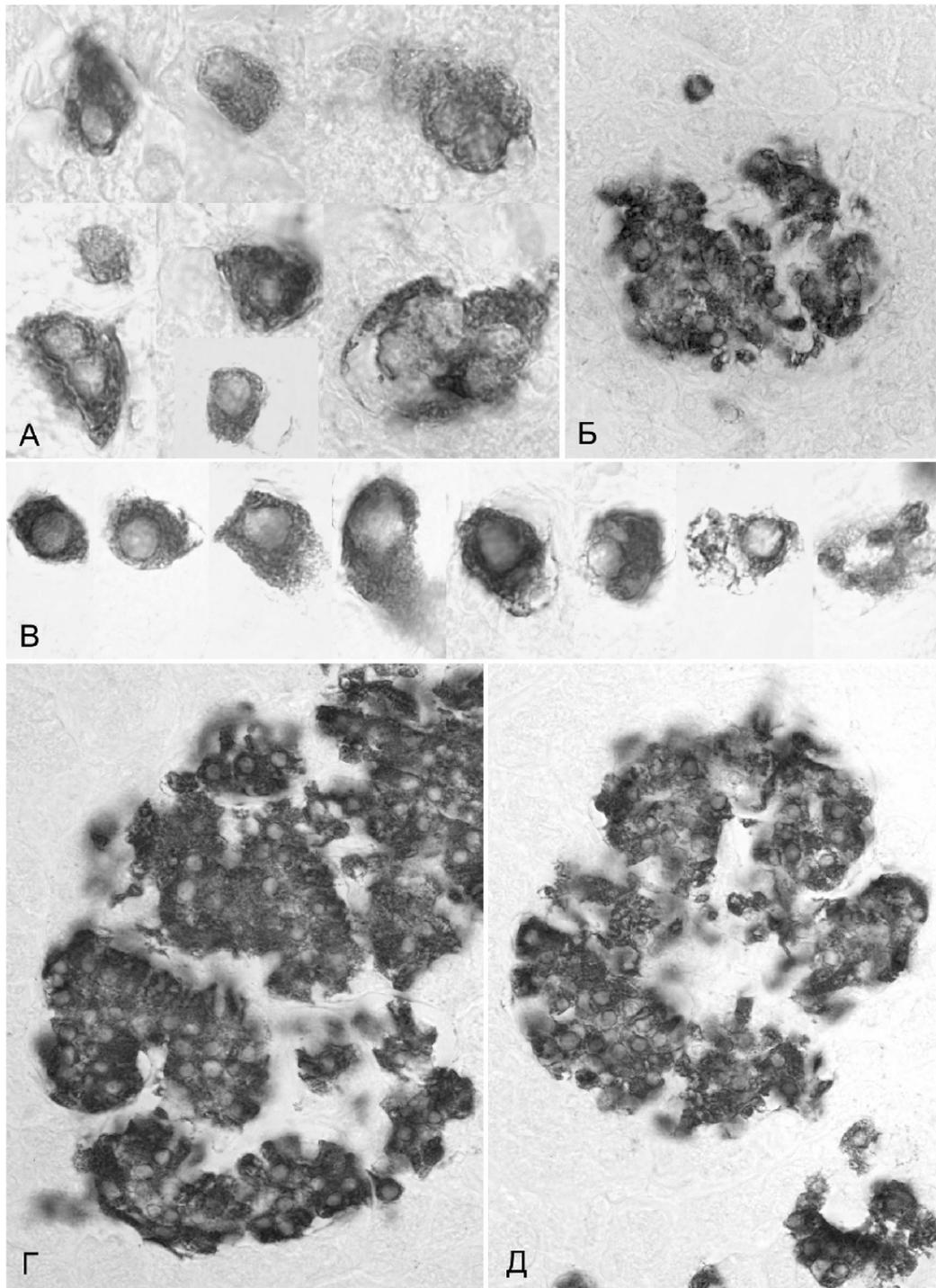
Действительно, кластерный анализ, проведенный по основанию “содержание в крови проинсулина”, позволил выделить из обследованного контингента 3 группы, указанные в таблице.

