

Иммунитет у больных сахарным диабетом 2 типа с сопутствующим метаболическим синдромом/ожирением. Сообщение 1. Лейкоцитарный состав крови, иммунофенотип лимфоцитов и ультраструктура нейтрофилов

К.П. Зак,
Б.Н. Маньковский,
И.Н. Кондрацкая,
В.В. Попова,
Я.А. Саенко,
О.Е. Липская,
Т.А. Семионова,
В.В. Афанасьева

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

Резюме. Исследован ряд показателей иммунитета у 108 больных, разделённых на 3 группы: 1) с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа (СД-2), 2) с метаболическим синдромом (МС) и 3) с СД-2 и сопутствующим МС (СД-2+МС). Контрольная группа состояла из 40 здоровых лиц, разделённых на две подгруппы, худых и полных, в зависимости от ИМТ. Установлено, что лейкоцитоз, наблюдаемый у больных СД-2, во многом зависит от сопутствующего ожирения. Он обусловлен преимущественно повышением абсолютных количеств моноцитов и нейтрофилов и сопровождается изменением их ультраструктуры, что указывает на дисрегуляцию их функции. Между показателями массы тела (ОТ и ИМТ) и количеством лейкоцитов у пациентов с МС и СД-2+МС существует положительная корреляция. При проточно-цитометрическом исследовании иммунофенотипа лимфоцитов не было выявлено достоверного изменения абсолютных количеств CD3+T-, CD4+T-, CD8+T-, CD20+ и CD56+ клеток в крови у худых больных с впервые выявленным СД-2. Однако у больных СД-2+МС с ожирением и пациентов только с МС имелось достоверное повышение абсолютных количеств CD3+T- и CD4+T-клеток. Подобное изменение количества CD3+T и CD4+T-клеток наблюдалось также в подгруппе полных здоровых лиц по сравнению с подгруппой худых лиц контроля. Следовательно, избыточная мас-

* адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна; e-mail: zdovado@ukr.net

Оригінальні дослідження

са является одним из основных триггеров, приводящих к нарушению как врождённого, так и адаптивного иммунитета. Полученные данные подтверждают и дополняют современную концепцию о том, что МС и СД-2 принадлежат к воспалительным хроническим системным низкоградиентным заболеваниям, в механизме которых ключевую роль играют адипокины. Локальное воспаление жировой ткани является одним из главных источников инсулинорезистентности и предиабета, за которыми следует развитие клинически диагностируемого СД-2. Таким образом, ряд нарушений, наблюдаемых у больных СД-2, является, по-видимому, следствием не столько самого заболевания, сколько сопутствующего ему ожирения.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, метаболический синдром, ожирение, иммунитет, лейкоциты, иммунофенотип лимфоцитов, ультраструктура нейтрофилов.

В настоящее время во всем мире отмечается драматическое прогрессирующее увеличение количества больных сахарным диабетом 2 типа (СД-2), которое, по прогнозам ВОЗ, превысит в 2030 г. 366 млн человек [1, 2]. В США СД-2 сейчас страдают 25,4 млн человек (11,5%) в возрасте от 20 до 70 лет, и число заболевших увеличится к 2031 г. предположительно до 37,7 млн (14,5%), а в 2050 г. будет составлять 21% всего населения страны [3, 4]. Аналогичное резкое возрастание численности заболевших СД-2 отмечается и в ряде стран ЕС. По официальным данным, в Украине количество больных СД-2 в последние годы также резко увеличилось, и в 2010 г. превысило 1,2 млн человек [5].

Одновременно с возрастанием частоты СД-2 наблюдается и глобальное увеличение числа лиц с избыточной массой тела и ожирением. К примеру, в США около четверти (24 %) взрослого населения страны страдает ожирением [4]. Согласно данным Государственной службы статистики Украины за 2012 г., повышенный индекс массы тела (ИМТ) от 25 до 30 кг/м² был обнаружен в среднем у 39,1%, а ожирение (ИМТ от 30 до 40 кг/м² и более) – у 15,8% населения нашей страны. Причем количество лиц с ожирением составляло в Полтавской обл. – 18,9%, в Черниговской – 20,5%, Черкасской – 20,6%, Херсонской – 20,7%, Луганской – 21,1% [6].

Вместе с тем, огромный клинический материал свидетельствует о том, что у 75-80% больных СД-2 обнаруживается выраженное абдоминальное ожирение [7, 8], которое относят к неотъемлемым компонентам метаболического синдрома (МС) [9].

Ожирение и МС являются предшественниками как СД-2, так наиболее частых его осложнений – атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний [10-12], а также злокачественных опухолей [13, 14], т.е. болезней, приводящих к инвалидизации лиц трудоспособного возраста и главного источника смертности, ежегодно уносящего жизни

более 35 млн человек в мире [9]. Лечение СД-2 обходится обществу колоссальными материальными затратами, исчисляемыми десятками миллиардов долларов в год [15].

Принимая во внимание тот факт, что кривые увеличения числа больных СД-2 и лиц с ожирением идут параллельно, объединенная группа экспертов Всемирного Эндокринологического общества, Американской Диабетической Ассоциации (АМА) и Европейской Ассоциации по Изучению Диабета (ЕАСД) пришли к заключению, что одним из важнейших вопросов диабетологии на сегодняшний день является выяснение механизмов патогенеза СД-2, в которые вовлечены различные виды жировой ткани (ЖТ), в частности участия в этом процессе её гормонов – адипоцитокинов [4].

Вместе с тем, значение иммунной системы в этиопатогенезе СД-2 у человека, в отличие от СД-1, до последнего времени практически не изучалось, так как существовало мнение, что СД-2 является исключительно метаболическим заболеванием. Вместе с тем, в последние годы появились неоспоримые доказательства того, что в патогенезе СД-2 принимают участие многие иммунные факторы, особенно связанные с гормонами ЖТ и приводящие как к развитию инсулинорезистентности (ИР), так и к ослаблению функции инсулярного аппарата [16-18]. Однако в этом вопросе мы находимся только на начальной стадии исследования, и многое, касающееся роли различных иммунных механизмов, участвующих в развитии СД-2, особенно при ожирении и МС у человека, остается неясным и, нередко, неоднозначным.

