



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

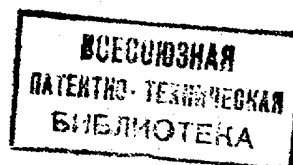
(19) SU (11) 1767433 A1

(51)5 G 01 N 33/53

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



1

(21) 4764167/14

(22) 27.11.89

(46) 07.10.92. Бюл. № 37

(71) Пермский государственный медицинский институт

(72) А.А.Быкова, Т.А.Юшкова и Е.В.Быкова

(56) 1. Потемкин В.В. Эндокринология, М., 1986, с. 250.

2. Taylor S. - Clin Res - 1987, 35, № 5, p. 459-472.

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ИММУННОГО ГЕНЕЗА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ I ТИПА

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к лабораторной диагностике инсу-

2

линорезистентности и ее генеза у больных сахарным диабетом I типа. Цель изобретения - повышение точности диагностики. Активированные *in vitro* инсулином лимфоциты донора обрабатывают цельной сывороткой крови больного при температуре +37°C в течение 30 мин, добавляют к ним эритроциты барана, сенсibilизированные инсулином, при снижении числа розеткообразующих клеток в 2 и более раз диагностируют инсулинорезистентность иммунного генеза. Способ дает возможность чувствительной и объективной диагностики инсулинорезистентности и ее генеза, что важно в плане ее своевременной специфической профилактики и терапии.

Изобретение относится к области медицины, а именно к лабораторной диагностике инсулинорезистентности и ее генеза у больных сахарным диабетом I типа.

Наиболее часто встречается иммунный тип инсулинорезистентности - прототип (Потемкин В.В. Эндокринология, - М., 1986 г., с. 250). Одним из факторов ее генеза является образование антител к инсулинорецепторам (Tan for S. Clin Res. - 1987, У.35, - 1 № 5. - P. 459-472).

Однако, методов выполнения этих антител, пригодных для клиники, в доступной нам медицинской литературе, мы не встретили.

Целью изобретения является повышение точности диагностики.

Способ осуществляют следующим образом.

В две центрифужные пробирки (одна - для определения исходного содержания ин-

сулиновых розеток в активированной гормоном суспензии лейкоцитов крови донора; другая - для изучения действия на лейкоциты сыворотки крови больного) забирают по 0,1-0,2 мл крови донора в 0,1-0,2 мл 5% свежеприготовленного раствора цитрата натрия для предупреждения свертывания крови. После тщательного встряхивания содержимого пробирок в него вносят для лизирования эритроцитов по 0,8-0,9 мл дистиллированной воды. Смесь встряхивают в течение 10-3,0 сек и добавляют до 10 мл питательную среду 199. Суспензии клеток центрифугируют в течение 5-6 мин при 1500 об/мин, после чего надосадочную жидкость отсасывают пипеткой, вновь добавляют 1 мл среды 299 и снова центрифугируют. Отсосав надосадочную жидкость, лимфоциты осадков активируют инсулином, для чего в пробирки вносят по 0,01 Ед бычьего инсулина, содержащегося в 0,25 мл пи-

(19) SU (11) 1767433 A1

тательной среды. Осадок осторожно встряхивают и смесь инкубируют при температуре +37°C в течение 30 мин. После инкубации смесь лейкоцитов в обеих пробирках отмывают от гормона с помощью 10 мл изотонического раствора натрия хлорида центрифугированием при 1500 об/мин, в течение 5–6 мин. Затем осадок первой пробирки оставляют временно без воздействия. Осадок второй пробирки соединяют с 0,1–0,2 мл исследуемой, полученной путем отстаивания крови, деконплементированной сыворотки крови больного, осторожно встряхивают и инкубируют при температуре +37°C в течение 30 мин.

После инкубации с сывороткой лейкоциты отмывают изотоническим раствором натрия хлорида (10 мл) путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 5–6 мин. Надосадочную жидкость отсасывают пипеткой, после чего осадки в обеих пробирках ресуспендируют в 0,1–0,2 мл изотонического раствора натрия хлорида pH –7,2. К полученным взвесям лейкоцитов добавляют по 0,1–0,2 мл 0,5% взвеси эритроцитного диагностикума, и смесь инкубируют при температуре +37°C в течение 10–15 мин, а затем в течение 18 ч в условиях холодильника. Через 18 ч в обе пробирки добавляют по 1 мл 50%-ного раствора бычьей сыворотки, центрифугируют смеси при 1500 об/мин 5–6 мин, надосадочную жидкость сливают, а из осадков делают мазки, которые высушивают на воздухе, фиксируют в этиловом спирте 20–25 мин и окрашивают по Романовскому-Гимза. Просматривают под микроскопом при 900-кратном увеличении 100 лимфоцитов, отмечая среди них число (в процентах) лимфоцитов, фиксировавших на себе три и более эритроцитов (розеткообразующие клетки – РОК). Суспензия лейкоцитов донора считается активированной гормоном, если в ней содержится от 20% и более розеткообразующих лимфоцитов, специфичных инсулину. При наличии в сыворотке крови больного антител к инсулинорецепторам отмечается блокада ими инсулинорецепторов лимфоцитов крови донора с резким (в 2 – 10 раз и более) уменьшением числа РОК, взаимодействующих с гормоном, фиксированным на эритроцитах барана. На основании этих данных ставится диагноз инсулинорезистентности иммунного генеза.

