УДК 577.1:612(075.8)-089.86

С.В. Савельев<sup>1</sup>, С.Б. Шустов<sup>2</sup>, Б.В. Ромашевский<sup>2</sup>, А.Е. Прощина<sup>1</sup>, В.В. Чекавская<sup>1</sup>, С.А. Апполонова<sup>3</sup>,

Е.С. Савельева<sup>1</sup>, Е.В. Балясникова<sup>2</sup>

## Клинико-морфологическая оценка синтеза инсулина β-клетками поджелудочной железы при длительном развитии сахарного диабета 1-го типа

Резюме. У 300 пациентов, страдающих диабетом 1-го типа не менее 20 лет в периферической крови исследовано содержание глюкагона, С-пептида и антител к инсулину. Синтез собственного инсулина, который определяли по концентрации С-пептида обнаружен у 90 (30%) пациентов. Среди них только у 7% пациентов был обнаружен высокий титр антител к инсулину. У 147 (49%) больных высокий уровень антител к инсулину сохранялся, но с отсутствием С-пептида в периферической крови, что говорит о хронической вторичной иммунизации экзогенным инсулином. У 63 (21%) пациентов низкий уровень С-пептида совпадал с отсутствием антител к инсулину. Показано, что при длительном развитии сахарного диабета 1-го типа у пациентов сохраняется или восстанавливается дифференцировка β-клеток, которые способны синтезировать собственный инсулин, что подтверждается результатами анализа аутопсий. По-видимому, имеет место существование двух популяций β-клеток. Популяция ВВ-клеток включает в себя 90% от всех инсулинпродуцирующих клеток и не обладает способностью к синтезу второго гормона. Популяция АВ-клеток включает менее 10% инсулин-продуцирующих клеток и может одновременно синтезировать глюкагон, но при этом не вызывает аутоиммунной агрессии. При длительном развитии сахарного диабета первого типа в поджелудочной железе начинают превалировать АВ-клетки, что приводит к отсроченному восстановлению синтеза эндогенного инсулина у части больных сахарным диабетом 1-го типа.

**Ключевые слова**: сахарный диабет 1-го типа, островки поджелудочной железы, инсулин, глюкагон, C-пептид, ко-локализация, AB-клетки, BB-клетки, β-клетки, эндокринология.

Введение. При развитии сахарного диабета 1-го типа (СД1) ключевым вопросом является природа аутоиммунного разрушения β-клеток и отсутствие регенерационных процессов в поджелудочной железе. Общепринятой является точка зрения необратимости разрушения β-клеток и дальнейшей аутоиммунной агрессии по отношению к вновь дифференцирующимся инсулин-секретирующим клеткам островков Лангерганса [2]. После клинической манифестации СД1 даже частичное восстановление секреции инсулина считается невозможным, поскольку большая часть β-клеток к этому моменту уже погибла. Традиционным критерием завершения аутоиммунного разрушения β-клеток эндокринных островков считается отсутствие С-пептида. Предполагается, что наличие С-пептида в крови замедляет развитие осложнений, а его экзогенное введение в ряде случаев может облегчить страдание пациентов [4].

С другой стороны, существуют предварительные сведения о возможности регенерации эндокринных клеток при СД и неоднородности популяции β-клеток внутри островков Лангерганса [5]. Таким образом, для понимания патогенеза

заболевания необходимо на достаточно большом материале оценить масштабы индивидуальной изменчивости инволюции β-клеток. По этой причине обследование пациентов с длительным анамнезом СД1 представляет собой важную научную и клиническую задачу.

**Цель исследования.** Выявить синтез С-пептида, как маркёра наличия функционирующих β-клеток и синтеза собственного инсулина у пациентов с длительным течением СД1.

Материалы и методы. У 300 пациентов СД1, в возрасте от 18 до 55 лет, 132 мужчин и 168 женщин, с длительностью диабета от 20 лет до 40 лет в периферической крови исследована концентрация глюкагона, С-пептида, антител к инсулину. Клиническое обследование проводилась в 1 клинике (терапии усовершенствования врачей) им. Н.С. Молчанова Военно-медицинской академии в 2012–2013 гг. У большинства обследуемых больных имелись осложнения сахарного диабета.