В связи с этим основной целью настоящей работы явилось исследование ряда показателей врожденного и адаптивного иммунитета у больных СД-2 и МС, особенно с сопутствующим ожирением. В настоящей статье (сообщение 1) излагаются данные, касающиеся изменения лей-

коцитарного состава крови, иммунофенотипа лимфоцитов и ультраструктуры нейтрофилов у трёх групп пациентов: больных СД-2, пациентов с МС и больных СД-2 с МС (СД-2+МС), а также у здоровых лиц (контрольная группа) с нормальной и избыточной массой тела.

Материалы и методы

Обследованы 108 пациентов обоего пола в возрасте от 30 до 60 лет, которые были распределены на 3 примерно одинаковые по полу и возрасту группы: 1. больные с впервые выявленным СД-2 с нормальной массой тела (ИМТ <25 кг/м²; 23,4±1,3 кг/м²) и отсутствием других компонентов МС; 2. пациенты с МС без наличия клинических признаков СД-2 (ИМТ >25 кг/м²; 33,5±2,0 кг/м²); 3. больные СД-2 с сопутствующим МС (ИМТ >25 кг/м²; 34,6±1,2 кг/м²).

Контрольную группу составили 40 здоровых лиц с нормогликемией и отсутствием компонентов МС (кроме ИМТ), сопоставимых по полу и возрасту, которые были разделены на две подгруппы: с нормальной массой тела (ИМТ <25 кг/м²; 22,8±0,5 кг/м²; худые) и с избыточной массой тела или ожирением (ИМТ >25 кг/м²; 31,1±0,7 кг/м²; полные).

В список обследуемых не включали пациентов с перенесенным инфарктом миокарда и инсультом, а также со злокачественными новообразованиями, острыми и хроническими воспалительными процессами. До обследования пациенты не принимали антигипергликемической, гиполипидемической и антигипертензивной терапии.

Диагноз СД-2 устанавливали согласно рекомендациям экспертов ВОЗ (1999) [19], а МС – согласно критериям Международной диабетической ассоциации (IDF) и Национальной образовательной программе по холестерину NCEP АТР III [20].

При антропометрическом исследовании у пациентов определяли массу тела и окружность талии (ОТ) с последующим расчетом ИМТ. Уровень глюкозы в сыворотке периферической крови (ПК) определяли глюкозооксидантным методом, инсулина – радиоиммунологическим методом с использованием наборов реактивов «Insulin-IRMA» фирмы «Immunotech» (Чехия). Для характеристики ИР использовали индекс НОМА (Homeostasis Model Assessment), который вычислялся по формуле $(I \times G)/22,5$, где I – уровень инсулина натощак (МЕ/мл), а G – уровень глюкозы натощак в плазме ПК [21]. Уровень общего холестерина (ОХ), триглицеридов (ТГ), липопротеидов высокой плот-

ности (ЛПВП), липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) определяли с помощью набора реактивов фирмы «Bio-System» (Испания).

Общее число лейкоцитов подсчитывали традиционным способом или с помощью анализатора. Лейкоцитарную формулу при идентификации 200 клеток определяли в мазках крови, окрашенных по Паппенгейму с использованием фосфатного буферного раствора с рН 6,58. В отдельную группу выделяли большие гранулоцитарные лимфоциты (БГЛ), считающиеся морфологическим гомологом естественных клеток-киллеров (ЕК-клеток) [22].

Определение содержания лимфоцитов различного иммунофенотипа в ПК проводили методом проточной цитометрии с использованием лазерного цитофлуориметра «FACStar plus» фирмы «Becton Dickinson» (США).

Моноуклеары из гепаринизированной ПК выделяли методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности гипак-фиколла. Поверхностные антигены лимфоцитов метили моноклональными антителами, маркированными флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC) или фикоэритрином (PE). Использовали моноклональные антитела к поверхностным антигенам: CD3 (все Т-лимфоциты), CD4 (Т-индукторы/хелперы), CD8 (Т-супрессоры/киллеры), CD20 (В-лимфоциты) и CD56 (ЕК-клетки) фирм «Becton Dickinson» (США) и «Dako Cytomation» (Дания).

Для электронной микроскопии лейкоцитов выделенную из ПК лейкоцитарную пленку фиксировали 2,5% глутаральдегидом на 0,1 М какодилатном буфере фирмы «Fluka» (Германия) с 2% сахарозой, постфиксировали 1% тетраокисью осмия на том же буфере, проводили через спирты восходящей концентрации и безводный ацетон, заключали в аралдит фирмы «Fluka» (Германия). Ультратонкие срезы приготавливали на микротоме LKB-8800 (Швеция) и исследовали под электронным микроскопом фирмы JEM-100С (Япония).

Статистическую обработку полученных данных проводили методом вариационной статистики с помощью стандартного пакета статистического расчета по программе Microsoft Excel. Достоверность различий средних величин определяли по парному критерию t Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Оригінальні дослідження

Результаты и их обсуждение

Данные традиционного клинико-лабораторного исследования всех групп обследуемых лиц представлены в **таблице 1**. В целом в контрольной группе практически здоровых лиц с нормогликемией показатели кровяного давления, содержания липопротеидов, инсулина и индекса НОМА-IR были близки к норме. Всё же в подгруппе лиц с избыточной массой тела (ИМТ $31,1 \pm 0,7$ кг/м²) имелось небольшое, но статистически достоверное, повышение содержания инсулина ($p < 0,05$) и индекса НОМА-IR ($p < 0,05$) в ПК по сравнению с контрольной подгруппой худых (ИМТ $22,8 \pm 0,5$ кг/м²).

У худых (ИМТ $23,4 \pm 1,3$ кг/м²) больных с впервые выявленным СД-2 отмечалось достоверное увеличение содержания инсулина и индекса НОМА-IR, по сравнению как с подгруппой здоровых худых лиц ($p < 0,01$), так и со всей контрольной группой ($p < 0,05$).

Ещё более выраженное повышение уровня инсулина ($p < 0,01$) и индекса НОМА-IR ($p < 0,01$) наблюдалось у пациентов с МС (ИМТ $33,5 \pm 2,0$ кг/м²) и больных СД-2+МС с выраженным ожирением (ИМТ $34,6 \pm 1,2$ кг/м²) ($p < 0,01$, $p < 0,01$).

При гематологическом исследовании было установлено, что для больных СД-2 характерно умеренное, но достоверное увеличение общего количества лейкоцитов в ПК (**табл. 2**), что согласуется с предыдущими нашими исследованиями [23] и данными других авторов, полученных на огромном клиническом материале [24, 25].

