МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МЕДИЦИНСКИХ ПРОБЛЕМ СЕВЕРА

РОЛЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ И МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА I ТИПА

Монография

Красноярск
СФУ
2012

УДК 611.43
ББК 54.151.6,23
Р68

Рецензенты:
С.В. Смирнова, доктор медицинских наук, профессор;
Л.М. Куртасова, доктор медицинских наук, профессор

Авторы:
А.А. Савченко, Н.М. Титова, Т.Н. Субботина, Ф.А. Гершкорон, В.Т. Манчук, Е.В. Альбрант

Р68 Роль свободнорадикальных и метаболических процессов в патогенезе сахарного диабета I типа: монография [Текст] / А.А. Савченко, Н.М. Титова, Т.Н. Субботина, Ф.А. Гершкорон, В.Т. Манчук, Е.В. Альбрант. – Красноярск : Сиб. федер. ун-т, 2012. – 269 с.

ISBN 978-5-7638-2460-5

Рассмотрены современные данные о роли метаболических и перекисных процессов в патогенезе сахарного диабета I типа. Представлены результаты исследований метаболического статуса лимфоцитов, состояния перекисных процессов и активности антиоксидантной системы в клетках и плазме крови у детей и подростков в зависимости от продолжительности, стадии компенсации заболевания и развития осложнений.

Книга предназначена ученым, занимающимся исследованием патогенеза сахарного диабета I типа, врачам-эндокринологам, студентам и аспирантам вузов биологического и медицинского профиля.

УДК 611.43
ББК 54.151.6,23

ISBN 978-5-7638-2460-5

© Сибирский федеральный университет, 2012

Оглавление

Список сокращений **5**
Введение **7**

ГЛАВА 1. Молекулярно-клеточные механизмы этиопатогенеза инсулинзависимого сахарного диабета I типа (обзор литературы) **10**
1.1. Этиология и патогенез инсулинзависимого сахарного диабета I типа 10
1.2. Значение аутоиммунных процессов в развитии инсулинзависимого сахарного диабета I типа 16
1.3. Взаимосвязь между функцией метаболизма лимфоцитов в норме и при аутоиммунных заболеваниях 26

ГЛАВА 2. Механизмы нарушения обменных процессов при ИЗСД **39**
2.1. Синтез и секреция инсулина 39
2.2. Транспорт глюкозы в ткани в норме и при диабете 42
2.3. Нарушение обмена углеводов, липидов и белков при диабете 48
2.4. Гипергликемия как фактор развития осложнений сахарного диабета 53

ГЛАВА 3. Механизмы свободнорадикальных процессов и их роль в развитии и осложнении ИЗСД **59**
3.1. Активные формы кислорода: характеристика и механизмы образования 60
3.2. Свободнорадикальное окисление липидов, белков и углеводов при диабете 65
3.3. Система антиоксидантной защиты организма 73

ГЛАВА 4. Характеристика метаболических процессов лимфоцитов крови у детей с инсулинзависимым сахарным диабетом I типа **91**
4.1. Активность окислительно-восстановительных ферментов в лимфоцитах крови у детей и подростков с сахарным диабетом I типа 98
4.2. Особенности уровней активности ферментов в лимфоцитах крови у детей с впервые выявленным инсулинзависимым сахарным диабетом 116
4.3. Зависимость активности оксидоредуктаз и НЭ в лимфоцитах крови от длительности заболевания 124

4.4. Зависимость активности НАД(Ф)- и ФАД-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах от наличия осложнений у детей с сахарным диабетом I типа 138
4.5. Зависимость метаболического статуса лимфоцитов крови больных сахарным диабетом I типа от степени компенсации 148

ГЛАВА 5. Особенности состояния системы глутатиона и перекисное окисление липидов в лимфоцитах крови при сахарном диабете I типа 157
5.1. Состояние системы глутатиона и процессов перекисного окисления липидов в лимфоцитах крови больных сахарным диабетом I типа 158
5.2. Зависимость состояния системы глутатиона и процессов перекисного окисления липидов лимфоцитов от длительности сахарного диабета I типа 163
5.3. Зависимость состояния системы глутатиона и процессов перекисного окисления липидов лимфоцитов крови больных сахарным диабетом I типа от степени компенсации 165

ГЛАВА 6. Про- и антиоксидантный статус эритроцитов и плазмы крови у детей с сахарным диабетом I типа 168
6.1. Оценка процессов перекисного окисления липидов у детей и подростков с сахарным диабетом I типа 168
6.2. Состояние эритроцитарных мембран у детей и подростков с сахарным диабетом I типа 176
6.3. Содержание восстановленного глутатиона и активность ферментов его метаболизма в эритроцитах у детей и подростков с сахарным диабетом I типа 184
6.4. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах у детей и подростков с сахарным диабетом I типа 196
6.5. Содержание церулоплазмина в плазме крови у детей и подростков с сахарным диабетом I типа 203
6.6. Содержание аскорбиновой кислоты и её метаболитов в эритроцитах у детей и подростков с сахарным диабетом I типа 207
6.7. Интегральная характеристика уровня перекисных процессов и системы антиоксидантов в крови у детей и подростков с ИЗСД 215

Заключение 220
Библиографический список 225

Список сокращений

АДФ	—	аденозиндифосфат
АИТ	—	аутоиммунный тиреоидит
АК	—	восстановленная аскорбиновая кислота
АОС	—	антиоксидантная система
АПК	—	антигенпрезентирующая клетка
АТФ	—	аденозинтрифосфат
АФК	—	активные формы кислорода
Г3ФДГ	—	глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (НАД-зависимая)
Г6ФДГ	—	глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГSH	—	глутатион восстановленный
ГSSГ	—	глутатион окисленный
ГST	—	глутатион-S-трансфераза
ГПЛ	—	гидроперекиси липидов
ГПО	—	глутатионпероксидаза
ГР	—	глутатионредуктаза
ДАК	—	дегидроаскорбиновая кислота
ДК	—	диеновые конъюгаты
ДКГК	—	дикетогулоновая кислота
ДНК	—	дезоксинуклеиновая кислота
ДТЗ	—	диффузный токсический зоб
ИЗСД	—	инсулинзависимый сахарный диабет
ИПС	—	индекс прооксидантного статуса клетки
КоQ	—	коэнзим Q
КоА	—	коэнзим А
КТ	—	каталаза
ЛДГ	—	лактатдегидрогеназа
МДА	—	малоновый диальдегид
МДГ	—	малатдегидрогеназа
$НАД^+$	—	никотинамиддинуклеотид окисленный
НАДГДГ	—	НАД-зависимая глутаматдегидрогеназа
НАДН	—	никотинамиддинуклеотид восстановленный
НАДН-ГДГ	—	НАДН-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы
НАДН-ЛДГ	—	НАДН-зависимая реакция ЛДГ (анаэробная)
НАДН-МДГ	—	НАДН-зависимая реакция МДГ
$НАДФ^+$	—	никотинамиддинуклеотидфосфат окисленный
НАДФГДГ	—	НАДФ-зависимая глутаматдегидрогеназа
НАДФМДГ	—	НАДФ-зависимая декарбоксилирующая малатдегидрогеназа (малик-фермент)
НАДФН	—	никотинамиддинуклеотидфосфат восстановленный

