

**В данном номере публикуются статьи, подготовленные по материалам
III Всероссийского диабетологического конгресса**

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2005

УДК 616.379-008.64-092:612.017.1]-078.33:577.21

*И. И. Дедов, Т. В. Никонова, О. М. Смирнова, С. А. Прокофьев, С. М. Степанова,
Л. П. Алексеев*

**РОЛЬ ЦИТОКИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА И МЕХАНИЗМЫ
ГИБЕЛИ β -КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ ТЕЧЕНИЯ САХАРНОГО
ДИАБЕТА ТИПА 1**

ГУ Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАН И. И. Дедов) РАМН, Москва

В последние годы в молекулярной биологии происходит смещение приоритетов в сторону расшифровки механизмов реализации генетической информации. В результате на первый план выходят исследования, касающиеся передачи сигналов между клетками и внутри каждой клетки.

Известно, что запуск программы, ведущей к смерти клетки, начинается с приема сигнала — предвестника гибели в виде информации, поступающей к клетке извне или возникающей в недрах самой клетки. Сигнал воспринимается рецептором и подвергается анализу. Далее через рецепторы или их сочетания полученный сигнал последовательно передается молекулам-посредникам (мессенджерам) различного порядка и в конечном итоге достигает ядра, где и происходит включение программы клеточной гибели путем активации летальных или подавления антилетальных генов [5, 6].

По современным представлениям, существуют два вида клеточной смерти: апоптоз и некроз.

Некроз — это патологический процесс, развивающийся одновременно в большой группе клеток в результате гипоксии, физических и токсических воздействий, под действием комплемента или вируса. Некроз сопровождается отеком клетки, ранней потерей целостности ее мембраны, повреждением митохондрий и других органелл, что в итоге заканчивается лизисом остатков клетки [6].

Некроз клетки становится причиной повреждения и воспаления окружающих клеток и виден на срезах тканей.

β -клетки подвергаются некрозу в присутствии избыточного количества свободных радикалов — кислородных радикалов или оксида азота или под действием провоспалительных цитокинов.

Некроз не связан с потреблением энергии и синтезом белка, тогда как апоптоз — это энергозависимый процесс.

Термин "апоптоз" соответствует русскому "листопад". В процессе апоптоза клетка исчезает в течение 15—120 мин.

В большинстве случаев апоптоз связан с активацией специфических цистеиновых протеаз — каспаз, существующих в клетке в виде неактивных форм — прокаспаз.

В названии "каспаза" отражен механизм протеолиза: в активном центре находится цистеин, аспарагиновая кислота распознается как субстрат; кас-

пазы расщепляют белки после остатков аспарагиновой кислоты.

В результате действия каспаз происходят разрушение белков, участвующих в формировании цитоскелета; гидролиз белков ядерной мембраны, конденсация хроматина; расщепление антиапоптотических белков семейства Bcl-2; протеолиз ингибитора ДНКазы, ответственного за фрагментацию ДНК; инактивация и нарушение регуляции белков, участвующих в репарации ДНК (мишенью каспаз является поли (АДФ-рибополимераза)).

Существуют следующие пути реализации программы клеточной смерти: 1) с участием рецепторов плазматической мембраны; 2) с участием митохондриального цитохрома С.

Рецептор, обозначаемый Fas (Apo-1 CD95), взаимодействуя с соответствующим лигандом (Fas-L) — трансмембранным белком Т-киллера, активируется и запускает программу смерти клетки [14].

При активации каспазы 1-го эшелона жизнь клетки еще можно сохранить. Существуют регуляторы, которые блокируют или, наоборот, усиливают разрушительное действие каспаз 1-го эшелона.

При активации каспаз 2-го эшелона (эффекторных каспаз) процесс, запущенный программой смерти, оказывается необратимым.

Другой путь реализации программы апоптоза зависит от митохондриального цитохрома С.

При повреждении митохондрий, например при истощении клеток восстановленным глутатионом или НАДФН, происходит образование гигантской поры или гигантского белкового канала в самой наружной мембране и высвобождение растворимых белков межмембранного пространства (среди них апоптогенные факторы, цитохром С и прокаспазы). Затем запускается каскад каспаз, ведущий к гибели клетки.