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика обследуемых больных с впервые выявленным СД-2, МС и СД-2+МС, а также лиц контрольной группы (худых с ИМТ < 25 кг/м² и полных с ИМТ > 25 кг/м²)

Показатели	Контроль		СД-2	МС	СД-2+МС
	худые	полные			
Возраст	$48,4 \pm 2,5$	$49,2 \pm 1,8$	$53,5 \pm 2,1$	$48,5 \pm 2,7$	$52,8 \pm 1,6$
ИМТ, кг/м ²	$22,8 \pm 0,5$	$31,1 \pm 0,7^*$	$23,4 \pm 1,3$	$33,5 \pm 2,0^a$	$34,6 \pm 1,2^a$
ОТ, см	$79,2 \pm 2,3$	$101,1 \pm 2,3^*$	$96,1 \pm 2,3$	$103,8 \pm 2,0$	$111,6 \pm 2,3^a$
САД, мм рт.ст.	$112,6 \pm 2,9$	$117,1 \pm 2,9$	$128,2 \pm 7,1^{\#}$	$138,6 \pm 5,9^a$	$144,8 \pm 3,5^a$
ДАД, мм рт.ст.	$69,6 \pm 1,7$	$82,3 \pm 2,7^*$	$80,6 \pm 3,9$	$84,8 \pm 2,7^a$	$90,6 \pm 2,4^a$
ХС, ммоль/л	$5,2 \pm 0,3$	$5,7 \pm 0,3$	$5,7 \pm 0,3^{\#}$	$6,7 \pm 0,45^a$	$6,1 \pm 0,3^a$
ТГ, ммоль/л	$1,1 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,2^{\#}$	$2,05 \pm 0,2^a$	$2,3 \pm 0,2^a$
ЛПВП, ммоль/л	$1,2 \pm 0,06$	$1,1 \pm 0,06$	$1,0 \pm 0,07^{\#}$	$1,02 \pm 0,06^a$	$1,02 \pm 0,04^a$
ЛПНП, ммоль/л	$3,4 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,3^{\#}$	$4,6 \pm 0,4^a$	$4,1 \pm 0,2^a$
ЛПОНП, ммоль/л	$0,5 \pm 0,05$	$0,7 \pm 0,06$	$0,6 \pm 0,06$	$0,9 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,04^a$
Инсулин, МЕ/мл	$6,7 \pm 1,6$	$8,0 \pm 1,6^*$	$12,8 \pm 1,5^{\#}$	$11,8 \pm 1,7^a$	$15,7 \pm 1,8^a$
Индекс НОМА-IR	$2,1 \pm 0,7$	$2,7 \pm 0,7^*$	$3,2 \pm 0,6^{\#}$	$5,2 \pm 0,7^a$	$5,8 \pm 0,7^a$

Примечания: достоверность различий ($p < 0,05$): * – подгруппы худых лиц по отношению к полным лицам контрольной группы; [#] – подгруппы худых здоровых лиц по отношению к больным с впервые выявленным СД-2; ^a – подгруппы полных здоровых лиц по отношению к больным с МС и СД-2+МС.

Если сравнивать средние величины содержания лейкоцитов в ПК у худых больных с впервые выявленным СД-2 с таковыми контрольной группы в целом, то повышение числа лейкоцитов выглядит не столь значительным, но при сравнении их с подгруппой контроля, включающего в себя только худых лиц, лейкоцитоз у больных СД-2 выглядит более выраженным и достоверным. Это объясняется тем, что у здоровых полных лиц количество лейкоцитов в ПК было выше, чем у худых. Вместе с тем достоверное повышение числа лейкоцитов было обнаружено также у пациентов с МС (ИМТ > 25 кг/м²) без СД-2. Но наиболее значительный лейкоцитоз, как видно из **табл. 2**, наблюдался у больных СД-2 с сопутствующим МС ($p < 0,01$). Обычно это были пациенты, болевшие не менее 3-5 лет и более, и у большинства из них ИМТ превышал 30 кг/м². Полученные нами данные наводят на мысль, что повышение общего количества лейкоцитов при СД-2 во многом, по-видимому, обусловлено одновременно наличием избыточной массы тела за счёт ЖТ.

Одним из подтверждений этого является тот факт, что у пациентов с МС и СД-2+МС отмечается хорошая позитивная корреляция ($R_1^2 = 0,72$; $R_2^2 = 0,89$) количества лейкоцитов в ПК с показателями ожирения (ОТ и ИМТ) (**рис. 1**).

К сожалению, во многих публикациях, в которых сообщается о повышении общего количества лейкоцитов у больных СД-2, часто не приводятся сведения, за счёт каких именно видов лейкоцитов он возникает, т.е. данные о лейкоцитарном составе ПК. Согласно нашим данным (**табл. 2**), умеренный лейкоцитоз обусловлен преимущественно увеличением абсолютного количества сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов. Причём количество моноцитов в ПК у некоторых пациентов составляло 12,5-13,0%.

У больных СД-2, находящихся на инсулинотерапии, иногда отмечалась эозинофилия, а при выраженном ожирении (ИМТ > 35 кг/м²) число лимфоцитов и базофилов иногда превышало норму (2-3 базофила на 200 идентифицированных лейкоцитов).

Таблица 2. Общее количество лейкоцитов и лейкоцитарная формула ПК худых (ИМТ<25 кг/м²) и полных (ИМТ>25 кг/м²) нормогликемических лиц (контроль), больных с впервые выявленным СД-2 (ИМТ<25 кг/м²), МС (ИМТ>25 кг/м²) и СД-2+МС (ИМТ>25 кг/м²).