Количественная оценка концентрации глюкагона в плазме крови проведена способом конкурентного

<sup>1</sup> Научно-исследователький институт морфологии человека РАН, РФ, Москва

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>Анти-допинговый центр, РФ, Москва

иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы «BioVendor» (Гонг-Гонг, Китай). Концентрация С-пептида, антител к инсулину выполнена путем иммунорадиометрического анализа с использованием наборов фирмы «Immunotech» (Франция).

Морфологическая часть исследования проводилась на аутопсийном материале поджелудочных желез (ПЖ) человека, собранном в 2007-2011 гг. в больницах г. Москвы. Было исследовано 18 аутопсий ПЖ, полученных от мужчин (24-88 лет) и 12 - от женщин (31-96 лет), не страдавших нарушениями углеводного обмена и заболеваниями ПЖ. Кроме этого было исследовано 5 аутопсий поджелудочной железы людей, страдавших длительное время СД1 (мужчины 27-66 лет). Образцы аутопсий брали из хвостового отдела ПЖ. Материал фиксировали в забуференном формалине или жидкости Буэна, заливали в парафин и делали серийные срезы толщиной 3, 5 и 10 мкм. Для изучения распределения в островках α- и β- клеток было проведено двойное иммуногистохимическое окрашивание в реакции инсулин (мышиные моноклональные антитела) + глюкагон (кроличьи поликлональные антитела). Для выявления указанных антигенов использована система детекции MultiVision Polymer Detection System: MultiVision anti-rabbit/HRP + anti-mouse/AP polymers (Thermo Scientific).

Результаты и их обсуждение. Установлено, что у пациентов, страдающих СД1 не менее 20 лет, имел место синтез собственного инсулина. При этом, в 23% случаев синтез инсулина β-клетками был близок или соответствовал принятой клинической норме.

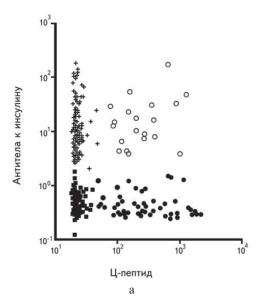
При таком уровне синтеза эндогенного инсулина логически оправдано сопоставление уровня синтеза С-пептида и количества антител к инсулину (рис. 1а). Сравнение индивидуальных количественных характеристик этих параметров в логарифмических координатах позволило выявить четыре группы пациентов. Наиболее ожидаемый результат был получен для 23% пациентов. В этой группе низкий уровень С-пептида соответствовал практическому отсутствию антител к инсулину (см. рис. 1а, черные квадраты). Такая корреляция между уровнем С-пептида и антител к инсулину ожидаема. Для большинства исследователей и клиницистов очевидна ситуация, при которой снижение уровня синтеза собственного инсулина должно приводить к снижению уровня антител. Эти выводы отчасти нарушает вторая группа пациентов, которые показывают практическое отсутствие синтеза С-пептида при высоком уровне антител к инсулину (см. рис. 1а, крестики). В 45% случаев высокий уровень антител к инсулину сохранялся у пациентов при отсутствии С-пептида в периферической крови. По-видимому, это указывает на хроническую вторичную иммунизацию экзогенным инсулином, что является следствием проводимой инсулинотерапии.

В рамки общепринятой гипотезы развития СД1 вписываются данные третей группы пациентов, отмеченных на рисунке 1а белыми кружками. В группу вошли пациенты с высоким уровнем С-пептида и антител к инсулину. Эта ситуация вполне объяснима, поскольку высокий уровень синтеза собственного инсулина и регулярное введение экзогенного гормона должны приводить к ответной выработке соответствующих антител. В эту группу вошло только 7% обследованных пациентов, это позволяет полагать, что спустя 20 лет после манифестации СД1 у пациентов сохранился синтез собственного инсулина. Его наличие не находит внятного объяснения как в теоретических, так и клинических исследованиях [5]. Один вариант объяснения этих наблюдений состоит в том, что аутоиммунная агрессия против β-клеток никак не может завершиться. Несмотря на более чем 20-летнюю аутоиммунизацию, β-клетки воспроизводятся и продолжают синтезировать инсулин и С-пептид. Это примитивное объяснение вызывает вполне понятные сомнения. Противовесом ему может служить предположение о том, что в островках Лангерганса могут быть клетки, не вызывающие аутоиммунной агрессии, а обнаруженные в пробах антитела к инсулину выработаны к экзогенному гормону.