Различные пути апоптоза могут взаимодействовать между собой. Программируемая клеточная смерть может быть реализована в результате комбинированного действия двух путей — с участием и рецепторов плазматической мембраны, и митохондриального цитохрома С.

В последние годы было показано, что процессы некроза и апоптоза не противостоят друг другу.

Важную роль в процессе клеточной гибели играют цитокины — секреторные белки, выполняющие функцию медиаторов межклеточных сигналов

и основных регуляторов активности иммунной системы. Цитокины называют "белками связи".

В зависимости от обеспечения клеточных или гуморальных форм иммунного ответа цитокины могут быть отнесены у Th1- или Th2-хелперным клеткам.

К Th1-клеткам относятся интерлейкины (ИЛ) 2 и 3, γ -интерфероны, факторы некроза опухоли α и β , к Th2-клеткам — ИЛ 4, 5, 6, 9, 10, 13.

Некоторые цитокины могут активировать механизм сигнализации, ведущий к гибели клетки.

Целью работы явилось сравнительное изучение особенностей аутоиммунного процесса, цитокинового профиля, маркеров апоптоза при различных вариантах течения сахарного диабета типа 1 (СД1).

Материалы и методы

Обследовано 109 больных СД с длительностью заболевания до 1 года в фазе декомпенсации, из них 36 больных СД1 и 33 — медленно прогрессирующим аутоиммунным СД взрослых (LADA). В качестве контроля обследовано 40 больных СД типа 2 (СД2) с длительностью заболевания до 1 года и 15 здоровых доноров (табл. 1).

Оценку иммунного статуса проводили на проточном цитометре FACSCalibur с использованием моноклональных антител ("Becton Dickinson") к дифференцировочным антигенам лимфоцитов периферической крови по стандартной методике. При этом оценивали процентные и количественные показатели Т-клеточной популяции ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$), естественных клеток-киллеров ($CD16^+$), В-клеточной популяции ($CD19^+$) лимфоцитов, а также процентное содержание лимфоидных клеток, несущих маркеры активации (HLA-DR-антиген, $CD38$) и маркерный антиген апоптоза ($CD95$).

Типирование 3 локусов HLA 2-го класса (DRB1, DQA1, DQB1) осуществляли с использованием наборов НПФ ЗАО "ДНК-технология" по прилагаемому протоколу.

Количественное определение ИЛ проводили методом иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием коммерческих наборов "Cytelisa" для определения ИЛ 1, 2, 4 и набора "Biosource International" для определения ИЛ-8.

Аутоантитела к цитоплазматическим антигенам β -клеток (ICA) и глутаматдекарбоксилазе (GAD) определяли методом непрямого иммуноферментного анализа с использованием наборов "Isletest ICA" фирмы "Biomedica", аутоантитела к инсулину

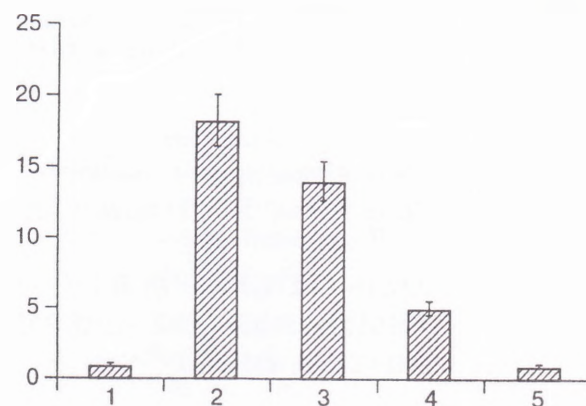


Рис. 1. Содержание антител к GAD (в Ед/мл).

Здесь и на рис. 2—6: 1 — норма; 2 — СД1; 3 — LADA-1; 4 — LADA-2; 5 — СД2.

(IAA) — методом непрямого иммуноферментного анализа ("ELISA test" фирмы "Merckodia"). Для оценки функции β -клеток определяли уровень С-пептида натошак иммуноферментным методом с использованием наборов DSL (США). Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы Excel и Statistica v 6.0.

