

П. И. Шишко, А. В. Древаль, Р. Е. Садыкова, С. С. Ефуни, А. Э. Матюков, И. А. Абугова, И. С. Полянская, Б. Г. Скуйбин, А. В. Филатов

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БОЛЬНЫХ ИНСУЛИНЗАВИСИМЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ С РАЗЛИЧНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТЬЮ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Институт питания РАМН, Институт иммунологии Минздрава РФ, Эндокринологический научный центр РАМН, Москва

В манифестации инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД), его течении и развитии осложнений одно из основных мест отводится изменениям в иммунном статусе организма [3, 5, 7, 8]. В деструкции β -клеток островков Лангерганса участвуют как клеточное, так и гуморальное звено иммунитета. Подтверждением аутоиммунных механизмов развития диабета служит высокая частота определяемости аутоантител не только к β -клеткам, но и ко многим структурам организма. Факты и теории по данному вопросу обстоятельно изложены в обзоре [5]. Поскольку изменения в иммунной системе находят за долго до клинической манифестации диабета, то определение состояния иммунного статуса может иметь прогностическое значение, а у больных диабетом дает возможность проводить иммунокорректирующую терапию на разных сроках течения заболевания.

Однако результаты исследований иммунной системы больных ИЗСД часто противоречивы из-за неоднородности исследуемых групп по длительности заболевания, а также из-за отсутствия HLA-типирования, поскольку носители разных антигенов системы HLA имеют разную степень выраженности иммунных реакций [6]. Поэтому целью настоящего исследования было изучение иммунного статуса больных ИЗСД с разными сроками болезни и определение корреляций между степенью иммунного дисбаланса и носительством антигенов I и II классов системы HLA.

Материалы и методы

Обследованы 3 группы (А, Б, В) больных ИЗСД с разной длительностью заболевания (табл. 1). Контрольную группу составили 50 здоровых лиц, проживающих в Москве,

сходных по возрасту и полу с обследованными больными ИЗСД. Диабет исключался по результатам перорального глюкозотолерантного теста с 75 г глюкозы.

Субпопуляции лимфоцитов определяли методом проточной цитометрии. Счет клеток проводился на цитометре EPICS-C (фирма «Coulter» Франция).

Фагоцитарное звено иммунитета (фагоцитарный индекс, фагоцитарное число) определяли с помощью культуры стафилококка St 883. Имуноглобулины классов М, G, А определяли методом радиальной иммунодиффузии в геле с использованием моноспецифических сывороток. HLA-типирование проводили стандартным методом комплементзависимой цитотоксичности [14] с использованием набора гистотипирующих сывороток производства «Behring Institute» и Санкт-Петербургского НИИ гематологии и переливания крови.

Концентрацию глюкозы сыворотки определяли глюкозооксидазным методом, содержание сахара в моче — по цветной реакции с ортолунидином, ацетон в моче — готовым набором «Ацетотест» для экспресс-анализа. Больные получали инъекции инсулина Actrapid и Monotard в суточной дозе 45 ± 15 ЕД.

Статистическую обработку материала проводили на компьютере IBM с использованием программы «Microstat».

Результаты и их обсуждение

Анализ субпопуляций лимфоцитов крови больных ИЗСД выявил в начальные сроки заболевания сдвиги в сторону активации иммунной системы. Так, в группе А, где продолжительность диабета составила $0,5 \pm 0,4$ года, процентное содержание и абсолютное количество Т-лимфоцитов (T_L) значительно выше, чем в контрольной группе (табл. 2). Распределение субпопуляций T_L было сдвинуто в сторону Т-хелперов-индукторов (T_{H-I}), а отношение Т-хелперов-индукторов/Т-супрессоров-цитотоксических (T_{H-I}/T_{C-II}) превышало контрольные значения. Процент В-лимфоцитов (B_L) также превышал контрольные значения. Уровень клеток, несущих HLA-DR-рецепторы,

Таблица 1

Клинические характеристики больных с различной длительностью заболевания ($M \pm m$)