НАДФН-ГДГ — НАДФН-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы
НЭ — неспецифическая эстераза
ОВИ — окислительно-восстановительный индекс
ОС — окислительный стресс
ПДГК — пируватдегидрогеназный комплекс
ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты
ПОЛ — перекисное окисление липидов
ПФП — пентозофосфатный путь
ПЭМ — проницаемость эритроцитарных мембран
РНК — рибоксинуклеиновая кислота
СД — сахарный диабет
СДГ — сукцинатдегидрогеназа
СЖК — свободные жирные кислоты
СОД — супероксиддисмутаза
СР — свободные радикалы
СРО — свободнорадикальное окисление
ССЭ — сорбционная способность эритроцитарных мембран
T_3 — трийодтиронин
ТТГ — тиреотропный гормон
ФАД — флавинадениндинуклеотид
ФМН — флавинмононуклеотид
ЦП — церулоплазмин
αГФДГ — глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ФАД-зависимая)
АВТМА — антитела к микросомальной фракции тиреоцитов
FT_4 — свободный тироксин
Hb — гемоглобин
HbA_{1c} — гликозилированный гемоглобин
IFN-γ — γ-интерферон
IL-1, 2, 6, 12 — интерлейкины-1, 2, 6, 12
MHC — главный комплекс гистосовместимости
NO — оксид азота
Th0-лимфоциты — Т-лимфоциты-хелперы 0 типа
Th1-лимфоциты — Т-лимфоциты-хелперы 1 типа
Th2-лимфоциты — Т-лимфоциты-хелперы 2 типа
TNF-α — фактор некроза опухоли-α

Введение

Сахарный диабет I типа, или инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД) является одним из наиболее распространенных эндокринных заболеваний в детском возрасте с ранним развитием осложнений, приводящих в последующем к инвалидизации больных. В Российской Федерации по данным обращаемости насчитывается более 2 млн больных сахарным диабетом, из которых около 300 тыс. страдают инсулинзависимым сахарным диабетом (в том числе дети). По данным литературы, в настоящее время во всем мире насчитывается 170 млн больных, к 2030 г. их количество удвоится (Дедов И. И. с соавт., 1998; Древаль А. В. с соавт., 1999; Adeghate E. et al., 2006; Tripathi B. K., Srivastava A. K., 2006; Brem H., Tomic-Canic M., 2007; Rane K. et al., 2011).

Сахарный диабет – одна из основных медико-социальных проблем современной медицины. Особенно часто сахарный диабет выявляется у детей. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в терапии ИЗСД, продолжительность жизни таких больных ниже среднепопуляционной и значительно увеличена смертность среди лиц молодого возраста. В нашей стране дети с момента установления диагноза получают юридический статус пожизненной инвалидности (как мера социальной помощи этой категории больных). Сахарный диабет относится к числу заболеваний, которые из-за широкой распространенности и наличия осложнений представляет реальную угрозу для экономики многих стран мира. Это ведет к повышению затрат на оказание медицинской помощи данной категории больных (Hanninen A., Harrison L. C., 2004; Adeghate E. et al., 2006; Tripathi B.K., Srivastava A.K., 2006; Jahansouz C. et al., 2011).

Диабет приводит к ранней инвалидизации и летальности, которые обусловлены поздними сосудистыми осложнениями: микроангиопатиями (ретинопатия и нефропатия), макроангиопатиями (инфаркт миокарда, инсульт, гангрена нижних конечностей) и нейропатиями. Сахарный диабет – частая причина слепоты и смерти от уремии.

Несмотря на сложность патогенеза поздних осложнений ИЗСД, основное место в их инициации и прогрессировании принадлежит хронической гипергликемии. Однако изучение распространенности

и частоты поздних осложнений сахарного диабета показывает, что не у всех больных, даже при наличии в течение длительного времени плохой компенсации, развиваются сосудистые осложнения. Это указывает на то, что, помимо гипергликемии, в развитии осложнений участвуют различные генетические или иммунологические факторы (Балаболкин М.И., 2000; Sia C., 2005; Sia C., Weinem M., 2005; Brem H., Tomic-Canic M., 2007; Байбурина Г.Г., 2011; Rohana A.G. et al., 2011; Skyler J.S., 2011).

Для детей с ИЗСД не существует альтернативы лечению инсулином. Чем ранее ИЗСД диагностирован и начата заместительная терапия инсулином, тем больше сохраняется функционирующих β-клеток поджелудочной железы и более гладко проходит первый период лечения.

В последние годы накапливается все больше сведений о ключевой роли иммунной системы в развитии многих патологических процессов, в том числе и ИЗСД. Диабет часто сочетается с другими заболеваниями аутоиммунной природы, при которых доказано наличие аутоантител (аутоиммунный тиреоидит, диффузный токсический зоб, пернициозная анемия, Аддисонова болезнь и др.), что свидетельствует о срыве иммунитета у этих больных. У 7–10 % больных с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы развивается ИЗСД, что в 30–50 раз чаще, чем в здоровой популяции (Балаболкин М.И., 2000; Вартанян Н.Л. с соавт., 2000; Lopez E.R. et al., 2004; Van de Linde P. et al., 2007; You S. et al., 2007; Fröhlich-Reiterer E. E. et al., 2011).

Известно, что иммунная система, является одной из гомеостатических структур организма и участвует во всех адаптационных реакциях (Хаитов Р.М., 2000; Рабсон А. с соавт., 2006; Chinen J. et al., 2006; Ярилин А.А., 2010). При этом лимфоциты (как основные эффекторы иммунитета) не только определяют резистентность организма, но и выделяют биологически активные вещества, влияющие как на реактивность самой иммунной системы, так и на другие органы и системы организма (Хаитов Р.М., 2000; Reinhardt R.L. et al., 2006; Xin J. et al., 2007; Ярилин А.А., 2010). Кроме того, клетки иммунной системы имеют богатый набор рецепторов, что делает их высокочувствительными к разнообразным изменениям гомеостаза организма (Klecha A.J. et al., 2006; Lanzavecchia A., Sallusto F., 2007; Vallochi A.L. et al., 2007; You S. et al., 2007; Krüger K. et al., 2011; Meylan F. et al., 2011). Можно считать доказанным, что нормальное функцио-

нирование лимфоцитов происходит только при соответствующем уровне внутриклеточных метаболических реакций (Frauwirth K.A., Thompson C.B., 2004; Куртасова Л.М. с соавт., 2006; Савченко А.А. с соавт., 2006; Капустина Т.А. с соавт., 2007; Куртасова Л.М. с соавт., 2010).

Кроме того, ИЗСД на первых этапах развития характеризуется повышенным окислительным стрессом с гиперактивацией прооксидантных и угнетением антиоксидантных механизмов. Одной из основных причин поздних осложнений диабета является гипергликемия (Brownlee M., 1992; The Diabetes Control…, 1993; Туракулов Р.И. с соавт., 1999; Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., 2000).