Эта точка зрения подтверждается существованием четвёртой группы пациентов, данные которых обозначены чёрными кружками (см. рис. 1а). В этом случае наличие С-пептида свидетельствует о масштабном синтезе и секреции собственного инсулина. Выявленный уровень С-пептида в плазме крови пациентов свидетельствует о том, что количества эндогенного инсулина могло бы хватить для снижения дозы и даже для отмены инсулинотерапии. При этом обращает на себя внимание низкий уровень антител к инсулину, что улучшает прогноз уменьшения введения экзогенного инсулина.

При анализе выделенных выше групп особый интерес представляет соотношения синтеза С-пептида и глюкагона, который был количественно исследован у тех же пациентов. Для визуализации этих отношений значки групп, выделенных на рисунке 1а, сохранены на рисунке 1б.

На рисунке 1б видно, что две группы с высоким и низким уровнем антител к инсулину перемешаны. Это говорит о том, что связь между уровнем секреции глюкагона и выработкой антител к инсулину невелика. Показательно отсутствие прямой связи между секрецией С-пептида и глюкагона. Однако выявлено две не однозначных тенденции, требующих дополнительных исследований. В 50% случаев обнаружена сниженная концентрация глюкагона и С-пептида, а в 19% случаев у пациентов была выявлена высокая концентрация С-пептида при низком уровне глюкагона. Оставшиеся пациенты (31% от общего числа обследованных) распределились между двумя неравными группами. У 7% был выявлен как высокий уровень С-пептида, так и глюкагона. В 24% случаев С-пептид был обнаружен



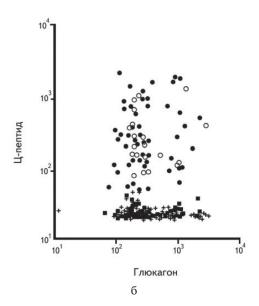


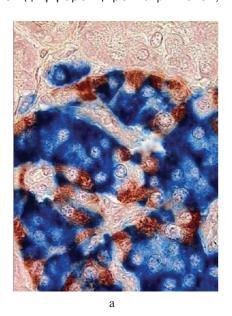
Рис. 1. Распределение индивидуальных параметров количественной оценки синтеза С-пептида, антител к инсулину и глюкагона в периферической крови у больных страдающих сахарным диабетом первого типа более 20 лет. а — логарифмический график показателей С-пептида и антител к инсулину. Разными значками выделены четыре группы пациентов; б — логарифмический график показателей с-пептида и глюкагона. Значки конкретных показателей соответствуют группам на графике а

в следовых количествах, а концентрация глюкагона существенно превышала норму. Следовательно, выявленные соотношения С-пептида и глюкагона предполагают параллельное существование нескольких вариантов функциональной активности островков поджелудочной железы у больных СД1.

Таким образом, при длительном анамнезе СД1 у 15–20% пациентов сохраняется или восстанавливается дифференцировка  $\beta$ -клеток, которые

способны синтезировать собственный инсулин в количестве, близком к нормальному. Эти результаты подтверждаются и данными иммуногистохимического исследования: в 3 из 5 аутопсий ПЖ больных СД1 окраска на инсулин показала наличие β-клеток способных к синтезу собственного инсулина (рис. 2).

