

# АУТОАНТИТЕЛА К ДЕКАРБОКСИЛАЗЕ ГЛЮТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ КАК ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАРКЕР САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА

Пивень Н.В., Лухверчик Л.Н., Бураковский А.И.,  
Полегенькая Н.В., Карпович М.В.

ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», лаборатория медицинского микроанализа, г. Минск, Республика Беларусь

**Резюме.** Разработан новый метод иммуноферментного анализа (в формате твердофазного ELISA) концентрации аутоантител к декарбоксилазе глютаминовой кислоты и научно обоснованная методология его использования в медицинской практике в качестве количественного клинико-диагностического, патогенетического и прогностического критерия аутоиммунной агрессии в организме при сахарном диабете 1 типа. Разработанная технология будет положена в основу опытно-промышленного выпуска отечественных диагностических наборов реактивов для иммуноферментного анализа аутоантител к декарбоксилазе глютаминовой кислоты.

*Ключевые слова:* аутоантитела, декарбоксилаза глютаминовой кислоты, иммуноферментный анализ, сахарный диабет, патогенез.

*Piven N.V., Lukhverchyk L.N., Burakovsky A.I., Polegenkaya N.V., Karpovich M.V.*

## AUTOANTIBODIES TO GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE AS A PATHOGENETIC MARKER OF TYPE I DIABETES MELLITUS

**Abstract.** A new method of enzyme-linked immunosorbent assay (in solid-phase ELISA format) has been developed to determine concentrations of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase, as well as an evidence-based methodology is proposed for its medical implications, as a quantitative pathogenetic predictive marker of autoimmune diagnostics in type 1 diabetes mellitus. This technique could be implied for serial production of diagnostic reagent kits, aimed for detection of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase by means of ELISA approach. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 2-3, pp 257-260)

*Keywords:* autoantibodies, glutamic acid decarboxylase, immunoenzyme assay, diabetes mellitus, pathogenesis.

## Введение

Декарбоксилаза глютаминовой кислоты (ДГК) – основной антиген, возникающий при деструкции  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, продуцирующих инсулин. Аутоантитела к ДГК

(АТ-ДГК) представляют собой высокоинформативный маркер для идентификации и выявления индивидуумов с высоким риском развития сахарного диабета 1 типа (СД 1). Их появление в циркуляции по времени намного (на 5-7 лет) опережает клинические проявления болезни, а у пациентов с СД 1 они выявляются в 50-80% случаев. В настоящее время существуют коммерческие наборы реактивов для анализа циркулирующих АТ-ДГК зарубежного производства («Immunotech», Франция; «Orgentec», Германия и др.), аналоги которых отсутствуют в Беларуси и странах СНГ. Высокая стоимость импортных диагностикумов (от 600 до 1000 долларов США) существенно ограничивает их применение в отечественной медицинской практике [1].

### Адрес для переписки:

Пивень Надежда Викторовна,  
Институт биоорганической химии НАН Беларуси,  
Лаборатория медицинского микроанализа,  
220141, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Купревича, 5/2.

Тел. +375 (17) 263-72-73.

Факс: +375 (17) 267-87-61.

E-mail: piven@iboch.bas-net.by

**Цель исследования** — разработать научные основы и методологию использования в медицинской практике нового высокочувствительного метода количественного анализа АТ-ДГК в формате непрямого твердофазного ИФА (иммуноферментного анализа) — ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

## Материалы и методы

При разработке иммунохимической тест-системы были использованы: синтетический препарат фермента ДГК и стандартные антитела к нему, конъюгат антивидовых моноклональных антител к IgG человека со щелочной фосфатазой (Abscam, Великобритания), хромогенный субстрат на основе р-нитрофенилфосфата (Acros Organic, США); планшеты фирмы Nunc (Дания) в силу их большей оптической однородности и лучшей антигенсвязывающей способности; промывочный раствор — 0,1М фосфатный буфер, содержащий 0,05% Твина 20 (Sigma, США). Апробация метода была проведена на 15 образцах сывороток крови здоровых лиц (контрольная группа) и 50 образцах сыворотки крови больных СД 1 в возрасте 22-28 лет, средняя длительность заболевания  $3,5 \pm 0,9$  года. Степень выраженности аутоиммунных нарушений у больных оценивали путем определения концентрации аутоантител к инсулину (АТ-И) в сыворотках крови иммуноферментной тест-системой (DRG, Германия). Контроль полученных значений концентраций АТ-ДГК в анализируемых образцах с помощью разработанной тест-системы проводили путем сравнительного изучения этого показателя в тех же образцах с использованием коммерческой тест-системы для ИФА АТ-ДГК (DRG, Германия). Результаты оценивали на планшетном спектрофотометре АС-8К (Беларусь). Статистическую обработку результатов проводили методами описательной статистики, рассчитывая среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего значения ( $M \pm m$ ). Достоверность различий между группами определяли по критерию Стьюдента с использованием пакета анализа данных программы Excel для Windows XP.

