

На правах рукописи

ПРОЦЕНКО АННА МЕРГЕНОВНА

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ АНТИТЕЛ К ИНСУЛИНУ
В ПЕРИНАТАЛЬНЫХ ИСХОДАХ ПРИ ИНСУЛИНЗАВИСИМОМ
ДИАБЕТЕ У БЕРЕМЕННЫХ**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители
чл.-корр. РАН С.Г. Морозов
д.м.н. Т.С. Будыкина

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Научные руководители:

Морозов Сергей Георгиевич – доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН

Будыкина Татьяна Сергеевна – доктор медицинских наук

Официальные оппоненты:

Гущин Игорь Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заведующий отделом клинической иммунологии и аллергологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России

Оразмурадов Агамурад Акмамедович – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов».

Ведущая организация: бюджетное учреждение высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа – Югры «Сургутский государственный университет»

Защита состоится « 15 » декабря 2022 г. в 14 ч. 00 мин.
на заседании диссертационного совета 24.1.180.01, созданного на базе
ФГБНУ «НИИОПП», по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП»,
а также на сайте <http://www.niiopp.ru/>.

Автореферат разослан « 11 » ноября 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук



Н.Б. Панкова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Рост численности больных сахарным диабетом (СД) и связанных с этим заболеванием осложнений остается одной из наиболее актуальных проблем современного здравоохранения. Несмотря на очевидные успехи в области диабетологии, достигнутые в последние десятилетия, число таких больных постоянно растет.

По последним данным, численность больных СД в мире за последние 10 лет увеличилась более чем в 2 раза, и к концу 2017 г. превысила 425 млн человек. Согласно прогнозам Международной диабетической федерации к 2045 г. СД будет страдать 629 млн человек. В России, как и во всех странах мира, отмечается значимый рост распространенности СД. По данным федерального регистра СД, в РФ на окончание 2018 г. состояло на диспансерном учете более 4,5 млн человек (3,1% населения), из которых СД 1 типа составляет 6%. Однако эти данные недооценивают реальное количество пациентов, поскольку учитывают только выявленные и зарегистрированные случаи заболевания [Дедов И.И. и соавт., 2019].

Очень важной стороной этой проблемы является тенденция к увеличению числа беременных женщин, страдающих СД, в том числе инсулинзависимым сахарным диабетом 1 типа (СД1). Распространённость СД I и II типа среди женщин фертильного возраста в РФ составляет 0,9–2%. Прегестационный СД выявляется у 1% беременных, в 1–5% случаев развивается гестационный СД или манифестирует истинный СД [Айламазян Э.К. и соавт., 2017].

Эпидемиологические исследования показывают, что по сравнению с общей популяцией беременных, у женщин, страдающих СД1, значительно увеличиваются риски преждевременных родов [Капустин Р.В. и соавт., 2020], серьезных осложнений развития эмбриона и плода [Петров Ю.А. и соавт., 2019]. При наличии у матери СД I типа диабетическую фетопатию (ДФ) имеют до 75% новорожденных, беременность протекает с осложнениями у 75–85% женщин, страдающих СД [Солодкова И.В. и соавт., 2015]. По данным зарубежных авторов, перинатальная заболеваемость и смертность в этой группе новорожденных в 3–9 раз выше, чем у беременных, не страдающих СД1 [Lapolla A. et al., 2008; Капустин Р.В. и соавторы, 2018]. У женщин, страдающих сахарным диабетом, повышен риск рождения детей с врожденными аномалиями. У детей, рожденных от матерей с диабетом, 50% перинатальной смертности приходится на врожденные пороки развития, в то время как у детей, рожденных женщинами, не страдающими СД, данный показатель составляет не более 20–30% [Есаян Р.М., и соавт., 2009; Капустин Р.В. и соавторы, 2018; Ходжаева З.С. и соавторы, 2020]. У этих детей часто выявляют аномальную массу тела, неонатальную гиперинсулинемию, гипогликемию, изменения толерантности к глюкозе, нарушения липидного метаболизма. Также у них часто страдают нервная и сердечно-сосудистая системы [Капустин Р.В. и соавт., 2018; Папышева О.В. и соавт., 2019].

По-прежнему, главным диагностическим признаком СД1 остается высокое содержание глюкозы в крови. Однако, положение осложняется тем, что даже добившись нормального уровня сахара в крови во время беременности у пациенток с СД1 не всегда удается кардинально улучшить перинатальные исходы, о чем свидетельствуют многочисленные данные отечественных и зарубежных ученых. При рассмотрении возможных механизмов неблагоприятного влияния СД1 матери на перинатальные исходы многие исследователи в настоящее время пришли к заключению о важнейшей роли изменений в гуморальном звене материнской иммунной системы, а именно, повышенной продукции антител (АТ) к инсулину [Atkinson M.A. et al., 2009; Bell R. et al., 2008; Borchers A.T. et al., 2010]. В недавних исследованиях

показана связь худших неонатальных исходов с наличием аутоантител (аАТ) к островковым клеткам у матерей [Li Zhe et al., 2015].

Высокое содержание АТ к антигенам островковых клеток поджелудочной железы, в том числе АТ к инсулину, выявляется в крови большинства больных СД1. В ряде случаев наступлению явного диабета предшествует довольно длительный субклинический период, характеризующийся появлением в крови аАТ против островково-специфических аутоантигенов (антиостровковых аАТ) [Nokoff N., Rewers M., 2013]. Полагают, что взаимодействие таких АТ с антигенами β -клеток железы приводит к разрушению этих клеток с последующей редукцией выработки инсулина. На более поздних стадиях заболевания, когда собственные β -клетки уже полностью разрушены, выявляемые повышенные уровни противоинсулиновых АТ, вероятно, образуются уже на экзогенно вводимый инсулин.

По данным зарубежных исследователей, перинатальная патология у новорожденных от матерей с различными аутоиммунными нарушениями составляет значительный процент в детской заболеваемости и смертности [Min Y. et al., 2005; Borchers A.T. et al., 2010]. Имеются многочисленные данные об отрицательных онтогенетических последствиях присутствия аномального содержания в крови беременных женщин целого ряда аАТ [Di Mario U. et al., 1982; Hoftman A.C. et al., 2008; Borchers A.T. et al., 2010; Wucher H. et al., 2011; Yuan Rong, et al., 2010]. Эти данные дают основания для предположения о существовании иммунных механизмов поражения плода у женщин с диагнозом СД1.

Известно, что иммунная система плода начинает функционировать примерно с 20-24 нед беременности [Ходжаева З.С. и соавторы, 2020; Щеплягина Л.А., Круглова И.В., 2009]. Собственные АТ в крови новорожденного могут выявляться уже в первые несколько месяцев жизни. При этом основу пула АТ у них составляют трансплацентарные материнские АТ, перенос которых через плаценту начинается во втором триместре беременности [Щеплягина Л.А., Круглова И.В., 2009], а их исчезновение из кровотока, как правило, происходит в течение первых 6-9 месяцев жизни.

У детей от матерей с СД1 отмечена индукция синтеза собственных антиостровковых аАТ, которая обычно наблюдается в период от 9 месяцев до 3-х лет жизни. При этом, как правило, прежде всего, синтезируются антиинсулиновые аАТ, а позже – аАТ к глутаматдекарбоксилазе [Atkinson M.A. et al., 2009; Yuan Rong, et al., 2010].

В литературе обычно рассматривается содержание только идиотипических антител к инсулину, или антител первого порядка (АТ1). Известно, именно они появляются в период бессимптомного течения СД1 у взрослых. Кроме того, АТ1 к инсулину признаются в настоящее время наиболее информативными иммунологическими маркерами при диагностике и мониторинге патологического процесса при СД1 [Potter K.N. et al., 2000; Atkinson M.A. et al., 2009; Hampe C.S., 2012; McCance D.R. et al., 2008].

В то же время, по имеющимся данным, значительное влияние на особенности течения СД1 оказывают также антиидиотипические антитела (АИАТ) к инсулину или антитела второго порядка (АТ2) [Будыкина Т.С., 2010; Alyafei F. et al., 2018; Larsson H.E. et al., 2013; Lijuan Luan et al., 2016]. Известно, что АИАТ против биологически активных веществ, как правило, обладают способностью взаимодействовать не только с $F_{(ab)}$ -фрагментами соответствующего идиотипа АТ1, но и с рецепторами исходного вещества, как бы «мимикрируя» при этом под образ самого антигена [Lapolla A. et al., 2009]. Это дает основание для предположения, что АИАТ к инсулину, являясь как бы иммунохимическим подобием, «зеркальным» отображением самого инсулина, обладают способностью связываться с его рецепторами и проявлять, таким образом, активность, свойственную антирецепторным антителам.

Несмотря на то, что многие аспекты влияния иммунных нарушений при СД1 у беременных на перинатальные исходы уже изучены [Будыкина Т.С., 2010; Melanitou E., 2013; Pertyńska-Marczewska M. et al., 2010; Duriez M., et al., 2014; Li Zhe et al., 2015], до сих пор не произведена комплексная оценка влияния антител различных порядков к инсулину (АТ1, АТ2 и АТ3) на особенности углеводного обмена у беременных с СД1 и на состояние здоровья их новорожденных. В то же время такие исследования представляются нам чрезвычайно важными, поскольку могут раскрыть новые механизмы влияния иммунных изменений у беременных с СД1 на течение беременности и перинатальные исходы, а также определить перспективы более эффективной коррекции выявляемых нарушений.

Поэтому **цель** настоящего исследования заключалась в оценке роли антител 1, 2 и 3 порядков к инсулину у беременных с СД1 в перинатальных исходах.

Для этого были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать иммуноферментную тест-систему для определения АТ1, АТ2 и АТ3 к инсулину.
2. Изучить в эксперименте и клинике при СД1 динамику продукции АТ1, АТ2 и АТ3 к инсулину.
3. Оценить специфичность взаимодействия АТ2 к инсулину с рецепторами инсулина.
4. Показать взаимосвязь антител различного порядка к инсулину с течением СД1 до и во время беременности.
5. Изучить взаимосвязь между особенностями гуморального иммунитета к инсулину и экспрессией рецепторов к инсулину и глюкозе на лейкоцитах периферической крови беременных с СД1.
6. Показать взаимосвязь антител различного порядка к инсулину с патологией новорожденных.
7. Изучить содержание АТ1, АТ2 и АТ3 к инсулину и уровень гликемии у новорожденных от матерей, страдающих СД1.