Хроническая гипергликемия через повышение скорости аутоокисления глюкозы увеличивает образование свободных радикалов, стимулирует процессы перекисного окисления липидов, приводит к избыточному образованию гликозилированных белков, а повышенная активность полиолового пути обмена глюкозы способствует истощению запасов НАДФН.

Состояние эритроцитарных мембран может служить естественной моделью для оценки тяжести патологического процесса при ИЗСД, поскольку доказана высокая корреляция между изменениями свойств мембраны эритроцитов и клеточных мембран других органов (Черницкий Е.А., Воробей А.В., 1981; Ивков В.Г., Берестовский Г.Н., 1982; Кагава Я., 1985; Дороховских Я.А., 1998; Колосова М.В., с соавт., 2000).

Таким образом, исследование метаболического статуса лимфоцитов и состояния свободнорадикальных и антиоксидантных процессов в эритроцитах в разные фазы заболевания может иметь важное прогностическое значение для больных ИЗСД и будет способствовать познанию патогенетических процессов заболевания.

ГЛАВА 1

Молекулярно-клеточные механизмы этиопатогенеза инсулинзависимого сахарного диабета I типа (обзор литературы)

ИЗСД является органоспецифическим аутоиммунным заболеванием с прогрессирующим повреждением β-клеток поджелудочной железы и снижением секреции инсулина. Заболевание манифестирует при разрушении примерно 80 % β-клеток поджелудочной железы. При этом возникает состояние абсолютного дефицита инсулина, вследствие которого организм теряет свою способность к утилизации углеводов как энергетического материала (Балаболкин М.И., 2000; Вартанян Н.Л. с соавт., 2000; Adeghate E. et al., 2006; Brem H., Tomic-Canic M., 2007; Заводник И.Б. с соавт., 2011).

Диабет у детей и подростков характеризуется тяжелым течением и, как правило, острым началом заболевания (Дедов И.И. с соавт., 2005; Яновская Э.Ю. с соавт., 2005; Cochran J.B. et al., 2006; Tripathi B.K., Srivastava A.K., 2006; Куликова Н.Г., Байтокова Р.Р., 2011). От времени появления первых признаков заболевания (жажда, похудание, выделение большого количества мочи, общая слабость, сухость кожи) до развития тяжелого состояния и значительных нарушений обмена веществ проходит обычно 2–4 недели. Детям, больным сахарным диабетом, требуется обязательное лечение инсулином и постоянный лечебный контроль.

Утвержденная в 1985 г. Всемирной организацией здравоохранения и принятая во всем мире современная классификация сахарного диабета явилась важным этапом в процессе изучения эпидемиологии, этиологии, патогенеза осложнений и лечения этого заболевания.

1.1. Этиология и патогенез инсулинзависимого сахарного диабета I типа

В последние десятилетия наметилась явная тенденция к росту заболеваемости сахарным диабетом вообще и инсулинзависимым в

частности. Ежегодно в мире регистрируется более 609 000 случаев вновь выявленного сахарного диабета, из которых 3–4 % приходится на инсулинзависимый тип (Дедов И.И. с соавт., 1998; Древаль А.В. с соавт., 1999; Балаболкин М.И., 2000; Adeghate E. et al., 2006; Skyler J.S., 2011). Каждые 15 лет число больных сахарным диабетом удваивается. Не находит объяснения достоверный факт сезонных колебаний заболеваемости ИЗСД. Так, абсолютно в любых географических широтах просматривается следующая закономерность: минимум случаев вновь выявленного ИЗСД приходится на весну и лето, и максимум – на осень и зиму. Отмечено, что через 1–2 года после эпидемии эпидемического паротита увеличивается число впервые выявленных случаев диабета у детей, а у некоторых больных уже в период заболевания эпидемическим паротитом могут появляться нарушения углеводного обмена вплоть до диабета и даже с кетоацидозом. Врожденная краснуха и вирусный гепатит нередко предшествуют развитию инсулинзависимого диабета. Вирусная инфекция ведет к поражению поджелудочной железы в виде инсулита, лимфоидной инфильтрации с последующей деструкцией островков Лангерганса. Возможно, что вирусная инфекция оказывает повреждающее действие на мембрану β-клеток, приводя к ее деструкции или изменяя антигенные свойства мембраны, и “включает” механизмы, осуществляющие аутоиммунные реакции, вызывая повреждение β-клеток и инсулиновую недостаточность (Adeghate E. et al., 2006; Roivainen M., 2006; Saliba F. et al., 2007; Kobayashi T. et al., 2011).

Учитывая важную роль вирусной инфекции в иммунопатогенезе ИЗСД, многие исследователи склонны связывать эту закономерность с большей частотой вирусных заболеваний в осенне-зимнее время года. Оппоненты этой точки зрения считают, что вирусная инфекция, которой ребенок переболел в осенне-зимнее время, не может быть триггером ИЗСД, развившегося вскоре после инфекции, так как известно, что инсулит, независимо от вызвавшей его причины, протекает, как минимум, несколько месяцев или лет. Считается, что вирусная инфекция в данном случае выступает в роли не триггера аутоиммунитета, а фактора, ускоряющего клиническую манифестацию латентно протекающего инсулита (Baltar J. et al., 2005; Sezer S. et al., 2006; Kobayashi T. et al., 2011). Более того, исследованиями Н.С. Асфандияровой с соавт. (2006) доказано, что с развитием сахарного диабета ассоциируется пролонгированный клеточный иммунитет на вирусные антигены (корь и/или паротит). Конкордантность отве-

та лимфоцитов на вирусные антигены и инсулин свидетельствует о том, что вирусы семейства *Paramyxoviridae* у некоторых лиц инициируют каскад иммунных реакций, ведущих к развитию диабета, при этом тип диабета определяется характером реакции иммунной системы на вирусные антигены и инсулин. Общий механизм развития аутоиммунной реакции на β-клетки поджелудочной железы в ответ на вирусную инфекцию представлен на рис. 1.1. В целом, это проявляется в трех различных механизмах. Во-первых, вирусы, инфицируя β-клетки, нарушают синтез и секрецию инсулина. При этом для иммунной системы становятся открытыми ранее скрытые антигены островковых клеток, к которым отсутствует естественная толерантность. Во-вторых, повреждение β-клеток может осуществляться за счет инфекции в экзокринном компартменте. В-третьих, механизм развития аутоиммунной реакции может основываться на молекулярной мимикрии (Roivainen M., 2006).

Согласно современным представлениям развитие ИЗСД может быть спровоцировано вирусной инфекцией у лиц с генетической предрасположенностью к заболеванию. Ключевым моментом патогенеза является воздействие диабетогенного вируса на иммуногенетически детерминированную к низкому иммунному ответу β-клетку островковой ткани поджелудочной железы. Предполагают, что отдельные эпитопы вирусной молекулы гомологичны детерминантам некоторых антигенов системы HLA, маркеров ИЗСД, которые экспрессируются клетками иммунной системы. Именно это обстоятельство, по-видимому, препятствует распознаванию вируса как чужеродного агента у лиц, предрасположенных к ИЗСД (Sia C., Weinem M., 2005).