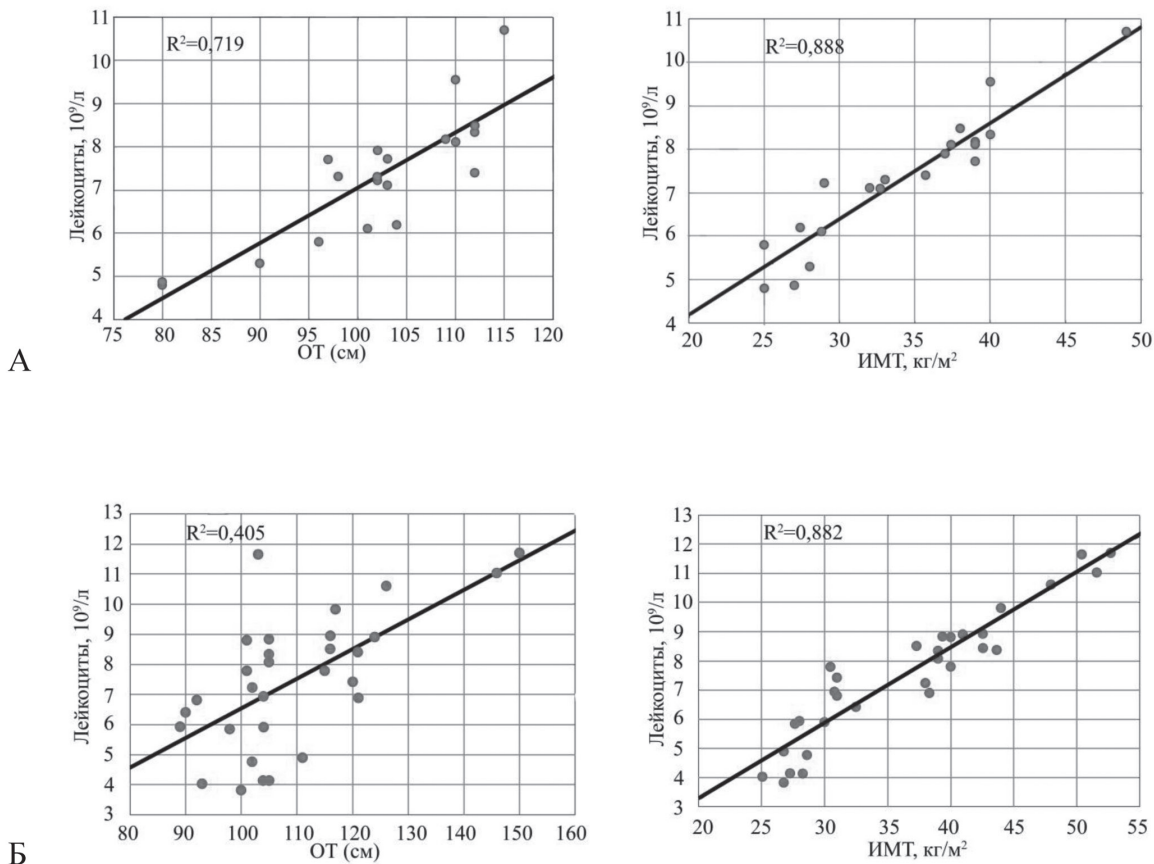
Типы лейкоцитов	Контроль (худые)	Контроль (полные)	Общий контроль (худые+полные)	СД-2	МС	СД-2+МС
Общее количество лейкоцитов	5,40 ± 0,29	6,17 ± 0,38	5,77 ± 0,24	6,27 ± 0,28** ^Δ	6,29 ± 0,38*	7,23 ± 0,30* ^Δ
п/я нейтрофилы, %	2,85 ± 0,49	2,53 ± 0,27	2,69 ± 0,28	3,24 ± 0,32	2,50 ± 0,35	3,19 ± 0,39
п/я нейтрофилы, 10 ⁹ /л	0,16 ± 0,03	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,22 ± 0,03
с/я нейтрофилы, %	55,28 ± 1,98	57,45 ± 1,83	56,33 ± 1,35	56,76 ± 1,70	58,63 ± 1,49*	58,19 ± 1,30
с/я нейтрофилы, 10 ⁹ /л	3,00 ± 0,21	3,55 ± 0,27	3,27 ± 0,17	3,39 ± 0,16* [#]	3,48 ± 0,27* ^Δ	3,93 ± 0,22* ^Δ
Базофилы, %	0,25 ± 0,06	0,28 ± 0,08	0,26 ± 0,05	0,71 ± 0,21	0,10 ± 0,05	0,49 ± 0,14
Базофилы, 10 ⁹ /л	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,01
Эозинофилы, %	3,05 ± 0,53	2,34 ± 0,39	2,71 ± 0,33	1,92 ± 0,42	2,33 ± 0,51	2,62 ± 0,28
Эозинофилы, 10 ⁹ /л	0,16 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,14 ± 0,03	0,17 ± 0,02
Моноциты, %	5,18 ± 0,44	7,74 ± 0,55	6,42 ± 0,40	8,18 ± 0,75* [#]	8,90 ± 0,85* ^Δ	8,59 ± 0,42* ^Δ
Моноциты, 10 ⁹ /л	0,28 ± 0,03	0,49 ± 0,05	0,38 ± 0,03	0,49 ± 0,05* [#]	0,54 ± 0,06* ^Δ	0,60 ± 0,04* ^Δ
Лимфоциты, %	31,30 ± 2,05	27,95 ± 1,62	29,67 ± 1,33	27,08 ± 1,49	26,85 ± 1,54	28,38 ± 1,11
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	1,66 ± 2,13	1,71 ± 0,12	1,68 ± 0,09	1,61 ± 0,09	1,59 ± 0,11	1,91 ± 0,10
БГЛ, %	1,92 ± 0,48	1,89 ± 0,27	1,91 ± 0,27	2,11 ± 0,48	1,58 ± 0,40	1,64 ± 0,24
БГЛ, 10 ⁹ /л	0,11 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,02

Примечание. Различие достоверно (p<0,05): * – у больных СД-2, МС и СД-2+МС по сравнению с группой лиц общего контроля;

[#] – у больных СД-2 по сравнению с худыми лицами контрольной группы (ИМТ < 25 кг/м²);

^Δ – у больных МС и СД-2+МС по сравнению с полными лицами контрольной группы (ИМТ > 25 кг/м²).

Рисунок 1. Корреляция между общим числом лейкоцитов (×10⁹/л) в ПК с величиной ОТ (см) и показателем ИМТ у пациентов с МС (А) и больных СД-2 с МС (Б).



Оригінальні дослідження

В связи с увеличением количества циркулирующих нейтрофилов в сосудистом русле у больных СД-2, особенно при сопутствующем МС и ожирении, значительный интерес представляла бы, естественно, информация о функциональном их изменении при этом заболевании. Как известно, нейтрофилы, наряду с моноцитами/макрофагами и ЕК-клетками, относятся к главным клеточным элементам естественного иммунитета, создающим первую линию защиты организма от патогенов. Данные об моноцитозе и субмикроскопической организации моноцитов, указывающие на повышение их секреторной функции у больных СД-2 и МС, полученные нами при обследовании этих же групп пациентов, были уже опубликованы ранее [26].