Научная новизна исследования

Впервые на экспериментальных моделях изучена динамика продукции АТ1, АТ2 и АТ3 к инсулину в ответ на экзогенно вводимый инсулин. Экспериментально доказано, что антиидиотипические антитела к инсулину (АТ2) специфически взаимодействуют с рецепторами инсулина, что позволяет рассматривать их в качестве антирецепторных антител. На экспериментальных моделях показано, что избыточное содержание в крови АТ2 к инсулину по сравнению с уровнем АТ1 способствует повышению толерантности к глюкозе при проведении теста с глюкозной нагрузкой. Впервые установлена корреляция повышенного содержания АТ1, АТ2 и АТ3 к инсулину с характером течения СД1 при беременности. Впервые показана взаимосвязь между продукцией АТ1, АТ2 и АТ3 к инсулину у беременных с СД1 и состоянием новорожденного.

Теоретическая значимость

Показано, что патогенетически значимым механизмом развития патологии у новорожденного от матерей с СД1 является продукция АТ к инсулину. Установлено, что особенности продукции АТ1, АТ2 и АТ3 к инсулину оказывают существенное влияние на состояние здоровья родившихся детей у матерей с СД1, а также на течение СД1, в том числе во время беременности. Показана протекторная роль АТ1 и АТ3 к инсулину и негативное влияние АТ2 к инсулину на течение СД1 и состояние новорожденных, что расширяет представ-

ления о регуляторном и дизрегуляторном влиянии гуморального аутоиммунитета, «иммунной сети» с направленностью к инсулину.

Практическая значимость

Внедрение разработанных иммуноферментных тест-систем для определения АТ1, АТ2 и АТ3 к инсулину позволит более эффективно проводить предгравидарную подготовку женщинам с СД1, мониторинг СД1 во время беременности, а также осуществлять прогноз здоровья новорожденных. Кроме того, полученные данные о состоянии здоровья новорожденных в зависимости от особенностей гуморального иммунитета к инсулину могут лечь в основу для создания новых эффективных лечебно-профилактических мероприятий, направленных на улучшение состояния здоровья новорожденных у женщин с СД1.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Течение СД1, течение беременности и перинатальные исходы при СД1 во многом зависят от содержания в сыворотке крови антител первого (АТ1), второго (АТ2) и третьего (АТ3) порядка к инсулину.
2. Повышенная продукция антиинсулиновых минимум одного из трех порядков - АТ1, АТ2 и АТ3 - установлена у 79,2% женщин с диагнозом СД1.
3. Наиболее благоприятное течение гестационного периода и перинатальные исходы отмечаются у беременных с преимущественным содержанием АТ1 к инсулину,
4. Наиболее неблагоприятное течение гестационного периода и наиболее тяжелое состояние новорожденных отмечается у женщин с преимущественным содержанием АТ2 к инсулину, способных взаимодействовать с рецепторами к инсулину.
5. АТ3 к инсулину, связывающие вариабельные участки АТ2 к инсулину, нивелируют патогенное влияние соответствующих АТ2 и тем самым улучшают течение гестационного процесса при СД1 и перинатальные исходы.

Внедрение результатов работы. Основные результаты настоящей работы внедрены работу отделения клинической и экспериментальной иммунологии ГБУЗ ГКБ №29 им. Н.Э. Баумана г. Москвы.

Апробация работы. Материалы диссертационного исследования были представлены на VI Междисциплинарной конференции с международным участием «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций» (Москва, 2022), XIV Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2020 г.), VII Международной конференции «Современные биотехнологии для науки и практики-2020» (С.-Петербург, 2020), Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2019 г.), на XI Всероссийской научно-практической конференции «Аллергические и иммунопатологические заболевания – проблема XXI века» (С.-Петербург, 2019), на шестой и седьмой российских конференциях «Нейроиммунопатология» (Москва 2010, 2012, 2022 гг.).

Публикации по теме диссертации. Всего по теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, 4 из которых в журналах, рекомендованных ВАК.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в разработке концепции исследования, в постановке его цели и задач, в сборе и анализе материалов исследования, проведении большей части лабораторных исследований, формировании базы данных, анализе и интерпретации полученных данных, статистической обработке материала.

Разработка иммуноферментных тест-систем и сбор клинического материала проводились совместно с научным руководителем д.м.н. Т.С. Будыкиной.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, контингента обследованных, глав с изложением материалов собственных исследований, главы с обсуждением полученных результатов, выводов, списка сокращений и библиографии, содержащей 39 отечественных и 177 иностранных источников. Материалы диссертации изложены на 137 страницах компьютерного текста, иллюстрированы 9 таблицами и 11 рисунками.

КОНТИНГЕНТ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнялась на базе ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», ГБУЗ Городская клиническая больница № 29 им. Н.Э. Баумана Департамента здравоохранения г. Москвы,

Экспериментальные и лабораторные методы исследований

Получение олигомерного инсулина. Для получения антисывороток к инсулину при иммунизации кроликов, для изучения динамики продукции АТ различного порядка при иммунизации крыс и для создания тест-систем для определения АТ1 к инсулину использовали олигомерный инсулин, который полимеризовали глутаровым альдегидом.

Иммунизация лабораторных животных. Взрослых лабораторных крыс-самок линии Вистар (весом 190–200 г) иммунизировали олигомерным инсулином (0,1 мг на одну инъекцию) с полным адъювантом Фрейнда. Пятимесячных кроликов породы шиншилла иммунизировали подкожно в 5-6 точек в зоны лимфатических узлов 3 раза с интервалом в 7-10 дней. При необходимости делали дополнительные инъекции. Для получения АТ1 к инсулину кроликов иммунизировали олигомерным инсулином. Для получения АТ2 проводили иммунизацию F(ab)₂-фрагментами АТ1 к инсулину.

Синтез специфических иммуносорбентов для иммуноаффинного выделения антиинсулиновых антител и их антиидиотипов. Хроматографические колонки заполняли иммуносорбентом по стандартной методике [Остерман Л.А., 1985]. На бромциансефарозе иммобилизовывали инсулин, F(ab)₂-фрагменты антиинсулиновых АТ1 кролика, IgG фракцию сыворотки крови здорового человека и IgG фракцию интактного кролика.

Иммуноаффинное выделение антител из крови кроликов. На специфических иммуносорбентах получали АТ1 и АТ2 к инсулину из сыворотки гипериммунных кроликов.

Получение F(ab)₂-фрагментов АТ1 или АТ2 к инсулину, а также неиммунных IgG проводили с помощью протеолитического гидролиза пепсином с последующей гель-фильтрацией.

Выделение мембранной фракции клеток мозга проводили с помощью гомогенизации с добавлением PBS, центрифугирования, растворения осадка с помощью 50мМ октилглюкозида, повторных циклов центрифугирования, в том числе в 0,32М сахарозе.

Конкурентный иммуноферментный анализ (ИФА) проводили с помощью сорбированной мембранной фракции ткани мозга, инсулина и АТ2 к инсулину.

Оценку содержания антител АТ1 (к инсулину), АТ2 (к инсулиновым рецепторам) и АТ3 в сыворотке крови проводили с помощью ИФА. На планшетах иммобилизовывали: 1) олигомерный инсулин человека; 2) F(ab)₂-фрагменты антиинсулиновых АТ1 кролика; 3) F(ab)₂-фрагменты антиинсулиновых АТ2 кролика. Коэффициент вариации созданных тест-систем составлял не более 10%.

Иммунореактивность каждого образца исследуемых сывороток выражали в условных единицах (У.Е.), отражавших проценты иммунореактивности образца от интенсивности реакции стандартной сыворотки в соответствии с уравнением:

$$\text{У.Е.} = (\text{ОП анализируемого образца} \times 100 / \text{ОП стандартной сыворотки}) - 100$$

В качестве стандартной сыворотки, в зависимости от того, какая кровь подвергалась исследованиям, использовали смешанные в равных количествах сыворотки 9 взрослых лабораторных крыс (или 9 лабораторных кроликов), не подвергавшихся иммунизации, либо (при анализе сывороток человека) пулированную сыворотку здоровых доноров.

Для выяснения, антитела какого порядка преобладают у экспериментальных лабораторных животных и у контингента обследуемых женщин, высчитывали соотношение относительных уровней сывороточного содержания антиинсулиновых АТ1, АТ2 и АТ3. Для этого были введены коэффициенты K :

$$K1(AT1/AT2) = (y.e.1 + 100)/(y.e.2+100)$$

$$K2(AT2/AT3) = (y.e.2 + 100)/(y.e.3+100)$$

$K3(AT1/AT3) = (y.e.1 + 100)/(y.e.3+100)$, где у.е.1- уровень АТ1 в усл. ед., у.е.2- уровень АТ2 в усл. ед., у.е.3 - уровень АТ3 в усл. ед.

Уровни антител первого, второго и третьего порядков считали сбалансированными, если коэффициенты K находились в пределах 1,2 - 0,8. Повышение коэффициентов $K1 > 1,2$ и $K3 > 1,2$ расценивали как преобладание АТ1, при $K2 > 1,2$ преобладали АТ2. Уменьшение коэффициента $K1 < 0,8$ говорит о преобладании АТ2, при $K2 < 0,8$ и $K3 < 0,8$ преобладают АТ3.

Определение содержания глюкозы в сыворотке крыс проводилось при помощи модифицированного для микрообъемов феррицианидного метода.

Получение сывороток крови у женщин и их новорожденных. Забор крови у женщин проводили натошак из локтевой вены. Пробы отстаивали, центрифугировали; сыворотку разливали, подвергали однократной заморозке до исследования при температуре -20°C не более 1 мес. Для определения экспрессии рецепторов инсулина и глюкозы на лейкоцитах кровь брали в вакутейнеры с ЭДТА для предотвращения агломерации клеток. У новорожденных кровь получали из вены пуповины. Сыворотку крови получали и хранили способом, описанным выше.

Определение уровня глюкозы в крови беременных женщин и новорожденных проводили глюкозооксидазным методом на полуавтоматическом анализаторе глюкозы АГКМ-01 (Россия). **Определение гликозилированного гемоглобина (HbA1c)** проводили на биохимическом анализаторе AU480 (Beckman Coulter, США) с помощью наборов реагентов Beckman Coulter Diagnostics (США).

Определение экспрессии рецепторов инсулина и глюкозы на лейкоцитах крови беременных женщин с СД1 проведены на проточном цитометре FACSCalibur по программе SimulSet. Интерпретация результатов и их обработка проведены с помощью программы WinMD28.