Генетические дефекты при ИЗСД как моногенные признаки можно условно квалифицировать следующим образом (Aoki K. et al., 2006; Park Y. et al., 2006; Sanjeevi C.B., 2006; Philip B., Isabel W., 2011):

1. Генетически обусловленные дисфункции β-клеток: дефекты биосинтеза, депонирования и гранулирования инсулина; биосинтез аномального инсулина как следствие мутации генов, осуществляющих сборку А- и В-цепей гормона; дефекты мембранных глюкорецепторов и ферментов, конвертирующих проинсулин в инсулин; дефекты освобождения инсулина; снижение скорости репликации γ-клеток.

2. Генетически обусловленные нарушения периферического действия инсулина: аномальное связывание инсулина белковыми компонентами неиммунной природы; дефекты рецепторов к инсулину (снижение их количества и аффинитета) и антитела к ним; де-

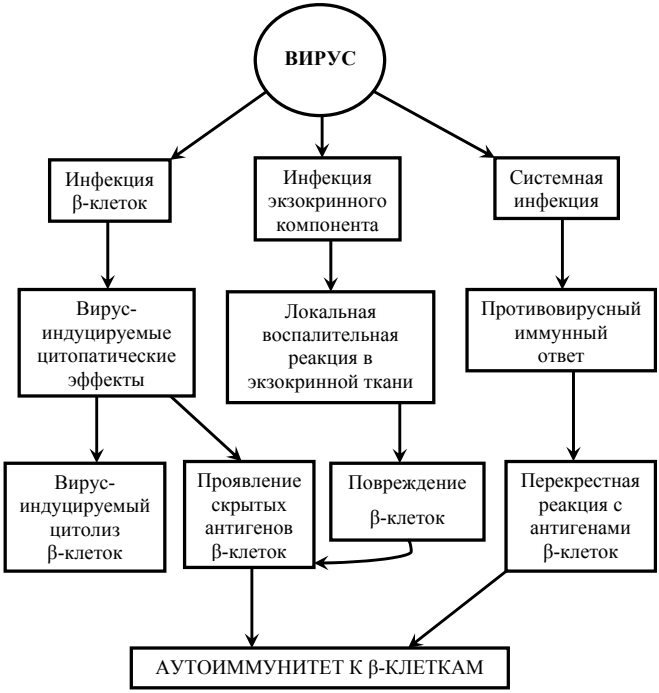

Рис. 1.1. Вирус-индуцированный механизм развития аутоиммунитета к β-клеткам поджелудочной железы

фекты пострецепторного взаимодействия, активация антагонистов и ингибиторов инсулина; дефекты структуры основной мембраны.

3. Генетические дефекты иммунной системы – принадлежность к определенным HLA-гаплотипам, склонность к аутоиммунным процессам, иммунологическая инсулинрезистентность.

По данным некоторых исследователей, при манифестном ИЗСД выявлена тесная ассоциация между носительством отдельных специфичностей (особенно DR3 и DR4) системы HLA и титром антител к вирусам Коксаки (Кураева Т.Л. с соавт., 1997; Асфандиярова Н.С. с соавт., 1999; Rohana A.G. et al., 2011). В свою очередь в других работах установлено, что хотя у больных с впервые выявленным ИЗСД встречаются антитела к вирусам Коксаки $B_{1\text{-}5}$ с высоким титром, однако не найдено связи между наличием и титром этих антител и HLA-фенотипом (Расовский Б.Л. с соавт., 1998). С помощью мето-

да РНК-молекулярной гибридизации в β-клетках обнаружена РНК-последовательность вируса Коксаки. Эти данные объясняют трудности идентификации вирусной инфекции у больных ИЗСД и свидетельствуют о том, что прогрессирование повреждения β-клеток связано не столько с цитотоксическим действием самого вируса, сколько с развитием вирусиндуцированного аутоиммунного процесса (Трофименко Е.В., 1995; Жук Е.А., 1997).

С этих позиций обсуждается роль нарушений экспрессии аутоантигенов клеточных мембран. Клетки-мишени несут на мембране антигены системы HLA, под влиянием вирусов их экспрессия усиливается, и они приобретают способность представлять антиген Т-лимфоцитам без участия антигенпрезентирующих клеток (Галенок В.А., Жук Е.А., 1997; Асфандиярова Н.С. с соавт., 1998). Вместе с тем особое значение в патогенезе имеют нарушения регуляторных механизмов иммунной системы и дисфункция тимуса. ИЗСД развивается при неэффективности супрессорных механизмов в иммунной системе, представленных субпопуляциями Т- и В-лимфоцитов, а также идиотип-антиидиотипической сетью антител (рис. 1.2). Причиной дисфункции регуляторных Т-лимфоцитов может служить врожденное или приобретенное нарушение деятельности тимуса как центрального органа иммунной системы, ответственного за дифференцировку Т-лимфоцитов (Дедов И.И. с соавт., 1994; Асфандиярова Н.С. с соавт., 1998; Ярилин А.А., 2010).

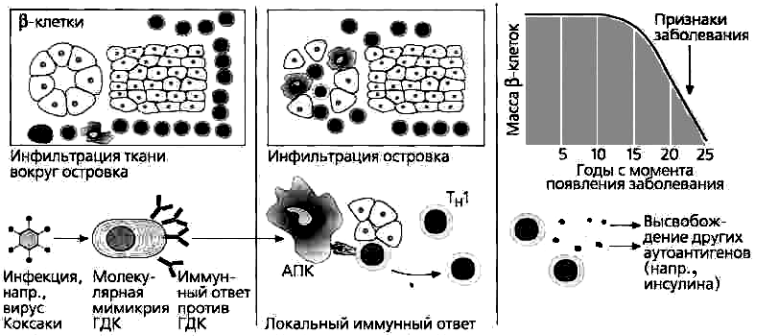

Рис. 1.2. Интегральный механизм этиопатогенеза при инсулинзависимом сахарном диабете I типа (Бурместер Г.-Р., Пецутто А., 2007)

Примечание: АПК – антигенпрезентирующая клетка, ГДК – глутаматдекарбоксилаза (p65).

При обследовании больных с впервые выявленным ИЗСД обнаружено, что абсолютно нормальными морфологически выглядят около 10–15 % панкреатических островков. Это оставшиеся неповрежденные β-клетки, продуцирующие инсулин в количестве, недостаточном для обеспечения потребности организма в инсулине. Более чем в 50 % островков β-клетки отсутствуют, а на их месте обнаруживается соединительная ткань. Как правило, никаких клеточных элементов иммунной системы в этих островках не выявляется. В описанных островках аутоиммунный процесс закончился, так как все β-клетки, несущие антигены, уничтожены. Остальные панкреатические островки буквально "нафаршированы" всеми клетками иммунной системы, причем клетками, находящимися в активированном состоянии. Сами же β-клетки находятся на различных стадиях гибели. Размер многих из них резко увеличен. Присутствие среди β-клеток практически всего спектра иммунокомпетентных клеток свидетельствует о разнообразии форм иммунологических реакций, протекающих там. Описанный инсулит представляет определенную стадию развития ИЗСД – предиабет, который протекает латентно в течение достаточно длительного времени (от нескольких месяцев у маленьких детей до нескольких лет у подростков и взрослых). К сожалению, выявить заболевание на данной стадии сложно, так как единственным маркером инсулита у детей, клинически абсолютно здоровых, является нарастающий титр аутоантител к различным компонентам β-клетки (Галенок В.А., Жук Е.А., 1995; Жук Е.А., 1997; Асфандиярова Н.С. с соавт., 1999; Зверева Я.С. с соавт., 1999; Liadis N. et al., 2005; Rhode A. et al., 2005).

