

Роль Th1/Th2 дисбаланса иммунного ответа в детерминации клинических особенностей аутоиммунного сахарного диабета взрослых

Саприна Т.В., Лазаренко Ф.Э., Прохоренко Т.С., Рязанцева Н.В., Ворожцова И.Н.

ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск
(ректор — академик РАМН В.В. Новицкий)

Цель. Установить закономерности Th1/Th2-поляризации иммунного ответа у больных латентным аутоиммунным диабетом взрослых — latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA) и ее роль в реализации клинического фенотипа заболевания.

Материал и методы. В исследование было включено 70 пациентов в возрасте от 21 до 61 года (средний возраст — $41,3 \pm 1,0$ г.). Диагноз сахарного диабета (СД) устанавливался на основании критериев ВОЗ (1999 г.). Выделено несколько групп: группу с СД 1 типа (СД1) составили 13 человек ($34,6 \pm 7,2$ г.), с СД 2 типа (СД2) — 57 человек ($43,6 \pm 7,6$ г.). Среди пациентов с диагнозом СД2, согласно критериям P. Zimmet, были отобраны пациенты с вероятным LADA — 27 человек ($41,2 \pm 1,6$ г.).

Проводили определение присутствия в сыворотке у больных аутоантител (АТ) к декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GAD65), к клеткам островков Лангерганса (ICA) и к инсулину (IAA), определение С-пептида в сыворотке у больных, полученной утром натощак и на 120-й мин стандартного теста толерантности к глюкозе (ТТГ), методом твердофазного иммуноферментного анализа по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем. Учет результатов иммуноферментного анализа проводили с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 405 нм для GAD и ICA, 450 нм — для IAA и С-пептида. Концентрации GAD, IAA и С-пептида вычислялись автоматически по калибровочным кривым.

Мононуклеарные лейкоциты выделяли на градиенте плотности фиколл-верографин. Для получения супернатантов выделенные клетки ресуспендировали в полной питательной среде, стандартизируя их количество до $2,0 \times 10^6$ /мл. Для стимуляции мононуклеарных лейкоцитов в пробы вносили фитогемагглютинин («Difco», Германия) (10 мкг на 1 мл) с дальнейшей инкубацией клеточных суспензий в течение 24 ч.

Определяли спонтанные и фитогемагглютинин (ФГА)-стимулированные уровни интерлейкинов-2, -4 и -10 (IL-2, IL-4, IL-10) в супернатантах клеточных культур с использованием твердофазного иммуноферментного метода по инструкциям, предлагаемым производителем, учет результатов осуществляли при длине волны 450 нм.

Результаты. АТ хотя бы одного типа (GAD, ICA или IAA) выявлены у 24,3% пациентов среди всех больных СД (17/70). Причем среди больных с клиническим фенотипом СД2 — у 18% (10/57). Концентрация GAD- и ICA-АТ и процент АТ-положительных пациентов были выше у пациентов с LADA, а IAA — в группе с СД1 с классическим вариантом развития. Одновременно два типа АТ присутствовали у 17% (4/23) пациентов с аутоиммунным СД без статистически значимых различий между группами LADA и СД1. Пациенты с LADA характеризовались достоверно более низким базальным уровнем С-пептида, чем пациенты с СД2. Отмечена тенденция к более низкой стимулированной секреции С-пептида при LADA, по сравнению с пациентами с СД2, что отражает снижение секреторной способности β -клеток при их аутоиммунном повреждении.

В нашем исследовании отмечено повышение базальной продукции интерферона-гамма (IFN- γ) мононуклеарными лейкоцитами крови у всех пациентов с СД. Достоверных различий между подгруппами пациентов с СД зарегистрировано не было. Митоген-стимулированная продукция у всех пациентов с СД также достоверно отличалась от контрольных значений в сторону уменьшения, без существенных различий между подгруппами пациентов с разным фенотипом СД. У пациентов с СД2 отмечался инвертированный тип секреции IL-2, в отличие от аутоиммунного диабета; различия были достоверны по сравнению с контролем. Отмечена тенденция к более высокой базальной продукции мононуклеарными лейкоцитами IL-4 у больных LADA и СД2 по сравнению с пациентами с СД1. ФГА-стимулированная продукция IL-4 при LADA и СД2 была также достоверно выше, чем при СД1. Это, вероятно, отражает патогенетические особенности функционирования Т-звена иммунной системы при LADA, отличные от механизмов развития СД1, и определяющие медленное повреждение β -клеток при этом заболевании, что фенотипически приближает LADA к СД2. При оценке базальной продукции IL-10 установлено достоверно более высокое его содержание в супернатантах у пациентов, страдающих LADA, затем — при СД2 и наименьшее — у больных СД1. Наиболее высокий уровень ФГА-стимулированной продукции IL-10 отмечался у пациентов, страдающих LADA и СД2, минимальный — у больных СД1. Высокий уровень базальной и ФГА-стимулированной продукции IL-10 мононуклеарными лейкоцитами при LADA свидетельствует о повышении супрессорной активности мононуклеарных лейкоцитов, которая, возможно, имеет протективное значение в отношении аутоиммунной деструкции β -клеток и детерминирует постепенное развитие клинических симптомов инсулиновой недостаточности. Напротив, низкий уровень базальной и ФГА-стимулированной продукции IL-10 при СД1 свидетельствует в пользу Th1 поляризации иммунного ответа.