Клинические наблюдения за беременными женщинами и их детьми

Обследованы 188 женщин с диагнозом СД1 в возрасте от 19 до 34 лет, у которых в дальнейшем наступила беременность, закончившаяся родами. В качестве контрольных наблюдались 32 беременных в возрасте от 17 до 35 лет без эндокринной и другой значимой патологии.

Обследование женщин включало получение всех анамнестических данных (акушерских, сведений о наличии генитальных и экстрагенитальных заболеваний до наступления беременности).

При исследовании рецепторов инсулина и глюкозы был исследован дополнительный контингент из 12 женщин в возрасте от 18 до 34 лет с ожирением 2 или 3 степени (средний ИМТ $36 \pm 4 \text{ кг/м}^2$) с нормально протекающей беременностью на сроке от 13 до 24 недель без СД1 и какой-либо другой патологии.

При наблюдениях за новорожденными рассматривали состояние ребенка и его матери при рождении и особенности течения раннего неонатального периода. Оценка состояния ребенка в раннем неонатальном периоде проводилась врачом-неонатологом. Все данные фиксировали в отдельной для каждого ребенка карточке. В ходе наблюдений за новорожденными анализировали состояние ЦНС, наличие сердечно-сосудистых и респираторных нарушений и другую патологию.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью непараметрических критериев (Уилкоксона-Манна-Уитни, Смирнова, Фишера, Ньюмена-Кейлса, Хи-квадрат) с помощью специализированных компьютерных программ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для решения поставленных задач были созданы иммуноферментные тест-системы для определения антител первого, второго и третьего порядка к инсулину (АТ1, АТ2 и АТ3) (коэф. вариации 7,2-9,1%).

По данным литературы, определение АТ3, которые во многом подобны АТ1, часто является более информативным, по сравнению с определением самих АТ1, так как при активации полистироловых планшетов $F(ab)_2$ – фрагментами соответствующих антиидиотипических антител (АТ2), обеспечивается презентация более полного спектра эпитопов белка. Происходит это потому, что вариабельные участки АТ2 являются как бы зеркальным отражением детерминант самого белка, его иммунохимическими аналогами. При иммобилизации на планшете нативного белка часть его эпитопов являются скрытыми, часть деформируется при иммобилизации, поэтому при определении АТ1 мы детектируем антитела лишь к «мажорным» детерминантам [Морозов С.Г., 1997; Гнеденко Б.Б., 2006].

В справедливости такого подхода мы убедились при сравнительном исследовании интенсивности взаимодействия антиинсулиновых антител, содержащихся в крови иммунизированных инсулином крыс, с $F(ab)_2$ -фрагментами кроличьих АТ2 к инсулину и нативным инсулином (рис. 1).

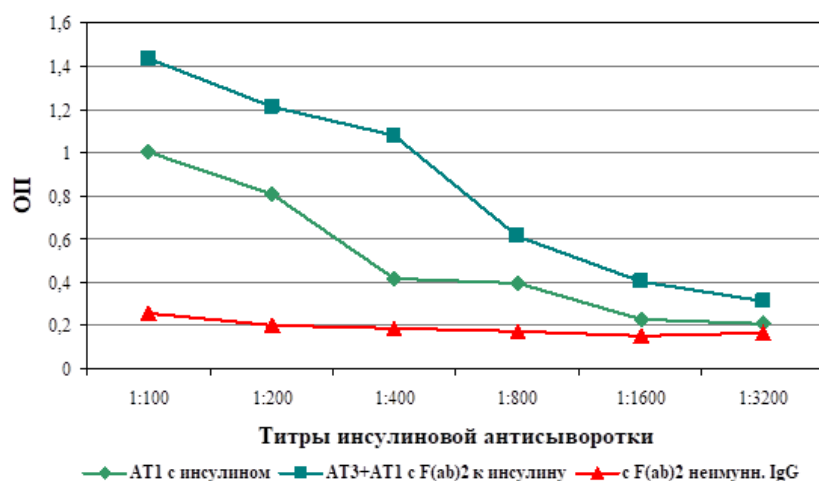


Рис. 1. Сравнительная интенсивность взаимодействия (по оптической плотности) антител к инсулину с нативным инсулином, $F(ab)_2$ -фрагментами АТ2 к инсулину и $F(ab)_2$ -фрагментами неиммунных IgG.

Мы видим, что интенсивность сигнала при взаимодействии с F(ab)₂-фрагментами кроличьих АТ2 к инсулину значительно выше, чем с нативным инсулином.

Далее была изучена динамика продукции АТ1, АТ2 и АТ3 к инсулину в сыворотке крови лабораторных крыс, иммунизированных олигомерным инсулином (рис. 2).

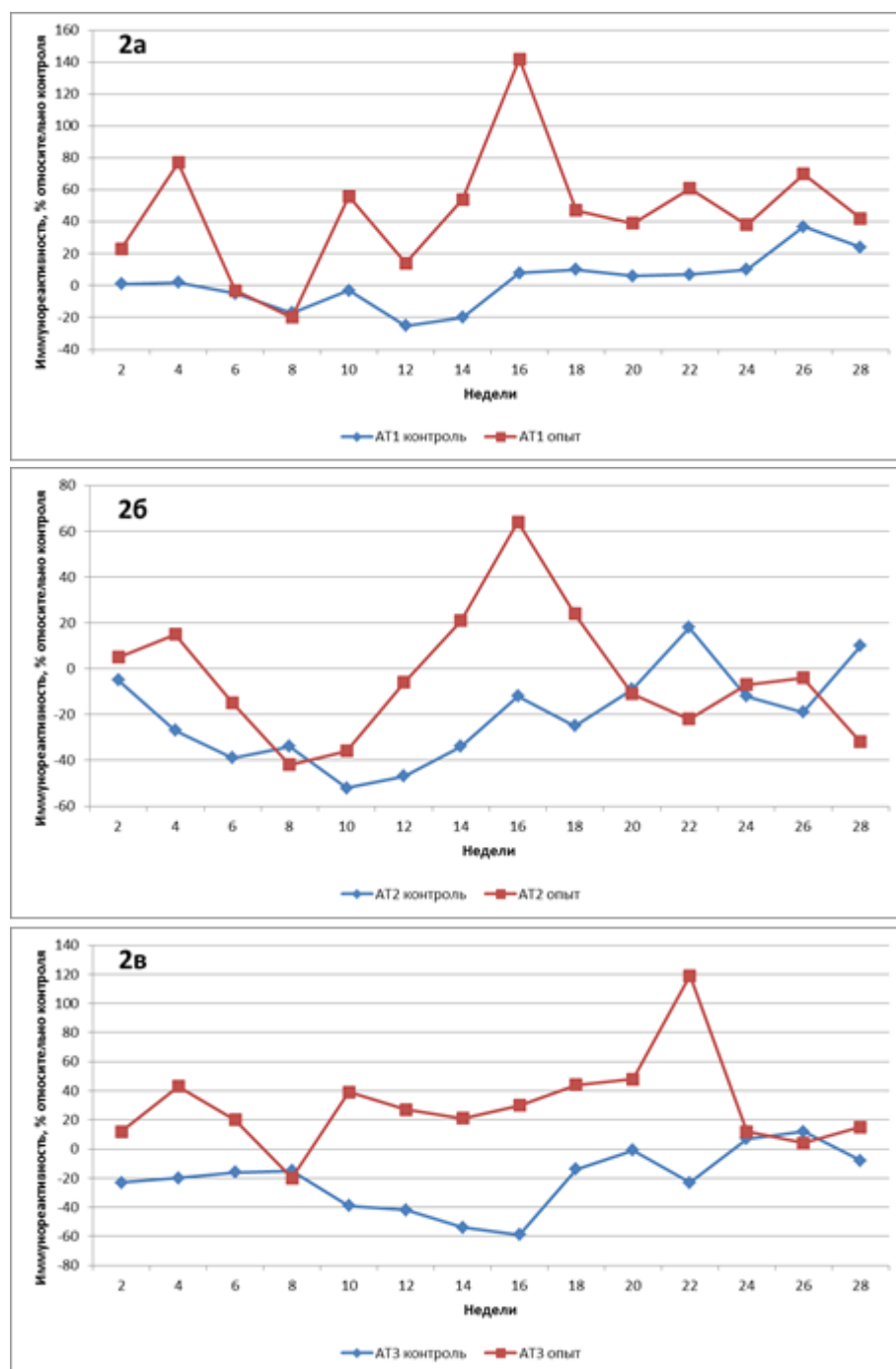


Рис. 2. Динамика биосинтеза антиинсулиновых АТ1 (2а), АТ2 (2б) и АТ3 (2в) при иммунизации крыс олигомерным инсулином.

Содержание всех трех видов исследуемых антител носило волнообразный характер. Как и следовало ожидать, прежде всего появляется пик, соответствующий АТ1. Этому же периоду соответствует и несколько менее интенсивное повышение АТ3. Далее идет волнообразное понижение с последующим повышением уровней АТ1 и АТ3 через 6 нед. Однако, есть все основания полагать, что первый пик - это не истинные АТ3, образовавшиеся в ответ на переменные участки АТ2, а АТ3-подобные АТ1, взаимодействующие с F(ab)₂-фрагментами АТ2. Еще через 6 нед после второго пика АТ1 мы наблюдаем уже максималь-

ный пик АТ1. На это же время приходится и максимальный пик АТ2. Есть основания полагать, что к этому времени соотношение АТ1/АТ2 уже становится сбалансированным.

Еще через 6 нед наблюдается максимальный подъем АТ3. В отличие от первого пика, это уже «истинные» АТ3, синтез которых индуцирован вариabельными участками АТ2.

Наблюдаемый скачкообразный подъем АТ1, АТ2 и АТ3 в разные периоды времени свидетельствует о глобальной перестройке «иммунной сети» с направленностью к вводимому антигену и приведении антител различного порядка к состоянию равновесия.

Содержание определяемых антител в сыворотке крови контрольных крыс оставалось практически неизменным на уровне фоновых значений и колебалось в небольшом диапазоне концентраций.

Совместно с д.м.н. Будыкиной Т.С. по выявлению конкуренции между АТ2 и инсулином за взаимодействие с инсулиновыми рецепторами. На рисунке 3 представлены результаты конкурентного ИФА по взаимодействию кроличьих АТ2 (к антиинсулиновым АТ1) с мембранной фракцией клеток мозга, содержащей рецепторы инсулина, в присутствии инсулина.