Таблица. Результаты кластерного анализа контингента детей с СД1 по основанию “содержание в крови проинсулина”.

Содержание проинсулина (нмоль/л) в группах	Целая выборка (n=82)	Продолжительность СД1		
		Впервые выявленные n=10	< 1года n=15	>1 года n=57
Группа 1: <0,0010	$0,00038 \pm 0,00025$ n=44	$0,00043 \pm 0,00030$ n=6	$0,00023 \pm 0,00016$ n=5	$0,00038 \pm 0,00028$ n=33
Группа 2: 0,0010-0,0078	$0,0032 \pm 0,0019$ n=34	$0,0034 \pm 0,0020$ n=4	$0,0032 \pm 0,0020$ n=8	$0,0027 \pm 0,0017$ n=22
Группа 3: >0,0078	$0,0131 \pm 0,0050$ n=4	-	$0,0112 \pm 0,0038$ n=2	$0,015 \pm 0,0062$ n=2

Как видно из представленных данных, более чем у половины лиц (54%), составивших обследуемый контингент, содержание проинсулина в крови было в 2-4 раза ниже значения, принятого за нижнюю границу нормального интервала. Это полностью согласуется с общепринятыми представлениями о ключевой роли повреждения и гибели  $\beta$ -клеток островков Лангерганса в патогенезе СД1 и может быть проиллюстрировано результатами собственных гистологических и иммуногистохимических исследований.

Сравнительное изучение аутопсийного материала поджелудочных желёз ребёнка без нарушений углеводного обмена (4,9 лет) и ребёнка, страдавшего СД1 (3,9 лет) показало, что во втором случае сохранились лишь отдельные, редко встречающиеся, хотя и содержащие инсулин небольшие островки Лангерганса и эндокринные клетки, отличающиеся существенным полиморфизмом и наличием двух ядер (рис. 1 А,Б), что в целом затрудняло выявление характерных этапов их дифференцировки и инволюции. На рисунке 1 В,Г,Д в качестве контроля представлены снимки аутопсии поджелудочной железы ребёнка без нарушений углеводного обмена.



**Рисунок 1.**

Выявление инсулин-содержащих клеток методами иммуногистохимии в аутопсийном материале поджелудочных желез ребёнка с СД1 (возраст 3,9 лет) и ребёнка без нарушений углеводного обмена (возраст 4,9 лет)

**А,Б** - отдельные инсулинсекретирующие  $\beta$ -клетки, группы клеток и островок Лангерганса у ребёнка с СД1. **В** - последовательный ряд от первичной дифференцировки до разрушения  $\beta$ -клетки в аутопсии поджелудочной железы ребёнка без нарушений углеводного обмена.