Заключение. Вследствие особенностей цитокиноопосредованных клеточных взаимодействий при LADA потеря функциональной паренхимы и манифестация инсулиновой недостаточности развивается медленно, растягиваясь на годы. Вышеизложенное требует более активной и тщательной диагностической тактики с использованием иммунологических методов обследования в группе пациентов в старшей возрастной группе, где представлены различные патогенетические варианты СД.

Ключевые слова: латентный аутоиммунный сахарный диабет взрослых, сахарный диабет 1 типа, цитокины, иммунопатогенез

The role of Th1/Th2 disbalanced immune response in the determination of clinical features of autoimmune diabetes mellitus

Saprina T.V., Lasarenko F.E., Prochorenko T.S., Ryzantseva N.V., Vorozhova I.N.
Siberian State Medical University, Tomsk

Aim. To elucidate the role of Th1/Th2 polarization of immune response in LADA patients in the realization of the clinical phenotype of the disease.

Materials and methods. 70 patients aged 21-61 (mean 41.3 ± 1.0 yr) with DM diagnosed based on WHO criteria (1999). Groups 1 and 2 included 13 DM1 and 57 DM2 patients (34.6 ± 7.2 and 43.6 ± 7.6 yr respectively). 27 DM2 patients (41.2 ± 1.6 yr) presumably had LADA (P. Zimmet's criteria).

Serum anti-GAD65, ICA, and IAA antibodies along with C-peptide were measured in fasting sera and 120 min after GTT by solid phase immuno-enzyme assays following manufacturer's instructions with the use of a photometer for Multiscan EX microplates (ThermoLabSystems, Finland) at 405 nm (for GAG and ICA) and 450 nm (for IAA and C-peptide). GAD, IAA, and C-peptides levels were calculated automatically from calibration curves. Mononuclear leukocytes were isolated by centrifugation in the ficoll-verographin density gradient. The cells thus obtained were resuspended in the complete nutritient medium reducing their concentration to 2.0×10^6 /ml. Phytohemagglutinin (Difco, Germany) was added (10 mcg/1 ml) to the samples to stimulate mononuclear leukocytes; cell suspensions were further incubated for 24 hr. Initial and PGA-induced levels of IL-2, 4, 10 in supernatants of cell cultures were measured by solid phase immunoassay at 450 nm.

Results. At least one type of autoantibodies (GAD, ICA or IAA) was identified in 24.3% of all DM patients (17/70) and in 18% of the DM2 patients (10/57). The level of anti-GAD and ICA ABs and percentage of AB-positive patients were higher in the LADA group while that of anti-IAA ABs among DM1 patients without LADA. Two AB types at a time were found in 17% (4/23) of the patients with autoimmune DM in the absence of significant difference between LADA and DM1. Patients with LADA had a significantly lower basal C-peptide level than DM2 patients. There was a tendency toward lower level of stimulated C-peptide secretion in LADA patients compared with DM2 ones. It suggests impairment of B-cell secretory function affected by the autoimmune process. We observed enhanced basal production of IFN- γ by blood mononuclear leukocytes in all DM patients in the absence of significant difference between the groups. Mitogen-activated production in all CD patients was lower than normal without inter-group differences. Patients with DM2 had the inverted type of IL-2 secretion unlike those with autoimmune diabetes. In both cases it was significantly different from normal values. There was a tendency toward higher basal production of IL-4 by mononuclear leukocytes in LADA and DM2 compared with CD1 which reflects pathogenetic peculiarities of T-cell function in LADA differing from those in DM1 and responsible for slower impairment of B-cell function in this condition. Basal and PGA-induced production of IL-10 was higher in LADA and DM2 than in DM1. It suggests enhanced suppressor activity of leukocytes that may protect B-cells from autoimmune destruction and determines gradual development of clinical symptoms of insulin deficiency. In contrast, low production of IL-10 in DM1 gives evidence of polarization of the immune response.

Conclusion. The loss of functional parenchyma and manifestation of insulin deficiency in LADA occur at a relatively low rate due to the peculiar character of cytokine-mediated cell interactions. It suggests the necessity of an active and careful diagnostic strategy with the use of immunological methods for examination of elder patients presenting with a variety of pathogenetic variants of DM.

Key words: latent autoimmune diabetes, mellitus in adults, type 1 diabetes, cytokines, immunopathogenesis

В настоящее время отмечается неуклонный рост заболеваемости сахарным диабетом (СД) во всех возрастных и этнических группах. Прогнозируемое увеличение распространенности СД среди лиц в возрасте от 20 до 44 лет к 2030 г. до 60 млн человек приведет к катастрофическим последствиям [1]. Этот возрастной интервал является интересным с эпидемиологической точки зрения, поскольку заболеваемость СД 1 типа (СД1) находится еще на довольно высоком уровне, а заболеваемость СД 2 типа (СД2), резко нарастая к 30 годам, сравнивается с заболеваемостью СД1 [2].

