

© Коллектив авторов, 2003

Е.В. Альбрант, А.А. Савченко, В.Т. Манчук

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА И МЕТАБОЛИЗМА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА

Институт медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск, РФ

Исследована зависимость иммунного статуса и метаболизма лимфоцитов крови у детей и подростков с сахарным диабетом 1-го типа. Обнаружено, что у детей с впервые выявленным диабетом отмечается значительное повышение величины иммунорегуляторного индекса и концентрации В-лимфоцитов при резком снижении ими биосинтеза Ig A, M и G. У этих детей выражено ингибирование начальных стадий гликолиза и окислительных реакций пентозофосфатного цикла, а также выявлены разнонаправленные изменения активности дегидрогеназных реакций цикла трикарбоновых кислот. Кроме того, в лимфоцитах крови этих больных снижен уровень антиоксидантной защиты, что дополнительно ухудшает физиологическое и функциональное состояние иммунокомпетентных клеток. Установленные изменения внутриклеточного метаболизма лимфоцитов крови у детей и подростков, отражающие снижение энергетических и пластических процессов, несомненно соответствуют нарушению функциональной реактивности иммунокомпетентных клеток и являются метаболической основой иммунопатогенетических осложнений сахарного диабета 1-го типа.

Authors studied correlation between immune system state and metabolism of lymphocytes in children and adolescents with I type of diabetes mellitus. Patients with initially diagnosed diabetes had significantly increased B-lymphocytes regulatory index and concentration accompanied by significantly depressed production of immunoglobulines A, M and G. These patients demonstrated also inhibition of initial stage of glycolysis and pentosophosphate cycle oxidative reactions accompanied by changed activity of dehydrogenase reactions in tricarbone acids cycle. In addition the level of anti-oxidative protection in serum of these patients was low, and this depression also deteriorate physiologic and functional state of immunocompetent cells. These changes of intracellular metabolism of blood lymphocytes in children and adolescents, reflected the depression of energetic and plastic processes, correlate with disorders of immune cells functional activity and are the metabolic basis of diabetes mellitus type I immunopathogenetic complications.

Сахарный диабет (СД) 1-го типа — одно из распространенных и наиболее тяжелых заболеваний, превращающих детей в инвалидов на всю оставшуюся жизнь, требующее постоянной дорогостоящей терапии, чреватое многочисленными тяжелыми осложнениями, иногда возникающими даже на фоне адекватной терапии.

Известно, что причиной развития СД 1-го типа являются аутоиммune реакции к β -клеткам островков Лангерганса поджелудочной железы [1—3]. Вместе с тем в литературе имеются достаточно противоречивые данные о роли различных звеньев иммунной системы в этиологии и патогенезе СД 1-го типа. В большинстве случаев на всех этапах заболевания, кроме наличия антител к β -клеткам, выявляется дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов, а также изменение их функциональной активности [4, 5]. В связи с этим в лечении СД 1-го типа все чаще стали применять иммунотропные средства [5, 6]. Однако для успешного применения иммуномодуляторов не-

обходимы знания состояния параметров иммунной системы как при впервые выявленном заболевании, так и в динамике патологического процесса.

Функциональная активность иммунокомпетентных клеток зависит от интенсивности внутриклеточных метаболических процессов [4, 5]. Лимфоциты имеют богатый набор рецепторов, через которые осуществляется регуляция их метаболических реакций и, следовательно, функциональной активности. Зависимость синтетических и энергетических процессов от гормонального статуса организма позволяет использовать лимфоциты периферической крови в качестве объекта исследования нарушений внутриклеточного обмена веществ при СД 1-го типа.

Целью данного исследования явилось изучение состояния клеточного и гуморального иммунитета, а также внутриклеточного метаболизма лимфоцитов у детей и подростков с впервые выявленным СД 1-го типа.