Кроме того, были обнаружены клетки, содержащие одновременно инсулин и глюкагон в зрелых островках



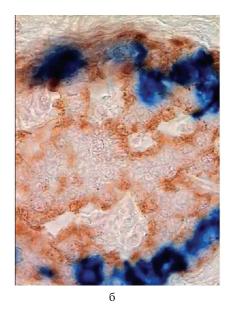


Рис. 2. Микрофотографии островков поджелудочной железы: а — мужчина, 76 лет, не страдавший нарушениями углеводного обмена. б — Крупный островок Лангерганса мужчины 41 г., страдавшего СД1. Двойная иммуногистохимическая окраска на инсулин (синий) и глюкагон (красный). В некоторых клетках обнаружена ко-локализация 2 гормонов. Толщина среза — 3 мкм, ув. ×100

человека, в том числе и у лиц, страдавших сахарным диабетом 1-го типа, у которых сохранилась остаточная секреция инсулина. При двойном иммуногистохимическом окрашивании на инсулин и глюкагон в норме была обнаружена ко-локализация инсулина и глюкагона в цитоплазме части клеток, расположенных вблизи капилляров (рис 2а). У больных СД1 эти клетки расположены преимущественно по периферии островка и соседствуют с глюкагон-содержащими клетками и капиллярами (рис. 2б).

Клетки, синтезирующие одновременно инсулин и глюкагон, обнаружены многими авторами во время пренатального развития человека. Ко-локализация инсулина и глюкагона была обнаружена и в клетках панкреатических островков грызунов, как во время развития, так и у взрослых животных.

В настоящее время широко обсуждается возможность трансформации эндокринных клеток ПЖ [3, 6]. Нами уже была предложена схема развития островков у взрослого человека [1]. В этой схеме предполагается, что островки проходят в развитии несколько стадий. В зрелых островках Лангерганса происходит уменьшение процентного соотношения инсулинсодержащих клеток к глюкагонсодержащим и, следовательно, можно предположить, что по мере развития островка ряд β-клеток дедифференцируется в глюкагонсекретирующие клетки.

Однако эта гипотеза не дает ответа о причинах прекращения аутоимунного процесса в части случаев СД1. Мы предлагаем альтернативную гипотезу. Сохранение в поджелудочной железе пациентов системы воспроизводства и функциональной активности островков Лангерганса позволяет сделать предположение о неоднородности популяции β-клеток. Допустим, что в поджелудочной железе здоровых людей существует два типа β-клеток секретирующих инсулин и С-пептид. Как самым простым, так и самым вероятным можно считать предположение о существовании вызывающих и не вызывающих аутоиммунную реакцию популяций β-клеток. Для удобства рассуждений гипотетически выделим неиммуногенную популяцию АВ-клеток, а иммуногенную – ВВ-клеток. Остаётся наделить эти две группы клеток различными свойствами, которые помогут найти формально непротиворечивое объяснение полученным результатам. В начале развития сахарного диабета 1-го типа повышение нормального уровня антител к инсулину, а затем и их гиперпродукция отражает только снижение количества ВВ-клеток. Процессы компенсаторной дифференцировки ВВ-клеток индивидуально изменчивы и предопределяют темпы снижения синтеза инсулина. Когда процессы аутоиммунного разрушения популяции ВВ-клеток завершаются, наступает так называемая абсолютная инсулиновая недостаточность, характерная для диабета 1-го типа.

Следовательно, полученные данные позволяют реконструировать примерную последовательность развития сахарного диабета первого типа. После начала заболевания аутоиммунной агрессии подвер-

гаются только ВВ-клетки, а АВ-клетки сохраняются интактными. Соотношение популяций клеток 9:1, на что указывают многочисленные наблюдения. Во всех клинических исследованиях отмечается, что в островках поджелудочной железы общее число инсулинпродуцирующих клеток уменьшается до 10% от нормального количества. Судя по всему, этот остаток и является исходной популяцией АВ-клеток. При дальнейшем развитии заболевания регенерация популяции ВВ-клеток крайне затруднена, поскольку сывороточное содержание антиинсулиновых аутоантител класса IgG сохраняется аномально повышенным. Островки, содержащие ВВ-клетки подвергаются аутоиммунной агрессии и разрушаются. При длительном течении заболевания популяция не вызывающих аутоиммунной агрессии АВ-клеток постепенно увеличивается. Это длительный процесс, который позволяет предположить существование пока неизвестных процессов торможения дифференцировки АВ-клеток или механизмов подавления их функциональной активности.

Выявление клеток, содержащих одновременно инсулин и глюкагон, также доказывает возможность одновременного существования двух субпопуляций β-клеток. Одна субпопуляция (АВ-клетки) одновременно синтезирует два гормона, а вторая (ВВ-клетки) – только инсулин.