Среди пациентов с СД в данном возрастном диапазоне обособилась особая группа больных латентным аутоиммунным диабетом взрослых — latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA) [3, 4]. К моменту постановки диагноза СД у пациентов с LADA, как правило, сохраняется значительный уровень остаточной секреции инсулина. Исследование DCCT (1993) свидетельствует, что при аутоиммунном СД даже минимальная остаточная секреция С-пептида ассоциирована с лучшим метаболическим контролем [5, 6, 7]. Следовательно, группа больных с LADA представляет особый интерес для исследователей как модель для оценки эффективности терапевтических вмешательств с целью предупреждения снижения уровня эндогенного инсулина.

Известно, что морфологическим субстратом СД1 является воспаление, локализующееся в островке Лангерганса и приводящее к дисфункции и гибели β -клеток. Это воспаление имеет аутоиммунный характер (аутоиммунный инсулит, АИ) и вызывает гибель β -клеток как путем некроза, так и апоптоза [8, 9]. Т-лимфоциты играют важную роль в инициации и дальнейшем развитии аутоиммунного процесса [10]. При этом основная роль принадлежит CD8-лимфоцитам (цитотоксическим) и CD4-лимфоцитам, преимущественно Th1-профилю [11].

Цитокины играют принципиальную роль в индукции и поддержании иммунологической толерантности. Имеющиеся в литературе данные позволяют считать, что медленное повреждение β -клеток при LADA не является случайным, а отражает патогенетические особенности функционирования Т-звена иммунитета, отличные от механизмов развития классического СД1 [12]. Вклад каждого компонента цитокиновой сети в сохранение иммунологической толерантности к клеткам островкового аппарата поджелудочной железы и его повреждение остается до конца не выясненным. Исследование цитокинового дисбаланса при СД

аутоиммунного генеза и его связи с клинко-метаболическими нарушениями представляет не только научный, но и практический интерес.

Цель работы — установить закономерности Th1/Th2-поляризации иммунного ответа у больных LADA и ее роль в реализации клинического фенотипа заболевания.

Материал и методы

В исследование было включено 70 пациентов (37 женщин и 33 мужчины) в возрасте от 21 до 61 года (средний возраст — $41,3 \pm 1,0$ г.). Диагноз сахарного диабета устанавливался на основании критериев ВОЗ (1999 г.).

Группу больных с СД1 составили 13 человек (4 женщины и 9 мужчин); средний возраст — $34,6 \pm 7,2$ г. Диагноз СД1 устанавливался на основании развития кетоацидоза в течение первых 6 мес от начала заболевания, персистирующей потребности в инсулинотерапии после ликвидации кетоза и достижения метаболической компенсации.

В группу пациентов СД2 входили 57 человек (32 женщины и 25 мужчин), средний возраст — $43,6 \pm 7,6$ г. Заболевание характеризовалось постепенным началом без развития кетоацидоза; отсутствовала потребность в инсулинотерапии после ликвидации кетоза и для достижения метаболической компенсации как минимум в течение 6 мес после манифестации диабета. Среди этих пациентов, согласно критериям P. Zimmet [13], были отобраны пациенты с подозрением на LADA — 27 человек (17 женщин и 10 мужчин), средний возраст — $41,2 \pm 1,6$ г. В качестве клинических критериев диагноза LADA использовались: манифестация в возрасте от 30 до 50 лет без развития кетоацидоза, индекс массы тела (ИМТ) менее 25 кг/м^2 , отсутствие признаков метаболического синдрома, наличие личного и семейного анамнеза аутоиммунных заболеваний. В качестве косвенного лабораторного маркера LADA считали отсутствие гиперинсулинемии натощак и/или отсутствие прироста секреторной реакции β -клеток на 120-й мин. стандартного теста толерантности к глюкозе (ТТГ).

Материалом исследования являлась венозная кровь обследованных лиц, взятая утром натощак.

Определение присутствия в сыворотке у больных аутоантител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GAD65), к клеткам

Таблица 1

Клиническая характеристика обследованных групп ($M \pm \sigma$)

Показатели	СД1 n=13	LADA n=10	СД2 n=47	Достоверность (ANOVA)
Пол (м/ж)	9/4	5/5	19/28	
Возраст, годы	34,6±7,2	39,7±9,0	43,6±7,6	p=0,002
	p _{СД1-LADA} =ns			
		p _{СД2-LADA} =ns		
Вес, кг	71,6±12,4	83,0±24,6	86,1±16,3	p=0,03
	p _{СД1-LADA} =ns			
		p _{СД2-LADA} =ns		
ИМТ, кг/м ²	25,0±4,5	27,5±5,4	30,8±5,5	p=0,002
	p _{СД1-LADA} =ns			
		p _{СД2-LADA} =0,03		
Окружность талии, см	74,2±9,2	83,4±21,0	87,3±12,1	p=0,009
	p _{СД1-LADA} =0,05			
		p _{СД2-LADA} =ns		
Длительность СД, годы	7,6±6,8	3,8±4,1	3,1±2,0	p=0,003
	p _{СД1-LADA} =0,01			
		p _{СД2-LADA} =ns		
Возраст дебюта, годы	27,0±8,8	35,9±6,5	40,5±7,6	p<0,01
	p _{СД1-LADA} <0,01			
		p _{СД2-LADA} =ns		
Продолжительность предшествующей инсулинотерапии, годы	7,6±6,8	1,5±3,3	1,1±2,6	p<0,01
	p _{СД1-LADA} <0,01			
		p _{СД2-LADA} =ns		

Примечание: данные представлены в виде $M \pm \sigma$, где M – среднее, σ – стандартное отклонение, n – объем выборки, $P_{\text{СД2-LADA}}$ – достоверность различий показателей между группами пациентов с СД2 и LADA, $P_{\text{СД1-LADA}}$ – достоверность различий показателей между группами пациентов с СД1 и LADA, ns – достоверность различия не достигала критического уровня значимости ($p < 0,05$), ИМТ – индекс массы тела.