Материалы и методы исследования

Обследовано 94 детей и подростков (мальчиков 56% и девочек 44%) в возрасте от 7 до 17 лет, больных СД 1-го типа. Средний возраст больных составлял $11,75 \pm 0,2$ года. Контрольная группа состояла из 104 здоровых детей аналогичного возраста и соотношения по полу. На момент обследования дети не имели признаков инфекционной патологии и обострения хронических заболеваний. Больные СД 1-го типа были разделены на 2 группы: 1-я группа — 17 детей с впервые выявленным СД (гликозилированный гемоглобин $9,72 \pm 0,2$ %; мальчиков — 58,8%, девочек — 42,2%; средняя доза инсулина 0,96 Ед./кг); 2-я группа — 77 детей с длительностью заболевания СД от 1 мес до 12 лет (гликозилированный гемоглобин $11,2 \pm 0,6$ %; мальчиков — 42,6%, девочек — 57,4%; средняя доза инсулина 0,84 Ед./кг).

Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 и HLADR. Концентрацию IgA, M и G в сыворотке определяли методом радиальной иммунодиффузии по Манчини. Дополнительно вычисляли иммунорегуляторный индекс (CD4+/CD8+), лейко-Т-клеточный (лейкоциты/CD3+)

и лейко-В-клеточный индекс (лейкоциты/CD19+). Состояние В-системы иммунитета оценивали соотношением концентрации IgA, M и G к уровню В-лимфоцитов в крови.

С помощью биолюминесцентного метода определяли активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), прямой и обратной реакций лактатдегидрогеназы (соответственно ЛДГ и обр. ЛДГ), прямой и обратной реакций малатдегидрогеназы (соответственно МДГ и обр. МДГ), малик-фермента (НАДФМДГ), прямых и обратных реакций НАД- и НАДФ-зависимых глутаматдегидрогеназ (НАДГДГ и обр. НАДГДГ, НАДФГДГ и обр. НАДФГДГ соответственно), НАД- и НАДФ- зависимых изоцитратдегидрогеназ (соответственно НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ) и глутатионредуктазы (ГР) [4]. Активность НАДФ- зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах ($1\text{ E}=1\text{ мкмоль}/\text{мин}$) на 10 000 клеток.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Фонда содействия отечественной медицины.

Достоверность различий оценивали с помощью критерия Манна—Уитни. Статистическую обработку осуществляли в пакете прикладных программ SPSS 8,0.

Результаты и их обсуждение

У детей с впервые выявленным СД на фоне ярких клинических признаков декомпенсации (тяжелое общее состояние, тахикардия, рвота,

Таблица 1

Иммунный статус у детей и подростков с впервые выявленным СД и с продолжительностью заболевания более 1 месяца

Показатели	Здоровые дети (n=104)	Впервые выявленный СД (n=17)	СД более 1 месяца (n=77)
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	$6,67 \pm 0,26$	$6,28 \pm 0,21$	$6,51 \pm 0,19$
Лимфоциты, %	$38,6 \pm 1,1$	$46,5 \pm 1,6^{(1)}$	$40,0 \pm 1,2^{(2)}$
CD3+, %	$59,2 \pm 1,4$	$52,6 \pm 2,7$	$48,6 \pm 1,9^{(1)}$
CD4+, %	$31,5 \pm 1,2$	$40,3 \pm 3,5^{(1)}$	$39,1 \pm 2,1^{(1)}$
CD8+, %	$22,1 \pm 0,9$	$22,5 \pm 1,9$	$28,3 \pm 1,7^{(1)(2)}$
CD16+, %	$14,2 \pm 1,0$	$23,7 \pm 3,3^{(1)}$	$22,6 \pm 1,6^{(1)}$
CD19+, %	$18,1 \pm 2,0$	$27,5 \pm 3,7^{(1)}$	$20,9 \pm 1,2^{(2)}$
HLADR+, %	$15,9 \pm 0,7$	$21,6 \pm 2,8^{(1)}$	$21,2 \pm 1,2^{(1)}$
CD4+/CD8+	$1,45 \pm 0,07$	$2,01 \pm 0,38^{(1)}$	$1,35 \pm 0,07^{(2)}$
Лейкоциты/CD3+	$5,82 \pm 0,61$	$3,81 \pm 0,17^{(1)}$	$5,85 \pm 0,32^{(2)}$
Лейкоциты/CD19+	$16,43 \pm 2,12$	$8,34 \pm 1,41^{(1)}$	$14,47 \pm 1,01^{(2)}$
IgA, г/л	$1,31 \pm 0,08$	$1,97 \pm 0,32^{(1)}$	$2,21 \pm 0,20^{(1)}$
IgM, г/л	$1,33 \pm 0,08$	$1,38 \pm 0,27$	$1,47 \pm 0,12$
IgG, г/л	$10,79 \pm 0,47$	$10,53 \pm 1,32$	$10,85 \pm 0,64$
IgA/CD19+	$4,52 \pm 0,68$	$1,34 \pm 0,17^{(1)}$	$5,02 \pm 0,58^{(2)}$
IgM/CD19+	$4,50 \pm 0,84$	$1,49 \pm 0,57^{(1)}$	$3,50 \pm 0,42^{(2)}$
IgG/CD19+	$32,94 \pm 4,96$	$16,93 \pm 3,97^{(1)}$	$25,15 \pm 2,09^{(2)}$