Как известно, нейтрофилы являются полифункциональными клетками, основная функция которых заключается в защите организма от патогенов. Механизм противомикробной защиты довольно сложный, многостадийный, в нем участвуют многочисленные факторы, в том числе провоспалительные цитокины и хемокины. Он включает в себя хемотаксис, перемещения нейтрофилов по сосудам, адгезию и фагоцитоз в очагах воспаления. Уничтожение патогенов происходит вследствие комбинированного действия различных протеаз в первичных и вторичных гранулах, в механизме которого происходит образование токсических форм кислорода и азота. Для движения в одном направлении (из ПК в ткани) в нейтрофилах существуют специфические рецепторы, в том числе и С5 компонент системы-комплемента. Вместе с тем нейтрофилы также участвуют в ряде иммунных реакций, особенно гиперчувствительности II типа, воздействуя на функционирование эндотелия сосудов [27, 28]. Однако изучению функции нейтрофилов при СД-2 и ожирении с использованием современных методов исследования посвящены только единичные публикации [18].

Совсем отсутствуют работы, посвященные изучению нейтрофилов ПК под электронным микроскопом у больных СД-2, МС и ожирением, дающие возможности получить информацию о субмикроскопических изменениях основных органоидов цитоплазмы и ядра этих клеток и, следовательно, судить об их функциональной и секреторной активности.

Проведенные электронно-микроскопические исследования показали, что ультраструктура сегментоядерных нейтрофилов у здоровых лиц с избыточной массой тела, но без наличия других компонентов МС, мало чем отличается от тако-

вой у здоровых лиц с нормальным ИМТ и отсутствием других компонентов МС, за исключением несколько большего числа электронно-плотных гранул и удлинённых митохондрий в цитоплазме (рис. 2А).

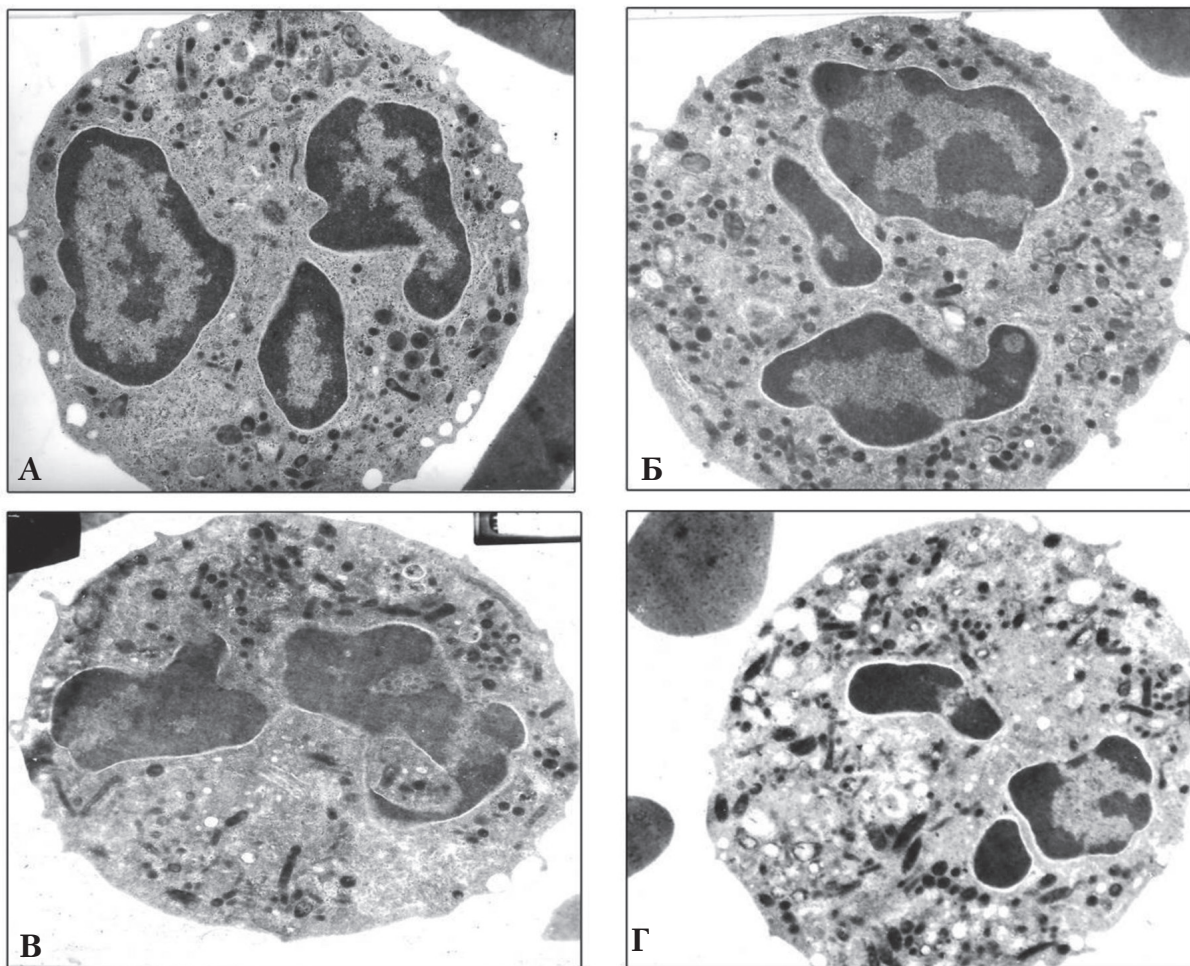
При электронно-микроскопическом исследовании лейкоцитов в ПК худых больных с впервые выявленным СД-2 с нормальным ИМТ у большинства нейтрофилов обнаруживается более гладкий контур плазматической мембраны с несколько увеличенным, по сравнению с нормой, числом удлинённых митохондрий и значительным количеством электронно-плотных гранул (рис. 2Б). Нейтрофилы у лиц с МС с отчётливым ожирением характеризуются, по сравнению с нормой, особенно гладким контуром плазматических мембран, обилием азурофильных и специфических гранул, матрикс которых при высоком увеличении (20 000-25 000) имеет пористую структуру, а также большим количеством удлинённых митохондрий в цитоплазме и наличием выростов ядра (рис. 2В).

Наиболее выраженные изменения ультраструктуры нейтрофилов наблюдались у больных СД-2 с сопутствующим МС, обычно болеющих не менее пяти лет ($ИМТ=34,6\pm 1,2$ кг/м²). Как и при СД-2 или МС, такие клетки имели гладкую плазматическую мембрану с редкими микроворсинками, но, в отличие от них, в цитоплазме нейтрофилов, наряду с увеличением числа удлинённых митохондрий, электронно-плотные гранулы часто были опущены. Одновременно отмечалось выраженное увеличение числа вакуолей (фагосом) с остатком матрикса гранул, иногда встречались тельца Деле. Наблюдались также нейтрофилы с гиперсегментацией ядер, расширением перинуклеарного пространства и с фокальным расслоением ядерной мембраны, что указывает на деструктивные изменения клетки (рис. 2Г).