островков Лангерганса (ICA) и к инсулину (IAA) проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («Biomerica» (Германия) для GAD и ICA; «Orgentec» (Германия) для IAA). Определение С-пептида в сыворотке у больных, полученной утром натощак и на 120-й мин ТТГ, проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа по инструкции, предлагаемой производителем тест-системы («AccuBind», США). Учет результатов иммуноферментного анализа проводили с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 405 нм для GAD и ICA, 450 нм – для IAA и С-пептида. Концентрации GAD, IAA и С-пептида вычислялись автоматически по калибровочным кривым.

Мононуклеарные лейкоциты выделяли на градиенте плотности фиколл-верографин. Для получения супернатантов выделенные клетки ресуспендировали в полной питательной среде, стандартизируя их количество до $2,0 \times 10^6$ /мл. Для стимуляции мононуклеарных лейкоцитов в пробы вносили фитогемагглютинин (ФГА) («Difco», Германия) (10 мкг на 1 мл) с дальнейшей инкубацией клеточных суспензий в течение 24 ч.

Определение спонтанного и ФГА-стимулированного уровня интерлейкинов-2, -4 и -10 (IL-2, IL-4, IL-10) в супернатантах клеточных культур проводили с использованием твердофазного иммуноферментного метода по инструкциям, предлагаемым производителями («ВекторБест», Новосибирск). Учет результатов иммуноферментного анализа осуществляли при длине волны 450 нм.

Все лица, участвующие в исследовании, подписали информированное согласие.

Результаты исследования обрабатывали с использованием пакета программ Statistica for Windows (2008 г., версия 8.0) и пакета программ Microsoft Excel (2007 г.). Критический уровень

значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался менее 0,05.

Результаты и обсуждение

Основным лабораторным критерием LADA является наличие циркулирующих аутоантител (АТ) к β -клеткам панкреатических островков. После выполнения иммуноферментного анализа из группы пациентов с предварительным диагнозом СД2 была выделена подгруппа пациентов с LADA, у которых регистрировалось повышение титра аутоантител хотя бы одного типа (табл. 2).

Интересно отметить, что LADA был подтвержден серологически у 26% пациентов, у которых его подозревали на основании клинических критериев, и у 10% пациентов, не удовлетворяющих этим критериям. По нашим данным, чувствительность и специфичность клинических критериев LADA составили 70 и 57% соответственно ($p < 0,05$). Это позволило сделать вывод, что клинические критерии, взятые изолированно, не позволяют

Таблица 2

Распределение аутоантител к β -клеткам поджелудочной железы при различных клинических вариантах аутоиммунного диабета				
Показатели		СД1 n=13	LADA n=10	Достоверность (p)
Антитела к GAD	частота	8% (1/13)	40% (4/10)	p>0,05
	концентрация, Ме (25–75%)	0,49 (0,41–0,58)	0,85 (0,53–1,38)	p=0,07
ICA	частота	23% (3/13)	70% (7/10)	p>0,05
	концентрация, Ме (25–75%)	0,20 (0,14–0,36)	0,44 (0,35–0,56)	p=0,04
IAA	частота	39% (5/13)	10% (1/10)	p=0,05
	концентрация, Ме (25–75%)	8,04 (5,33–8,83)	5,49 (5,02–6,30)	p>0,05

Примечание: n – объем выборки, Ме (25–75%) – медиана и квартили.

Таблица 3

Характеристика остаточной секреции эндогенного инсулина, метаболических показателей, распространенность осложнений и сопутствующих заболеваний при сахарном диабете (M±σ)				
Показатели	СД1, n=13	LADA, n=10	СД2, n=47	Достоверность (ANOVA)
Концентрация С-пептида в зависимости от длительности СД (M±σ)				
Базальный С-пептид, нг/мл	0,46±0,43	1,15±0,97	2,26±1,66	p=0,002 p _{СД1-LADA} =ns p _{СД1-LADA} =0,05
Длительность СД до 4 лет	0,44±0,28	1,15±0,86	2,44±1,73	p=0,07
Длительность СД от 4 до 7 лет	0,61±0,61	1,18±0,43	1,54±1,06	ns
Длительность СД от 7 до 10 лет	0,16±0,02	1,64±1,84	3,78±1,88	ns
Длительность СД 10 лет и более	0,50±0,31	0,15±0,24	1,90±1,75	ns
С-пептид на 120 минуте ТТГ, нг/мл	-	1,09±0,21	2,76±0,50	p=0,16
Характеристика показателей углеводного и липидного обмена (M±σ)				
Гликированный гемоглобин, HbA _{1c} , %	10,5±2,2	8,4±1,0	8,7±2,2	p>0,05
Общий холестерин, ммоль/л	5,5±2,5	5,7±0,8	6,0±1,4	p>0,05
Триглицериды, ммоль/л	1,1±0,7	1,8±1,5	2,9±4,7	p>0,05
Холестерин ЛПНП, ммоль/л	3,4±2,1	3,3±0,6	3,7±1,4	p>0,05
Распространенность микро- и макроангиопатий, сопутствующих заболеваний				
Ретинопатия, %	70 (9/13)	20 (2/10)	34 (16/47)	p>0,05
Нефропатия, %	77 (10/13)	20 (2/10)	23 (11/47)	p>0,05
Артериальная гипертензия, %	0 (0/13)	10 (1/10)	43 (20/47)	p=0,07
Аутоиммунный тиреоидит, %	0 (0/13)	20 (2/10)	13 (6/47)	p>0,05