Здесь и в табл. 2: достоверность различия показателей: ⁽¹⁾ при сравнении со здоровыми детьми, ⁽²⁾ при сравнении 1-й и 2-й групп больных СД.

Таблица 2

Активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у детей и подростков с впервые выявленным СД и длительностью заболевания более 1 месяца

Показатели, мкЕ	Здоровые дети (n=104)	Впервые выявленный СД (n=17)	СД более 1 месяца (n=77)
Г6ФДГ	6,87±0,71	0,002±0,001 ¹⁾	0,042±0,01 ¹⁾
Г3ФДГ	0,81±0,13	0,01±0,001 ¹⁾	0,01±0,001 ¹⁾
ЛДГ	18,13±2,14	14,41±3,57	2,90±0,39 ¹⁽²⁾
МДГ	45,79±4,62	34,87±8,95	116,38±25,98 ¹⁾
НАДФМДГ	7,02±0,94	29,46±8,19 ¹⁾	9,51±0,90 ²⁾
НАДФГДГ	0,34±0,06	0,63±0,33	0,80±0,15 ¹⁾
НАДГДГ	2,17±0,36	0,25±0,12 ¹⁾	1,85±0,29 ²⁾
НАДИЦДГ	1,65±0,28	1,06±0,36	0,67±0,10 ¹⁾
НАДФИЦДГ	12,35±1,26	0,01±0,001 ¹⁾	186,52±50,48 ¹⁾
Обр. ЛДГ	13,26±2,06	5,43±2,31 ¹⁾	52,43±10,26 ¹⁽²⁾
Обр. МДГ	81,41±10,21	13,76±3,31 ¹⁾	127,43±13,66 ¹⁽²⁾
ГР	7,75±0,88	0,13±0,08 ¹⁾	17,88±3,67 ¹⁽²⁾
Обр. НАДГДГ	79,37±9,72	1,31±0,45 ¹⁾	53,42±8,37 ¹⁽²⁾
Обр. НАДФГДГ	86,90±10,21	33,55±13,90 ¹⁾	37,31±4,53 ¹⁾

запах ацетона изо рта, полидипсия, полиурия, снижение массы тела, диабетический румянце, сухость кожных покровов и др.) выявлялись резкие изменения в лабораторных анализах (анемия, относительный и абсолютный лимфоцитоз и моноцитоз, ускоренная СОЭ, снижение общего белка, натрия и калия; повышение уровня триглицеридов, кетоновых тел и сахара крови). После назначения инсулина, дезинтоксикационной и метаболической терапии лабораторные показатели у этих детей нормализовались.