Необходимо отметить, что вирусная инфекция на фоне генетической предрасположенности – не единственный этиологический фактор ИЗСД. Считается, что важную роль в механизмах развития заболевания играют также химические вещества, попадание которых в организм повышает вероятность аутоиммунного инсулита у генетически предрасположенных к ИЗСД людей (Мейрамова А.Г., 2003; Mathews C.E. et al., 2005; Lukivskaya O. et al., 2007; Smith A. C. et al., 2007). Такие вещества, называемые "диабетогенами", обладают высокой тропностью к β-клеткам поджелудочной железы, вызывая гибель последних. Наиболее выраженный вклад в химическое повреждение островковых β-клеток вносят диабетогены, содержащиеся в пищевых продуктах – нитрозамины и цианиды (Mathews C.E. et al., 2005; Al-Shamsi M. et al., 2006). Хроническое злоупотребление алкоголем, ведущее к разви-

тию панкреатита, также является немаловажным фактором развития сахарного диабета I типа (He L. et al., 2006; Bourikas L.A. et al., 2007; Nagasawa H. et al., 2007). Серьезные последствия инсулита – это дефицит секреции инсулина. Именно дефицит данного гормона определяет сложную систему сочетанных расстройств метаболизма и в конечном счете обусловливает развитие осложнений ИЗСД.

В связи с пожизненным характером заболевание имеет такие стадии: компенсация, декомпенсация с ее крайними формами – диабетической и гипогликемической комами, ремиссия (Трофименко Е.В., 1995; Балаболкин М.И., 2000; Adeghate E. et al., 2006; Noori N., Kopple J.D., 2010).

Компенсация – отсутствие клинических симптомов болезни и нормализация метаболических нарушений на фоне основного комплексного лечения в виде дието- и инсулинотерапии. Если же метаболические нарушения сохраняются выраженными при отсутствии клинических проявлений болезни, можно констатировать лишь состояние клинической, т. е. неполной компенсации.

Декомпенсация – характеризуется как клиническими, так и метаболическими нарушениями. Метаболические нарушения при этом могут быть различной степени тяжести, показателем которых в первую очередь является развитие кетоза, что определяет также необходимость срочных терапевтических вмешательств. В связи с этим предлагается выделять состояния декомпенсации с кетозом и без кетоза.

Ремиссия – состояние, характеризующееся полным отсутствием клинических проявлений заболевания и нормализацией метаболических нарушений при соблюдении диетического режима и отсутствии потребности в экзогенном инсулине или при очень низкой потребности в нем (до 0,3 ЕД на 1 кг массы тела ребенка в сутки). Однако по истечении года болезни и тем более при длительных сроках заболевания и у этих детей процесс может прогрессировать до тотальной инсулинной недостаточности (Мартынова М.И., 1984).

1.2. Значение аутоиммунных процессов в развитии инсулинзависимого сахарного диабета I типа

Критерии аутоиммунных болезней были сформулированы в 1961 г. L. Witebsky (Хаитов Р.М., 2000; Ярилин А.А., 2010). Во-первых,

критерии болезни включают наличие аутоантител или сенсибилизированных лимфоцитов во всех случаях заболевания, хотя бы на некоторых его стадиях. Во-вторых, при аутоиммунном заболевании должен быть обнаружен и охарактеризован аутоантиген. С момента проведения первых исследований, показавших, что ИЗСД характеризуется наличием аутоантител к антигенам островка поджелудочной железы, установлена их характерная поликлональная активация. Особый интерес представляют имеющие наибольшее прогностическое значение аутоантитела к видонеспецифическому антигенному комплексу β-клеток p64-69 и аутоантитела к цитоплазматическому антигену β-клеток, появляющиеся задолго до манифестации сахарного диабета и постепенно исчезающие в течение нескольких лет после возникновения клинических симптомов. Доклиническая иммунодиагностика ИЗСД в группах риска, основанная на выявлении аутоантител к белку p64-69 β-клеток, позволяет за время от года до восьми лет до клинической манифестации заболевания ставить диагноз предиабета, подбирать диету и иммунокорригирующую терапию (Жук Е.А., Галенок В.А., 1995; Жук Е.А., 1997; Petersen J.S. et al., 1999; Goffin L. et al., 2006; Skyler J.S., 2011).

Помимо указанных антител, при диабете I типа в сыворотке крови больных выявляются и другие антитела к антигенам островка поджелудочной железы: цитотоксические, к инсулину, проинсулину и глутаматдекарбоксилазе. У больных, страдающих ИЗСД, в сыворотке крови также определяются органоспецифические аутоантитела к тиреоглобулину, пероксидазе щитовидной железы, париетальным клеткам желудка, внутреннему фактору Кастла, клеткам коры надпочечника, антилимфоцитотоксические, к тубулину, активину, иммуноглобулинам (Ig G) и неорганоспецифические аутоантитела: антиядерные, к гладкомышечным волокнам, фибробластам; ретикулярные и митохондриальные, а при лечении инсулином – антитела к экзогенному инсулину, глюкагону, соматостатину, панкреатическому полипептиду. Все перечисленные антитела рассматриваются как эпифеномен или как маркеры ИЗСД. Они не вовлечены в механизмы деструкции β-клеток (Badenhoop K., Boehm B.O., 2004; Carnevale V. et al., 2004; Park Y. et al., 2006; Sezer S. et al., 2006; Wenzlau J.M. et al., 2011).

Механизм деструкции β-клеток поджелудочной железы сложен. Длительное время обсуждались три модели патогенеза ИЗСД: “Копенгагенская”, “Лондонская” и “Стенфордская”.

Последовательность патогенетических процессов в "Копенгагенской" модели была представлена следующим образом:

1. Инициация и деструкция β-клеток поджелудочной железы зависит от высвобождения под влиянием различных веществ (вирусы, химические вещества, избыток интерлейкина-1) антигена β-клеток.

2. Триггирование синтеза и высвобождения из макрофагов ИЛ-1.

3. Стимуляция секреции лимфокинов (γ-интерферон и фактор некроза опухолей) Т-хелперами под влиянием ИЛ-1.

4. γ-Интерферон и фактор некроза опухолей непосредственно принимают участие в разрушении β-клеток, причем γ-интерферон индуцирует экспрессию генов HLA II и I классов в островке поджелудочной железы, что и замыкает "порочный" круг деструкции новых β-клеток (Almawi W.Y. et al., 1999; Ivakine E.A. et al., 2006; Zhang C.L. et al., 2007; Zipris D. et al., 2007; Прохоренко Т.С. с соавт., 2011; Meylan F. et al., 2011).