достоверно различить LADA от СД2 (табл. 2). Обязательным для диагностики LADA является исследование лабораторных маркеров аутоиммунного процесса, направленного против β-клеток.

АТ хотя бы одного типа (GAD, ICA или IAA) выявлены у 24,3% пациентов среди всех больных СД (17/70). Причем, среди больных с клиническим фенотипом СД2 – у 18% (10/57). Это согласуется с данными литературы относительно доли LADA в структуре заболеваемости СД с клиническим фенотипом типа 2 [6]. Причем концентрация GAD- и ICA-АТ и процент АТ-положительных пациентов были выше у пациентов с LADA, а IAA – в группе с СД1 с классическим вариантом развития. Одновременно два типа аутоантител присутствовали у 17% (4/23) пациентов с аутоиммунным СД, без статистически значимых различий между группами LADA и СД1.

При анализе особенностей клинического течения диабета было отмечено, что ИМТ у больных LADA был достоверно ниже, чем при СД2. Тенденция к более низкому уровню триглицеридов в сыворотке крови были у больных LADA. Это отражает значение для развития СД2 метаболического синдрома, компонентами которого являются ожирение и дислипидемия. Также зарегистрировано, что дебют СД1 приходился на более ранний возраст, а длительность инсулинотерапии была достоверно больше, чем у пациентов с LADA (табл. 1, 3).

При анализе структуры и частоты микро- и макроангиопатий у пациентов с СД было отмечено преобладание в группе пациентов с СД2 частоты артериальной гипертензии. В группе с LADA чаще, в сравнении с группой СД2, регистрировался аутоиммунный тиреоидит (табл. 3).

Пациенты с LADA характеризовались достоверно более низким базальным уровнем С-пептида, чем пациенты с СД2. Отмечена тенденция к более низкой стимулированной секреции С-пептида при LADA по сравнению с пациентами с СД2, что отражает снижение секреторной способности β-клеток при их аутоиммунном повреждении.

Основную роль в аутоиммунном разрушении инсулин-синтезирующих клеток островков играют CD8⁺-лимфоциты, в то время как CD4⁺-лимфоциты имеют второстепенное значение [11]. CD4⁺-лимфоциты и макрофаги, привлеченные в островки, начинают активно синтезировать интерферон-гамма (IFN-γ), который определяет дальнейший характер аутоиммун-

ных реакций в островках. Он привлекает антигенпрезентирующие клетки (АПК), которые участвуют в презентации антигена [14]. IFN-γ подавляет функцию клеток Th-2 типа, снижая тем самым выработку цитокинов, ответственных за активацию В-лимфоцитов [15]. На роль IFN-γ в качестве медиатора деструкции β-клеток указывает то, что подавление его синтеза защищает мышей линии NOD (линия мышей, склонных к развитию СД в отсутствие ожирения, None-Obese Diabetic Mice) от развития аутоиммунного инсулита [16, 17].

IFN-γ относится к плейотропным провоспалительным цитокинам Th1-профиля. В эксперименте на животных, изолированных островках Лангерганса человека и грызунов было показано, что IFN-γ обладает выраженным цитотоксическим действием на инсулинпродуцирующие клетки, особенно – при совместном его применении с IL-1 или TNF-α [18, 19, 20, 21].

Некоторые авторы [22, 23] сообщают о сниженном уровне продукции IFN-γ мононуклеарными лейкоцитами крови (особенно CD3⁺ клетками) после их стимуляции митогенами у больных с впервые выявленным СД1 и АТ-положительных пациентов. При проточно-цитометрическом определении интрацеллюлярного содержания IFN-γ в CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитах у больных СД1 было обнаружено значительное уменьшение количества клеток, содержащих IFN-γ по сравнению с контролем и лицами из группы риска. Этот феномен объясняют двояко: как уходом CD4⁺- и CD8⁺-популяций лимфоцитов в очаг воспаления, так и тем, что сниженное образование IFN-γ в организме делает β-клетки более чувствительными к вирусным инфекциям, вызывающим их деструкцию [24].

В нашем исследовании отмечено повышение базальной продукции IFN-γ мононуклеарными лейкоцитами крови у всех пациентов с СД; достоверных различий между подгруппами пациентов с СД зарегистрировано не было. Митогенстимулированная продукция у всех пациентов с СД также достоверно отличалась от контрольных значений в сторону уменьшения, без существенных различий между подгруппами пациентов с разным фенотипом СД (табл. 4).