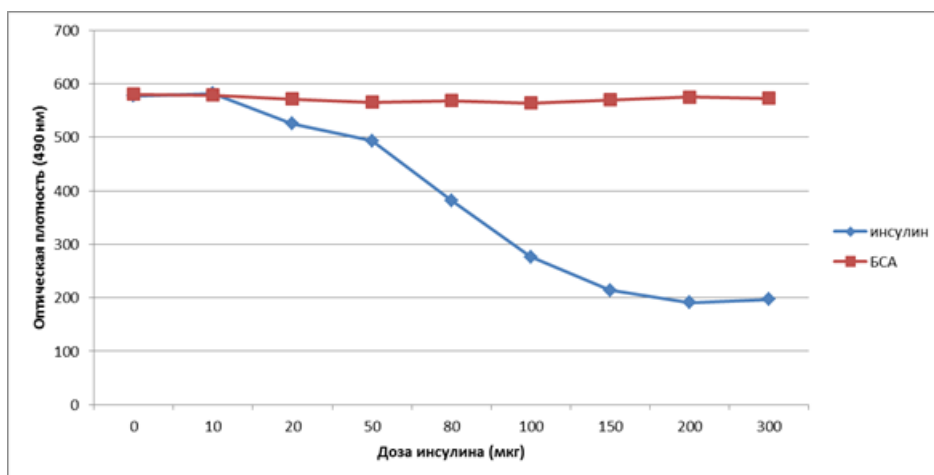


Рис. 3. Взаимодействие АТ2 к инсулину с инсулиновыми рецепторами при добавлении инсулина и БСА.

Было показано ингибирование взаимодействия рецепторов с АТ2 при внесении в лунку инсулина. Данные эксперимента подтверждают иммунохимическую идентичность данных АТ2 и инсулина, а, следовательно, косвенно свидетельствуют о способности данных антител при взаимодействии с инсулиновыми рецепторами влиять на метаболизм глюкозы.

По имеющимся в литературе данным, у большинства больных, страдающих СД, наблюдаются повышенные уровни АТ к инсулину, что часто коррелирует с тяжестью течения патологического процесса. У женщин, страдающих СД, эти АТ влияют и на перинатальные исходы [Будыкина Т.С., 2010; Borchers A. et al., 2010; Penno M.A., 2013, 2020]. При этом не проводилось комплексного изучения взаимосвязи продукции АТ1, АТ2 и АТ3 к инсулину с течением СД и перинатальными исходами.

Содержание АТ1, АТ2 и АТ3 к инсулину в сыворотке крови исследовали у 188 женщин с диагнозом СД1, у которых в дальнейшем наступила беременность. При наступлении беременности содержание АТ определяли в течение всего срока гестации.

Было установлено, что у 137 из всех взятых в исследование женщин с СД1 (72,9%) имеет место аномальный биосинтез антител. При этом спектр данных антител значительно варьировал как по содержанию, так и по соотношению. Для последующего анализа возможного влияния этих различий на течение заболевания было предпринято условное подразде-

ление всех женщин на группы в соответствии с особенностями биосинтеза у них антиинсулиновых антител различных порядков.

Все обследуемые были разделены на 5 групп, включая контрольную группу:

1 группа - женщины с диагнозом СД1, у которых уровень АТ1, АТ2, АТ3 к инсулину не превышал норму или был ниже нормы – 51 женщина (27,1%)

2 группа – женщины с диагнозом СД1, для которых было характерно повышение уровней антител к инсулину, с преимущественным повышением АТ1 к инсулину – 49 (26,1%) женщин;

3 группа - женщины с диагнозом СД1, для которых было характерно повышение уровней антител к инсулину, с преимущественным повышением АТ2 к инсулину – 35 (18,6%) женщин;

4 группа - женщины с диагнозом СД1, для которых было характерно повышение уровней антител к инсулину, с преимущественным повышением АТ3 к инсулину – 53 (28,2%) женщины;

5 группа (контрольная) - пациентки без СД1 и другой значимой патологии – 32 женщины.

Данные определения АТ1, АТ2 и АТ3 к инсулину у обследуемых групп представлены в таблице 1. При анализе анамнестических данных пациенток, в целом, была установлена некоторая взаимосвязь между уровнями антител различных порядков к инсулину и продолжительностью заболевания СД.

Так, от 2 до 4 группы, по мере возрастания максимальных значений антител от 1 до 3 порядков, увеличивалась давность заболевания. Во второй группе у большинства обследуемых (32 чел. - 65,3%) она составила от 1 года до 6 лет (отличие от 1 и 4 групп; $p < 0,05$), в 3 группе (20 чел. - 57,1%) от 3 до 8 лет (отличие от 1 группы; $p < 0,05$), а в 4 группе (33 чел. - 62,3%) от 7 до 10 лет. Эти данные в чем-то отражают результаты приведенных выше экспериментов, где мы наблюдали нарастание уровней вначале АТ1, затем АТ2, а лишь затем АТ3 у иммунизированных инсулином животных. Следует отметить, что у пациентов 1 группы, с сывороточными уровнями определяемых АТ, не превышающими нормальные показатели, отмечалась, в целом, самая большая давность заболевания, что, вероятно, свидетельствует об истощении пулов данных АТ.

Известно, что течение СД1 может протекать значительно тяжелее при наличии у больных характерных для данной патологии осложнений: диабетической ретинопатии, полинейропатии или нефропатии. Такие осложнения разной степени выраженности были диагностированы в наших исследованиях у 131 (69,7%) из всех обследованных пациенток с диагнозом СД1 (до наступления беременности). Эти осложнения коррелировали с давностью заболевания, а не с наблюдаемыми иммунохимическими изменениями.

В **таблице 1** представлены медианы минимальных и максимальных величин среднесуточной гликемии, значения гликированного гемоглобина и дозы вводимого инсулина в разных группах пациенток до наступления беременности.

У женщин 3 и 4 групп медианы максимального среднесуточного уровня гликемии составляли 12,6 и 11,8 ммоль/л соответственно, что достоверно ($p < 0,05$) превышало аналогичный параметр у женщин 2 группы – 9,2 ммоль/л. У пациенток 1 группы, медиана максимальной среднесуточной гликемии по величине приближалась к показателям 2 группы и составляла 9,0 ммоль/л.

Значения гликированного гемоглобина HbA1c (%) во всех наблюдаемых группах отражали разную степень компенсированности заболевания: наиболее благоприятное и ста-

бильное состояние - во 2 группе, где HbA_{1c} составил 6,6%. Наименьшая степень компенсированности определена в 3 и 4 группах с высоким содержанием АТ2 и АТ3, где HbA_{1c} составлял 8,9% и 8,2% соответственно.

Таблица 1

Содержание антител к инсулину, уровни гликемии, гликированного гемоглобина и вводимой дозы инсулина у женщин с СД1 вне беременности

Группы женщин	Уровни АТ, у.е.			Уровень гликемии, ммоль/л		Суточ. доза инсулина, ЕД/сут	Уровень HbA _{1c} (%)	Продолжительность заболевания
	АТ1	АТ2	АТ3	max	min			
1 (n=51)	-15± 8	-11 ± 12	1 ± 9	9,0 (7,5-10,0)	8,0 (6,7-9,4)	42 (36-50)	7,0 (5,7-7,9)	Более 10 лет (69,8%)
2 (n=49)	53 ± 8	15,4 ± 9 [^]	28 ± 7 [^]	9,2 (7,2-10,4)	6,8 (6,1-7,9)	32 (14-42)	6,6 (5,4-7,7)	1-6 лет (65,3%)
3 (n=35)	21 ± 6 [#]	49 ± 7	24 ± 12 [#]	12,2 * (11,2-14,6)	9,8 (7,2-10,9)	56 (48-62)	8,9 * (8,0-9,7)	3-8 лет (57,1%)
4 (n=53)	31 ± 10 ⁺	36 ± 13 ⁺	62 ± 18	11,8 * (10,2-13,9)	9,2 (7,2-9,8)	50 (38-53)	8,2 * (7,6-9,4)	7-10 лет (62,3%)
5 (n=32)	-7 ± 10	0 ± 9	4 ± 12					

Примечания: n - число обследованных; статистически значимые отличия от группы 2 ($p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни) обозначены «*»; статистические значимые отличия ($p < 0,05$ по критерию Стьюдента) от АТ1 соответствующей группы обозначены «[^]», от АТ2 – «[#]», от АТ3 – «⁺».

Характер течения заболевания в разных группах пациенток в большинстве случаев коррелировал с состоянием у них антиинсулиновой иммунореактивности. В 1 и 2 группах до наступления беременности, как правило, удавалось добиться субкомпенсации, а в некоторых случаях, главным образом во 2 группе, течение заболевания носило компенсированный характер (10 чел. – 20,4%). В 3 группе пациенток, характеризовавшейся гиперпродукцией АТ2, компенсированности не удавалось добиться даже при применении инсулинотерапии до 62 ЕД/сут, субкомпенсации удалось достичь только у 5 пациенток (14,3%). В 4 группе течение СД1 отличалось достаточно высокой степенью лабильности и, в целом, характеризовалось как субкомпенсированное.

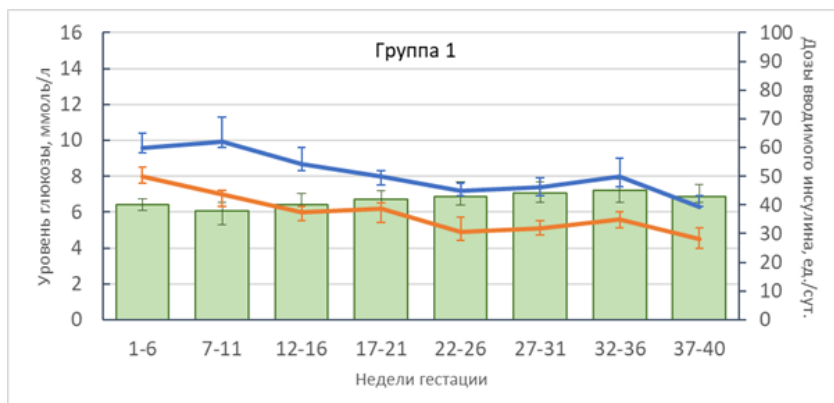
Тяжесть течения патологического процесса во всех обследованных группах также была различной. В целом, тяжелая форма СД1 была диагностирована у 67,6% обследованных женщин. При этом в 1 группе их численность составила 45,1% (23 чел.), во 2-й – 24,5% (12 чел.), в 3-й – 71,4% (25 чел.), в 4-й – 54,7% (29 чел.). Значение показателя в 3 группе было самым высоким и достоверно превышало соответствующие значения, характерные для 1 и 2 групп ($p < 0,05$).

