

## ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВАРИАНТА ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Канд. мед. наук Т. М. ТИХОНОВА

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского АМН Украины», Харьков

**Проведен сравнительный анализ состояния клеточного иммунитета у больных медленно прогрессирующим аутоиммунным диабетом взрослых, сахарным диабетом (СД) 1-го и 2-го типа с длительностью заболевания до 6 лет. Вне зависимости от варианта течения заболевания установлено отсутствие достоверного различия в содержании общего числа лимфоцитов, снижение относительного количества CD3<sup>+</sup>-Т-зрелых, а также повышение содержания CD20<sup>+</sup>-В-лимфоцитов во всех группах больных СД по сравнению с данными контроля.**

*Ключевые слова:* сахарный диабет, медленно прогрессирующий аутоиммунный диабет взрослых, клеточный иммунитет.

Среди механизмов развития и эволюции сахарного диабета (СД) одна из ведущих ролей отводится иммунологическому звену патогенеза данного заболевания. Выступая на этапе манифестации в качестве ответной реакции на влияние пусковых факторов, как, например, при СД 1-го типа, иммунные нарушения определяют в дальнейшем характер течения самого СД, в том числе скорость развития и выраженность его специфических осложнений, а также атипичность течения сопутствующих воспалительных процессов [1, 2].

В последние годы показано наличие еще одной формы СД 1-го типа, а именно медленно прогрессирующего аутоиммунного диабета взрослых (МПАДВ или Latent autoimmune diabetes of the adults – LADA). Этот подтип СД 1-го типа манифестируется, как правило, у лиц старше 35 лет и характеризуется торпидным течением с постепенным развитием абсолютной инсулиновой недостаточности. С учетом основного патогенетического механизма поражения β-клеток с возникновением аутоиммунного инсулита верификация диагноза МПАДВ (или LADA) основана на выявлении аутоантител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GAD ab), цитоплазматическому антигену (ICA ab), тирозинфосфатазе (IA-2A ab), инсулину (IAA ab). Наличие указанных антител наряду со снижением базального и стимулированного уровня С-пептида является основным диагностическим маркером МПАДВ [3].

Несмотря на значительное количество исследований по изучению клеточного иммунитета у больных СД с учетом гетерогенности заболевания, данные по этому вопросу достаточно противоречивы. Изменения иммунного статуса у больных СД находят свое отражение в соотношении основных популяций и субпопуляций лимфоцитов в периферической крови. Большая часть работ

посвящена изучению состояния клеточного звена иммунитета у больных СД 1-го типа.

Проведенные исследования свидетельствуют о неоднородности изменений соотношения субпопуляций лимфоцитов у больных с впервые выявленным СД 1-го типа, а именно: при отсутствии изменений относительного содержания общих Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), Т-хелперов/индукторов (CD4<sup>+</sup>) в периферической крови содержание Т-лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>) у части больных выявлялось на нижней границе нормы, не установлено однозначных изменений в отношении иммунорегуляторного индекса (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), а также В-лимфоцитов [4]. Н. А. Сибирная и соавт. [5] обнаружили у больных СД 1-го типа с более продолжительным анамнезом заболевания активацию иммунного ответа по В-клеточному типу со снижением количества Т-супрессоров / цитотоксических лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>); Т-зрелых лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>). Выявленные И. И. Дедовым и соавт. [6] различия в величине иммунорегуляторных индексов у больных с острым и подострым началом инсулинозависимого СД стали основанием для предположения о клинической и иммунологической неоднородности данной формы заболевания. Результаты обследования больных СД 2-го типа, по данным Ю. В. Сульской и соавт. [7], свидетельствуют об активации как Т-клеточного, так и В-клеточного звена иммунитета. По мнению авторов, интегральным фактором, приводящим к указанным изменениям, является наличие СД 2-го типа, а не тяжесть и длительность заболевания.

Сравнительная оценка состояния клеточного иммунитета у больных МПАДВ, СД 1-го и 2-го типа представлена в единичных исследованиях [8].

Целью данной работы явился сравнительный анализ состояния клеточного иммунитета

у больных МПАДВ, СД 1-го и 2-го типа с длительностью заболевания до 6 лет.