При исследовании количества лимфоцитов различных иммунофенотипов прежде всего следует отметить, что у худых и полных здоровых лиц контрольной группы имелись некоторые их различия. Так, у лиц с избыточной массой тела имелось, в отличие от лиц с нормальной массой тела, достоверное повышение ($p<0,05$) абсолютного количества клеток, экспрессирующих CD3 и CD4-T антигены (табл. 3).

У больных с впервые выявленным СД-2 ($ИМТ<25$ кг/м²) не имелось достоверных изменений абсолютного количества CD3+T, CD4+T, CD8+T, CD20+T и CD56+T клеток в ПК. Однако у больных СД-2 с сопутствующим МС и ожире-

Рисунок 2. Сегментоядерный нейтрофил в ПК: А – здорового человека (контроль) с нормальным ИМТ (23,5 кг/м²), Б – больного с впервые выявленным СД-2 и нормальным ИМТ (22,8 кг/м²), В – пациента с МС (ИМТ=35 кг/м²), Г – больного СД-2+МС (ИМТ=37 кг/м²) × 9 000.



нием и пациентов с МС наблюдалось достоверное повышение абсолютных количеств CD3+T и CD4+T-клеток (табл. 3). Полученные нами данные подтверждают наши более ранние исследования [29], а также согласуются с публикациями зарубежных авторов, появившимися в последние годы, в которых описано аналогичное увеличение количества CD3+ и CD4+ клеток в ПК у больных СД-2 с ожирением [30-32]. Следовательно, это наводит на мысль, что избыточная масса ЖТ является одной из основных причин, приводящих к дисрегуляции врождённого и адаптивного иммунитета.

Закономерных изменений абсолютных количеств ЕК-клеток (CD56+лимфоцитов и их морфологического гомолога – БГЛ в ПК ни у больных с впервые выявленным СД-2, ни у пациентов с СД2+МС обнаружено не было. Всё же, как показали наши предыдущие электронно-микроско-

пические исследования [23], у больных СД-2 с ожирением имелись выраженные изменения их функционального состояния.

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что в развитии СД-2, особенно сопровождаемом ожирением, наряду с клеточными элементами врождённого иммунитета [18] значительная роль отводится также лимфоидным клеткам, участвующим в адаптивном иммунитете [17]. Проведенные нами исследования подтверждают и дополняют современные представления об ожирении и СД-2 как заболеваниях хронического системного низкоградиентного воспаления, в патогенезе которого существенную роль играют адипокины и хемокины, продуцируемые и секретируемые ЖТ. Локальное ожирение, одно из неотъемлемых компонентов МС, является главной причиной развития ИР и предиабета, за которым следует возникновение клинически диагностиру-

Оригінальні дослідження

Таблиця 3. Относительное (%) и абсолютное ($\times 10^9/\text{л}$) содержание лимфоцитов различного иммунофенотипа в ПК здоровых лиц (худых – ИМТ < 25 кг/м² и полных – (ИМТ) > 25 кг/м²) больных с впервые выявленным СД-2 (ИМТ < 25 кг/м²), МС (ИМТ > 25 кг/м²) и СД-2+МС (ИМТ>30 кг/м²).

Фенотип лимфоцитов	Контроль (худые)	Контроль (полные)	Общий контроль (худые+полные)	СД-2	МС	СД-2+МС
CD3+ клетки, %	54,71 ± 0,88	54,78 ± 1,04	54,75 ± 0,67	50,64 ± 3,24	56,54 ± 0,74	59,57 ± 0,77 [#]
CD3+ клетки, $\times 10^9/\text{л}$	0,87 ± 0,12	0,92 ± 0,10*	0,89 ± 0,08	0,88 ± 0,07	0,93 ± 0,07 [#]	0,95 ± 0,08 [#]
CD4+ клетки, %	36,95 ± 1,12	36,41 ± 0,59	36,67 ± 0,61	32,72 ± 2,17	37,58 ± 0,68	38,03 ± 1,86
CD4+ клетки, $\times 10^9/\text{л}$	0,58 ± 0,08	0,61 ± 0,06*	0,60 ± 0,05	0,54 ± 0,06	0,63 ± 0,05 [#]	0,64 ± 0,05 [#]
CD8+ клетки, %	23,60 ± 0,63	20,82 ± 0,81	22,16 ± 0,57	22,33 ± 2,04	22,12 ± 0,70	19,11 ± 1,13
CD8+ клетки, $\times 10^9/\text{л}$	0,37 ± 0,05	0,35 ± 0,04	0,36 ± 0,03	0,37 ± 0,04	0,37 ± 0,03	0,37 ± 0,03
CD20+ клетки, %	10,07 ± 0,70	9,82 ± 0,59	9,94 ± 0,45	8,26 ± 0,87	9,48 ± 0,71	8,36 ± 0,76
CD20+ клетки, $\times 10^9/\text{л}$	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,02
CD56+ клетки, %	9,69 ± 0,58	10,77 ± 0,61	10,27 ± 0,43	9,09 ± 0,76	8,67 ± 0,48	8,38 ± 0,57
CD56+ клетки, $\times 10^9/\text{л}$	0,14 ± 0,02	0,19 ± 0,02*	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,02 [#]	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,02
Индекс CD4+/ CD8+			1,76 ± 0,05	1,56 ± 0,05	1,8 ± 0,07	1,82 ± 0,06 [#]

Примечание: различия достоверны (p<0,05); * – у полных лиц по сравнению с худыми здоровыми лицами; # – у больных СД-2, МС и СД-2+МС по сравнению с общим контролем.

емого СД-2 [16, 17]. Всё это наводит на мысль, что ряд патологических нарушений, наблюдаемых у больных СД-2, является следствием не столько самого заболевания, сколько сопутствующего ожирения. В связи с этим, одним из основных факторов профилактики развития ИР следует считать борьбу с ожирением, а при уже развившемся СД-2, наряду со специфическим лечением фармацевтическими препаратами, необходимо применять различные способы, приводящие к похудению пациента.