Особенности продукции исследуемых АТ у пациенток различных групп во время беременности могли стать причиной осложненного течения СД1.

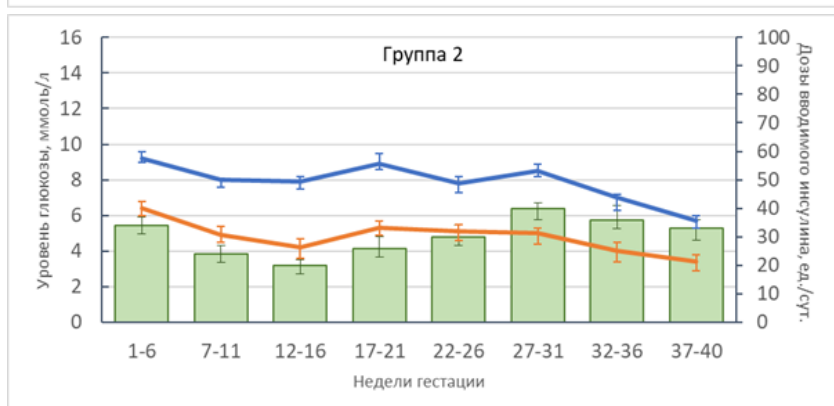
Наши наблюдения за 188 пациентками с диагнозом СД1 перед наступлением у них беременности и в процессе ее развития показали, что в каждой из групп течение СД1 при беременности имело свои особенности.

Для 1 группы женщин, где уровни исследуемых АТ не превышали норму, были характерны небольшие колебания гликемии и потребности в инсулине на всем протяжении беременности (рис. 4А).

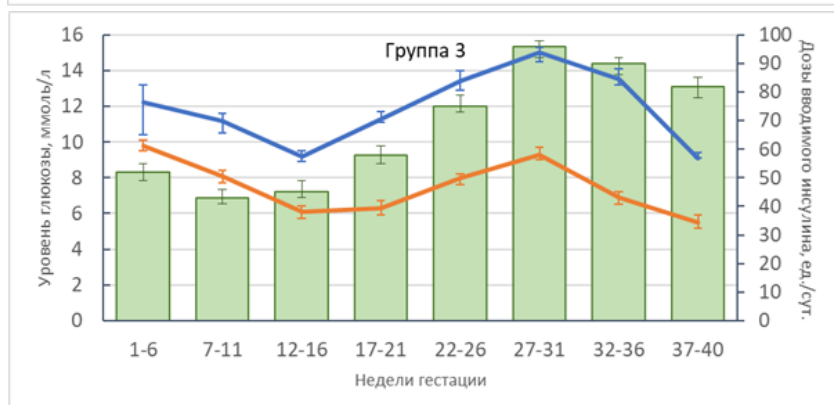
А



Б



В



Г

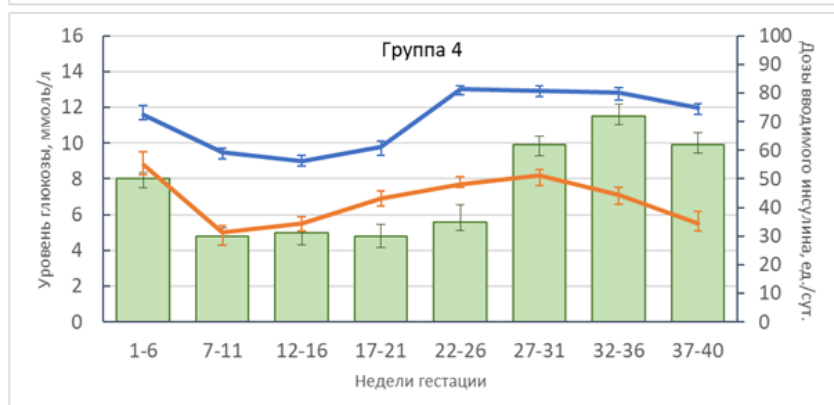


Рисунок 4. Максимальные (синяя линия) и минимальные (оранжевая линия) уровни гликемии, и дозы вводимого инсулина (столбцы) в женщин 1-й (А), 2-й (Б), 3-й (В) и 4-й (Г) групп в течение беременности. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха.

При наступлении беременности медианы минимальной и максимальной гликемии составляли 8,0 (7,2-10,6) и 9,6 (8,8-11,0) ммоль/л соответственно, а доза необходимого инсулина равнялась 40 (32-45) ЕД/сут. В первые недели беременности уровни гликемии, в целом,

незначительно снижались: медианы минимальной и максимальной гликемии в начале 2 триметра составляли 6,0 и 8,7 ммоль/л, а средняя доза инсулина составляла около 40 ЕД/сут. В последующие недели медианы минимальной и максимальной гликемии незначительно колебались около 5,3 (4,5-6,2) и 7,4 (6,3-8,0) ммоль/л при дозах необходимого инсулина до 45 ЕД/сут.

В отдельных случаях у небольшого числа беременных (21,6%) (11 чел.) отмечался кратковременный подъем уровня гликемии до 13,0-13,5 ммоль/л, сопровождавшийся кетонурией и глюкозурией. Уровень HbA_{1c} варьировал в пределах 7,2 (6,2-8,3) ммоль/л.

С начала 3 триместра отмечался незначительный подъем уровня гликемии и к окончанию срока беременности на 36-37 неделе, медианы минимальной и максимальной гликемии составляли 5,0 ммоль/л и 7,1 ммоль/л соответственно.

У женщин 2 группы течение СД1 на протяжении всего периода беременности было относительно благоприятным, а вводимые дозы инсулина нередко помогали добиться компенсированного течения заболевания.

К началу беременности медианы минимальной и максимальной гликемии варьировали в пределах 6,4 (4,9-7,9) и 9,2 (7,2-10,4) ммоль/л соответственно, необходимая доза инсулина составляла 34 (15-44) ЕД/сут (рис. 4Б). Снижение уровня гликемии и потребности в инсулине в конце 1 триместра было достаточно заметным; доза вводимого инсулина была снижена примерно на 30,0%.

Во 2 триместре потребность в инсулине начинала возрастать, достигая максимума в первую половину 3-го триместра - 40 (29-44) ЕД/сут. Иногда (20,4% случаев, 10 чел.) во 2-м и 3-м триместрах наступали периоды декомпенсации СД1, сопровождавшиеся повышенным уровнем гликемии до 13,0-13,5 ммоль/л, что часто было связано с нарушением диеты или режима инсулинотерапии. Однако у основного числа пациенток 2 группы (79,6%) (39 чел.) течение СД1 в этот период характеризовалось как компенсированное или субкомпенсированное. Медианы минимальной и максимальной гликемии колебались во 2 триместре в пределах 4,2-5,3 и 7,8-8,9 ммоль/л соответственно, значения HbA_{1c} были на уровне 6,7 (6,0-7,4)%. В конце беременности потребность в инсулине незначительно снижалась до 33 (28-36) ЕД/сут.

Для пациенток 3 группы характерны наиболее значительные изменения в течении СД1 и самые высокие уровни гликемии (рис. 4В). Медианы минимального и максимального уровней гликемии в процессе беременности изменялись в широком диапазоне значений: минимальные от 6,0 до 9,9 ммоль/л, а максимальные - от 9,1 до 15,0 ммоль/л. Перед наступлением беременности течение СД1 характеризовалось как декомпенсированное: медианы минимальной и максимальной гликемии определялись на уровне 9,8 (7,2-10,9) и 12,2 (11,2-14,6) ммоль/л соответственно, вводимая доза инсулина в этой группе значительно превышала таковые в других группах и составляла 56 (48-62) ЕД/сут.

В 1 триместре, как и в других группах, наблюдалось снижение уровня гликемии на 25-31% и потребности в инсулине до 44 ЕД/сут.

Затем на протяжении 2 и 3 триместров, характеризовавшихся лабильным и некомпенсированным течением СД1, значения медианы гликемии неуклонно возрастали и в 3 триместре достигали минимальные до 9,2 (7,7-12,2) ммоль/л, максимальные - до 15,0 (12,0-17,5) ммоль/л, а уровень HbA_{1c} поднимался до 8,5 (7,5-9,3)%. Потребность в инсулине, начиная со 2 триместра резко возрастала, достигая максимальных значений в 94-98 ЕД/сут к 29 неделе ($p < 0,01$). У 20% (7 беременных) на протяжении 2 и начала 3 триместров наблюдались явные признаки гипергликемии с характерной для этого состояния клинической картиной.

У большинства женщин 4 группы с гиперпродукцией АТЗ к инсулину течение СД1 перед наступлением беременности и в процессе гестации в 73,6% (39 чел.) случаев характеризовалось как субкомпенсированное (рис. 4Г). На начальных сроках беременности значения медианы минимальной и максимальной гликемии составляли 8,8 (7,2-10,4) и 11,6 (10,2-14,2) ммоль/л, а доза вводимого инсулина - 50 (38-53) ЕД/сут. В течение 1 триместра беременности потребности в инсулине резко снижалась, часто на 30-40% от исходной дозы до 28-32 ЕД/сут.

Начиная со 2 триместра уровень гликемии возрастал и достигал своего максимума к 24-29 нед беременности (медианы минимальной и максимальной гликемии 8,1 ммоль/л и 13,1 ммоль/л соответственно). Потребность в инсулине тоже возрастала максимально к 34 нед до 70-75 ЕД/сут и затем несколько снижалась в последние недели перед родами. Уровень HbA1c составлял 7,8 (6,5-8,6)%, что можно расценивать как состояние субкомпенсированности.

Таким образом, каждой из обследуемых групп женщин, отличающихся определенным набором антиинсулиновых аАТ различных порядков, свойственны различные особенности клинической картины течения СД1:

- в тех случаях, когда уровни АТ1, АТ2 и АТЗ к инсулину не превышают норму, а также при изолированной гиперпродукции АТ1 к инсулину, т.е. в 1 и 2 группах, течение СД1 характеризуется отсутствием существенных колебаний уровней гликемии и потребности в инсулине на всем протяжении беременности. Этой категории больных свойственно стабильно субкомпенсированное течение СД1;

- самая тяжелая картина течения СД1 характерна для пациенток с преимущественной продукцией антирецепторных АТ2 (3 группа). У женщин этой группы отмечается аномально высокий уровень гликемии и повышенная потребность в инсулине практически на всем протяжении беременности, но особенно - во 2-м и 3-м триместрах. Развивающиеся при этом гипергликемические состояния носят тяжелый характер.