Схема участия клеток иммунной системы и основных цитокинов в аутоиммунной реакции против β-клеток поджелудочной железы представлена на рис. 1.3. На начальной стадии болезни антигенпрезентирующие клетки (АПК), в качестве которых выступают макрофаги и дендритные клетки, представляют специфические рецепторы β-клеток наивным Th0-лимфоцитам (Т-хелперы нулевого типа, $CD4^+$-клетки) посредством иммунного синапса (с участием пар антигенов главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса – Т-клеточный рецептор и корецепторных взаимодействий). АПК продуцируют интерлейкин-12 (IL-12), который способствует дифференцировке Th0-лимфоцитов в Th1-клетки (Т-хелперы 1 типа, $CD4^+$-клетки). Th1-лимфоциты начинают продуцировать γ-интерферон (IFN-γ) и интерлейкин-2 (IL-2). Эти цитокины стимулируют покоящиеся макрофаги, которые образуют интерлейкин-1 (IL-1), фактор некроза опухоли-α (TNF-α) и свободные радикалы. Их комплексное действие на β-клетки вызывает цитотоксический эффект. Цитотоксические Т-лимфоциты ($CD8^+$-клетки), экспрессирующие Т-клеточный рецептор к антигенам β-клеток, распознают комплекс МНС I класса и антигенного пептида β-клеток и разрушают последние с помощью перфоринов и гранзимов. Разрушению β-клеток также способствует взаимодействие клеток с участием пар Fas–FasL (Воробьев А.А. с соавт., 2006).

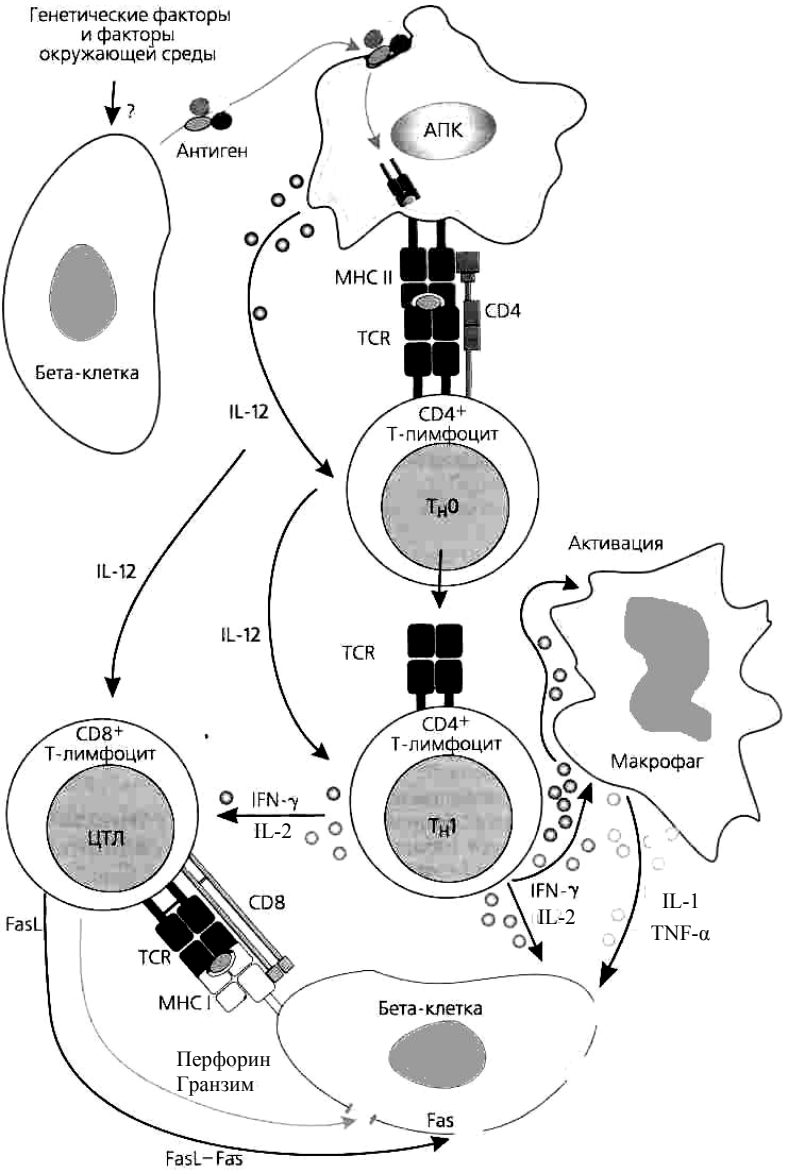

Рис. 1.3. Механизмы аутоиммунной деструкции β-клеток (Воробьев А.А. с соавт., 2006)

В “Лондонской” модели основное внимание уделено индукции генов HLA II класса на эндокринных клетках островка поджелудочной железы под влиянием фактора некроза опухолей и γ-интерферона при высокой концентрации ИЛ-1. Далее следует абберантная экспрессия генов DR3 и DR4. В этих условиях Т-цитотоксические лимфоциты способствуют усилению В-клеточного киллерового механизма (Nikitina-Zake L., 2004; Sanjeevi C. B., 2006; Philip B., Isabel W., 2011).

Исходя из “Стенфордской” модели, в основе иммунопатогенеза ИЗСД лежит особенность аминокислотной последовательности определенного участка локуса DQ. Доказано, что в цепи этого локуса у здоровых лиц в 57-ом положении находится аспарагиновая кислота, тогда как у больных диабетом она замещена на другие аминокислоты – валин, серин или аланин (Ronkainen M.S. et al., 2006; Бурместер Г.-Р., Пецутто А., 2007). Так называемые “диабетогенные” аллели, по-видимому, связывают пептиды с отрицательным зарядом в положении 9, а определяющие “устойчивость” к диабету аллели с остатком аспарагиновой кислоты в положении 57 связывают пептиды, имеющие в положении 9 остатки серина, глицина или аланина. Пептиды с положительным зарядом в положении 9 направляют иммунный ответ по пути образования Th2-лимфоцитов, а пептиды с отрицательным зарядом индуцируют цитотоксический ответ с участием Th1-лимфоцитов (рис. 1.4).