Результаты и их обсуждение

В обследуемых группах диагноз СД1 и СД2 ставили на основании этиологической классификации [19], диагноз LADA — на основании критериев, предложенных P. Zimmet [20]:

- возраст дебюта обычно старше 35 лет;
- клиническая картина СД2 без ожирения;
- вначале — удовлетворительный метаболический контроль диетой и пероральными сахароснижающими препаратами;
- развитие потребности в инсулине в период от нескольких месяцев до 10 лет;
- наличие маркеров СД1:
 - низкий уровень С-пептида;
 - наличие HLA-аллелей, характерных для СД1;
 - наличие аутоантител к β -клеткам (ICA и/или GAD).

Как выяснилось в последние годы, группа больных LADA является гетерогенной [13, 17].

Наличие высоких титров аутоантител к GAD65 позволяет идентифицировать подгруппу больных LADA-1 с клиническими характеристиками, близкими к СД1, и более ранним развитием инсулинопотребности по сравнению с другой подгруппой — LADA-2, характеризующейся низкими титрами GAD65 и клиническими критериями СД2.

У больных LADA-1 повышен риск развития других аутоиммунных заболеваний, в том числе тиреоидита Хашимото, болезни Аддисона. Некоторые авторы расценивают этот подтип как компонент аутоиммунного полиэндокринного синдрома [11].

По результатам определения уровня аутоантител группу больных LADA разделили на 2 подгруппы — LADA-1 и LADA-2 (рис. 1, 2).

К группе LADA-2 были отнесены больные с низким титром антител к GAD ($5,0 \pm 0,14$ Ед/мл) и отсутствием других групп антител, к группе LADA-1 —

Таблица 1

Основные клинические характеристики больных ($M \pm m$)

Показатель	СД1 (n = 36)	LADA (n = 33)	СД2 (n = 40)
Пол (м/ж)	14/22	13/20	19/21
Возраст, годы	$40,8 \pm 10,5$	$46,4 \pm 8,2$	$51,4 \pm 7,9$
Продолжительность заболевания, мес	$7,4 \pm 4,6$	$7,9 \pm 4,1$	$9,1 \pm 2,9$
Нб А _{1с} , %	$9,6 \pm 2,5$	$9,5 \pm 2,4$	$9,1 \pm 1,3$
ИМТ, кг/м ²	$24,2 \pm 1,1$	$26,5 \pm 5,7$	$29,7 \pm 5,3$
С-пептид, нг/мл	$1,1 \pm 0,8$	$2,4 \pm 1,8$	$3,4 \pm 1,5$

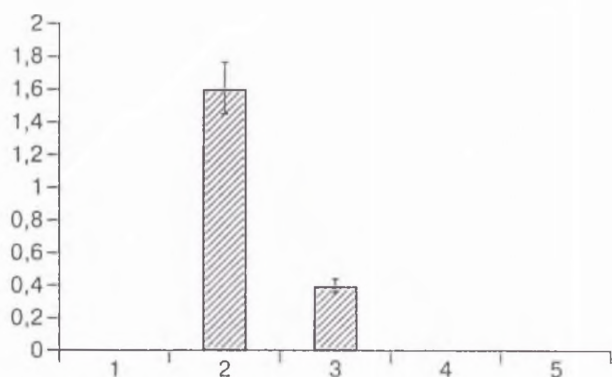


Рис. 2. Содержание ICA (в Ед/мл).

больные с высоким титром антител к GAD ($14,0 \pm 1,8$ Ед/мл) и наличием комбинации антител к GAD и островковым клеткам. При этом титр антител к GAD и ICA был значительно ниже у больных LADA-1 по сравнению с больными СД1 ($p < 0,05$ и $p < 0,001$ соответственно).

Сравнительно низкие титры антител к антигенам островковых клеток у больных LADA, вероятно, обуславливают менее агрессивное течение аутоиммунного процесса, развитие потребности в экзогенном инсулине через несколько лет от начала заболевания и как следствие выявление LADA на поздней стадии [4] (табл. 2).