- при гиперпродукции антиинсулиновых АТЗ (4 группа) течение заболевания имеет, как правило, субкомпенсированный характер, чаще всего проявляющийся во 2-м и 3-м триместрах. Эти состояния нередко чередуются с периодами декомпенсации. У пациенток этой группы определяется высокая (но более низкая по сравнению с 3 группой) потребность в инсулине, достигающая максимальных значений в 3 периоде гестации. Нестабильный, субкомпенсированный характер течения СД1 у беременных 4 группы, по-видимому, обусловлен дисбалансом эффектов, вызываемых АТ2 и АТЗ.

Важно добавить, что уровни АТ1, АТ2 и АТЗ к инсулину и их соотношение достоверно не изменялись на протяжении всего срока гестации во всех исследованных группах, что может свидетельствовать об отсутствии заметного влияния процесса беременности на их продукцию.

Было сделано предположение, что в тех случаях, когда у беременных с СД1 наблюдается изменение уровней АТ различных порядков к инсулину, может иметь место и изменение экспрессии самих рецепторов к инсулину, а также к глюкозе. Однако, результаты проведенных экспериментов показали, что изменения экспрессии рецепторов инсулина (IR- β) и глюкозы (GLUT-1 и GLUT-4) на лейкоцитах периферической крови беременных женщин с СД1 не зависят от изменения уровней антител различных порядков.

Выявляемые у беременных с СД1 различия в содержании аАТ различных порядков к инсулину, а также соответствующие им особенности углеводного обмена и характера тече-

ния этого заболевания не могут не сказаться как на развитии плода, так и на исходах родов и состоянии новорожденных. Поэтому было проведено изучение состояния новорожденных у женщин всех обследуемых групп.

Известно, что наличие СД1 у беременных существенно образом отражается на физическом развитии их детей [Silva Idos S. et al., 2005; Bonifacio E. et al., 2019]. В то же время, зависимость показателей физического развития от выявленных нами особенностей гуморального аутоиммунитета к инсулину не изучалась.

У обследуемых беременных синдром задержки роста плода (СЗРП) отмечался у 46 женщин из 188 (24,5%); чаще всего - у женщин 3 группы (15 чел. - 42,8%). В остальных группах частота встречаемости СЗРП была следующей: в 1 группе – у 9 (17,6%), во 2 группе – у 6 (12,2%), в 4 группе - у 14 женщин (26,4%).

Данные по массе тела новорожденных представлены в таблице 2. При анализе этих данных видно, что наибольшие отклонения в весе наблюдались у детей женщин 3 группы. У 34,3% из них (12 чел.) масса тела колебалась в диапазоне 2000–3000 г. С микросомией (менее 2000 г) в этой группе было 3 ребенка (8,6%).

Наиболее высокие показатели массы тела новорожденных были отмечены у женщин 2 группы. Так, количество детей с массой более 3 кг у женщин 2 группы было достоверно ($p<0,05$) больше, чем у женщин 3 группы.

Таблица 2

Масса тела новорожденных у матерей с СД1 (в граммах)

Группы женщин	Масса тела новорожденного (грамм)			
	< 2000	2000-3000	3000-4000	>4000
1 гр. – 51 чел.	1 (2,0%)	13 (25,5%)	34 (66,7%)	3 (5,9%)
2 гр. – 49 чел.	-	9 (18,4%)	36 (73,5%)	4 (8,2%)
3 гр. – 35 чел.	3 (8,6%)	12 (34,3%)	20 (57,1%)	-
4 гр. – 53 чел.	1 (1,9%)	17 (32,1%)	34 (64,2%)	1 (1,9%)
Контроль – 32 чел.	-	4 (12,5%)	27 (84,4%)	1 (3,1%)

Одним из наиболее частых видов патологии новорожденных от матерей с СД1 являются нарушения функций ЦНС, в первую очередь - гипоксически-ишемического поражения ЦНС I, II и III степени тяжести. На рисунке 5 представлены различия по степени выраженности таких поражений у новорожденных от матерей исследуемых групп в первые 20 дней жизни. При анализе представленных диаграмм видно, что степени НМК коррелируют с содержанием АТ различных порядков к инсулину.

Наибольшее число новорожденных с гипоксически-ишемическими поражениями ЦНС II и III степени наблюдалось у женщин 3 группы (27 человек – 77,2%), что достоверно больше ($p<0,05$), чем в любой другой группе.

Синдром угнетения ЦНС встречался в 3 группе чаще ($p<0,05$), чем в других группах – у 40% детей. Также чаще здесь диагностировался судорожный синдром – у 31,4% детей ($p<0,05$ по сравнению со 2 группой).

Таким образом, результаты исследования нарушений функций ЦНС у новорожденных свидетельствовали о том, что наиболее благоприятные показатели наблюдались у детей женщин 2 группы, а самые неблагоприятные – у детей женщин 3 группы.

У наблюдавшихся 188 беременных с СД1 роды закончились рождением живых детей. У 1 женщины новорожденный погиб в постнатальном периоде в связи с декомпенсацией наблюдающихся нарушений.

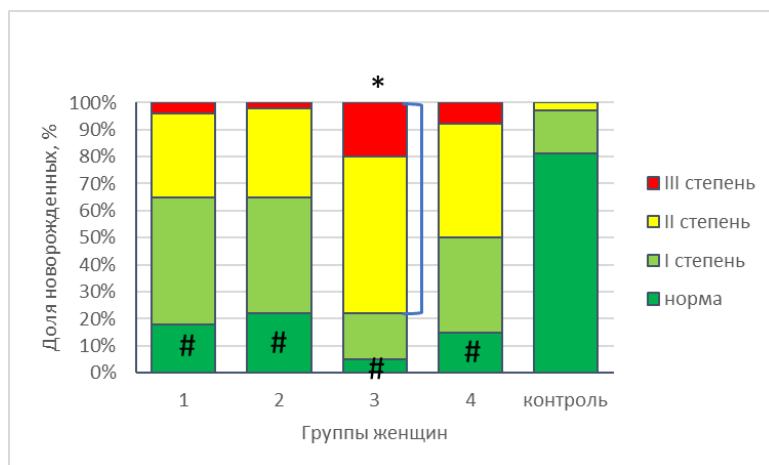


Рис. 5. Степени гипоксически-ишемического поражения ЦНС новорожденных у женщин различных групп. * - отличия от других групп; # - отличия от контрольной группы

Количество преждевременных родов по группам составило 11,8%, 10,2%, 22,9%, 13,2% соответственно. Наблюдалась тенденция к увеличению числа преждевременных родов в 3 группе. В большинстве случаев досрочные роды были вызваны тяжелой формой гестоза и ухудшением внутриутробного состояния плода.

Среди осложнений при родах у новорожденных отмечены состояния асфиксии разной степени тяжести. Частота их встречаемости представлена в таблице 3.

Таблица 3

Степень тяжести асфиксии в различных группах				
Группы	N	Степень асфиксии		
		Лёгкая	Средняя	Тяжёлая
1	51	15 (29,4%)	9 (17,6%)	-
2	49	16 (32,7%)	10 (20,4%)	-
3	35	12 (34,3%)	11 (31,4%)	1 (2,9%)
4	53	21 (39,6%)	13 (24,5%)	-
Контрольная	32	2 (6,3%)	1 (3,1%)	-

Примечание: N – число образцов сыворотки

Как видно из представленной таблицы, наблюдалась тенденция к увеличению более тяжёлых форм асфиксии у женщин 3 группы.

Для анализа взаимосвязи между состоянием здоровья новорожденных и уровнем определяемых аАТ мы разделили новорожденных на несколько групп в соответствии с тяжестью их состояния и особенностями течения раннего неонатального периода.

Выделено 4 группы детей:

- группа Ia – 54 новорожденных (28,7%) с относительно удовлетворительным состоянием при рождении и в раннем неонатальном периоде;
- группа Ib – 62 новорожденных (33,0%) с незначительными поражениями ЦНС при рождении и положительной динамикой состояния в течение раннего неонатального периода
- группа II – 55 новорожденных (29,3%) в состоянии средней тяжести при рождении и в раннем неонатальном периоде;
- группа III – 17 новорожденных (9,0%) с тяжелым состоянием при рождении и в течение раннего неонатального периода.

Распределение этих детей по группам женщин с различным содержанием противои-нсулиновых аАТ представлено на рисунке 6.

При анализе представленных диаграмм видно, что опять наиболее благоприятной в плане показателей здоровья новорожденных оказалась 2 группа женщин с преимущественным повышением АТ1 к инсулину. Только в этой группе детей в тяжелом состоянии было меньше всего – 2,0%. К группе Ia относилось 51,0% детей, что достоверно ($p<0,05$) больше по сравнению со всеми остальными группами.

Наиболее неблагоприятной в отношении состояния новорожденных оказалась 3 группа пациенток. Среди них было 22,8% детей, родившихся в тяжелом состоянии и 45,7% детей в состоянии средней тяжести (в сумме – 68,5%, что больше, чем в других группах, $p<0,05$). В этой группе один ребёнок, родившийся в тяжёлом состоянии, умер в раннем неонатальном периоде.

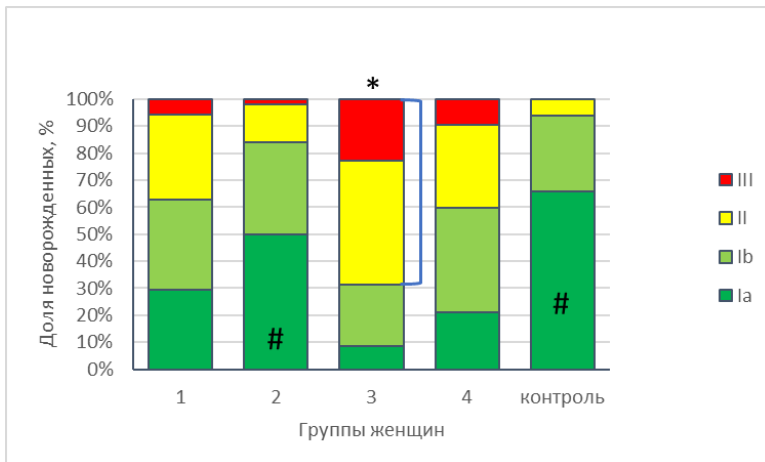


Рис. 6. Состояние здоровья новорожденных у женщин различных групп.
* - отличия от других групп; # - отличия от 1, 3 и 4 групп

В целом, полученные результаты продемонстрировали взаимосвязь между особенностями гуморального аутоиммунитета к инсулину и состоянием здоровья родившихся детей.