У детей с впервые выявленным СД, также как и в общей группе больных, было снижено относительное количество CD3+-лимфоцитов, повышенено содержание CD4+-, CD16+- и HLADR+-клеток (табл. 1). В дебюте заболевания уровень CD8+-лимфоцитов соответствовал значениям здоровых детей, тогда как у больных СД в целом этот показатель был достоверно выше. Также у детей 1-й группы было повышенено содержание CD19+-клеток, увеличен иммунорегуляторный индекс и снижены значения соотношений лейкоциты/CD3+, лейкоциты/CD19+, IgA/CD19+ и IgM/CD19+.

Таким образом, у детей с впервые выявленным СД обнаружено повышенное процентное содержание Т-хеллеров/индукторов по сравнению с детьми 2-й группы, неизмененный уровень Т-супрессоров/киллеров по сравнению со здоровыми детьми и увеличение иммунорегуляторного индекса. Эти данные свидетельствуют об активации цитокинового механизма аутоиммунной деструкции поджелудоч-

ной железы при клинической манифестации диабета и о стимуляции пролиферации и дифференцировки антителобразующих клеток в ответ на аутоантогенный стимул. Однако активация гуморального иммунитета у детей с впервые выявленным СД ограничивается только повышением количества В-лимфоцитов и концентрации IgA. Возможно, это связано с тем, что именно Ig A является наиболее часто встречающимся аутоантителом к ряду антигенов β-клеток поджелудочной железы [5, 7]. При этом продукция В-клетками IgA, IgM и IgG была снижена, что свидетельствует о нарушении функциональной активности, уменьшении синтеза в них иммуноглобулинов в дебюте заболевания при резком недостатке инсулина в крови у этих детей.

При исследовании особенностей метаболического статуса иммунокомпетентных клеток у детей и подростков 1-й группы обнаружена сниженная активность Г6ФДГ, Г3ФДГ, обр. НАДГДГ и обр. НАДФГДГ как по сравнению со здоровыми детьми, так и с детьми 2-й группы (табл. 2). Уровень НАДФМДГ у больных 1-й группы был резко повышен по сравнению с больными 2-й группы и здоровыми детьми. Также у этих детей были выявлены низкие уровни активности НАДФИЦДГ, обр. ЛДГ, обр. МДГ и ГР по сравнению со здоровыми. Установлено повышение этих ферментов у детей с длительностью диабета более 1 месяца. Уровни ЛДГ, МДГ, НАДФГДГ и НАДИЦДГ у больных 1-й группы не имели достоверных отличий от показателей здоровых детей.

Исследуемые оксидоредуктазы находятся на разных метаболических путях лимфоцитов, следовательно, по их активности можно судить об особенностях различных сторон внутриклеточного обмена веществ при данной патологии. Так, Г6ФДГ является инициализирующим и ключевым ферментом пентозофосфатного пути, конечные продукты которого (НАДФН и рибозо-5-фосфат) участвуют во многих реакциях макромолекулярного синтеза [4, 5, 8]. Снижение активности этого фермента в лимфоцитах больных СД предполагает пониженную наработку указанных интермедиаторов. Естественно, что интеграционные процессы клеточного метаболизма позволяют компенсировать отдельные звенья, функционирование которых по разным причинам не достаточно для поддержания оптимального уровня жизнедеятельности клетки. В частности, активность НАДФМДГ в лимфоцитах больных детей была повышена. Малик-фермент восстанавливает НАДФ до НАДФН и является ключевым в анаболических реакциях липидного обмена [9]. Причем повышение активности НАДФМДГ проявляется вместе с понижением уровня Г3ФДГ — фермента, участвующего в реакциях катаболизма липидов и осуществляющего перенос продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза [10, 11]. Следовательно, в иммунокомпетентных клетках детей и подростков с СД 1-го типа процессы анаболизма липидов преобладают над их распадом. При снижении активности Г3ФДГ и, соответственно, стимуляции гликолиза продукталипидного обмена можно предположить снижение субстратного потока по гликолизу, то есть ингибиование анаэробного дыхания клеток.