Значительным прорывом в понимании механизмов деструкции β-клеток поджелудочной железы явились исследования о биологической значимости оксида азота (NO). NO – это относительно стабильный свободный радикал, период полужизни которого составляет несколько секунд. Продуктами окисления NO являются нитраты и нитриты (Jezek P., Hlavata L., 2005; Mason R.P., 2006). Повышение уровня в клетках также NO инициирует развитие апоптоза (рис. 1.5). Исследованиями последних лет показано, что именно NO, который образуется в островках и β-клетках поджелудочной железы, принадлежит основная роль в механизмах разрушения и гибели β-клеток, что и приводит к их резкому количественному уменьшению и развитию клинического ИЗСД (Alba-Loureiro T.C. et al., 2007; Ramakrishna V., Jailkhani R., 2007; Schuffer M. et al., 2007). Процесс, протекающий в β-клетках поджелудочной железы и приводящий к аутоиммунному диабету, выглядит следующим образом. Островок содержит около 2000 эндокринных клеток, из которых 65 % приходится на β-клетки

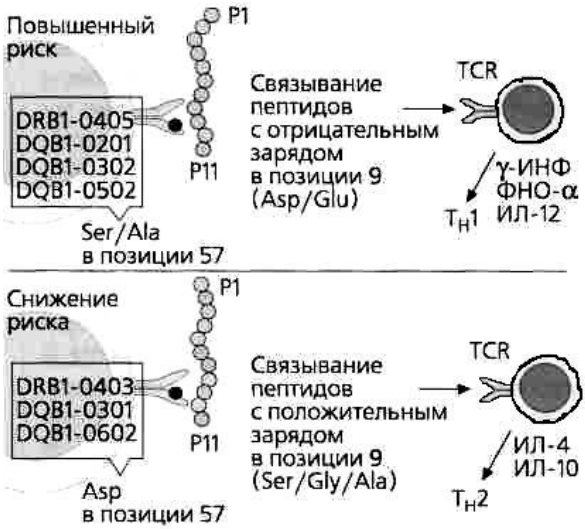

Рис. 1.4. Зависимость риска развития сахарного диабета I типа от аминокислотной последовательности локуса DQ (Бурместер Г.-Р., Пецутто А., 2007)

Примечание: TCR – Т-клеточный рецептор; ИЛ-4, 10, 12 – интерлейкины 4, 10, 12; ФНО-α – фактор некроза опухоли-α.

и 30 % – на α-клетки, и неэндокринных клеток (около 10 макрофагов на островок, фибробласты, эндотелиальные и дендритические клетки). Неэндокринные клетки островка опосредуют лизис интактных островков IL-1. Макрофагам принадлежит центральная роль в инициации каскада иммунных реакций, приводящих в конечном счете к аутоиммунной деструкции β-клеток. Активирование макрофагов осуществляется несколькими путями: взаимодействием с липополисахаридами, γ-интерфероном или фактором некроза опухолей, что сопровождается высвобождением большого количества NO и цитокинов (IL-1) и значительным повышением уровня нитритов, которые, по мнению многих исследователей, также участвуют в механизмах повреждения β-клеток. Установлено также, что ген NO-синтетазы локализуется на 11-й хромосоме в непосредственной близости от "полиморфной диабетической" области, что позволяет высказать предположение о сопряженности и вовлеченности этих двух областей хромосомы 11 в патогенез ИЗСД (Mullsten A. et al., 2006).

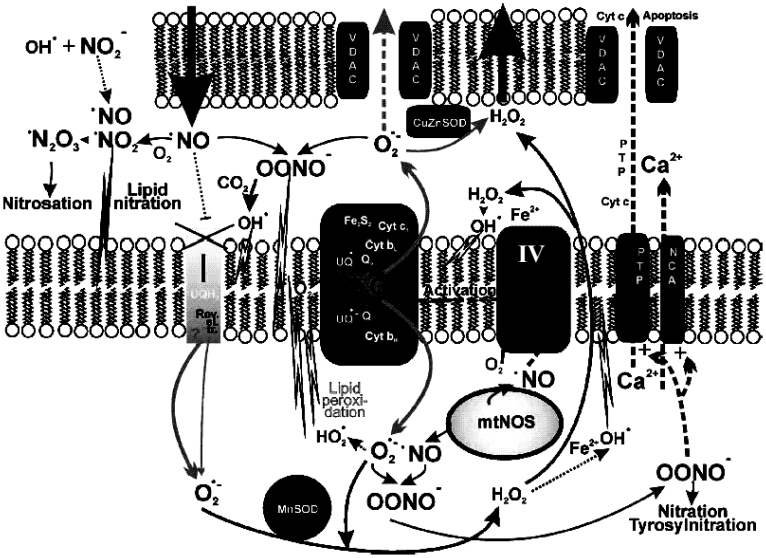

Рис. 1.5. Схема участия NO в развитии апоптоза

Примечание: подробно механизм участия NO в развитии апоптоза представлен в обзоре Jezek P. и Hlavata L. (2005).

Значительное место в механизмах деструкции β-клеток отводится простагландинам островка поджелудочной железы. Инфильтрация островка лимфоцитами и макрофагами, как установлено, постоянно встречается на самых ранних этапах развития диабета (Kumpfer H. et al., 2005; Bengmark S., 2006). Клеточные элементы, участвующие в "инсулите" индуцируют экспрессию цитокинов (IL-1 и др.), а последние в свою очередь – NO-синтетазу и цепную реакцию образования свободнорадикального соединения, которым является оксид азота, а также циклооксигеназу, ответственную за биосинтез из арахидоновой кислоты противовоспалительных простагландинов, усиливающих инсулит и приводящих вместе с оксидом азота к аутоиммунной деструкции β-клеток. Установлено, что в период развития аутоиммунного диабета четко прослеживаются две фазы процесса: NO-зависимая и NO-независимая. NO участвует в механизмах развития диабета на ранней стадии лимфатической инфильтрации островка поджелудочной железы. Накопление большого количества лимфоцитов повышает Т-лимфоцитоопосредованное

повреждение β-клеток независимо от образования NO (Балаболкин М.И., 2000; Fallarino F. et al., 2004).

Таким образом, исследования роли клеточного звена иммунитета в развитии сахарного диабета I типа сконцентрированы в трех направлениях:

1) получение характеристики клеток, инфильтрирующих и повреждающих островки Лангерганса;
2) выявление нарушений субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови при ИЗСД;
3) изучение факторов, подтверждающих наличие Т-клеточных иммунных реакций против островков Лангерганса.

Для характеристики лимфоцитов, инфильтрирующих β-клетки, необходима "аутопсийная" поджелудочная железа больных, с недавно выявленным ИЗСД. Случаи гибели людей вскоре после диагностики сахарного диабета редки, однако установлено, что большинство из мононуклеарных клеток, инфильтрирующих поджелудочную железу, несут маркеры $CD8^+$, $CD25^+$, $HLA\text{-}DR^+$. Т-лимфоциты крови не идентичны внутриостровковым лимфоцитам. Наибольшее значение при впервые выявленном ИЗСД имеют $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоциты, хотя их изменения неоднозначны у разных больных (Трофименко Е.В., 1995; Балаболкин М.И., 2000; Sia C., 2005; Tiittanen M. et al., 2006; Zhang C.L. et al., 2007; Skyler J.S., 2011).

В последние годы отмечен повышенный интерес к изоформам клеточного поверхностного маркера CD45: "наивным" $CD45RA^+$-лимфоцитам, относительно нечувствительным к антигенной стимуляции, и клеткам памяти $CD45RO^+$, которые пролиферируют в ответ на антиген и обеспечивают функции зрелых лимфоцитов. Показано, что при диагностировании ИЗСД увеличивается количество $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов, одновременно экспрессирующих обе изоформы маркера ($CD45RA^+$ и $CD45RO^+$). Лимфоциты с одновременной экспрессией маркеров "наивных" клеток и клеток памяти являются промежуточной формой дифференцировки лимфоцитов. Направление их дальнейшего функционального созревания определяется средовыми факторами, связанными с развитием ИЗСД (Ernerudh J. et al., 2004; Thude H. et al., 2004; Ярилин А.А., 2010).