Для приготовления диагностикума используют эритроциты барана, обработанные гютаровым альдегидом. Свежие эритроциты барана трижды отмывают изотоническим раствором натрия хлорида (pH-7,2), центрифугируя взвесь в течение 5

минут при 1500 об/мин. Из отмытых эритроцитов готовят 5% взвесь, соединяя 0,5 мл осадка эритроцитов и 9,5 мл забуференного изотонического раствора натрия хлорида pH-7,2. При гютаризации смешивают 5% взвесь эритроцитов с 0,25% свежеприготовленным раствором гютарового альдегида в соотношении 1:1. Выдерживают смесь при температуре +37°C в течение 15 мин, после чего эритроциты тщательно отмывают от гютарового альдегида забуференным изотоническим раствором натрия хлорида и доводят тем же раствором до первоначального объема (5% взвесь). Приготовленные таким образом эритроциты хранятся при температуре +14°C в течение 6 месяцев.

Для сенсibilизации эритроцитов инсулином гютаризированные эритроциты отмывают изотоническим раствором натрия хлорида pH-6,4 и доводят им же взвесь до первоначального объема. Затем соединяют с раствором инсулина, содержащим 20 ЕД в мл, в соотношении 1:1. Смесь оставляют при комнатной температуре на 20 мин, после чего отмывают дважды забуференным раствором натрия хлорида pH-7,2. Слив надосадочную жидкость, доводят объем до первоначального (5% взвесь). В реакции используют 0,5% взвесь сенсibilизированных эритроцитов, которую готовят из исходной (5%) взвеси путем соединения 1 мл ее с 9 мл среды 199.

Пример 1. Больная П-ва Т.В. 1968 года рождения. Поступила в эндокринологическое отделение ОКБ г. Перми 28 октября 1988 года с жалобами на тошному, головную боль, периодически наступающее ощущение слабости. Больна с 1981 года, когда появились жажда, значительное похудание. В сентябре 1981 года после перенесенной ангины состояние резко ухудшилось и в тяжелом состоянии была госпитализирована в ОКБ, где был установлен диагноз сахарного диабета. С 1981 года периодически лечится с эндокринологическом отделении ОКБ. Объективно: рост 165 см, вес 64 кг. Кожные покровы гиперемированы, руброз щек, язык ярко-красный. Содержание сахара в крови – 10,8 – 8,19; 12,0; 16,1; 11,6; 9,8; 12,2 м/моль/л. Содержание сахара в моче – 5,6 – 2,8; 0,8; 1,2%. Больная получает 56 ЕД инсулина для инъекций.

Диагноз: сахарный диабет, 1 тип, средней тяжести, декомпенсированный, рецидивирующий. Кетоацидоз. Липодистрофия, печени. Инсулинорезистентность.

При исследовании крови больной в две центрифужные пробирки забрали 0,1 мл крови донора в 0,1 мл 5% свежеприготовленного раствора цитрата натрия. После

тщательного встряхивания содержимого пробирок в него внесли по 0,8 мл дистиллированной воды. В смеси после встряхивания в течение 10 секунд добавили до 10 мл среды 199. Затем суспензии клеток отцентрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин надосадочную жидкость отсосали пипеткой, добавили 1 мл среды 199 и снова отцентрифугировали. Отсосав надосадочную жидкость, лимфоциты осадка проактивировали инсулином, для чего в пробирки внесли по 0,001 ЕД инсулина, содержащегося в 0,25 мл среды 199. Смесь инкубировали при температуре +37°C в течение 30 мин. После инкубации смесь лейкоцитов в обеих пробирках отмывали от гормона с помощью 10 мл изотонического раствора натрия хлорида центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин. Осадок одной пробирки соединили в 0,1 мл исследуемой сыворотки крови больного, встряхнули смесь и проинкубировали при температуре +37°C в течение 30 мин. Затем дейкоциты отмыли изотоническим раствором натрия хлорида (10 мл) путем центрифугирования и отсосали надосадочную жидкость. Далее осадки в обеих пробирках ресуспендировали в 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида и к обеим взвесям добавили по 0,1 мл 0,5% взвеси эритроцитарного диагностикума, после чего проинкубировали их при температуре +37°C в течение 10 мин, а затем в течение 18 часов в условиях холодильника. Через 18 часов в обе пробирки добавили по 1 мл 50%-ного раствора бычьей сыворотки и процентрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость слили, а из осадков сделали мазки, которые высушили, зафиксировали этиловым спиртом в течение 20 мин и окрасили по Романовскому-Гимза, после чего просмотрели в мазках 100 лимфоцитов, отметив среди них число лимфоцитов, фиксировавших на себе три и более эритроцита.