Под нашим наблюдением находилось 136 больных СД с продолжительностью заболевания до 6 лет. Все больные были разделены на 3 группы. Первую группу составили больные (31 человек, из них 17 женщин и 14 мужчин, средний возраст  $32,14 \pm 1,97$  лет) с установленным диагнозом СД 1-го типа. Ко второй группе были отнесены 72 человека (43 женщины и 29 мужчин, средний возраст  $45,12 \pm 1,19$  лет). У этих пациентов, по данным анамнеза (торпидная манифестация заболевания, кратковременная и/или нестойкая компенсация углеводного обмена на фоне приема пероральной сахароснижающей терапии и развитие в ранние, до 6 лет, сроки от начала заболевания инсулинозависимости) предположительно был диагностирован МПАДВ. Верификация диагноза МПАДВ осуществлялась путем определения антител к цитоплазматическому антигену островков Лангерганса (ICA ab) с использованием набора «Qualitative ELISA Test for the Detection of circulating autoantibodies against islet cell antigens», антител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GAD ab) с помощью набора «Qualitative ELISA test for the detection of circulating autoantibodies against GAD antigens» и антител к тирозинфосфатазе (IA-2A ab) с использованием набора «Qualitative ELISA test for the detection of circulating autoantibodies against IA-2A». Титр антител считали положительным, если оптическая плотность для GAD ab была больше 1,05; для ICA ab — больше 1,05; а титр IA-2A ab был больше или равен 10 МЕ/мл. Наличие у больных одного и более вида антител в сочетании с указанными особенностями анамнеза заболевания являлось основанием для верификации диагноза МПАДВ.

К третьей группе были отнесены 33 больных (19 женщин и 14 мужчин, средний возраст  $48,61 \pm 1,17$  лет) с установленным диагнозом СД 2-го типа, назначение которым пероральной сахароснижающей терапии на протяжении периода наблюдения приводило к стойкой суб- или компенсации углеводного обмена.

У всех больных на момент обследования были исключены обострения хронических воспалительных процессов или острые процессы.

Помимо общеклинического обследования больным с помощью моноклональных антител прямым иммунопероксидазным методом проводилось определение таких иммунокомпетентных клеток, как: CD8<sup>+</sup>-Т-супрессоры/цитотоксические лимфоциты, CD3<sup>+</sup>-Т-зрелые лимфоциты, CD4<sup>+</sup>-Т-хелперы, CD16<sup>+</sup>-Т-натуральные киллеры, CD20<sup>+</sup>-В-лимфоциты. Согласно полученным результатам рассчитывался иммунорегуляторный индекс (ИРИ): CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Контрольную группу составили 50 практически здоровых лиц.

Значимость влияния клинического варианта течения СД на состояние клеточного иммунитета (по результатам определения субпопуляций

лимфоцитов) оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа.

В зависимости от характера распределения полученных показателей в изучаемых группах использовались критерии Краскела — Уоллиса (при распределении в сравниваемых группах, отличном от нормального) и Фишера (при нормальном распределении). Парное сравнение показателей в группах проводилось при помощи критериев Стьюдента (нормальное распределение) и Манна — Уитни (распределение, отличное от нормального).

На основании полученных результатов проведен анализ влияния фактора клинического варианта течения СД на показатели клеточного иммунитета (табл. 1).

Таблица 1

**Анализ соотношения содержания субпопуляций лимфоцитов в зависимости от варианта течения СД**

Исследуемый показатель	Установленные различия в зависимости от варианта течения СД
CD3 <sup>+</sup>	СД 1-го типа < МПАДВ < СД 2-го типа < контроль
CD4 <sup>+</sup>	МПАДВ < контроль – СД 1-го типа < СД 2-го типа
CD8 <sup>+</sup>	МПАДВ < контроль – СД 1-го типа < СД 2-го типа
CD16 <sup>+</sup>	СД 2-го типа < МПАДВ < СД 1-го типа < контроль
CD20 <sup>+</sup>	Контроль < СД 2-го типа – МПАДВ < СД 1-го типа
ИРИ	Контроль < СД 2-го типа – СД 1-го типа < МПАДВ

www.imj.kh.ua

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что вариант клинического течения СД является определяющим фактором в отношении таких показателей клеточного иммунитета, как CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> и ИРИ. Значимого влияния изучаемого фактора на общее количество лимфоцитов у больных выделенных групп установлено не было (табл. 2).

Для оценки достоверности различий показателей клеточного иммунитета в зависимости от варианта течения заболевания был применен критерий Ньюмана — Кейлса (*q*). Была показана значимость различий по сравнению с контрольной группой у больных СД 1-го и 2-го типа и МПАДВ для CD3<sup>+</sup> (*q* составлял 5,891; 3,294; 6,770; *p* < 0,05, соответственно); для CD16<sup>+</sup> (*q* составлял 3,400; 6,243; 5,613; *p* < 0,05, соответственно); для CD20<sup>+</sup> (*q* составлял 6,899; 5,612; 6,227; *p* < 0,05, соответственно).