Показатель	Группа больных			p	p ₁
	А (n=20)	Б (n=20)	В (n=20)		
Длительность диабета, годы	$0,5 \pm 0,4$	$3 \pm 1,8$	$15 \pm 4,0$	<0,001	<0,05
Возраст, годы	$20 \pm 2,3$	$22 \pm 3,0$	$25 \pm 2,1$		
Распределение по полу (м/ж)	12м/8ж	10м/10ж	14м/6ж		
Среднесуточная гликемия, ммоль/л	$5,1 \pm 0,3$	$12,4 \pm 1,4$	$11,9 \pm 1,8$	<0,05	<0,05
Средняя амплитуда гликемических колебаний, ммоль/л	$2,0 \pm 0,2$	$6,0 \pm 0,5$	$5,6 \pm 1,1$	<0,05	<0,05
Суточная глюкозурия, г/сут	$3,5 \pm 1,2$	$25,81 \pm 9,15$	$35,4 \pm 9,82$	<0,001	<0,001
Доза инсулина, ЕД/сут	$20 \pm 4,8$	$46,8 \pm 5,1$	$54,6 \pm 4,9$	<0,01	<0,05
Ацетонурия, % больных	0	25,4	32,8		
Хронические неспецифические гнойные инфекции, % больных	2	4	60,4	<0,001	>0,05
Декомпенсация диабета, % больных	10	44,8	84,2	<0,001	<0,001

Примечание. p — достоверность показателей между группами А и В, p₁ — между группами А и Б.

Субпопуляции лимфоцитов в крови больных ИЗСД в разные сроки заболевания

Вид клеток	Группа больных			Контроль (n=50)
	А (n=20)	Б (n=20)	В (n=20)	
T _л (ЛТ1)	84±4 ^{а,д} /3,6±0,18 ^б	68±3/1,8±0,21	57±2,18 ^а /0,9±0,07 ^б	70±5/2,0±0,15
T _{х-и} (ЛТ4)	60±2 ^{б,д} /2,57±0,17 ^г	40±5 ^е /1,05±0,06	30±1,28 ^а /0,48±0,02 ^б	42±5/1,2±0,07
T _{с-ц} (ЛТВ)	24±2 ^а /1,03±0,08	28±4/0,75±0,27	28±2,46/0,52±0,08	28±5/0,8±0,09
T _{х-и} /T _{с-ц} (ЛТ4/ЛТВ)	2,5±1,0 ^а	1,45±1,2	1,0±0,5	1,5±1,0
V _л (CD21)	20±3 ^а /0,77±0,07	12±3/0,40±0,03	10±2/0,37±0,07	12±2/0,45±0,04
HLA-DR	14±4 ^а /0,56±0,04 ^б	10±1,74/0,38±0,08	5±1,28/0,28±0,02	7±2/0,3±0,02

Примечание. В числителе — процентное содержание, в знаменателе — абсолютное число ·10⁹/л. а — p<0,05 достоверность показателей между процентным содержанием лимфоцитов у больных и лиц контрольной группы, б — p<0,01 — между процентными показателями больных и лиц контрольной группы, в — p<0,05 — между абсолютными показателями в сравнении с контрольными величинами, г — p<0,01 — между абсолютными показателями в сравнении с контрольными величинами, д — p<0,05 — между показателями групп А и В, е — p<0,05 — между показателями групп А и Б, ж — p<0,05 — между группой А и контрольными значениями.

т. е. V_л, активированные T_л, моноциты, макрофаги, был выше нормы.

В дальнейшем с увеличением длительности заболевания (группа Б, 3±1,8 года) большинство показателей, характеризующих клеточное звено иммунитета, выравнивалось до контрольных значений (см. табл. 2).

В группе В, где длительность ИЗСД составила более 15 лет, изменения клеточного иммунитета противоположны изменениям, наблюдавшимся в ранние сроки диабета, т. е. снижение общего числа T_л, смещение соотношения T_{х-и}/T_{с-ц} в сторону T_{с-ц}. Количество V_л и клеток, несущих HLA-DR-рецепторы, в данной группе существенно не отличалось от контрольных цифр, однако наблюдавшееся снижение этих показателей в сравнении с группой А статистически достоверно.

Полученные с помощью метода проточной цитофлуориметрии результаты подтверждают волнообразный характер изменений в иммунной системе, которые отражают клиническую картину течения диабета. Если исходить из аутоиммунной концепции происхождения ИЗСД, то в ранние сроки болезни активация иммунной системы ведет к элиминации аутоантигена. С увеличением продолжительности диабета наступает выравнивание изменений в иммунной системе, поскольку исчезает аутоантиген из-за деструкции β-клеток, и, наконец, в поздние сроки диабета наступает картина иммуносупрессии за счет выраженных метаболических нарушений (см. табл. 1), когда происходит гликозилирование мембранных белков и белков-рецепторов иммунокомпетентных клеток, что приводит к снижению числа и функции этих клеток [5, 6, 9]. При этом состоянии иммуносупрессии у больных в анамнезе чаще встречаются хронические неспецифические гнойные заболевания (см. табл. 1).