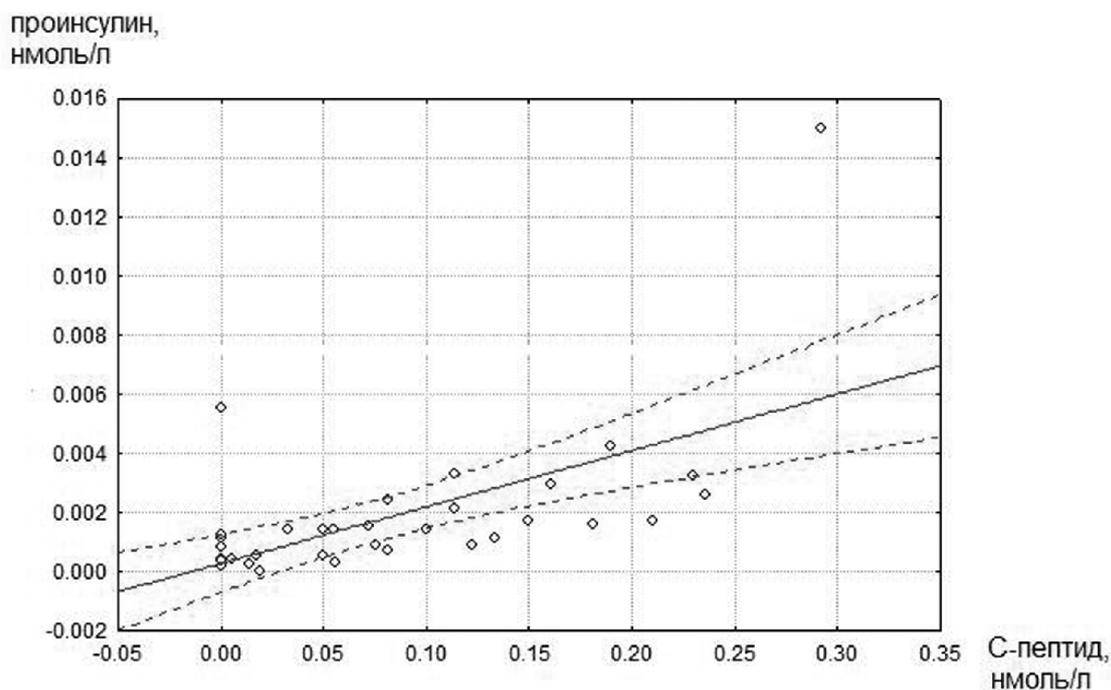
**Г,Д** - крупные островки Лангерганса, секретирующие инсулин, у ребёнка без нарушений углеводного обмена.

**А,Б** - увеличение об.  $\times 100$ , ок.  $\times 10$ ; **В,Г,Д** - увеличение об.  $\times 40$ , ок.  $\times 10$ .

В тоже время у значительного, сравнимого с количеством больных группы 1, числа пациентов группы 2 (41%), уровень проинсулина находился внутри нормального интервала значений. При небольшом сроке заболевания это можно объяснить тем, что на ранних стадиях клинически выявленного СД1 сохраняется некоторая часть нативных  $\beta$ -клеток. Но согласно данным таблицы, нормальный уровень проинсулина был у значительного числа больных с длительными сроками заболевания. На основании этого можно сделать заключение о различной степени гибели  $\beta$ -клеток в ПЖ больных СД1 не только на начальном этапе клинически выявленного СД1, но и при длительных сроках заболевания. В общем, это согласуется с данными King и соавторов, которые установили определяемый уровень С-пептида у некоторых больных с очень большими сроками заболевания (более 50 лет) [7].

Наконец, выявлены даже такие больные, у которых содержание прогормона в сыворотке крови почти в два раза превышало верхнюю границу нормального интервала значений. Зависимости содержания в крови уровня проинсулина от длительности заболевания и при таком подходе обнаружено не было.

Для подтверждения полученных результатов в отдельно сформированной группе из 36 пациентов (возраст  $10,4 \pm 4,1$  лет; продолжительность заболевания  $2,9 \pm 3,3$  лет) определили уровень проинсулина и С-пептида и выявили высокий коэффициент корреляции  $r$  между этими показателями, равный  $0,61$  ( $p < 0,05$ ). И в этой группе было два пациента (5%), которые имели повышенный уровень проинсулина, не коррелирующий с содержанием С-пептида (рис. 2).



**Рисунок 2.**

Корреляция между содержанием С-пептида и проинсулина в сыворотке крови 36 пациентов с различными сроками заболевания СД1.

Полученные результаты позволяют предположить, что снижение уровня инсулина при СД1 может происходить не только в результате аутоиммунной (и/или другой природы) гибели  $\beta$ -клеток. Такая же ситуация,

## ПРОИНСУЛИН В КРОВИ ДЕТЕЙ ПРИ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА

даже на фоне сохраненного количества секретирующих инсулин клеток [8], может возникнуть за счёт нарушений этапа превращения проинсулина в инсулин. Реализация этой возможности может иметь место при мутации в гене инсулина, обуславливающей замену Арг65 на гистидин, вследствие чего расщепления прогормона на С-пептид и инсулин не происходит. Возможно, именно этим обусловлена гиперпроинсулинемия, выявляемая даже у здоровых членов одной семьи [9]. Другой причиной низкого уровня инсулина может быть снижение активности гидролизующей проинсулин трипсин-подобной пептидазы (протеинконвертазы) [10].