Однако критерии, используемые при множественном сравнении групп (Ньюмана — Кейлса, Бонферрони), зачастую упускают существующие различия, которые проявляются при попарном

Влияние фактора клинического варианта течения СД на показатели клеточного иммунитета

Показатель	Сравниваемые группы				Критерий	df	p
	Контроль	СД 1-го типа	СД 2-го типа	LADA			
Лимфоциты	35,06±0,62	34,19±0,69	35,72±0,61	34,97±0,54	H = 2,048	3	0,769
CD4 <sup>+</sup>	40,10±0,63	40,29±1,02	42,76±0,89	39,69±0,87	H = 5680781,28	3	0,000
CD3 <sup>+</sup>	59,16±0,42	52,58±1,09	55,55±1,28	53,07±1,03	F = 9,263	3	0,000
CD8 <sup>+</sup>	27,82±0,52	27,61±1,31	28,33±0,93	25,22±0,88	F = 2,795	3	0,042
CD16 <sup>+</sup>	16,54±0,77	14,12±0,68	12,18±0,63	13,38±0,49	F = 7,845	3	0,000
CD20 <sup>+</sup>	10,34±0,36	14,55±0,88	13,70±0,67	13,40±0,46	F = 10,528	3	0,000
ИРИ	1,40±0,03	1,57±0,10	1,56±0,7	1,82±0,14	H = 5527151,04	3	0,000

Примечание. H – критерий Краскела – Уоллиса; F – критерий Фишера; df – число степеней свободы; p – значимость влияния.

сравнении. По мнению А. В. Рубановича, «при использовании поправки Бонферрони вероятность упустить существенные различия столь велика, что лучше просто перечислить, какие тесты дали значимые результаты» [цит. по 9]. Исходя из этого для уточнения анализа состояния клеточного иммунитета при разных вариантах течения СД применялось попарное сравнение изучаемых показателей (табл. 2).

Установлено снижение относительного количества CD3<sup>+</sup>-Т-зрелых лимфоцитов во всех группах больных СД по сравнению с таковым в контроле независимо от варианта течения заболевания. Достоверной разницы данного показателя между группами больных выявлено не было. Полученные результаты могут свидетельствовать о нарушении дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>) и/или об их усиленном апоптозе за счет усиления функциональной активности этой субпопуляции лимфоцитов у больных вне зависимости от варианта течения СД.

Патоморфологическим субстратом классического СД 1-го типа и МПАДВ является аутоиммунный инсулит (Т-клеточный инсулит). Установлено, что инфильтрированные вследствие развития аутоиммунного воспаления островки Лангерганса содержат в порядке убывания следующие иммунокомпетентные клетки: CD8<sup>+</sup>-лимфоциты (цитотоксические Т-лимфоциты), резидентные островковые макрофаги, CD4<sup>+</sup>-1 – лимфоциты (хелперы типа 1) и CD4<sup>+</sup>-2 – лимфоциты (хелперы типа 2). Т-лимфоциты играют важную роль в инициации и дальнейшем развитии аутоиммунного процесса, приводящего к уничтожению инсулинсинтезирующих клеток-островков. При этом основная роль принадлежит CD8<sup>+</sup>-лимфоцитам (цитотоксическим), в то время как CD4<sup>+</sup>-лимфоциты (особенно типа 2) имеют второстепенное значение [10].

При отсутствии достоверного различия в содержании Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>) у всех больных СД по сравнению с таковым в группе контроля определено значимое снижение этой фракции лимфоцитов у больных МПАДВ по сравнению

с аналогичным показателем у больных СД 2-го типа, что, по-видимому, связано как с относительным угнетением активности иммунного ответа на фоне торпидного течения аутоиммунного инсулита, являющегося патоморфологическим субстратом МПАДВ, так и частично с указанной выше умеренной миграцией Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>) в очаг аутоиммунного воспаления – островки Лангерганса. Полученные данные согласуются с результатами исследования, проведенного Y. Zhifang et al. [11].

Об угнетении супрессивных механизмов у больных МПАДВ свидетельствует снижение только у этой группы больных содержания CD8<sup>+</sup>-Т- супрессоров / цитотоксических лимфоцитов по сравнению с таковым в контроле. Последнее подтверждается повышением ИРИ (Тх/Тс) у больных МПАДВ на фоне отсутствия указанной выше достоверной разницы в содержании Т-хелперов по сравнению данными у здоровых лиц. Снижение количества CD8<sup>+</sup>-Т-супрессоров/цитотоксических лимфоцитов в периферической крови может быть обусловлено доказанным их участием в развитии локального аутоиммунного воспаления (инсулита).