Предрасположенность к СД1 генетически детерминирована. Наибольшее значение из известных генетических маркеров СД1 имеют гены области HLA на хромосоме 6p21.3 (IDDM1). Высокий риск развития СД1 определяют аллельные варианты генов HLA: DRB1*03*04; DQA1*0501*0301; DQB1*0201*0302 [8, 10]. По результатам генетического исследования у больных LADA (независимо от принадлежности к LADA-1 или LADA-2) чаще других определялись отдельные аллели DQA1*501 и DQB1*201, а также сочетания с протективными аллелями DQB1*0602-8.

Несмотря на выявление при LADA генотипов HLA-системы, свидетельствующих о высоком риске развития СД, некоторые авторы придают им меньшее значение, чем при СД1 [16, 18]. При этом низкие титры антител к GAD у пациентов пожилого возраста при отсутствии генотипов высокого риска и других типов антител к островковым клеткам, по данным ряда авторов, не могут свидетельствовать о прогрессирующем снижении функциональной активности β -клеток [9, 12].

Таблица 2
Клинические характеристики выделенных подгрупп LADA ($M \pm m$)

Показатель	LADA-1 (n = 14)	LADA-2 (n = 19)
Пол (м/ж)	5/9	8/11
Возраст, годы	$46,2 \pm 6,8$	$49,1 \pm 7,8$
Продолжительность заболевания, мес	$6,9 \pm 4,1$	$7,3 \pm 4,7$
Hb A _{1c} , %	$9,5 \pm 1,9$	$9,4 \pm 1,5$
ИМТ, кг/м ²	$25,8 \pm 4,9$	$27,1 \pm 5,7$
С-пептид, нг/мл	$2,1 \pm 1,9$	$2,5 \pm 1,6$

Распределение HLA DR-DQ-аллелей

HLA	Число аллелей		
	СД1 (n = 36)	LADA-1 (n = 14)	LADA-2 (n = 19)
DRB1*01	9	2	3
DRB1*03	24	11	15
DRB1*04	18	4	1
DRB1*07	5	2	4
DRB1*11	3	4	6
DRB1*13	7	2	4
DRB1*15	3	3	5
DRB1*16	3	0	0
DQA1*0101	9	2	3
DQA1*0501	27	15	21
DQA1*0301	18	4	1
DQA1*0201	5	2	4
DQA1*0103	7	2	4
DQA1*0102	6	3	5
DQB1*0501	9	2	3
DQB1*0201	29	17	19
DQB1*0302	18	4	1
DQB1*0301	3	4	6
DQB1*0602-8	10	5	9
DQB1*0502-4	3	0	0
DR3*DQA1*501	24	11	15
DQB1*201			
DR*4DQA1*301	18	4	1
DQB1*302			
DR*11DQA1*501	3	4	6
DQB1*301			
Другие	27	9	16

Разница гаплотипов LADA и СД1 ввиду небольшого объема выборки статистически недостоверна (табл. 3).

У всех больных отмечается дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов (рис. 3, 4).

Для цитокинов характерен сложный сетевой характер функционирования, при котором продукция одного из них влияет на образование или проявление активности ряда других. ИЛ, являющиеся подгруппой цитокинов, не способны самостоятельно индуцировать специфический иммунный ответ; они его регулируют. Воспалительные процессы регулируются провоспалительными ИЛ 1, 6, 8, 12 и противовоспалительными ИЛ 4, 10, специ-

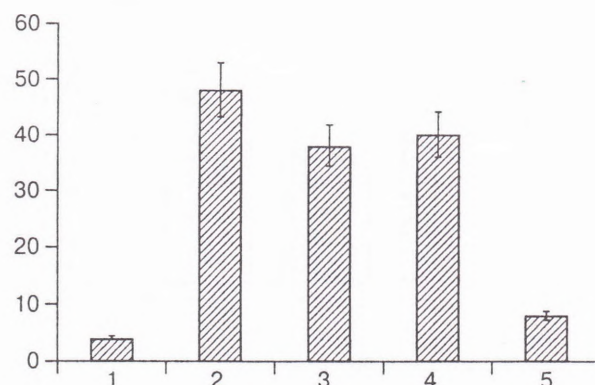


Рис. 3. Содержание ИЛ-1 (в пг/мл).