Полученные данные о различном содержании проинсулина у пациентов с СД1 могут свидетельствовать о существенных различиях в этиологии и патогенезе данного заболевания и согласуются с литературными данными, указывающими на его неаутоиммунную природу у 7-9% больных [1, 4]. В связи с этим следует заметить, что измерение содержания именно проинсулина, а не С-пептида и/или инсулина, уровень которых будет одинаково низок и в результате гибели  $\beta$ -клеток, и в результате нарушений в процессе синтеза гормона, может оказаться полезным для выявления интимных механизмов данной патологии.

Работа выполнена при участии специализированного фонда управления целевым капиталом для поддержки научно-исследовательских работ в области биологии и медицины “Фундаментальный”.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Vauhkonen I., Niskanen L., Knip M., Mykkänen L.M., Haffner S., Uusitupa M., Laakso M.* (2005) *Eur. J. Endocrinol.*, **153**, 265–273.
2. *Bain S.C., Gill G.V., Dyer P.H.* (2003) *Diabet Med.*, **20**, 808–811.
3. *Hartling S.G., Knip M., Roder M.E.* (1997) *Europ. J. Endocrin.*, **137**, 490–494.
4. *Dib S.A. Arq. Bras.* (2008) *Endocrinol. Metabol.*, **52**(2), 205-218.
5. *Савельев С.В., Барабанов В.М., Кривова Ю.С., Прощина А.Е.* (2008) *Архив патологии*, **6**, 9-11.
6. *Spinas G.A., Snorgaard O., Hartling S.G., Oberholzer M., Berger W.* (1992) *Diabetes Care*, **15**, 632–637.
7. *King G., Bain S.C., Gill G.V., Dyer P.H.* (2003) *Diabet Med.*, **20**, 808–811.
8. *Dotta F., Censini S., van Halteren A.G., Marselli L., Masini M., Dionisi S., Mosca F.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**(12), 5115-5120.
9. *Collinet M., Berthelon M., Bénit P., Laborde K., Desbuquois B., Munnich A., Robert J.J.* (1998) *Eur. J. Pediatr.*, **157**(6), 456-460.
10. *Furukawa H., Carroll R.J., Swift H.H., Steiner D.F.* (1999) *Diabetes*, **48**(7), 1395-1401.

Поступила: 01. 04. 2011.

**THE PROINSULIN LEVEL IN THE BLOOD OF CHILDREN WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS OF VARIOUS DURATION**

*N.Y. Lotosh<sup>1</sup>, A.A. Selishcheva<sup>1,5</sup>, S.A. Nadorov<sup>1</sup>, B.A. Badyshtov<sup>3</sup>, I.E. Volkov<sup>4</sup>, S.V. Saveljev<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>ANO "Institute of Biomedical Problems", Novodanilovskaya Nab., 4a, Moscow, Russia;  
tel./fax: 8(495) 490-03-42; e-mail: almostvelvet@rambler.ru

<sup>2</sup>Research Institute of Human Morphology of the Russian Academy of Medical Sciences,  
Moscow, Russia

<sup>3</sup>Central Clinic Hospital of Civil Aviation, Moscow, Russia

<sup>4</sup>Russian Children's Clinical Hospital, Moscow, Russia

<sup>5</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Proinsulin content was measured in the serum of 82 children (aged from 3 to 14 years) with type 1 diabetes mellitus of various duration. Three groups of patients characterized by low (54%), normal (42%) and high (4%) levels of this prohormone were recognized. No dependence the proinsulin level on the disease term was found. The serum proinsulin level may be used as a parameter specifying the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus.

**Key words:** diabetes mellitus type 1, proinsulin.