При определении CD16<sup>+</sup>-Т-натуральных киллеров выявлено относительное снижение этой субпопуляции лимфоцитов у всех больных СД, а также достоверная разница в их содержании в периферической крови у больных СД 1-го типа по сравнению с таковым у больных СД 2-го типа (табл. 3). Полученные результаты согласуются с данными литературы о снижении количества CD16<sup>+</sup>-Т-натуральных киллеров в периферической крови у больных СД 1-го типа с длительностью заболевания до 6 лет по сравнению с аналогичным показателем у больных СД 1-го типа с продолжительным (более 10 лет) анамнезом заболевания и контрольной группой. С. Akesson et al. установили у больных МПАДВ как снижение содержания натуральных киллеров в периферической крови, так и изменение их активности [12]. Идентичные изменения в содержании натуральных киллеров у больных СД 1-го типа и МПАДВ эти авторы объясняют едиными патогенетическими

Таблица 3

**Сравнительный анализ исследуемых показателей у больных СД с разными клиническими вариантами течения заболевания**

Показатель	Группы сравнения	Критерий сравнения, <i>t</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
CD4 <sup>+</sup>	LADA — СД 2-го типа	2,116	103	0,037
CD8 <sup>+</sup>	Контроль — LADA	2,276	120	0,025
	LADA — СД 2-го типа	2,151	103	0,034
CD16 <sup>+</sup>	СД 1-го типа — СД 2-го типа	2,096	62	0,040
ИРИ	Контроль — LADA	2,470	120	0,015

Примечание. *t* — критерий Стьюдента; *df* — степени свободы; *p* — значимость различий.

механизмами развития и прогрессирования этих двух вариантов течения СД с превалированием аутоиммунных реакций.

Инфильтрация CD16<sup>+</sup>-Т-натуральными киллерами островков Лангерганса при развитии инсулита не столь значительна, однако им отводится определенная роль в снижении функции β-клеток с развитием инсулинозависимости [13]. Снижение данной субпопуляции Т-лимфоцитов с угнетением антителозависимого цитолиза при всех вариантах течения СД определяет снижение устойчивости больных к инфекции, в частности к вирусной.

Установленное повышенное содержание CD20<sup>+</sup>-В-лимфоцитов у больных трех групп по сравнению с контролем обусловлено активной продукцией антител, наиболее выраженной при СД 1-го типа, что

связано с патогенетическими механизмами развития и прогрессирования как самого СД, так и его специфических осложнений. Активация В-клеточного звена иммунитета также отражает частое сочетание СД и других аутоиммунных заболеваний, в частности аутоиммунного тиреоидита.

Таким образом, у больных сахарным диабетом вне зависимости от варианта течения заболевания не установлено достоверного различия в содержании общего числа лимфоцитов по сравнению с таковым в контроле.

Выявлено снижение относительного количества CD3<sup>+</sup>-Т-зрелых лимфоцитов во всех группах больных СД по сравнению с данными контроля независимо от варианта течения заболевания при отсутствии достоверной разницы в отношении данного показателя между группами.

Не определено значимого различия в содержании Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>) у всех больных СД по сравнению с таковым в группе контроля. При этом установлено достоверное снижение этой фракции лимфоцитов у больных МПАДВ по сравнению с данными у больных СД 2-го типа.

Установлено снижение содержания Т-супрессоров / цитотоксических лимфоцитов по сравнению с показателями контроля только у больных МПАДВ.

Выявлены относительное снижение Т-натуральных киллеров (CD16<sup>+</sup>) лимфоцитов у всех больных СД, а также достоверная разница в их содержании в периферической крови у больных СД 1-го и 2-го типа.

Установлено повышение содержания В-лимфоцитов (CD20<sup>+</sup>) у больных трех групп по сравнению с таковым в контроле, что обусловлено активной продукцией антител, наиболее выраженной при СД 1-го типа.