При исследовании сыворотки крови больной заявляемым способом в ней обнаружены аутоантитела к инсулинорецепторам, так как сыворотка заблокирована инсулинорецепторы активированных лимфоцитов крови донора и уменьшила число инсулиновых розеток с 55% до 9%. Заключение: на основании данных проведенного анализа поставлен диагноз инсулинорезистентности иммунного генеза, обусловленной действием антирецепторных антител.

Пример 2. О-ев А.А., 28 лет, поступил в эндокринологическое отделение ОКБ Г. Перми 27 сентября 1988 года с жалобами на общую слабость, жажду, жидкий стул. Болен

в течение 11 лет, в первые два года болезни перенес пять диабетических ком. В последние 4 года наблюдается частые гипогликемии. Объективно: больной пониженного питания, вес 59 кг. Запах ацетона изо рта. Язык обложен. При пальпации отмечается болезненность в эпигастрии. Печень увеличена и выступает из-под подреберья на два поперечных пальца. Содержание сахара в крови: 10,0–15,5–11,0–7,0–21,2 м/моль/л. Содержание сахара в моче: 3,6–3,8–3,6–2,6%, ацетон +. Больной получает 54 ЕД инсулина для инъекций.

5 Диагноз: сахарный диабет I типа, тяжелое течение. Кетоацидоз. Диабетическая энцефалопатия. Нефропатия II. Пиелонефрит. Диабетический гепатит. Ретинопатия I. Инсулинорезистентность.

20 При исследовании крови больного в две центрифужные пробирки забрали 0,1 мл крови донора в 0,1 мл 5% свежеприготовленного раствора цитрата натрия. После тщательного встряхивания содержимого пробирки в него внесли по 0,8 мл дистиллированной воды. В смеси после встряхивания в течение 10 секунд добавили до 10 мл среды 199. Затем суспензии клеток отцентрифугировали в течение 5 минут при 1500 об/мин, надосадочную жидкость отсосали пипеткой, добавили 1 мл среды 199 и снова отцентрифугировали. Отсосав надосадочную жидкость, лимфоциты осадка проактивировали инсулином, для чего в пробирки внесли по 0,001 ЕД инсулина, содержащего в 0,25 мл среды 199. Смесь инкубировали при температуре +37°C в течение 30 мин. После инкубации смесь лейкоцитов в обеих пробирках отмыли от гормона с помощью 10 мл изотонического раствора натрия хлорида центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин. Осадок одной пробирки соединили с 0,1 мл исследуемой сыворотки крови больного, встряхнули смесь и проинкубировали при температуре +37°C в течение 30 мин. Затем лейкоциты отмыли изотоническим раствором натрия хлорида (10 мл) путем центрифугирования и отсосали надосадочную жидкость. Далее осадки в обеих пробирках ресуспендировали в 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида и к обеим взвесям добавили по 0,1 мл 0,5% взвеси эритроцитарного диагностикума, после чего проинкубировали их при температуре +37°C в течение 10 мин, а затем в течение 18 ч в условиях холодильника. Через 18 ч в обе пробирки добавили по 1 мл 30%-ного раствора бычьей сыворотки и процентрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость слили, а из осадков

сделали мазки, которые высушили, зафиксировали этиловым спиртом в течение 20 мин и окрасили по Романовскому-Гимза, после чего просмотрели в мазках 100 лимфоцитов, отметив среди них число лимфоцитов, фиксировавших на себе три и более эритроцитов.

При исследовании сыворотки крови больного заявленным способом обнаружены аутоантитела к инсулинорецепторам, так как сыворотка заблокирована инсулинорецепторы активированных лимфоцитов донора и уменьшила число инсулиновых розеток в суспензии лейкоцитов донора с 55% до 5%.

Заключение: у больного диагностирована инсулинорезистентность иммунного генеза, обусловленная антирецепторными антителами.