Ингибиование окислительных реакций пентозофосфатного цикла в лимфоцитах больных СД 1-го типа может привести не только к снижению ряда пластических процессов. Известно, что глутатионовая система антиоксидантной защиты тесно взаимосвязана с Г6ФДГ [9]. Поэтому неудивительно, что в лимфоцитах крови при СД 1-го типа снижается не только Г6ФДГ, но и ГР. ГР участвует не только в антиоксидантных процессах. Глутатион является одним из важнейших интермедиаторов синтеза цистеина, недостаток которого в иммунокомпетентных клетках приводит к развитию иммунодефицитных состояний.

Повышение активности ЛДГ и НАДФМДГ позволяет предположить активацию компенсаторных реакций, усиливающих аэробные процессы.

Тем более что снижение активности анаэробной реакции ЛДГ позволяет предположить понижение анаэробного гликолиза. Действительно, обнаружено, что активность МДГ и НАДИЦДГ в лимфоцитах детей с впервые выявленным СД не отличается от уровня здоровых детей, в то время как у больных с продолжительностью СД более 1 месяца активность МДГ значительно повышена, а уровень НАДИЦДГ снижен.

Таким образом, в метаболизме лимфоцитов периферической крови у детей и подростков с впервые выявленным СД обнаружено выраженное снижение внутриклеточной активности Г6ФДГ (в том числе и по сравнению с установленным уровнем у детей с продолжительностью СД более 1 месяца). По-видимому, снижение активности Г6ФДГ связано с понижением субстратного потока по гликолизу, что подтверждается выраженным ингибиованием уровня анаэробной реакции ЛДГ. Однако в иммунокомпетентных клетках детей с впервые выявленным СД обнаружены и компенсаторные процессы, позволяющие поддерживать уровень энергетических процессов. Так, сохранение активности аэробной реакции ЛДГ на уровне здоровых детей, но повышение активности ЛДГ и НАДФМДГ относительно больных детей с длительностью СД более 1 месяца определяют увеличение синтеза пирувата (в том числе и для окислительно-восстановительных реакций цикла трикарбоновых кислот). Вероятно, именно повышенный синтез пирувата определяет сохранение активности МДГ, НАДИЦДГ и СДГ на уровне нормы. В заключение можно констатировать, что у детей и подростков с впервые выявленным СД в лимфоцитах крови более выражены метаболические процессы цитоплазматического компартмента, а внутримитохондриальные реакции практически не изменены.

Выводы

1. У детей с впервые выявленным СД установлено значительное повышение величины иммунорегуляторного индекса и концентрации В-лимфоцитов при резком снижении уровня биосинтеза ими Ig A, M, G.
2. У детей и подростков с впервые выявленным СД выражено ингибиование начальных стадий гликолиза и окислительных реакций пентозофосфатного цикла, а также разнонаправленные изменения активности дегидрогеназных реакций цикла трикарбоновых кислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жук Е.А. // Иммунология. — 1997. — № 2. — С. 16—18.
2. Obrossova I.G., Fathallah L., Lang H.J., Greene D.A. // Diabetologia. — 1999. — Vol. 42. — P. 1187—1194.
3. Tsukamoto N., Chen J., Yoshida A. // Blood Cells Mol. Dis. — 1998. — Vol. 24. — P. 231—238.
4. Савченко А.А., Сунцова Л.Н. // Лаб. дело. — 1989. — № 11. — С. 23—25.
5. Biagiotti E., Bosch K.S., Ninfa P. et al. // J. Histochim. Cytochem. — 2000. — Vol. 48. — P. 971—978.
6. Дедов И.И., Сунцов Ю.И., Кудрякова С.В и др. // Пробл. эндокринол. — 1998. — № 2. — С. 47—51.

7. Verle P., Nhan D.H., Tinh T.T. et al. // Trop. Med. Int. Health. — 2000. — № 5. — P. 203—206.
8. Miguel A.S., Martins Das Neves L.C., Vitolo M. // Biotechnol. Prog. — 2003. — Vol. 19, № 2. — P. 320—324.
9. Gupta D., Raju J., Prakash J., Baquer N.Z. // Diabetes Res. Clin. Pract. — 1999. — Vol. 46. — P. 1—7.
10. Eguino P., Brocklehurst S., Arana A. // J. Anim. Sci. — 2003. — Vol. 81, № 2. — P. 432—440.
11. Markov A.K., Neely W.A., Didlake R.H. et al. // Metabolism. — 2000. — Vol. 49. — P. 698—703.