## Литература

1. Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Креминская В. М. Дифференциальная диагностика и лечение эндокринных заболеваний.— М.: Мед. информ. агентство, 2008.— 752 с.
2. Иммунологические аспекты эндокринных заболеваний: учебное пособие для системы послевузовского образования врачей / И. Н. Полякова, Г. А. Филатова, М. В. Чачиашвили, А. Л. Давыдов; под ред. Т. И. Гришиной.— М.: МГМСУ, 2006.— 42 с.
3. Pozzilli P., Di Mario U. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (Latent autoimmune diabetes of the adult). Definition, characterization, and potential prevention // *Diabetes Care*.— 2001.— Vol. 24, № 8.— P. 1460–1467.
4. Новиков В. И. Влияние Т-активина на показатели клеточного звена иммунитета у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 1-го типа [Электронный ресурс] // Сахарный диабет.— 1999.— № 4.— Режим доступа: www.diabet.ru.
5. Сибиряк Н. А., Барская М. Л., Лаповец Л. Е. Некоторые показатели клеточного и гуморального иммунитета у больных сахарным диабетом 1-го типа // *Лаб. диагностика*.— 2003.— № 4.— С. 47–50.
6. Особенности клеточного иммунитета у больных с впервые выявленным инсулинзависимым сахарным диабетом / И. И. Дедов, Л. А. Чугунова, О. М. Смирнова и др. // *Пробл. эндокринологии*.— 1994.— № 1.— С. 17–19.
7. Сульская Ю. В., Белоглазов В. А. Клеточное звено иммунитета у больных сахарным диабетом 2-го типа // *Имунология та алергологія*.— 2009.— № 4.— С. 55–61.
8. Роль цитокинов в регуляции иммунного ответа и механизмы гибели β-клеток при различных вариантах течения сахарного диабета типа 1 / И. И. Дедов, Т. В. Никонова, О. М. Смирнова и др. // *Пробл. эндокринологии*.— 2005.— Т. 51, № 3.— P. 3–7.
9. Рубанович А. В. Статистика множественных сравнений в ассоциативных исследованиях полиморфизма ДНК. Кошмар Бонферрони [Электронный ресурс] // Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова.— Режим доступа: [http://www.vigg.ru/get\\_file.php?id=196](http://www.vigg.ru/get_file.php?id=196).
10. Колесник Ю. М., Орловский М. А. Панкреатические

- островки: некоторые аспекты морфологии, физиологии и процессов деструкции при сахарном диабете типа 1 // Пробл. эндокринологии.— 2004.— Т. 50, № 2.— С. 3–10.
11. The CD4<sup>+</sup> regulatory T-cells is decreased in adults with latent autoimmune diabetes / Zh. Zhou, G. Huang, H. Ling et al. // Diabetes Res. Clin. Pract.— 2007. — Vol. 76, Is. 1.— P. 126–131.
12. Altered natural killer (NK) cell frequency and phenotype in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) prior to insulin deficiency / C. Akesson, K. Uvebrant, C. Oderup et al. // Clin. Exp. Immunol.— 2010.— Vol. 161, № 1.— P. 48–56.
13. Saicrian K. A. Study on the Role of Genes of Innate Immunity in Type 1 Diabetes.— Stockholm: Karolinska Institute, 2010.— 69 p.

### ОСОБЛИВОСТІ СТАНУ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ У ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ ЗАЛЕЖНО ВІД ВАРІАНТА ПЕРЕБІГУ ЗАХВОРЮВАННЯ

Т. М. ТИХОНОВА

Проведено порівняльний аналіз стану клітинного імунітету у хворих на повільно прогресуючий аутоімунний діабет дорослих, цукровий діабет (ЦД) 1-го і 2-го типу з тривалістю захворювання до 6 років. Незалежно від варіанта перебігу захворювання встановлено відсутність достовірної відмінності у складі загального числа лімфоцитів, зниження відносної кількості CD3<sup>+</sup>-Т-зрілих, а також підвищення вмісту CD20<sup>+</sup>-В-лімфоцитів у всіх групах хворих ЦД порівняно з даними контролю.

*Ключові слова:* цукровий діабет, повільно прогресуючий аутоімунний діабет дорослих, клітинний імунітет.

### THE PECULIARITIES OF THE STATE OF CELLULAR IMMUNITY IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS DEPENDING OF THE VARIANT OF THE DISEASE COURSE

T. M. TIKHONOVA

Comparative analysis of the state of cellular immunity was performed in the patients with slowly progressing autoimmune diabetes of adults, diabetes mellitus (DM) type 1 and 2 with the disease duration up to 6 years. Irrespective of the variant of the disease course, absence of significant differences in the amount of total number of lymphocytes, reduction of relative amount of CD3<sup>+</sup>-T-mature as well as increase of CD20<sup>+</sup>-B-lymphocytes in all groups of the patients with DM was determined in all groups of DM patients when compared with the controls.

*Key words:* diabetes mellitus, slowly progressing autoimmune diabetes of adults, cellular immunity.

Поступила 01.07.2011