Известно, что повышение уровня IL-2 в периферической крови, а также его продукции мононуклеарными лейкоцитами крови регистрировалось у лиц, недавно заболевших СД1, а также у детей с нормогликемией из группы риска с отягощенной на-

Таблица 4

Базальная и ФГА-стимулированная продукция IL-2, IL-4 и IL-10 мононуклеарными лейкоцитами у пациентов с СД, Me (Q1–Q3)

Показатели, пг/мл	Группа 1 СД1 n=13	Группа 2 LADA n=10	Группа 3 СД2 n=47	Здоровые доноры n=30	Достоверность (p)
Базальная продукция IL-2	70,88 (18,22; 281,54) p<0,05	35,4 (0,0; 228,9) p<0,05	18,2 (0,0; 123,5) p<0,05	2,0 (0,0; 30,0)	p ₁₋₂ >0,05 p ₂₋₃ >0,05 p ₁₋₃ <0,05
ФГА-стимулированная продукция IL-2	176,21 (70,88; 176,21) p<0,05	97,2 (0,0; 228,9) p<0,05	0,2 (0,0; 176,2) p<0,05	40,0 (10,0; 210,0)	p ₁₋₂ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₁₋₃ <0,05
Базальная продукция IFN-γ	30,45 (30,44–8,80) p<0,05	35,52 (30,13–40,60) p<0,05	38,21 (28,54–130,67) p<0,05	0,0 (0–20)	p ₁₋₂ >0,05 p ₂₋₃ >0,05 p ₁₋₃ >0,05
ФГА-стимулированная продукция IFN-γ	32,50 (28,86–36,16) p<0,05	34,89 (33,62–65,01) p<0,05	38,37 (28,22–95,15) p<0,05	820,0 (130–5350)	p ₁₋₂ >0,05 p ₂₋₃ >0,05 p ₁₋₃ >0,05
Базальная продукция IL-4	0,03 (0,0–17,9) p>0,05	31,3 (19,8–34,5) p<0,05	32,7 (12,2–37,9) p<0,05	0,1 (0,0; 2,0)	p ₁₋₂ <0,05 p ₂₋₃ >0,05 p ₁₋₃ <0,05
ФГА-стимулированная продукция IL-4	0,0 (0,0–7,8) p>0,05	29,4 (14,8–32,8) p<0,05	28,4 (10,1–38,2) p<0,05	1,7 (0,0; 25,0)	p ₁₋₂ <0,05 p ₂₋₃ >0,05 p ₁₋₃ <0,05
Базальная продукция IL-10	288,7 (0,0; 1933,1) p<0,05	635,6 (543,4; 666,1) p<0,05	543,4 (0,0; 2077,0) p<0,05	6,0 (0–50,0)	p ₁₋₂ >0,05 p ₂₋₃ >0,05 p ₁₋₃ >0,05
ФГА-стимулированная продукция IL-10	50,0 (0,0; 1408,4) p>0,05	50,0 (0,0; 1408,4) p>0,05	344,9 (0,0; 800,0) p<0,05	40,0 (7,0–130,0)	p ₁₋₂ >0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₁₋₃ <0,05

Примечание: Me – медиана, n – объем выборки.

p – достоверность в сравнении с контролем

p₁₋₂; p₂₋₃; p₁₋₃ – достоверность между группами (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферони).

следственностью [25], особенно – носителей АТ к антигенам β-клеток [26]. С другой стороны, имеются работы, в которых сообщается о снижении уровня IL-2 в крови и его продукции активированными мононуклеарными лейкоцитами у больных СД1 [27].

Проведенные нами исследования согласуются с работами той группы авторов, которые считают, что у большинства пациентов с аутоиммунным диабетом продукция IL-2 мононуклеарными лейкоцитами крови повышена, максимально – у пациентов с классическим течением СД1. У пациентов с СД2 отмечался инвертированный тип секреции IL-2, в отличие от аутоиммунного диабета; различия были достоверны по сравнению с контролем (табл. 4).

Интерлейкин-4 (IL-4) – это ключевой цитокин профиля Th-2. Этот интерлейкин способствует формированию «толерантного Th-2-фенотипа», привлекая В-лимфоциты в качестве «не-профессиональных» антиген-представляющих клеток, которые стимулируют развитие анергии в большей мере, чем активации. Более того, IL-4 ингибирует освобождение активированными макрофагами провоспалительных молекул (интерлейкин-1, фактор некроза опухолей-α, интерлейкин-8, простагландин E2 и др.). По данным литературы, IL-4 проявляет защитное действие при моделировании аутоиммунного диабета у грызунов [23]. Предварительная инкубация островковых клеток поджелудочной железы человека с IL-4 предотвращает апоптоз, вызываемый смесью IL-1+TNF-α+IFN-γ. Сведения относительно содержания этого цитокина в периферической крови у пациентов с СД1 и их сибсов, базальной и стимулированной ФГА продукции мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* крайне противоречивы. Одни авторы определяли более низкий его уровень [28, 29], другие – не находили отличия от контрольной группы [30], третьи – отмечали даже его повышение в дебюте СД1 [25].

В проведенном нами исследовании отмечена тенденция к более высокой базальной продукции мононуклеарными лейкоцитами IL-4 у больных LADA и СД2 по сравнению с пациентами с СД1. ФГА-стимулированная продукция IL-4 при LADA и СД2 также достоверно выше, чем при СД1. Это, вероятно, отражает патогенетические особенности функционирования Т-звена иммун-

ной системы при LADA, отличные от механизмов развития СД1 и определяющие медленное повреждение β-клеток при этом заболевании, что фенотипически приближает LADA к СД2.