Заключение

Лейкоцитоз, наблюдаемый у больных СД-2, во многом обусловлен сопутствующим ожирением, считающимся неотъемлемым компонентом МС. Повышение общего числа лейкоцитов в ПК обусловлено главным образом увеличением абсолютных количеств моноцитов и нейтрофилов, при электронной микроскопии которых выявляются изменения субмикроскопической организации цитоплазмы и ядра, указывающие на дисрегуляцию их функции. Между показателями ожирения (ОТ и ИМТ) и количеством лейкоцитов в ПК у пациентов с МС и СД-2+МС имеется положительная корреляция ($R_1^2 = 0,72$; $R_2^2 = 0,89$). При исследовании иммунофенотипа лимфоцитов не было выявлено достоверного изменения абсолютных количеств CD3+T-, CD4+T-, CD8+T, CD20 и CD56+ клеток в ПК больных с впервые выявленным СД-2. Однако, у больных СД-2+МС с ожирением и у пациентов только с МС имелось достоверное увеличение количества CD3+T- и

CD4+T-клеток. Аналогичное повышение числа CD3+T- и CD4+T-клеток наблюдалось также в подгруппе полных здоровых лиц по сравнению с подгруппой худых лиц контроля. Следовательно, избыточная масса тела является одной из основных причин, приводящих к дисрегуляции как врождённого, так и адаптивного иммунитета.

Полученные данные подтверждают и дополняют современную концепцию о том, что МС и СД-2 принадлежат к хроническим воспалительным системным низкоградиентным заболеваниям, в патогенезе которых ключевую роль играют адипокины, секретируемые ЖТ. Локальное воспаление ЖТ является одним из главных источников возникновения ИР, развития предиабета, за которыми следует возникновение клинически диагностируемого СД-2.

Литература

1. Wild S.H., Forouhi N.G. What is the scale of the future diabetes epidemic, and how certain are we about it? // Diabetologia. 2007, 50, 903-905.
2. Carnethon M.R. Can we out-run the diabetes epidemic? // Diabetologia. 2007, 50, 1113-1115.
3. Mainous A.G., Baker R., Koopman R.J. et al. III. Impact of the population at risk of diabetes on projections of diabetes burden in the United States: an epidemic on the way // Diabetologia. 2007, 50, 934-940.
4. Eckel R.H., Kahn S.E., Ferrannini E. et al. Obesity and type 2 diabetes: What can be unified and what needs to be individualized // Diabetes Care. 2011, 34, N 6, 1424-1430.
5. Тронько М.Д. Сучасний стан та перспективи розвитку фундаментальної і клінічної ендокринології в Україні

- // *Ендокринологія*. 2010, 12, № 2, 174-191.
6. Статистичний збірник Державної служби статистики України: «Соціально-демографічні характеристики господарств України у 2012 році». Київ, 2012.
 7. Lichardopol R., Popescu L.D., Ionescu I. et al. Abdominal obesity in type 1 and type 2 diabetes patients // *Diabetologia*. 2008, 51, Suppl. 1, S335.
 8. Kumar S., Wilson B., Watson L., Alsop J. Obesity is associated with poorer clinical outcomes following insulin initiation for patients with type 2 diabetes // *Diabetologia*. 2009, 52, Suppl. 1.
 9. Simmons R.K., Alberti K.G.M.M., Gale E.A.M. et al. The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert Consultation // *Diabetologia*. 2010, 53, 600-605.
 10. Guzder R.N., Gatling W., Mullee M.A., Byrne C.D. Impact of metanoli syndrome criteria on cardiovascular disease risk in people with newly diagnosed type 2 diabetes // *Diabetologia*. 2006, 49, N 1, 49-55.
 11. Saumell J., Cabre J.J., Pi ol J.L. et al. Cardiovascular disease prediction and type 2 diabetes: Framingham risk versus metabolic syndrome criteria // *Diabetologia*. 2007, 50, Suppl. 1, 147.
 12. Зак К.П. Кондрацька І.Н., Попова В.В. Гормони жирової ткани – адипокіни при сахарному діабеті і його ускладненнях (Обзор) // *Врачебное дело*. 2010, №5-6, 39-45.
 13. Esposito V.D. Adipocyte control of cancer cell growth // *Diabetologia*. 2010, 53, Suppl. 1, 766.
 14. Zhang Z.J., Zheng Z.J., Kan H. et al. Reduced risk of colorectal cancer with metformin therapy in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis // *Diabetes Care*. 2011, 34, N 10, 2323-2328.
 15. Hauber A., Gale E.A.M. The market in diabetes // *Diabetologia*. 2006, 49, N 2, 247-252.
 16. Kolb H., Mandrup-Poulsen T. The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation // *Diabetologia*. 2010, 53, N 1, 10-20.
 17. Chatzigeorgiou A., Karalis K.P., Bornstein S.R., Chavakis T. Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation // *Diabetologia*. 2012, 55, N 10, 2583-2592.
 18. Fernandez-Real J.-M., Pickup J.C. Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes // *Diabetologia*. 2012, 55, N 2, 273-278.
 19. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of WHO Consultation, 1999.
 20. Lawlor D.A., Smith G.D., Ebrahim S. Does the new International Diabetes Federation definition of the metabolic syndrome predict CHD any more strongly than older definitions? Findings from the British Women's Heart and Health Study // *Diabetologia*. 2006, 49, N 1, 41-48.
 21. Matthews D.R., Hosker I.P., Rudenski A.S. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man // *Diabetologia*. 1985, 28, 412-419.
 22. Зак К.П., Киндзельський Л.П., Бутенко А.К. Большие гранулосодержащие лимфоциты в патологии // К.: Наукова думка, 1992. 164 с.
 23. Зак К.П., Маньковський Б.Н., Кондрацька І.М. та ін. Адипокіни – гормони жирової тканини при метаболічному синдромі та цукровому діабеті 2 типу // *Ендокринологія*. 2012, 17, №1, додаток 1, 124.
 24. Ford E.S. Leukocyte count, erythrocyte sedimentation rate, and diabetes incidence in a national samples of US adults // *Am. J. Epidemiol.* 2002, 155, N 1, 57-64.
 25. Wannamethee S.G., Papacosta O., Lawlor D.A. et al. Do women exhibit greater differences in established and novel risk factors between diabetes and non-diabetes than men? The British Regional Heart Study and British Women's Heart Health Study // *Diabetologia*. 2012, 55, N 1, 80-87.
 26. Афанасьєва В.В., Зак К.П., Кондрацька І.М., Семіонова Т.А. Вміст, ультраструктура та функція моноцитів крові у хворих на цукровий діабет 2 типу і метаболічний синдром // *Ендокринологія*. 2009, 14, № 2, 201-208.
 27. Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д.Б., Ройтт А.М. Иммунология. Логосферс, 2007. 555 с.
 28. Шиффман Ф.Дж. Патологическая физиология крови. М.: Бином, 2009. 446 с.
 29. Koval D.M., Lysenko V.A., Zak K.P. et al. Immunologic phenotype of lymphocytes in obese and lean subjects with and without diabetes mellitus // *Diabetologia*. 2001, 33, Suppl. 1, 573.
 30. Lynch L.A., O'Connell J.M., Kwasnik A.K. et al. Are natural killer cells protecting the metabolically healthy obese patients? // *Obesity*. 2009, 17, N 3, 601-605.
 31. Al-Sufyani A.A., Mahassni S.H. Obesity and immune cells in Saudi females // *Innate Immunol.* 2011, 15, N 5, 439-450.
 32. van der Weerd K., Dik W.A., Schrijver B. et al. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype // *Diabetes*. 2012, 61, N 2, 401-408.