## Результаты и обсуждение

В основу разрабатываемого метода оценки содержания АТ-ДГК был положен формат ELISA. Принцип метода: анализируемые АТ-ДГК класса IgG, находящиеся в сыворотке крови, связываются с антигеном ДГК, предварительно иммобилизованным в лунках планшета для ИФА, с образованием иммунокомплекса. Несвязавшиеся компоненты удаляют путем промывки планшета. Затем к образовавшемуся иммунокомплексу «антиген—антитело» добавляют меченные щелочной

фосфатазой моноклональные антитела, специфичные к IgG человека. Индикатором является хромогенный субстрат — р-нитрофенилфосфат. Добавлением стоп-раствора (NaOH) останавливают развитие цветной реакции и спектрофотометрически измеряют ее интенсивность, которая прямо пропорциональна концентрации АТ-ДГК в образце. Содержание аутоантител рассчитывают по калибровочному графику, отражающему зависимость величины оптической плотности от концентрации АТ-ДГК в калибровочных (стандартных) пробах. Результаты интерпретируют следующим образом: при содержании АТ-ДГК в образце выше 1,050 Ед/мл — результат положительный, а при уровне ниже 1 Ед/мл — отрицательный.

В настоящее время для ИФА концентрации аутоантител различной специфичности в сыворотке крови чаще всего используют два формата: конкурентный и непрямой [4]. При конкурентном в отличие от непрямого на втором этапе анализа антитела, ранее связавшиеся с антигеном, являясь двухвалентными, связываются с антигеном, меченным биотином. Для последующего выявления связанного биотина вносят фермент, меченный авидином. При этом интенсивность цветной реакции прямо пропорциональна концентрации аутоантител. Сравнительный анализ двух модификаций ИФА показал, что по основным аналитическим характеристикам они практически идентичны. Однако разработка конкурентного формата связана с необходимостью получения дополнительных компонентов — препарата ДГК, меченного биотином, и щелочной фосфатазы, меченной авидином [4]. В силу этого за основу разрабатываемого метода был принят формат непрямого ИФА.

Разработанная тест-система имеет следующие аналитические характеристики: чувствительность — 0,3 МЕ/мл; специфичность — не менее 98%; кросс-реактивность с антинуклеарными антителами, ревматоидным фактором и ДНК — менее 1%; воспроизводимость (коэффициент вариации) — не более 8%; диапазон определяемых концентраций АТ-ДГК от 0,3 МЕ/мл до 40 МЕ/мл. Время анализа — 150 мин.

С помощью разработанного метода были исследованы образцы сыворотки крови больных СД 1 с различной степенью поражения  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, критерием которых служила предварительно изученная концентрация АТ-И [1]. Уровень АТ-И в сыворотке крови лиц с СД 1 был выше нормы (0,95 МЕ/мл) и колебался от 1,15 МЕ/мл до 5,22 МЕ/мл, а средний уровень АТ-И составил 1,99 МЕ/мл. На основе полученных значений АТ-И было сформировано 3 группы лиц:

с низким уровнем АТ-И (1,15-1,85 МЕ/мл), средним (2,2-2,8 МЕ/мл) и высоким (3,5-8,5 МЕ/мл), в которых и был проведен анализ содержания АТ-ДГК разработанным методом. У всех пациентов с СД 1 обнаружено повышение концентрации АТ-ДГК по сравнению со здоровыми лицами, которая составила  $0,64 \pm 0,2$  МЕ/мл. При этом обнаружена зависимость концентраций АТ-ДГК от степени выраженности аутоиммунного синдрома: уровень АТ-ДГК в группе 1 составил  $1,46 \pm 0,2$  МЕ/мл; в группе 2 –  $1,6 \pm 0,3$  МЕ/мл; в группе 3 –  $1,8 \pm 0,2$  МЕ/мл; т.е. уровень АТ-ДГК у 95% пациентов с СД 1 был выше порогового значения – 1,05 МЕ/мл. Выявленное повышение концентрации АТ-ДГК у всех больных свидетельствует об аутоиммунной интервенции, сопровождающей развитие СД 1. Анализ концентрации АТ-ДГК в сыворотке крови здоровых лиц показал, что средняя концентрация АТ-ДГК в этой группе составила  $0,64 \pm 0,2$  МЕ/мл. При этом в 90% случаев результат определения АТ-ДГК был отрицательным (ниже 1 МЕ/мл), а у 10% обследуемых – положительным (выше 1,05 МЕ/мл), что, с одной стороны, согласуется с современными представлениями о содержании АТ-ДГК у здоровых лиц, а с другой – свидетельствует о пригодности разработанной тест-системы для количественного анализа АТ-ДГК в сыворотке крови [6]. Результаты проведенного с помощью разрабатываемого метода теста на «открытие» известных концентраций АТ-ДГК в модельных образцах сыворотки крови, содержащих различное (от низких до высоких значений) количество этих аутоантител, показали высокую сопоставимость полученных и заложенных значений концентраций в контрольных образцах.

Результаты по изучению динамики диабет-ассоциированных антител в зависимости от возраста и длительности заболевания приведены в таблице 1. Как видно из таблицы, сочетанное повышение концентраций аутоантител двух специфичностей (АТ-ДГК и АТ-И) обнаружено у 25% обследуемых; у 30% больных было выявлено повышение уровня АТ-И, а у 20% – повышение АТ-ДГК при сроках длительности СД 1 более 5 лет, что, возможно, имеет прогностическое зна-

чение и является подтверждением генерализации аутоиммунного поражения и развития поздних нарушений в других органах и тканях, содержащих ДГК. В 25% случаев концентрации АТ-ДГК и АТ-И оставались в пределах нормы, что согласуется с мнением о том, что у молодых пациентов на ранних стадиях СД 1 именно аутоантитела к компонентам  $\beta$ -клеток выступают в качестве триггеров деструктивных процессов, инициируя участие в них макрофагов и натуральных киллеров – эффекторов неспецифического иммунитета. Процесс антителозависимого повреждения инсулинпродуцирующих  $\beta$ -клеток может продолжаться годами при сохраненной функции поджелудочной железы [5]. Антигенспецифические Т-лимфоциты – эффекторы адаптивного иммунитета, вероятно, вовлекаются в процессы аутодеструкции на более поздних этапах, что способствует ускорению процессов деструкции  $\beta$ -клеток и переводит заболевание в стадию клинической манифестации. Этот процесс характеризуется массовой гибелью клеток поджелудочной железы, снижением секреции инсулина и сопровождается повышением концентраций АТ-ДГК и АТ-И. С течением времени в результате гибели 80-90% инсулин-синтезирующих клеток исчезает источник антигенной стимуляции и концентрация диабет-ассоциированных антител снижается. Однако у 20% больных обнаружено повышение уровня АТ-ДГК, что, возможно, связано с вовлечением в патологический процесс других органов и тканей, таких как печень, семенники и яичники, содержащих ДГК – источник антигенной стимуляции. Один из механизмов участия аутоантител в развитии СД 1 – их воздействие на процессинг и презентацию аутоантигена молекулами главного комплекса гистосовместимости, в результате чего возникают изменения процессов транспортировки и процессинга в клетке, а также происходит презентация «скрытых» детерминант эпитопов аутоантигенов Т-клеткам. Это, в свою очередь, усиливает Т-клеточный ответ на ДГК [8]. Нарушение презентации аутоантигенов Т-лимфоцитам при СД 1, связанное с появлением аутоантител к ним, может быть одним из основных меха-

**ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АУТОАНТИТЕЛ К ДЕКАРБОКСИЛАЗЕ ГЛЮТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ИНСУЛИНУ У БОЛЬНЫХ СД 1 ТИПА**