Далее приведем краткую клиническую характеристику детей, отнесенных нами к различным клиническим группам.

Все дети группы Ia (54 чел.) родились своевременно и в хорошем или удовлетворительном состоянии, с оценкой по шкале Апгар равной или выше 8 баллов.

Масса тела при рождении по перцентильной шкале оценки для подавляющего большинства детей данной группы (96,3%) (52 чел.) соответствовала диапазону 25-75 П. У 3,7% (2 чел.) новорожденных имели место признаки макросомии с оценкой >75 П.

У части детей (11,1%, 6 чел.) на 2-й день проявилась желтуха, вскоре исчезнувшая.

У 7 детей (13,0%) к началу 2-х суток появились слабые симптомы повышенной нервно-рефлекторной возбудимости. Эти состояния достаточно быстро (в течение 5-6 дней) нормализовались. Все дети этой группы были выписаны в удовлетворительном состоянии.

Для детей группы Ib при рождении характерно удовлетворительное состояние (по шкале Апгар 7-8 баллов) и признаки гипоксически-ишемического поражения ЦНС I степени, выражающиеся в повышенной нервно-рефлекторной возбудимости, расстройствах сна, срыгивании, треморе подбородка, усилении или снижении рефлексов, снижении тонуса мышц. У большинства детей этой группы (54 ребёнка, 87,1%) в первые 3-4 суток не отмечалось значительных нарушений здоровья, однако у 12,9% (8 детей), рожденных в удовлетворительном состоянии, к началу 2-х суток здоровье ухудшилось до среднетяжелого. У этих детей проявились симптомы повышенной нервно-рефлекторной возбудимости и двигательных расстройств, которые достаточно быстро компенсировались соответствующими лечебными мероприятиями. У 6 из них наблюдались гипогликемические состояния, сопровождавшиеся

признаками акроцианоза. В результате предпринятого лечения их состояние быстро улучшалось, хотя при этом у 2 новорожденных сохранялась небольшая мышечная гипотония и невыраженное нарушение рефлекторной активности. При этом выявляемые нарушения ЦНС не превышали легкой степени тяжести.

Группу II (55 детей) составили новорожденные, состояние которых оценивалось как среднетяжелое. Из них 14 детей (25,5%) родилась недоношенными. В состоянии асфиксии средней тяжести родилось 27 детей (49,1%).

Оценка по шкале Апгар в основном не превышала 7 баллов на 1-й минуте, но к 5-й минуте в 74,5% (41 ребёнок) достигала 8 баллов. Масса тела при рождении по перцентильной шкале оценки у 21,8% (12 детей) составляла <25 П с признаками микросомии, и у такого же количества детей имели место признаки макросомии с оценкой >75Ц.

У 34,5% (19 новорожденных) определялся синдром морфофункциональной незрелости, что дополнительно осложнялось серьезной потерей массы тела в первые 3-4 суток.

В течение первых 2 дней жизни у 25,5% (14 новорожденных) состояние ухудшалось от среднетяжелого до тяжелого. Конъюгационная желтуха появилась у 17 (30,9%) детей. Нарушения функции ЦНС характеризовались проявлением симптомов НМК I, II или II–III степени, синдромами гипервозбудимости у 26 детей (47,3%), угнетения функций ЦНС - у 23 детей (41,8%), мышечной дистонией – у 36 детей (65,5%), нарушениями зрения, косоглазием у 3 (5,5%) детей. У 7 детей (12,7%) развился судорожный синдром.

Все новорожденные II группы сразу после рождения получали соответствующее лечение. Большинству детей требовалась интенсивная терапия. Проводились оксигенотерапия, инфузионная, гемостатическая и дегидрационная терапия, искусственная вентиляция легких в случаях дыхательной недостаточности. Дети получали антибиотики, комплекс метаболитов и адаптогенных препаратов.

Практически все новорожденные данной группы в состоянии средней тяжести проходили второй этап выхаживания.

Группа III состояла из 17 новорожденных с тяжелым состоянием. Из них 12 (70,6%) детей родились недоношенными; 16 детей в состоянии асфиксии средней тяжести и 1 ребёнок в состоянии тяжёлой асфиксии. Все дети были маловесными.

Тяжёлое гипоксически-ишемическое поражение ЦНС наблюдалось у 14 детей (82,4%) и характеризовалось тяжелыми нарушениями мозгового кровообращения II и III степени, синдромами гипервозбудимости и угнетения ЦНС, снижением безусловно-рефлекторной активности и мышечной гипотонией, которая в последующем нередко сменялась гипертонусом отдельных групп мышц конечностей и проявлением судорожного синдрома. В результате перенесенной гипоксии у 7 детей (41,2%) развивалась дыхательная недостаточность; у 6 детей (35,3%) формировался отечный синдром.

На 2-4 сутки жизни состояние 2 детей ухудшалось до крайне тяжелого, развивались нарушения микроциркуляции и гемодинамические расстройства, проявлялась конъюгационная желтуха 2 и 3 степени тяжести, а уровень общего билирубина возрастал до 320 мкмоль/л. Один ребёнок погиб в раннем неонатальном периоде.

Детям этой группы требовалось проведение интенсивной терапии с момента рождения. Они получали лечение в отделении интенсивной терапии с использованием оксигенотерапии и искусственной вентиляции легких. Проводилась инфузионная терапия и лечение антибиотиками, комплексом метаболитов, адаптогенных и гемостатических препаратов.

Материалы разделов 5.1, 5.2 и 5.3 опубликованы в журнале Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2022, № 3.

Признаки диабетической фетопатии (ДФ) различной степени выраженности встречались во всех группах новорожденных от матерей с СД1 (таблица 4).

Выявлено, что количество детей без признаков ДФ статистически значимо ($p < 0,001$) уменьшалось с утяжелением состояния новорожденных (в группах Ia, Ib, II). Количество детей с признаками ДФ в группе Ia достоверно меньше ($p < 0,001$) чем в других группах. У детей этой группы отсутствовали признаки выраженной ДФ (кардиомегалия, гепатомегалия, спленомегалия). Количество фенотипических признаков ДФ, встречающихся у одного новорожденного в группе Ia, составляло от 1 до 3. Максимальное количество сочетанных признаков ДФ отмечалось у детей II и III групп и доходило до 6-7 признаков у одного ребенка.

Таблица 4.

Признаки диабетической фетопатии у новорожденных от матерей с СД1

Признаки ДФ	Ia (54 чел.)	Ib (62 чел.)	II (55 чел.)	III (17 чел.)
кардиомегалия	-	-	7 (12,7%)	4 (23,5%)
гепатомегалия	-	6 (9,9%)	35 (63,6%)	13 (76,4%)
спленомегалия	-	-	4 (7,3%)	2 (11,6%)
лунообразное лицо	7 (12,9%)	15 (25%)	39 (70,9%)	14 (82,4%)
одутловатость лица	3 (5,5%)	13 (20,9%)	16 (29%)	3 (17,6%)
заплывшие глаза	-	9 (14,5%)	15 (27,3%)	6 (35,3%)
пастозность мягких тканей	4 (7,4%)	47 (75,8%)	51 (92,7%)	16 (94,1%)
короткая шея	5 (9,3%)	11 (17,7%)	25 (45,5%)	3 (17,6%)
короткие конечности	-	2 (3,3%)	13 (23,6%)	3 (17,6%)
выраженный плечевой пояс	-	3 (4,8%)	9 (16,4%)	2 (11,6%)
гипертрихоз	-	-	10 (18,1%)	5 (29,4%)
избыточный вес	2 (3,7%)	5 (8,1%)	12 (21,8%)	-
нет признаков ДФ	46 (85,2%)	32 (51,6%)	9 (16,4%)	1 (5,9%)

Литературные данные свидетельствуют о взаимосвязи состояния плода/новорожденного от особенностей антиинсулиновой иммунореактивности матерей с диагнозом СД1 [Bonifacio E. et al., 2019; Penno M.A., 2020]. Избыточные количества антиинсулиновых антител, переносимых трансплацентарно к плоду могут существенно влиять на развитие плода и состояние новорожденного.

Было показано влияние особенностей гуморального иммунитета к инсулину у новорожденных на тяжесть их состояния.

На рисунке 7 представлены результаты сопоставления состояния здоровья новорожденных, относящихся к группам Ia, Ib, II и III с содержанием у них АТ1, АТ2 и АТ3 к инсулину. Чем выше содержание у ребёнка АТ2 к инсулину, тем более тяжелое его состояние, т.е. мы видим их повышение от группы Ia к группе III ($p < 0,05$). Между группами Ia и II тоже наблюдалась достоверная разница по уровню АТ2 ($p < 0,05$).

Что касается уровней АТ1 и АТ3, то тут наблюдается противоположная картина. От группы Ia к группе III наблюдается достаточно равномерное снижение их содержания, причем для АТ3 это снижение носило достоверный характер ($p < 0,05$).

У детей группы Ia наблюдалось самое высокое содержание антиинсулиновых АТ1 и АТ3. Эти результаты дают основание рассматривать повышенное содержание антиинсулиновых АТ1 и АТ3 как положительный фактор для организма новорожденных при СД1 у их

матерей. Можно предположить, что высокие уровни АТ1 и АТ3 способствуют снижению отрицательного воздействия трансплацентарно поступающих к плоду повышенных количеств материнских антирецепторных АТ2. В тоже время, избыточные количества АТ1, связывая циркулирующий в крови ребенка эндогенный инсулин, помогают защитить его от протеолиза и пролонгируют его активность. АТ3 теоретически тоже могут связывать инсулин, однако эта связь на порядок слабее. При этом, вероятно, у самих новорожденных продукция собственных антиинсулиновых АТ1 и АТ3 вполне может оказаться недостаточной для блокирования избыточных количеств материнских АТ2, проникающих при беременности трансплацентарно.