В проводимой нами методике анализа лимфоцитов при помощи моноклональных антител (МКА) исследуются общие клоны T_{х-и} и также T_{с-ц}, хотя известен метод раздельного определения T_х, T_и, T_с, T_ц лимфоцитов, когда МКА метятся двойной меткой. Отсутствие такой информации не позволяет нам определить за счет каких лимфоцитов — T_х или T_и (и соответственно T_с или T_ц) происходят изменения исследованных нами общих клонов.

Фагоцитоз, определяемый фагоцитарным индексом и фагоцитарным числом, существенно менялся только в поздние сроки болезни (табл. 3). Снижение фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа в группе В в сравнении с контролем было характерно для больных с частыми гнойными инфекциями в анамнезе.

Изучение гуморального иммунитета по трем основным классам иммуноглобулинов (М, G, А) показало характерные изменения концентраций иммуноглобулинов в группах больных диабетом (табл. 4). Начало заболевания (группа А) знаменуется повышением концентрации иммуноглобулинов всех трех групп, и прежде всего IgG. Вероятно, это происходит вследствие того, что IgG представляют собой пул антител, в который входят антитела к β-клеткам [11], а последние в ранние сроки диабета, определяются в высоких концентрациях. С другой стороны, высокие цифры иммуноглобулинов могут отражать начало инсулинотерапии, так как введение инсулина вызывает выраженное повышение концентрации иммуноглобулинов всех классов [1, 8]. Поскольку в группе А только 2 больных не получили заместительную инсулинотерапию и их иммунологические показатели достоверно не отличались от значений всей группы, а остальные 18 человек получали Actrapid НМ и Monotard НМ, то говорить о влиянии экзогенного инсулина на иммунный статус больных не представляется возможным. С течением диабета уровень иммуноглобулинов достигает контрольных значений, в группе В их концентрация оказалась сниженной, за исключением IgA, содержание которого было повышено. Повышенный уровень

Таблица 3

Фагоцитоз у больных ИЗСД в разные сроки болезни

Показатель	Группа больных			Контроль (n=50)
	А (n=20)	Б (n=20)	В (n=20)	
Фагоцитарный индекс, %	92±4*	86±2	65±5**	85±10
Фагоцитарное число	9±3	8±2	4±2**	10±2

* p<0,05 между группами А и В.

** p<0,05 в сравнении с контролем.

Концентрация иммуноглобулинов (в мг%) у больных диабетом в разные сроки заболевания

Показатель	Группа больных			Контроль (n=50)	p	p ₁	p ₂	p ₃	p ₄
	A (n=20)	B (n=20)	B (n=20)						
IgM	214±51	172±32	134±21	156±74	<0,05	<0,05	<0,05	<0,01	<0,05
IgG	1200±124	971±97	550±74	914±387	<0,05	<0,05	<0,001	<0,01	<0,05
IgA	250±34	175±32	297±41	189±49	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Примечание. p — между группой А и контролем, p₁ — между группой Б и контролем, p₂ — между группой В и контролем, p₃ — между группами А и В, p₄ — между группами А и Б.

IgA характерен для ИЗСД [2], хотя природа данного феномена пока не известна.

Поскольку процент больных с декомпенсацией диабета, определяемой по величине гипергликемии и наличию ацетонурии, в группах Б и В был достоверно выше, чем в группе А (см. табл. 1), то возможно сделать предположение о влиянии степени метаболических нарушений на функцию иммунной системы. Так, выявленная у больных группы В картина иммуносупрессии может быть объяснена тем, что традиционная инсулинотерапия (подкожные инъекции инсулина 1—2 раза в сутки) была недостаточно эффективной, сопровождаясь частыми эпизодами ацетонурии, гликемией натощак более $13,2 \pm 0,5$ ммоль/л и неоднократными кетоацидотическими состояниями в анамнезе. Влияние метаболических нарушений на иммунный статус отмечено в ряде других работ [9, 11, 13].

Общепризнанная концепция ассоциации антигенов системы HLA с развитием диабета и его осложнений учитывает многообразие функций системы HLA, включая механизм двойного распознавания, презентацию антигена β-клетками, межклеточное взаимодействие, поэтому изменение функций HLA-системы меняет работу всей иммунной системы [8]. В литературе широко описаны корреляции классов HLA-системы со степенью риска заболевания диабетом. Нами предпринята попытка выявить ассоциации между классами HLA и степенью изменения иммунного статуса, поскольку в группах А, Б, В показатели иммунитета имели неоднородную характеристику.