Імунітет у хворих на цукровий діабет 2 типу, що супроводжується метаболічним синдромом/ожирінням. Повідомлення 1. Лейкоцитарний склад крові, імунофенотип лімфоцитів та ультраструктура нейтрофілів

К.П. Зак, Б.М. Маньковський, І.М. Кондрацька, В.В. Попова, Я.А. Саєнко, О.Є. Ліпська, Т.А. Семіонова, В.В. Афанасьєва

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

Резюме. Досліджено низку показників імунітету у 108 хворих, поділених на 3 групи: 1) з уперше виявленим цукровим діабетом 2 типу (ЦД-2); 2) з метаболічним синдромом (МС) і 3) з ЦД-2 із супутнім МС (ЦД-2+МС). Контрольна група складалася з 40 здоро-

Оригінальні дослідження

вих осіб, поділених на 2 підгрупи, худих і повних, залежно від ІМТ. Встановлено, що лейкоцитоз, який спостерігається у хворих на ЦД-2, багато в чому залежить від супутнього ожиріння. Він зумовлений переважно підвищенням абсолютної кількості моноцитів і нейтрофілів та супроводжується зміною їх ультраструктури, що вказує на дизрегуляцію їхньої функції. Між показниками маси тіла (ОТ і ІМТ) і кількістю лейкоцитів у пацієнтів з МС та ЦД-2+МС існує позитивна кореляція. При проточно-цитометричному дослідженні імунотипу лімфоцитів не було виявлено зміни абсолютної кількості CD3+T-, CD4+T-, CD8+T-, CD20+ і CD56+ клітин у крові в худих хворих із уперше виявленим ЦД-2. Проте у хворих із ЦД-2+МС і ожирінням та в пацієнтів із МС та ожирінням спостерігалось достовірне підвищення абсолютної кількості CD3+T- і CD4+T-клітин. Аналогічне підвищення кількості CD3+T- і CD4+T-клітин спостерігалось також у підгрупі повних здорових осіб порівняно з підгрупою худих осіб контролю. Отже, надлишкова маса є одним із основних тригерів, які спричиняють порушення вродженого та адаптивного імунітету. Одержані дані підтверджують та доповнюють сучасну концепцію про те, що МС і ЦД-2 належать до запальних хронічних системних низькоградієнтних захворювань, у механізмі яких ключову роль відіграють адіпокіни. Локальне запалення жирової тканини є одним із головних джерел розвитку інсулінорезистентності і предіабету, слідом за якими розвивається клінічно діагностований ЦД-2. Це наводить на думку, що низка порушень, які спостерігались у хворих на ЦД-2, очевидно є наслідком не стільки власне захворювання, скільки супутнього йому ожиріння.

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, метаболічний синдром, ожиріння, імунітет, лейкоцити, імунотип лімфоцитів, ультраструктура нейтрофілів.

Immunity in patients with type 2 diabetes mellitus with concomitant metabolic syndrome/obesity. Communication 1. Composition of blood leukocytes, immunophenotype of lymphocytes, and ultrastructure of neutrophils

**K.P. Zak, B.M. Mankovsky, I.N. Kondratska,
V.V. Popova, J.A. Saenko, O.Ye. Lipska,
T.A. Semionova, V.V. Afanasyeva**

State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Natl. Acad. Med. Sci. of Ukraine»

Summary. Series of immunity indices in 108 patients divided into three groups were investigated: 1) subjects with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus (T2DM); 2) subjects with metabolic syn-

drome (MS); and 3) subjects with type 2 diabetes mellitus with concomitant MS (T2DM + MS). The control group consisted of 40 healthy subjects divided into two subgroups – lean and obese, depending on body mass index (BMI). It has been established that leukocytosis observed in patients with T2DM depends on concomitant obesity. It is mostly caused by a higher absolute amount of monocytes and neutrophils and is accompanied by changes in their ultrastructure, indicating a dysregulation of their function. There is a positive correlation ($R_1^2=0,72$; $R_2^2=0,89$) between BMI, waist circumference, and leukocyte number in blood of patients with MS and T2DM+ MS. No significant changes in absolute contents of CD3 + T-, CD4 + T-, CD8 + T-, CD20 + and CD56 + - cells in the blood of lean patients with newly diagnosed T2DM was demonstrated by the flow-cytometric study of lymphocyte immunophenotype. However, a significant increase in absolute content of CD3 + T- and CD4 + T-cells was shown in patients with T2DM + MS with obesity, and in patients only with MS. Similar changes in the number of CD3 + T and CD4 + T-cells were also observed in the subgroup of obese healthy subjects compared to the subgroup of lean control individuals. Consequently, the excess of fat mass is one of the main triggers resulting in a disturbance of both the congenital and adaptive immunity. The obtained results confirm and complement the modern concept that MS and type 2 diabetes mellitus belong to the chronic inflammatory systemic low-gradient diseases, where adipokines secreted by adipose tissue play a key role in their mechanism. Local inflammation of adipose tissue is a major source of insulin resistance and pre-diabetes, followed by the beginning of clinically diagnosed T2DM. This suggests that the number of disorders observed in patients with T2DM, is, apparently, not so much a consequence of the disease, as comorbid obesity..

Keywords: type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome, obesity, immunity, leukocytes, immunophenotype of lymphocytes, ultrastructure of neutrophils.

(Надійшло 9.11.2012)