Пример 3: П-в И.М., 30 лет, практически здоров. Объективно: нормального телосложения, вес 64 кг. Язык чистый. Дыхание и сердечно-сосудистая система без особенностей. Живот мягкий, безболезненный. Содержание сахара в крови в пределах нормы. При исследовании сыворотки крови в две центрифужные пробирки забрали 0,1 мл крови донора в 0,1 мл 6% свежеприготовленного раствора цитрата натрия. После тщательного встряхивания содержимого пробирок в него внесли по 0,6 мл дистиллированной воды. В смеси после встряхивания в течение 10 сек добавили до 10 мл среды 199. Затем суспензии клеток отцентрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин, надосадочную жидкость отсосали пипеткой, добавили 1 мл среды 199 и снова отцентрифугировали. Отсосав надосадочную жидкость лимфоциты осадка проактивировали инсулином, для чего в пробирки внесли по 0,001 ЕД инсулина, содержащегося в 0,25 мл среды 199. Смесь инкубировали при температуре +37°C в течение 30 мин. После инкубации смесь лейкоцитов в обеих пробирках отмыли от гормона с помощью 10 мл изотонического раствора натрия хлорида центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин. Осадок одной пробирки соединили с 0,1 мл исследуемой сыворотки крови, встряхнули смесь и проинкубировали при температуре +37°C в течение 30 мин. Затем лейкоциты отмыли изотоническим раствором натрия хлорида (10 мл) путем центрифугирования и отсосали надосадочную жидкость. Далее осадки в обеих пробирках ресуспендировали в 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида и к обеим взвесям добавили по 0,1 мл 0,5% взвеси эритроцитарного диагностикума, после чего проинкубировали их при температуре +37°C в течение 10 мин, а затем в течение 18 ч в условиях холодильника. Через

18 ч в обе пробирки добавили по 1 мл 50%-ного раствора бычьей сыворотки и процентрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость слили, а из осадков сделали мазки, которые высушили, зафиксировали этиловым спиртом в течение 20 мин и окрасили по Романовскому-Гимза, после чего просмотрели в мазках 100 лимфоцитов, отметив среди них число лимфоцитов фиксированных на себе три и более эритроцита.

В результате исследования установлено, что обработка лимфоцитов донора, стимулированных инсулином, сывороткой крови здорового человека числа инсулиновых розеток не изменяет (41% – до обработки и 43% после обработки клеток). Заключение: антител к инсулинорецепторам в крови здорового человека нет, инсулинорезистентность исключается.

Для доказательства того, что мы имеем дело с антителами к инсулинорецепторам, а также для доказательства специфичности способа проводилась адсорбция антител к инсулинорецепторам из сыворотки крови больного путем двойной обработки исследуемых сывороток крови больных активированными в условиях подкожным введением инсулина в дозе 0,25 КД/кг массы спленоцитами крысы. Цель активации – экспрессия на мембране спленоцитов крысы инсулинорецепторов. После адсорбции спленоцитами, активированными инсулином, но любым другим соединением (гистамином, серотонином), сыворотки больных теряли способность блокировать образование розеток, специфичных инсулину. Так, если до адсорбции сыворотка крови больного Манылова уменьшала число инсулиновых розеток в суспензии лейкоцитов крови донора с 38% до 12%, то после истощения спленоцитами крысы она утратила эту способность, и число инсулиновых розеток в суспензии клеток крови донора после обработки их адсорбированной сывороткой больного не отличалась от исходного (34%).

Преимущества предлагаемого способа заключаются в его высокой специфичности, точности, чувствительности, малом количестве (0,1–0,2 мл) крови, забираемой как у донора, так и у больного, простоте технического исполнения способа и чтения его результатов, в необходимости минимальных количеств доступных реактивов и несложного оборудования, что позволяет осуществлять проведение способа в условиях клиники (больницы), в отсутствие необходимости привлечения высококвалифицированных кадров для выполнения способа. Выяснение генеза неэффективности инсу-

линотерапии, обусловленной разными иммунными факторами (антителами к инсулину, инсулинорецепторам и т.д.), представляет большой практический интерес, являясь основой для рациональной гормонотерапии, иммуносупрессивного и других видов лечения.

Способ дает возможность объективной диагностики инсулинорезистентности и ее генеза, что важно в плане ее своевременной специфической профилактики и терапии.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ определения инсулинорезистентности иммунного генеза у больных са-

харным диабетом I типа, включающий забор крови, выделение сыворотки с последующим ее исследованием, о т л и ч а ю щ и й - с я тем, что, с целью повышения точности диагностики, сыворотку больного инкубируют с обработанными инсулином лимфоцитами донора при 37°C в течение 30 мин, далее добавляют сенсibilизированные инсулином эритроциты барана, подсчитывают количество розеткообразующих клеток и при снижении их количества по сравнению с количеством розеткообразующих клеток без сыворотки в два раза диагностируют инсулинорезистентность.

Редактор С. Кулакова

Составитель В. Литовченко
Техред М.Моргентал

Корректор Н. Милюкова

Заказ 3546

Тираж

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул.Гагарина, 101