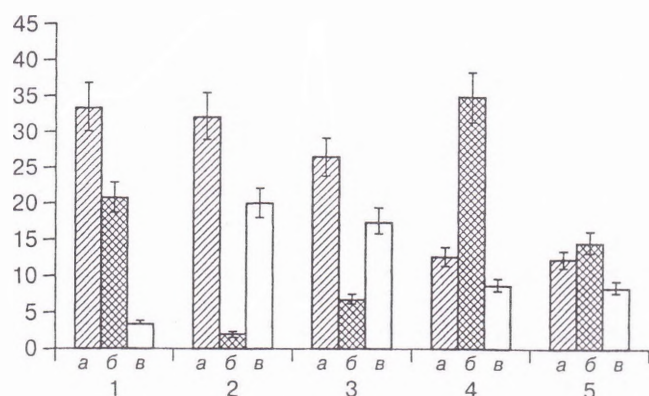


Рис. 4. Содержание ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8 (в пг/мл).
а — ИЛ-2; б — ИЛ-4; в — ИЛ-8.

фические иммунологические реакции — ИЛ 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12 [3].

В исследуемых группах больных СД1 и LADA по сравнению с контрольной группой здоровых доноров отмечается достоверное повышение уровня триггеров воспалительного ответа ИЛ-1 β ($p < 0,01$), хемоаттрактанта ИЛ-8 ($p < 0,01$). ИЛ-1, вызывая повреждение структуры ДНК и приводя к снижению ее содержания в клетке, ускоряет наступление гибели клетки. ИЛ-8 является индуктором острой воспалительной реакции, стимулирует адгезивные свойства нейтрофилов. Повышение уровня ИЛ-8 может свидетельствовать о развитии нарушения микроциркуляции уже в начальных стадиях СД.

В то же время наблюдаются тенденция к снижению уровня ИЛ-2 при СД1 и LADA-1 ($p > 0,05$) и достоверное его снижение при LADA-2 и СД2 ($p < 0,01$).

Цитокины Th1-типа активируют реакции клеточного иммунитета, т. е. цитотоксические и воспалительные реакции, опосредованные Т-клетками, естественными киллерами и макрофагами. Усиление реакций с участием цитокинов Th1-типа приводит к возникновению органоспецифических аутоиммунных заболеваний, развитие которых обусловлено чрезвычайно высокой степенью защищенности организма от воздействия вредных экзогенных внутриклеточных факторов.

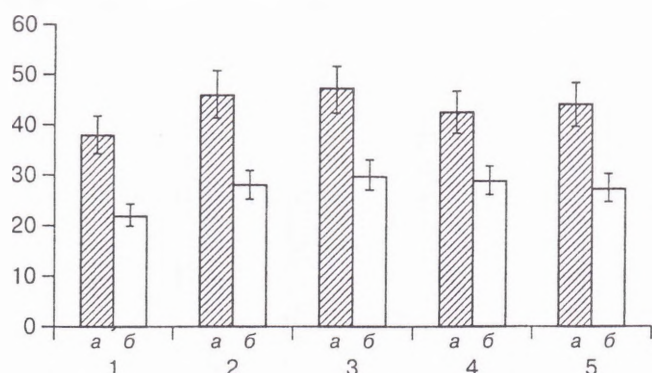


Рис. 5. Содержание (в %) CD4 (Т-хелперов) и CD8 (Т-супрессоров).

а — CD4; б — CD8.

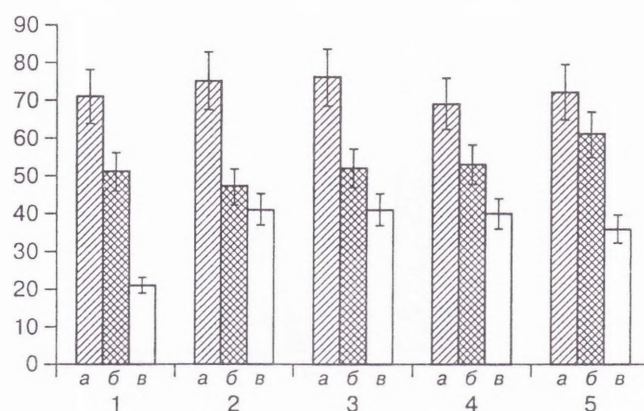


Рис. 6. Содержание (в %) лимфоцитов периферической крови с дифференцировочными маркерами CD3 (а), CD95 (б) и CD38 (в).