Тип аутоантител	Пациенты с СД 1 (n = 50)	Средний возраст группы	Длительность заболевания
АТ-ДГК + АТ-И	25%	22 года	2,5 $\pm$ 0,2 года
АТ-И	30%	28 лет	3,0 $\pm$ 0,9 года
АТ-ДГК	20%	28 лет	5,3 $\pm$ 0,6 года
Отсутствие повышения концентрации АТ-ДГК и АТ-И	25%	26 лет	4,4 $\pm$ 0,8 года

низмов срыва иммунологической толерантности к  $\beta$ -клеткам [7]. Таким образом, высказано мнение, что в зависимости от наличия или отсутствия аутоантител в организме презентация антигена может вызывать образование патологического Т-клеточного ответа и определять последующее течение аутоиммунного процесса. Согласно современным представлениям антитела при СД 1 сами по себе не могут вызывать деструкцию  $\beta$ -клеток, но «отражают» степень выраженности аутоиммунной агрессии в организме, а разрушение  $\beta$ -клеток опосредуют цитотоксические  $CD8^+$  и  $CD4^+$ Т-лимфоциты, натуральные киллеры, а также макрофаги, дендритные клетки, цитокины, свободный кислород, радикалы оксида азота и др. [6].

Разработанная технология нового метода количественного иммуноферментного анализа положена в основу организации промышленного выпуска отечественных наборов реактивов на базе производства Института биоорганической химии НАН Беларуси с целью импортозамещения зарубежных аналогов и обеспечения этими наборами медицинских учреждений страны. Разработка и внедрение в медицинскую практику отечественного диагностикума позволит: с высокой точностью и специфичностью обнаруживать даже следовые количества АТ-ДГК и тем самым диагностировать начальные стадии аутоиммунного поражения поджелудочной железы и СД 1; предоставить исследователям точный количественный критерий для контроля степени выраженности патологического процесса, оценки эффективности проводимой терапии и прогнозирования развития болезни; проводить скрининг родственников больного – потенциальных доноров для трансплантации и женщин с гестационным диабетом с целью оценки риска патологии беременности; выявлять группы риска в отношении сахарного диабета среди детского и взрослого населения.

## Список литературы

1. Пивень Н.В., Орлова Е.Е. Аутоантитела к декарбоксилазе глютаминовой кислоты как маркеры развития сахарного диабета (обзор) // Сб. «Биорегуляторы: исследование и применение». – 2008. – № 2. – С. 78-83.
2. Пивень Н.В., Орлова Е.Е., Лухверчик Л.Н. Иммуноферментный анализ аутоантител к декарбоксилазе глютаминовой кислоты – маркера сахарного диабета 1 типа // Вестник фонда фундаментальных исследований. – 2010. – № 1. – С. 70-77.
3. Kimpimäki T., Kulmala P., Savola K., Kupila A., Korhonen S., Simell T., Itonen J., Simell O., Knip M. Natural history of beta-cell autoimmunity in young children with increased genetic susceptibility to type 1 diabetes recruited from the general population // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2002. – Vol. 87. – P. 4572-4579.
4. Crowther J.R. The ELISA Guidebook. – New Jersey: Humana Press, 2001. – 421 p.
5. Mayr A., Schlosser M., Grober N., Kenk H., Ziegler A.G., Bonifacio E., Achenbach P. GAD autoantibody affinity and epitope specificity identify distinct immunization profiles in children at risk for type I diabetes // Diabetes. – 2007. – Vol. 56, N 6. – P. 1527-33.
6. Pihoker C., Gilliam L.K., Hampe C.S., Lernmark A. Autoantibodies in diabetes // Diabetes. – 2005. – Vol. 54, N 2. – P. 61-52.
7. Sabbah E. Role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in type 1 diabetes // Oulu. – 2000. – P. 17-34.
8. Viglietta V., Kent S.C., Orban T., Hafler D.A. GAD 65-reactive T cells are activated in patients with autoimmune type 1 diabetes // The Journal of Clinical Investigation. – 2002. – Vol. 109, N 7. – P. 895-903.

*поступила в редакцию 04.02.2011*

*отправлена на доработку 13.02.2011*

*принята к печати 03.03.2011*