Каждая группа больных делилась на 2 подгруппы в зависимости от степени изменения иммунологических показателей: 1-я — с выраженным отклонением от контрольных величин и 2-я — с незначительными изменениями в иммунном статусе. Критерием выраженности изменений в иммунном статусе служил процент отклонения от контрольных величин в сторону как повышения, так и снижения показателей клеточного иммунитета. У больных со значительными (более 10%) отклонениями показателей клеточного иммунитета чаще встречаются HLA A9, B8, B15, B18, DR3, DR4 по сравнению с больными, у которых изменения иммунной системы были достоверно малыми (отклонение от контрольных величин менее 3—5%) (табл. 5). При анализе частоты встречаемости DR4-антигена в группах А, Б, В определилась тенденция снижения процента дистрибуции данного антигена в генотипе больных с увеличением продолжительности заболевания. Работы по HLA-типированию больных ИЗСД показывают, что у носителей DR4-антигена в более ранние сроки развиваются диабетические ангионейропатии с неблагоприятным исходом по сравнению с лицами, не несущими данный антиген. Это позволяет предположить, что HLA-DR4 может служить маркером «летальности», поскольку с течением диабета процент больных, несущих HLA-DR4, уменьшается в общей популяции больных ИЗСД.

Таким образом, результаты исследования подтверждают значение антигенов HLA в прогнозировании не только возникновения диабета как

Таблица 5

Распределение антигенов HLA (в %) у больных диабетом с разными показателями иммунитета

Антигены HLA	Группа больных ИЗСД						Контроль (n=50)
	А (n=20)		Б (n=20)		В (n=20)		
	I	II	I	II	I	II	
A1	30,7	31,4	25,2	28,3	27,1	34,6	21,3
A9	43,6***	30,2	40,7*	31,1	44,5***	32,3	30,9
A10	15,1	16,7	15,8	17,2	17,8	20,1	14,7
B5	17,1	17,2	18,1	17,9	17,7	18,4	16,3
B8	29,7*	20,1	31,4***	21,5	30,9***	20,4	11,4
B12	12,0	12,1	12,5	13,7	12,6	11,2	7,1
B15	21,7*	17,4	19,8*	15,3	22,1*	16,7	10,2
B16	12,7	9,9	14,1	10,1	12,9	9,7	5,3
B18	21,4*	14,2	18,6*	12,7	20,8*	15,1	7,1
B27	15,1	14,0	15,9	14,7	15,9	15,7	8,1
DR3	89,7***	71,2	91,9***	75,1	94,5***	77,7	25,4
DR4	87,7***	78,1	76,5***	64,2	70,1***	62,2	17,7
DR5	20,1	24,5	21,2	25,5	22,0	25,7	21,9
DR7	39,5*	30,1	38,7	30,0	41,2*	30,7	29,7

Примечание. Достоверность показателей в сравнении с контролем: одна звездочка — p<0,05, две — p<0,01; три звездочки — p<0,05 достоверность между I и II подгруппами.

такого и его осложнений (вплоть до летальных), но и динамики иммунологических реакций, ведущих к деструкции β -клеток. Данный подход к ассоциации антигенов HLA с ИЗСД позволит при дальнейшем исследовании более точно определять диагностическую и прогностическую ценность генетических маркеров, отражающих гомеостаз иммунной системы при различных клинических формах диабета.

Выводы

1. Иммунологические показатели больных ИЗСД меняются волнообразно с течением заболевания: в ранние сроки диабета происходит активация как клеточного, так и гуморального звеньев иммунитета; с продолжительностью диабета изменения иммунной системы нивелируются и, наконец, через 10—15 лет развивается картина иммунологической супрессии.

2. У больных ИЗСД выраженные отклонения от нормы (более 10 %) показателей клеточного иммунитета ассоциируются с антигенами HLA A9, B8, B15, B18, DR3, DR4, в остальных случаях — с A1, A10, B5, B12, B16, B27, DR5, DR7.

3. Исследование генетических маркеров HLA у больных ИЗСД может быть использовано в комплексе предварительных исследований при проведении иммунокорректирующей терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Древал А. В., Жуковский М. А., Шербачева Л. Н., Михайлова В. С. // Сов. мед. — 1976. — № 6. — С. 16—18.
2. Древал А. В., Верещагина Г. В., Зубовский Г. А. // Там же. — № 7. — С. 11—14.
3. Кузьменко А. П., Шорин Ю. П. // Пробл. эндокринол. — 1991. — Т. 37, № 1. — С. 59—63.
4. Курава Т. Л. // Там же. — С. 63—67.
5. Шишко П. И. // Тер. арх. — 1991. — Т. 63, № 6. — С. 146—151.
6. Vach J.-F. // Clin. exp. Immunol. — 1988. — Vol. 72. — P. 1—8.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.379-008.64-06:616.13/.16-07:616.155.1-008.931