Интерлейкин 10 – лимфокин с молекулярной массой около 19 кДа, продуцируемый Th-2 CD4+-клетками. Он тормозит пролиферативный ответ Т-клеток на антигены и митогены, подавляет продукцию IFN-γ Th-1 CD4+-клетками, секрецию активированными макрофагами IL-1β, TNF, IL-6 и IFN-γ. В своем ингибирующем действии на клеточное звено иммунной системы IL-10 синергичен с IL-4 [31]. По данным литературы, большинство авторов считают IL-10 цитокином, оказывающим защитное действие в отношении развития СД1 [31, 32]. У больных с впервые выявленным СД1 отмечается значительное снижение его секреции мононуклеарными лейкоцитами крови [25, 30], в том числе, после введения адреналина.

При оценке базальной продукции IL-10 установлены достоверно более высокое его содержание в супернатантах у пациентов, страдающих LADA, затем – при СД2 и наименьшие – у больных СД1 (табл. 4).

Наиболее высокий уровень ФГА-стимулированной продукции IL-10 отмечался у пациентов, страдающих LADA и СД2, минимальные – у больных СД1. Высокий уровень базальной и ФГА-стимулированной продукции IL-10 мононуклеарными лейкоцитами при LADA свидетельствует о повышении супрессорной активности мононуклеарных лейкоцитов, которая, возможно, имеет протективное значение в отношении аутоиммунной деструкции β-клеток и детерминирует постепенное развитие клинических симптомов инсулиновой недостаточности. Напротив, низкий уровень базальной и ФГА-стимулированной продукции IL-10 при СД1 свидетельствует в пользу Th-1 поляризации иммунного ответа.

Заключение

Таким образом, обобщая данные литературы и результаты собственных исследований, можно прийти к заключению, что продукция различных видов цитокинов во многом определяет развитие и клинические особенности аутоиммунного СД.

Цитокины Th1-типа активируют реакции клеточного иммунитета, т.е. цитотоксические и воспалительные реакции. Усиление реакций с участием цитокинов Th1-профиля приводит к возникновению органоспецифических аутоиммунных заболеваний. При таком условии развитие гуморального ответа является антагонистическим путем при аутоиммунном СД, подавляющим активность цитотоксических реакций со стороны Т-клеток в островках Лангерганса. Вследствие особенностей цитокиноопосредованных клеточных взаимодействий при LADA потеря функциональной паренхимы и манифестация инсулиновой недостаточности развивается медленно, растягиваясь на годы. Вышеизложенное требует более активной и тщательной диагностической тактики с использованием иммунологических методов обследования в группе

пациентов в старшей возрастной группе, где представлены различные патогенетические варианты СД.

Исследования выполнены при поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. «Разработка технологической платформы молекулярной диагностики и лечения социально значимых заболеваний и подготовка на ее основе научно-исследовательских кадров для молекулярной медицины», ГК № 02.740.11.0311 и гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых «Молекулярные механизмы цитокин-опосредованной дисрегуляции апоптоза лимфоцитов при поляризации иммунного ответа по Th1- или Th2-пути», ГК № 02.120.11.3842-МД.