Известно, что при впервые выявленном сахарном диабете I типа в периферической крови больных повышено содержание активированных Т-лимфоцитов, преимущественно $CD4^+$ фенотипа, с маркерами CD25, HLA-DR, в то время как в островках Лангерганса эти лим-

фоциты относятся к $CD8^+$-фенотипу. Количество NK-лимфоцитов при манифестации ИЗСД снижено, но повышена их активность на одну клетку (Park Y. et al., 2006; Rodacki M. et al., 2007; You S. et al., 2007; Zhou R. et al., 2007).

Другим механизмом β-клеточной деструкции является цитокиновый механизм. В нем ведущая роль принадлежит моноцитам/макрофагам, которые презентируют β-клеточные белки, соединенные с антигенами II класса главного комплекса гистосовместимости и самостоятельно или через активацию $CD4^+$-Т-лимфоцитов вырабатывают цитотоксичные для β-клеток молекулы – цитокины: IL-1, IL-6, TNF-α, IFN-γ, фактор активации лимфоцитов. Установлено, что моноциты/макрофаги в поджелудочной железе содержат в период разрушения β-клеток избыточное количество мРНК для IL-1 и фактор некроза опухолей (Дедов И.И. с соавт., 2005; Sia C., 2005; Zipris D. et al., 2007; Прохоренко Т.С. с соавт., 2011).

Третий механизм – антителоопосредованная цитотоксичность Т-лимфоцитов – наименее доказанный у человека вариант β-клеточной деструкции. При впервые выявленном сахарном диабете плазматические клетки синтезируют антитела класса G, но в низких титрах. Разрушающее влияние этих антител проявляется только при связывании комплемента. Возможно, антителоопосредованная цитотоксичность осуществляется через связывание антител с Fc-рецепторами K- и NK-клеток, моноцитов/макрофагов (Ronkainen M.S. et al., 2006).

Таким образом, инсулинзависимый сахарный диабет на первых этапах развития характеризуется повышенным окислительным стрессом с гиперактивацией прооксидантных и угнетением антиоксидантных механизмов. Разрушение β-клеток свободными радикалами приводит к денатурации содержащихся в них белков и их гиперэкспрессии на мембране островковых клеток. Презентация вновь возникших аутоантигенов моноцитами/макрофагами Т-лимфоцитам и секреция цитокинов способствуют поддержанию уже начавшегося процесса через образование свободных радикалов, нарушению активности регуляторных Т-лимфоцитов, срыву аутотолерантности, реакциям разрушения и дальнейшей деструкции β-клеток.

В настоящее время современные клинические подходы к лечению сахарного диабета I типа основаны на принципах адекватной заместительной инсулинотерапии, диетотерапии, рациональной физической нагрузки. Вместе с тем сформированная в настоящее время концепция ИЗСД как органоспецифического аутоиммунного

заболевания ставит задачу разработки метолов иммунотерапии, направленной на блокаду (сдерживание) иммунной агрессии против β-клеток поджелудочной железы и развития абсолютной инсулиновой недостаточности (Балаболкин М.И., 2000).

Следует отметить, что инсулинотерапия не может в полной мере влиять на основные патогенетические звенья, ведущие к прогрессирующей гибели β-клеток поджелудочной железы (аутоиммунный процесс, активацию процессов перекисного окисления липидов и др.). Наблюдаемое в клинической практике в ранний период после начала инсулинотерапии улучшение течения сахарного диабета (“медовый месяц”) связано в первую очередь с достижением устойчивой компенсации метаболических нарушений (Балаболкин М.И., 2000; Дедов И.И. с соавт., 2005).

Важность разработки методов патогенетической терапии, направленной на сохранение β-клеток поджелудочной железы, диктуется и чисто клиническими аспектами. Наличие эндогенной (остаточной) секреции у больных ИЗСД во многом определяет стабильное течение заболевания, а в дальнейшем – замедление развития поздних осложнений. Следует полагать, что поскольку симптомы инсулиновой недостаточности в виде гипергликемии и связанных с нею жалоб развиваются при поражении 80 – 90 % инсулинпродуцирующих β-клеток поджелудочной железы, возможности иммуномодулирующей терапии ограничены.

Характеризуя в целом иммуномоделирующую терапию ИЗСД, отметим неспецифические сложности такого лечения, обусловленные следующими причинами (Балаболкин М.И., 2000; Дедов И.И. с соавт., 2005; Adeghate E. et al., 2006; Brem H., Tomic-Canic M., 2007; Morales A.E., Thrailkill K.M., 2011):

1) отсутствием методов и препаратов, селективно действующих на клетки, участвующих в иммунопатогенезе заболевания;
2) возможностью побочных реакций, обусловленных иммуномодуляцией и отсутствием маркеров их выявления;
3) отсутствием разработанных доз и схем терапии в зависимости от картины болезни и характера иммунологических изменений;
4) возможностью индивидуальной чувствительности у больных и отсутствием маркеров её выявления;
5) отсутствием разработанных параметров контроля за лечебным воздействием.

Иммуномодулирующая терапия ИЗСД имеет как достоинства, так и недостатки. Известны наблюдения, когда после лечения наступала ремиссия, но затем течение диабета становилось неконтролируемым, резистентным к любому виду терапии, в том числе иммунореактивными препаратами. Характер такого ответа организма предстоит выяснить (Brem H., Tomic-Canic M., 2007).

Несмотря на это, в некоторых случаях иммуномодулирующая терапия позволяет продлить период ремиссии при ИЗСД, приводит к улучшению состояния больных с большой продолжительностью заболевания. По-видимому, иммуномодулирующее лечение показано на ранних стадиях болезни, а еще лучше – до манифестации клинических проявлений диабета, но это затруднено отсутствием маркеров прогнозирования развития ИЗСД (Weiss L. et al., 2006; Gonzalez-Rey E. et al., 2007). Иммуномодуляция считается бесполезной при максимальном разрушении β-клеток, хотя, учитывая их способность к регенерации и роль иммунной системы в развитии диабетических микроангиопатий, а также предварительные результаты генной терапии, такая возможность не может быть полностью исключена.

В будущем детальное исследование иммунопатогенеза ИЗСД, возможно, позволит перейти к специфической иммунотерапии, обусловленной четкими представлениями об этиологическом факторе и механизме развития болезни. Среди возможности специфической иммунотерапии следует назвать применение антиидиотипических антител, селективных моноклональных антител, активную иммунизацию людей, предрасположенных к заболеванию, плазмо- и цитоферез через нагруженные специфическим антигеном/антителом колонки, использование радиомеченных или нагуженных препаратов специфических антител. Но, по-видимому, эти направления вряд ли можно отнести к ближайшим перспективам.

1.3. Взаимосвязь между функцией метаболизма лимфоцитов в норме и при аутоиммунных заболеваниях

На сегодняшний день не вызывает сомнений, что в основе функциональных проявлений лимфоцитов лежат их метаболические реакции. Уже через несколько секунд после контакта лимфоцита с