А. С. Ефимов, А. А. Сергиенко, З. Д. Воробец, Л. М. Сергиенко

АКТИВНОСТЬ МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ С и АТФаз ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ АНГИОПАТИИ

Диабетологический отдел (руководитель — акад. РАМН А. С. Ефимов) Киевского НИИ эндокринологии и обмена веществ, кафедра эндокринологии (зав. — проф. Я. И. Томашевский) Львовского медицинского института

Макрососудистые нарушения значительно чаще встречаются у более тяжелых больных сахарным диабетом, однако специфические механизмы их развития изучены недостаточно [13].

При сахарном диабете повышение внутриклеточного уровня глюкозы в тканях, независимых от инсулина, сопровождается метаболическими изменениями, играющими важную роль в патогенезе сосудистых нарушений [1, 2]. В частности, предполагается, что активация полиольного пути и угнетение метаболизма миоинозитола наряду с усилением неферментативного гликозилирования белков являются определяющими в механизмах

7. Bottazzo G. F., Dean B. M., McNally J. M. et al. // New Engl. J. Med. — 1985. — Vol. 313. — P. 353—360.
8. Bottazzo G. F., Todd I., Mirakian R. et al. // Immunol. Rev. — 1986. — Vol. 94. — P. 137—169.
9. Bottazzo G. F., Bosi E., Bonifacio E. et al. // Brit. med. Bull. — 1989. — Vol. 45, N 1. — P. 37—57.
10. Hitman G. A., Niven M. J. // Ibid. — P. 191—205.
11. Kennedy L., Lyons T. J. // Ibid. — P. 174—190.
12. Leslie R. D. G., Lazarus N. R., Vergani D. // Ibid. — P. 58—72.
13. Mandrup-Poulsen T. // Dan. med. Bull. — 1988. — Vol. 35. — P. 438—460.
14. Van Rood J. J., Hoof J. P., Keuning J. J. // Transplant. Rev. — 1975. — Vol. 22. — P. 75.

Поступила 05.12.91

P. I. Shishko, A. V. Dreval, R. E. Sadykova, S. S. Efuni, A. E. Matyukov, I. A. Abugova, I. S. Polyanskaya, B. G. Skubbin, A. B. Filatov — IMMUNE CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS WITH VARIOUS DURATION OF THE DISEASE

Summary. The paper presents data on the cellular and humoral immunity in different periods of insulin-dependent diabetes mellitus (with the disease standing of 0.5 ± 0.4 years, group A; 3 ± 1.8 years, group B; and 15 ± 4 years, group C). Group A patients presented with the immunity system activation: increased counts of T cells, B lymphocytes, T helpers and T inductors, increased share of active T cells (that is, DR positive ones), elevated content of IgM, IgG, IgA (214 ± 51 mg%, 1200 ± 124 mg%, 250 ± 34 mg%, respectively) as against the reference group (156 ± 74 , 914 ± 387 , 189 ± 49 mg%, respectively) ($p < 0.01$). In group B patients, who suffered a longer disease, the immunity parameters were within the normal range, and in group C patients, in whom the disease standing was the longest, these shifts were contrarywise as against those in group A, that is, T and B cell counts were lowered, as were the counts of T-helpers-inductors, Ig levels, and the phagocytosis index was 65 ± 5 vs. 85 ± 10 % in the controls ($p < 0.05$), the phagocytosis level being 4 ± 2 vs. 10 ± 2 in the controls ($p < 0.05$). The authors analyze the association of the HLA system characteristics with the immunity shifts. Patients with the HLA A9, B8, B15, B18, DR3, DR4 presented with significant shifts in the immunity status as against those with the HLA A1, A10, B5, B12, B16, B27, DR5, DR7. These data confirm a high informative value of the HLA markers for predicting the degree of alterations in the immunological homeostasis.

формирования диабетической ангиопатии [1, 11].

Эритроциты относят к инсулинрезистентным тканям, в которых при сахарном диабете создаются условия для повышения содержания глюкозы, сорбитола и фруктозы, снижения уровня миоинозитола, АТФ, глутатиона, активности мембраносвязанных ферментов, в том числе Na^+ , K^+ -АТФазы [18]. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы во многом зависит от функционального состояния фосфатдилинозитольного пути, тесно сопряженно с активностью протеинкиназы С [11].

Учитывая важность мембраносвязанной протеинкиназы С в поддержании необходимой кон-