Литература

1. Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. Global Prevalence of Diabetes // *Diabetes Care*. – 2004. – V 27. – № 5. – P. 1047–1053.
2. Дедов И. И., Кураева Т. Л., Петеркова В. А. Генетические факторы в развитии сахарного диабета в России // *Молекулярная медицина*. – 2003. – № 1. – С. 31–37.
3. Кононенко И. В., Прокофьев С. А., Смирнова О. М. Функциональное состояние β -клеток, иммунологические и клинико-биохимические характеристики у больных с медленно прогрессирующим аутоиммунным диабетом взрослых // *Проблемы эндокринологии*. – 2004. – Т. 50. – № 1. – С. 18–22.
4. Groop L., Bottazzo G. F., Doniach D. Islet cell antibodies identify latent type 1 diabetes in patient aged 35–75 years at diagnosis // *Diabetes*. – 1986. – V. 35. – P. 237–241.
5. Смирнова О. М., Кононенко И. В., Дедов И. И. Аутоиммунный латентный сахарный диабет у взрослых // *Проблемы эндокринологии*. – 2008. – Т. 54. – № 2. – С. 1–7.
6. Diabetes Control and Complication Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complication in insulin-dependent diabetes mellitus // *The New England Journal of Medicine*. – 1993. – V. 329. – P. 977–986.
7. Palmer J. P., Fleming G. A., Greenbaum C. J. C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop // *Diabetes*. – 2004. – V. 53. – P. 250–264.
8. Moriawaki M., Iton N., Miyagawa J. The development of IDDM in the BB-rats // *Diabetologia*. – 1999. – Vol. 42. – № 11. – P. 1332–1340.
9. Suarez-Pinzon W., Sorensen O., Bleackley R. C. Beta-cell destruction in NOD mice correlates with Fas (CD95) expression on beta-cells and proinflammatory cytokine expression in islets // *Diabetes*. – 1999. – Vol. 48. – № 1. – P. 21–28.
10. Toyoda H., Formby B. Contribution of T cells to the development of autoimmune diabetes in the NOD mouse model // *Bioessays*. – 1998. – Vol. 20, 39. – P. 750–757.
11. Green E. A., Flavell R. A. Tumor necrosis factor- α and the progression of diabetes in non-obese diabetic mice // *Immunol. Rev.* – 1999. – Vol. 169. – P. 11–22.
12. Hosszafalusi N., Vataj A., Rajczyk K. Similar genetic features and different islet cell autoantibody pattern of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) compared with adult-onset type 1 diabetes with rapid progression // *Diabetes Care*. – 2003. – Vol. 26. – P. 452–7.
13. Zimmet P. Z., Turner R., McCarty D. Crucial points at diagnosis. Type 2 diabetes or slow type 1 diabetes // *Diabetes Care*. – 1999. – Vol. 22. – № 2. – P. 59–64.
14. Pavlovic D., Vandewinkel M., Vanderauwera B. Effect of interferon- γ and glucose on major histocompatibility complex class I and class II expression by pancreatic beta- and non-beta-cells // *J. Clin. Endocrinol.* – 1997. Vol. 82. – № 7. – P. 2329–2336.
15. Ahren B., Havel P. J. Leptin inhibits insulin secretion induced by cellular cAMP in a pancreatic B cell line (INS-1 cells) // *Am. J. Physiol.* – 1999. – Vol. 277. – P. R959–R966.
16. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus // *Diabet. Metab.* – 1998. – Vol. 14. – № 2. – P. 129–151.
17. Rabinovitch A., Suarez-Pinzon W. L., Sorensen O. IFN- γ gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice // *J. Immunol.* – 1995. – Vol. 154. – № 9. – P. 4874–4882.
18. Bruun C., Heding P. E., Ronn S. G. Inhibitory effects of suppressor of cytokine signaling-3 on tumor necrosis factor- α induced signaling in pancreatic beta cells // *Diabetologia*. – 2005. – Vol. 48, suppl. 1. – A. 181.
19. Chen M., Yang Z. D., Zmish K. M. Activation of 12-lipoxygenase in proinflammatory cytokine-mediated beta cell toxicity // *Diabetologia*. – 2005. – Vol. 43. – № 3. – P. 486–495.
20. Storling I., Binzer J., Andersson A. K. Nitric oxide caused activation of JNK suppression of Akt in insulin-secreting cells // *Diabetologia*. – 2005. – Vol. 48, (suppl. 1). – A38.
21. Storling I., Binzer J., Andersson A. K. Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt // *Diabetologia*. – 2005. – Vol. 48. – № 10. – P. 2039–2050.
22. Kukreja A., Cost G., Marker J. Multiple immunoregulatory defects in type-1 diabetes // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 109. – № 1. – P. 131–140.
23. Kukreja A., Maclaren N. K. Autoimmunity and diabetes // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1999. – V. 84. – № 12. – P. 4371–4378.
24. Avanzini M. A., Ciardelli L., Lenta E. IFN- γ low production capacity in type 1 diabetes mellitus patients at onset of disease // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. – 2005. – Vol. 113. – № 6. – P. 313–317.
25. Rapaport M. J., Bistritz T., Aharoni D. Th1/Th2 cytokine secretion of first degree relatives of T1DM patients // *Cytokine*. – 2005. – Vol. 30. – № 5. – P. 219–227.
26. Citarella R., Richiusa P., Mattina A. Different Th1/Th2 cytokine expression in type 1 diabetes mellitus patients (T1DM) alone or associated with autoimmune thyroid disease (AITD) // *Diabetologia*. – 2004. – Vol. 47 (Suppl. 1): A188.
27. Tomoda T., Kurashige T., Taniguchi T. Imbalance of the interleukin 2 system in children with IDDM // *Diabetologia*. – 1994. – Vol. 37. – № 5. – P. 476–482.
28. Попова В. В., Мельниченко С. В., Малиновская Т. Н. Содержание цитокинов в крови в доклиническую и раннюю клиническую стадии развития сахарного диабета у детей // *Проблемы эндокринной патологии*. – 2004. – Т. 2. – С. 53–59.
29. Karlsson M. G., Lawesson S. S., Ludvigsson J. Th1-like dominance high risk first-degree relatives of type 1 diabetic patients // *Diabetologia*. – 2000. – V. 43, № 6. – P. 742–749.
30. Leech N. J., Elsegood K. A., Narendran P. T helper 1 profile of recently activated circulating T cells in type 1 diabetes // *Diabetologia*. – 1999. – V. 42, Suppl. 1. – A 316.
31. Bonato V., Dionisi S., Vendrame F. Oral probiotic administration in the NOD mouse induces systemic and islet IL-10 production and down regulates pancreatic expression of proinflammatory cytokine and chemokines // *Diabetologia*. – 2005. – V. 48, Suppl. 1. – A 193.
32. Chang Y., Piao S. L., Gao S. Regulatory effects of micronutrient complex on the expression of Th1 and Th2 cytokines in diabetic C57BL mice // *Wei Sheng Yan Jiu*. – 2005. – V. 34. – № 1. – P. 64–66.

Саприна Татьяна Владимировна

К.М.Н., ассистент кафедры эндокринологии и диabetологии, ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск
E-mail: tanja.v.saprina@mail.ru