Цитокины Th2-типа активируют реакции гуморального иммунитета, т. е. продукцию антител В-клетками, особенно реакции, опосредованные через IgE, усиление пролиферации и функционирования эозинофилов: их чрезмерная активность приводит к развитию atopических заболеваний [3].

В исследуемых группах отмечается снижение содержания противовоспалительного цитокина ИЛ-4, относящегося к Th2-клеткам, при СД1 ($p < 0,01$) и LADA-1 ($p < 0,01$). При LADA-2 наблюдается инверсия ИЛ-4 ($p < 0,05$), сопровождающая медленное прогрессирование заболевания.

Выделяя разные наборы цитокинов, Th1- и Th2-клетки не только стимулируют различные эффекторные механизмы иммунного ответа, но и взаимно подавляют иммунорегуляторную активность друг друга.

Не обнаружено значимых изменений со стороны NK-клеток (CD16), В-клеток (CD19), а также Т-хелперов (CD4) и Т-супрессоров (CD8) и их соотношения в исследуемых группах ($p > 0,05$) (рис. 5).

Отмечено нарастание процентного содержания активированных лимфоидных клеток (CD38), более выраженное при СД1 и обеих подгруппах LADA ($p > 0,05$), что свидетельствует о напряженности иммунной системы (рис. 6).

При исследовании содержания Fas-рецептора апоптоза (CD95) (см. рис. 6) обнаружена тенденция к его снижению при СД1 ($p > 0,05$) и более выраженная тенденция к повышению при СД2 ($p > 0,05$).

Апоптоз является физиологическим процессом, генетически детерминированным рецепторопосредованным механизмом самоуничтожения клеток. Поскольку эндокринный аппарат поджелудочной железы активно remodelируется в постнатальном периоде жизни, апоптоз фактически заново включает синтез белка [1]. По какому пути произойдет клеточная гибель — некроза или апоптоза, во многом зависит от клеточного содержания АТФ и Ca^{2+} . При дефиците АТФ не хватает энергии для реализации двух энергоемких процессов: деградации и распада ядра и перестройки клеточной мембраны с выходом на наружную поверхность аннексин-V-распознаваемого фосфатидилсерина, и тогда нару-

шение целостности клеточной мембраны приводит к утилизации клетки в процессе некроза [2, 7].

Снижение показателя Fas-рецептора апоптоза (CD95) при впервые выявленном СД1, вероятно, свидетельствует о дефиците внутриклеточной АТФ, преобладании интенсивности аутоиммунного процесса и некротической гибели клеток.

При LADA аутоиммунный процесс развивается постепенно; образования АТФ и, вероятно, сохраненного функционирования митохондрий достаточно для завершения апоптотической программы β -клеток.

Выводы

1. Полученные результаты свидетельствуют о гетерогенности LADA.

2. Высокий уровень антител и сниженные показатели Fas-рецептора апоптоза (CD95) указывают на преобладание интенсивности аутоиммунного процесса по сравнению с процессом апоптоза при СД1.

3. Вместе с тем Fas-рецептор CD95 лишь косвенно свидетельствует о запуске процесса программированной клеточной гибели. Быстротечность процесса апоптоза затрудняет исследование. В дальнейшем представляет интерес изучение роли лиганда Fas-L, так как пусковым моментом в реализации программированной клеточной гибели является взаимодействие Fas-рецептора с Fas-лигандом.