Заключение. Получены клинические и морфологические данные, предполагающие существование двух типов инсулин-продуцирующих клеток в поджелудочной железе человека. У здоровых людей β-клетки островков Лангерганса неоднородны и включают в себя две субпопуляции АВ-клеток и ВВ-клеток. Эти популяции различаются как по количественному представительству в островках, так и по отношению к аутоиммунным процессам при развитии СД1. Популяция АВ-клеток неиммуногенна и составляет около 10% всех инсулинпродущирующих клеток островков. Популяция ВВ-клеток включает в себя 90% всех инсулинпродуцирующих клеток и может вызывать аутоиммунную агрессию. При длительном развитии СД1 в поджелудочной железе начинают превалировать АВ-клетки, что приводит к отсроченному восстановлению синтеза эндогенного инсулина у части больных СД1.

## Литература

- 1. Прощина, А.Е. Иммуногистохимическое исследование распределения А- и В- клеток в разных типах островков Лангерганса поджелудочной железы человека / А.Е. Прощина, С.В. Савельев // Бюл. экспер. биол. и медицины. 2013. Т. 155. № 6. С. 763–767)
- Carlotti, F. β-Cell Generation: Can Rodent Studies Be Translated to Humans? / F. Carlotti [et al.] // J. of Transplantation. – 2011, Article ID. – 15 p.
- Mezza, T. Insulin Resistance Alters Islet Morphology in Nondiabetic Humans / T. Mezza // Diabetes. – 2014. – №3. – P. 994– 1007.
- Nordquist, L. Renal and vascular benefits of C-peptide: Molecular mechanisms of C-peptide action / L. Nordquist, F. Palm, B. Andresen // Biologics. – 2008. – №3 (2). – P. 441–452.

- 5. Wang, L. Persistence of prolonged C-peptide production in type 1 diabetes as measured with an ultrasensitive C-peptide assay / L. Wang, N. Lovejoy, D. Faustman // Diabetes Care. 2012. №3 (35). P. 465–470.
- 6. Weir, G., β-cell dedifferentiation in diabetes is important, but what is it? / G.Weir, C. Aguayo-Mazzucato, S. Bonner-Weir // Islets. 2013. № 5. P. 233–237.
- S.V. Saveliev, S.B. Shustov, B.V. Romashevskiy, A.E. Proshina,
- V.V. Chekavskaya, S.A. Appolonova, E.S. Savelieva, E.V. Balyasnikova

## Clinical evaluation of insulin synthesis of $\beta$ -cells pancreas during long-term diabetes mellitus type 1

**Abstract.** In 300 patients suffering from diabetes type 1 at least 20 years in the peripheral blood was investigated the content of glucagon, C-peptide and insulin antibodies. Synthesis of native insulin, which was determined by the concentration of C-peptide detected in 90 (30%) patients. Among them, only 7% of patients was detected a high titer of antibodies to the insulin. 147 (49%) patients with high levels of insulin antibodies persisted, but with the absence of C-peptide in the peripheral blood, indicating that the chronic secondary immunization with exogenous insulin. In 63 (21%) patients had low levels of C-peptide coincided with the absence of antibodies to the insulin. It has been shown that long-term development of type 1 diabetes patients maintain or restore the differentiation of  $\beta$ -cells, which are capable of synthesizing its own insulin, which is confirmed by the results of the analysis of autopsies. Apparently, there is the existence of two populations of  $\beta$ -cells. BB-population of cells comprises 90% of the insulin-producing cells and has no ability to synthesize second hormone. AB cell population contains less than 10% of the insulin-producing cells, and can simultaneously synthesize glucagon, but does not cause autoimmune aggression. With long-term development of the first type of diabetes the pancreas begin to prevail AB cells, resulting in delayed recovery of the synthesis of endogenous insulin in some patients with type 1 diabetes.

**Key words**: diabetes mellitus type 1, the pancreatic islets, insulin, glucagon, c-peptide, co-localization, AB-клетки, BB-клетки, β-клетки, endocrinology.

Контактный телефон: +79164941734; e-mail: proschina@mtu-net.ru