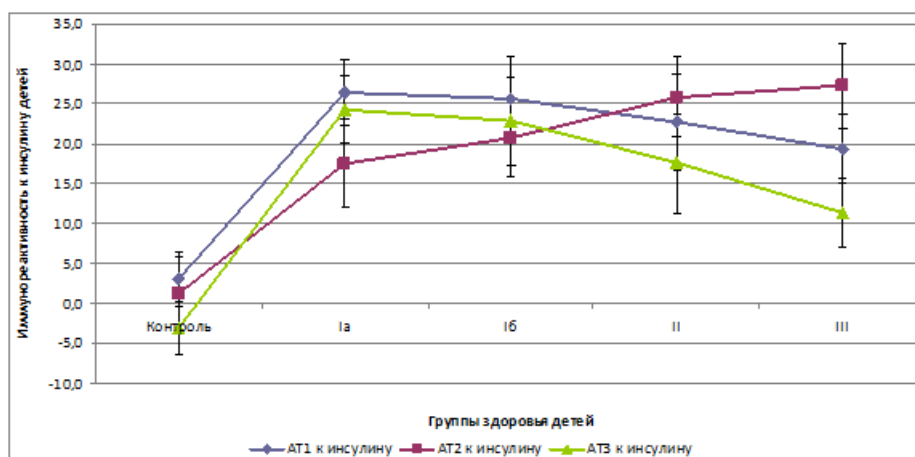


Рис. 7. Взаимосвязь между здоровьем новорожденных от матерей с СД1 и содержанием АТ1, АТ2 и АТ3 к инсулину.

Анализ основных параметров гликемии был проведен у всех 188 новорожденных от матерей с СД1. У 104 детей (55,3%) медианы среднесуточного уровня глюкозы в крови соответствовали значениям, характерным для здоровых новорожденных (2,0–5,6 ммоль/л). Отклонения от нормального уровня выявлены у 84 новорожденных (44,7%), из них синдром гипогликемии отмечен у 46 детей (24,5%), а гипергликемии – тоже у 38 новорожденных (20,2%). Частота проявления гипер- и гипогликемических состояний по группам детей представлена на рисунке 8.

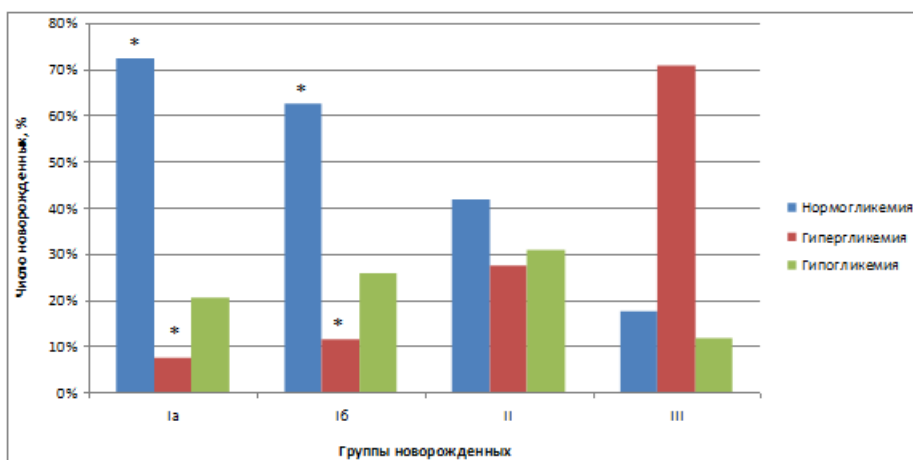


Рис. 8. Частота проявления среднесуточной нормогликемии, гипо- и гипергликемии в группах новорожденных в зависимости от тяжести их состояния.

*- $p < 0,01$ по сравнению с группой III

Нормогликемия чаще всего определялась у новорожденных с удовлетворительным состоянием или с незначительными отклонениями в группах Ia и Ib. Так, в первые сутки жизни нормальный уровень глюкозы в этих группах отмечен у 39 (72,2%) и 39 (62,9%) детей

соответственно, что достоверно выше ($p < 0,01$), чем в группе III (17,6%, 3 чел.).

Частота проявлений дисглюкоземии возрастала по мере утяжеления состояния новорожденных: от 27,8% (15 чел.) в группе Ia до 82,4% (14 чел.) в группе III ($p < 0,05$).

Анализируя взаимосвязь зависимости особенностей гликемии новорожденных от содержания в их крови АТ различного порядка к инсулину, мы видим, что если взять детей с дисглюкоземией Ia и Ib групп, для которых, в целом, характерно повышение АТ1 к инсулину, то гипогликемия встречалась в 71,1% (27 чел.) случаев, что выше, чем в III группе (2 чел., 14,3%, $p < 0,05$). Соответственно, среди детей Ia и Ib групп с дисглюкоземией количество детей с гипергликемией (11 чел., 28,9%) меньше, чем в III группе (12 чел., 85,7%, $p < 0,05$).

Исходя из этого можно сделать вывод о том, что АТ2, как было показано выше, блокируя рецепторы инсулина, создают основу для инсулинорезистентности, а АТ3 к инсулину, синтез которых индуцируется соответствующими АТ2, связывают АТ2 и тем самым блокируют их патогенное действие.

ВЫВОДЫ

1. Разработана иммуноферментная тест-система для определения антител первого, второго и третьего порядка к инсулину (АТ1, АТ2 и АТ3) (коэф. вариации 7,2-9,1%). Показано, что АТ2 к инсулину способны взаимодействовать с рецепторами инсулина.
2. При сахарном диабете 1 типа (СД1) повышенная продукция антиинсулиновых антител минимум одного из трех порядков - АТ1, АТ2 и АТ3 - установлена у 79,2% женщин. По мере возрастания преимущественно максимальных значений АТ от 1-го до 3-го порядков, увеличивалась давность заболевания.
3. Течение СД1 до и во время беременности во многом зависит от уровней АТ к инсулину различных порядков. При отсутствии повышенных уровней определяемых АТ к инсулину и при преимущественном повышении АТ1 к инсулину, как правило, удается добиться компенсации или субкомпенсации процесса. При преимущественном повышении АТ2 к инсулину у большинства пациентов (85,7%) не удается добиться компенсации СД1. Повышенный уровень АТ3 к инсулину способствует субкомпенсации процесса.
4. Показано снижение экспрессии рецепторов глюкозы (GLUT-1 и GLUT-4) и тенденция к снижению экспрессии рецепторов инсулина на лейкоцитах периферической крови беременных с СД1 на сроке от 13 до 24 нед, которые не зависели от уровней антител различных порядков к инсулину.
5. Показана взаимосвязь между особенностями гуморального иммунитета к инсулину и состоянием здоровья родившихся детей у матерей с СД1. При повышении уровней АТ к инсулину какого-либо порядка (АТ1, АТ2 или АТ3) наилучшие показатели здоровья новорожденных отмечаются у женщин с преимущественным повышением АТ1 к инсулину, наиболее низкие – с преимущественным повышением АТ2 к инсулину. Повышение материнских АТ3 к инсулину способствует улучшению состояния здоровья новорожденных.
6. Показана взаимосвязь между АТ1, АТ2 и АТ3 к инсулину у женщин с СД1 и состоянием здоровья новорожденных. Повышение уровня АТ1 и АТ3 к инсулину способствует улучшению, а АТ2 – ухудшению показателей здоровья новорожденных.
7. При преимущественном повышении АТ1 к инсулину у новорожденных от матерей с СД1 характерно развитие гипогликемических состояний, при повышении антирецепторных АТ2 к инсулину отмечается тенденция к развитию гипергликемических состояний.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

С целью прогнозирования состояния здоровья новорожденных у женщин с СД1, прогноза течения у них СД1, мониторинга проводимой терапии, рекомендуем проводить им комплексное определение АТ1, АТ2 и АТ3 к инсулину.

СПИСОК ОСНОВНЫХ НАУЧНЫХ ТРУДОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список статей в рецензируемых научных изданиях по специальности

3.3.3. Патологическая физиология, и приравненные к ним публикации

1. Проценко А.М. Влияние аутоантител к инсулину у беременных с сахарным диабетом 1 типа на состояние новорожденных // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2022. – Т. 66. – № 3. – С. 59-68.
2. Проценко А.М. Влияние антител различных порядков к инсулину на течение сахарного диабета первого типа до и во время беременности // Патогенез. – 2022. – Т. 20, № 2. – С. 29–37.
3. Папышева О.В., Захарова И.А., Проценко А.М., Будыкина Т.С., Морозов С.Г., Кожевникова Е.Н. Аутоиммунные нарушения у матери с сахарным диабетом в генезе перинатальной патологии // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2018. – Т. 17, № 4. – С. 111–119.
4. Проценко А.М., Будыкина Т.С., Морозов С.Г., Аникина О.М., Бурумкулова Ф.Ф., Петрухин В.А. Особенности течения сахарного диабета I типа у беременных в зависимости от уровней аутоантител к инсулину // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2010. – № 4. – С. 17–22.

Список публикаций в материалах конференций

1. Проценко А.М. Нарушения функции ЦНС у новорожденных от матерей с сахарным диабетом 1 типа с различной антиинсулиновой иммунореактивностью // Патогенез. – 2022. – Т. 20, № 3. – С. 102.
2. Проценко А.М. Взаимосвязь между состоянием здоровья новорожденных от женщин с сахарным диабетом 1 типа и содержанием у них антител к инсулину // VI Междисциплинарная конференция с международным участием СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ СИСТЕМНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ, посвященная 90-летию со дня рождения академика К.В. Судакова, 6-8 июля 2022 г., Москва. Тезисы докладов. – С. 438-439.
3. Проценко А.М., Морозов С.Г. Экспрессия рецепторов инсулина и глюкозы на лейкоцитах крови беременных женщин с диабетом 1 типа // Сборник РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ под ред. В.П. Зинченко, А.В. Бережнова. Пущино: Изд-во Типография Пятый Формат. – 2019. – С. 77-81.
4. Проценко А.М., Морозов С.Г. Особенности экспрессии рецепторов глюкозы на лимфоцитах периферической крови беременных женщин с диабетом 1 типа // Аллергические и иммунопатологические заболевания – проблема XXI века. Сборник материалов XI Всероссийской научно-практической конференции. СПб.: Изд-во Санкт-Петербургское региональное отделение общественной организации «Союз педиатров России». – 2019. – С. 20-21.
5. Будыкина Т.С., Петрухин В.А., Гришин В.Л., Аксенов А.Н., Проценко А.М., Морозов С.Г. Аутоиммунные аспекты перинатальных поражений нервной системы детей у матерей с сахарным диабетом // Патогенез. – 2010. – Т.8, №1. – С. 32–33.

Список используемых сокращений:

аАТ – аутоантитела

АИАТ – антиидиотипические антитела

АТ - антитела

АТ1 – антитела первого порядка

АТ2 – антитела второго порядка

АТ3 – антитела третьего порядка

ДФ – диабетическая фетопатия

ИМТ – индекс массы тела

ИФА – иммуноферментный анализ

СД 1 – сахарный диабет первого типа

СЗРП – синдром задержки роста плода

PBS – полибуфер (Phosphate Buffered Saline)