4. Повышение уровня ИЛ-8 может свидетельствовать о развитии нарушения микроциркуляции уже в начальных стадиях СД1 и LADA.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аметов А. С. Нарушение жизненного цикла и функции β -клеток поджелудочной железы: центральное звено патогенеза сахарного диабета 2 типа: Учебное пособие. — М., 2002.
2. Барышников А. Ю., Шишкин Ю. В. Иммунологические проблемы апоптоза. — М., 2002.
3. Клиническая иммунология и аллергология / Под ред. А. В. Караулова. — М., 2002.
4. Кононенко И. В., Смирнова О. М. // Сахарный диабет. — 2003. — № 2. — С. 42—48.
5. Миронова Г. Е. // Якут. мед. журн. — 2003. — С. 64—67.
6. Мохорт Т. В., Мельнов С. Б., Горанов В. А. // Пробл. эндокринологии. — 2000. — Т. 46, № 2. — С. 8—13.
7. Программированная клеточная гибель / Под ред. В. С. Новикова. — СПб., 1996.
8. Чистяков Д. А., Дедов И. И. // Сахарный диабет. — 1999. — № 3. — С. 52—57.
9. Bosi E. P. et al. // Diabetologia. — 1999. — Vol. 42. — P. 840—844.
10. Field L. L. // Diabetologia. — 2002. — Vol. 45. — P. 21—35.
11. Gambelunghie G. et al. // Clin. Endocrinol. — 2000. — Vol. 52. — P. 565—573.
12. Leslie R. D. G., Atkinson M. A., Notkins A. L. // Diabetologia. — 1999. — Vol. 42. — P. 3—14.
13. Lohmann T., Kellner K., Verloren H. S. et al. // Diabetologia. — 2001. — Vol. 44. — P. 1005—1010.
14. Nagata S., Suda T. // Immunol. Today. — 1995. — Vol. 16. — P. 39—43.
15. Ou D., Metzger D. L., Wang X. et al. // Diabetologia. — 2002. — Vol. 45. — P. 1678—1688.
16. Scherthaner G. // Международный журнал "Метаболизм" по факсу. Ежегодный обзор. — 2002. — Т. 4. — С. 8—10.
17. Seissler J., De Sonnaville J. J., Morgenthaler N. G. et al. // Diabetologia. — 1998. — Vol. 41. — P. 891—897.
18. Tuomi T., Carlsson A., Li H. et al. // Diabetes. — 1999. — Vol. 48. — P. 150—157.
19. WHO/ADA Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus // Diabetes Care. — 1997. — Vol. 20. — P. 1183—1197.
20. Zimmet P. Z., Turner R., McCarty D. // Diabetes Care. — 1999. — Vol. 22, N 2. — P. 59—64.

Поступила 28.09.04

© О. М. СМЕРНОВА, 2005

УДК 616.379-008.64-085

О. М. Смирнова

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА ТИПА 2

ГУ Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАН И. И. Дедов) РАМН, Москва

Сахарный диабет (СД) является одним из наиболее распространенных эндокринных заболеваний. Сегодня стало очевидным, что прогноз ВОЗ, предполагавшей, что к 2025 г. число больных СД в мире составит 300 млн человек, будет превышен. Социальное значение СД возрастает в течение последних десятилетий в связи с угрожающим увеличением частоты заболеваемости, тяжестью осложнений, высокой стоимостью лечения, существенным сокращением продолжительности жизни пациентов и возрастающей смертностью [1]. Установлено, что развитие СД существенно сокращает продолжительность жизни, причем чем моложе возраст, в котором дебютирует заболевание, тем на большее число лет сокращается продолжительность жизни [2, 3].

Развитию СД предшествует ряд стадий нарушения толерантности к углеводам. Так, если жизнь пациента представить в виде стрелки (рис. 1), то

видно, что от состояния нормы через стадию нарушения толерантности к глюкозе (НТГ), развитие СД типа 2 (СД2), осложнений диабета заболевание приводит к смерти. При таком понимании болезни возникает вопрос: возможна ли профилактика СД и его осложнений? В отношении СД2 можно ответить утвердительно. Первичная профилактика болезни подразумевает воздействие до начала болез-

Рождение $\rightleftharpoons$ НТГ $\rightleftharpoons$ СД2 $\rightarrow$ Осложнения $\rightarrow$ Смерть (норма)



Рис. 1. Развитие НТГ.