© Коллектив авторов, 2003

*М.К. Соболева, А.В. Чупрова, Ж.В. Нефедова, А.Г. Таранов, О.Б. Кириченко,
М.Е. Скоблякова, З.Н. Петухова, Г.А. Клевасова, М.Н. Голишева*

МАРКЕРЫ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Новосибирская государственная медицинская академия,
городской кардиоревматологический центр, г. Новосибирск, РФ

В работе представлены результаты выявления маркеров метаболического синдрома (МС) у 105 детей и подростков в возрасте от 8 до 18 лет с различными патогенетическими формами артериальной гипертензии (АГ). Оказалось, что случаи выявления как классической триады МС (гипертензия+гипергликемия+гиперурикемия), так и «смертельного квартета» (гипертензия+гипергликемия+гиперурикемия+ожирение), по-видимому, весьма редки — в нашем исследовании они не встретились. Независимо от генеза АГ, такие характерные для взрослых маркеры МС, как гипергликемия, инсулинорезистентность, гиперфибриногенемия, снижение фибринолитической активности крови, у наших пациентов отсутствовали. В то же время, опираясь на более современные критерии МС у взрослых, можно констатировать, что при различных клинико-патогенетических вариантах АГ у детей и подростков возможно встретить сочетание таких признаков МС, как АГ+висцеральный тип ожирения+сниженный уровень холестерина липидов высокой плотности и/или гипертриглицеридемия+гиперурикемия), так и «моно-маркеры» МС. На наш взгляд, важным ориентиром для поиска маркеров МС у детей и подростков с АГ для клиницистов должны быть сам клинико-патогенетический вариант АГ и данные наследственного анамнеза, ориентирующие на присутствие признаков МС у родственников пациента, при этом самый высокий риск обнаружения маркеров МС имеют дети с эссенциальной АГ и АГ, сопровождающей гипоталамический синдром в сочетании с висцеральным типом ожирения.

Authors examined 105 children and adolescents in the age 8—18 years old with different pathogenetic variants of arterial hypertension (AH) in order to estimate the rate on metabolic syndrome (MS) markers presence in these patients. Both classic MS triad (AH+hyperglycemia+hyperuricemia) and «mortal quartet» (AH+hyperglycemia+hyperuricemia+obesity) were no diagnosed in our study and may be they both are rather rare. Such MS markers as hyperglycemia, insulin resistance, hyperfibrinogenemia, decreased blood fibrinolytic capacity, typical in adult patients were absent in studied group. In the same time according to more contemporary MS criteria in adult patients, we can conclude that it is possible to detect both combination of such MS signs as AH+visceral obesity+decrease serum high density lipids and/or hypertriglyceridemia+hyperuricemia and MS «mono-markers» in children and adolescents with different clinical and pathogenetic variants of AH. We suppose that clinical and pathogenetic AH variant and family history date supposed the presents of MS markers in patient's relatives must orient the doctor on MS markers search, in children and adolescents with AH; and patients with essential AH and AH accompanied by hypothalamic syndrome and obesity, who have maximal risk of MS markers presence.

Артериальная гипертензия (АГ) — ведущий фактор риска развития основных сердечно-сосудистых заболеваний (ишемического и геморрагического инсультов, инфаркта миокарда и др.), доля которых в структуре заболеваемости, инвалидизации и смертности среди взрослого населения неуклонно возрастает [1, 2]. Совершенно очевидно, что истоки формирования АГ необходимо искать

в детском и подростковом периодах жизни [3—6]. По результатам различных исследований, АГ у детей и подростков выявляется с частотой 2,4—18% [3, 4]. В последние годы существенно возрос интерес к изучению сочетания нескольких факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний — ожирение, дислипидемия, гиперурикемия, гиперандрогения, АГ, а также сниженная толерантность