

Г.А. Замотаєва

СТАН ЕНДОКРИННОЇ ФУНКЦІЇ ТИМУСА У ДІТЕЙ ГРУПИ РИЗИКУ У ПЕРЕДКЛІНІЧНИЙ ПЕРІОД РОЗВИТКУ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1-ГО ТИПУ

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України», Київ

ВСТУП

Припущення про автоімунну природу цукрового діабету (ЦД) 1-го типу було висунуто 70-ми роками минулого сторіччя. З того часу численними дослідженнями доведено участь широкого спектра клітинних і гуморальних чинників природного й адаптивного імунітету у розвитку автоімунного процесу за ЦД 1-го типу, що призводить у результаті до загибелі інсулінпродукуючих клітин острівців Лангерганса підшлункової залози [1, 2]. Перелік цих чинників із кожним роком зростає, а механізм деструкції β -клітин уточнюється та деталізується.

Останніми роками значна увага приділяється вивченню функцій тимуса за умов цукрового діабету [3]. Це пов'язано із суттєвою зміною уявлень про роль тимуса у формуванні центральної імунної толерантності [4, 5]. Клітини медулярної стромы тимуса синтезують органоспецифічні антигени та «представляють» їх тимоцитам у процесі диференціювання. Лімфоцити з високоафінними рецепторами, що розпізнають власні антигени, підлягають елімінації. Порушення будь-якого етапу негативної селекції веде до появи клонів Т-лимфоцитів, агресивних щодо власних структур. У випадку цукрового діабету мішенню автоімунних реакцій є антигени β -клітин підшлункової залози. Раніше вважалося, що у тимусі відсутні тканинспецифічні антигени (ТсА), і толерантність до них забезпечується виключно механізмами периферичної супресії. Останніми роками отримано переконливі докази присутності у тимусі практично всіх відомих ТсА [6]. Більше того, встановлено, що синтез і секреція ТсА є фізіологічною властивістю клітин тимуса [4]. Доведено, що в тимусі експресуються всі гени сімейства інсулінів: IGF2 (в епітеліальних клітинах), IGF1 (у макрофагах), INS (в епітеліальних і дендритних клітинах), а також молекул GAD і IA-2.

У тварин із генетично детермінованим діабетом (NOD миші та BB щури) ще перед маніфестацією хвороби у тимусі виявляються різноманітні зміни: гістологічної будови, фенотипу тимоцитів та їх суб-

популяційного складу, синтезу цитокінів і хемокінів, рівня експресії антигенів β -клітин тощо [3, 7]. Водночас є лише поодинокі публікації з питань визначення ендокринної функції тимуса за умов діабету.

Основним гормоном, що продукується епітеліальними клітинами тимуса і присутній у плазмі крові у фізіологічно значущих концентраціях, є тимулін [8, 9]. Тимулін (друга назва — тимічний сироватковий чинник) є нанопептидом, зв'язаним з іонами цинку. На відміну від інших білків і пептидів тимічного походження, тимулін продукується виключно у тимусі і не визначається після тимектомії та у мишей *nude* з вродженою відсутністю тимуса. Біологічна активність тимуліну реалізується лише після зв'язування з молекулою цинку. За сучасними уявленнями, рівень тимуліну у сироватці крові вважається інтегральним показником ендокринної функції тимуса. Тимулін залучений у різні етапи інтра- та екстра-тимічного диференціювання Т-клітин, і його вміст є однією з найважливіших характеристик імунного статусу. Введення синтетичного тимуліну посилює пригнічену (за старіння, імунодефіцитів, після тимектомії) відповідь Т-клітин на мітогени, відторгнення алотрансплантатів, обмежує розвиток автоімунного процесу. Продукція тимуліну перебуває під контролем цитокінів (інтерлейкінів 1 α , 1 β , 2, γ -інтерферону) та великої кількості гормонів [10]. Клінічними та експериментальними дослідженнями показано, що вміст тимуліну в сироватці крові змінюється за умов багатьох захворювань.

Виявлено пригнічення ендокринної функції тимуса у дорослих хворих на цукровий діабет 1-го типу, а також у мишей із алоксаніндукованим ЦД [11]. Експерименти, проведені співробітниками лабораторії ендокринної регуляції імуногенезу, показали зниження вмісту гормонів тимуса у мишей із хімічно індукованим (стрептозотоцином або алоксаном) діабетом та у тварин із генетично детермінованим діабетом (щури BB, миші db/db) [12]. У клінічних дослідженнях нами виявлено істотне

зменшення вмісту тимічних гормонів у крові дітей, хворих на ЦД 1-го типу, встановлено залежність цих змін від тривалості захворювання та наявності ускладнень [13]. Важко визначити напевне, що спричиняє порушення функції тимуса за діабету. Ці зміни значною мірою можуть бути наслідком глибоких метаболічних порушень, пов'язаних із розвитком хвороби. Тому надто цікавими є дослідження ендокринної функції тимуса у передклінічний період розвитку ЦД 1-го типу.

На підставі викладеного вище метою роботи стало визначення ендокринної функції тимуса у дітей групи ризику щодо захворювання на ЦД 1-го типу.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Проведено визначення рівня тимуліну у 126 дітей віком 5–16 років. Серед них 69 осіб (35 дівчинок і 34 хлопчики) з підвищеним ризиком розвитку ЦД 1-го типу (нащадки та сібси хворих на цукровий діабет 1-го типу), 18 пацієнтів (10 дівчинок і 8 хлопчиків) із вперше виявленим діабетом перед початком інсулінотерапії та 39 практично здорових дітей без обтяженої спадковості (контрольна група).

Дослідження рівня глюкози у периферичній крові натще та у сечі проводили двічі з інтервалом у 2 тижні. У дітей групи ризику та контрольної групи показники були у межах норми.

Рівень тимуліну в сироватці крові визначали за модифікованим методом Bach [14], принцип якого полягає у відновленні під впливом гормонів тимуса чутливості до азатіоприну спонтанних розеткоутворюючих клітин (сРУК) селезінки тимектомованих мишей.

Зразки плазми крові центрифугували на ультрафільтрах Centriflow Amicon CF-50 (Amicon, Lexington, MA). Фільтровану плазму титрували у середовищі 199 для одержання серії двократних розведень: від 1:2 до 1:512. У мишей лінії СВА віком 4–6 тижнів видаляли тимус під гексеналовим наркозом, і тварин використовували у дослідгах через 4–8 тижнів після операції. Кожного разу перед вилученням селезінки ретельно перевіряли відсутність залишків тимуса. За допомогою гомогенізатора Поттера одержували суспензію спленоцитів, двічі відмивали в середовищі 199 і використовували в концентрації 4×10^7 . Для проведення тестування 100 мкл нерозведеної та по 100 мкл серійно розведеної плазми змішували із суспензією спленоцитів у співвідношенні 1:1 та інкубували 30 хвилин у термостаті за температури 37°C. Кожну пробу ставили в дуплетах. Чотири адекватні об'єми суспензії спленоцитів без додаван-

ня плазми використовували як контроль. Після культивування клітини змішували з азатіоприном у концентрації 10 мкг/мл, обережно перемішували та інкубували за 37°C протягом 90 хвилин. Азатіоприн додавали у дві з чотирьох контрольних проб, в інші — лише середовище 199. 100 мкл суспензії еритроцитів барана, що містила 12×10^7 клітин, вносили до кожної пробірки, 5 хвилин інкубували за 37°C, центрифугували 1 хвилину за 100 g і далі витримували за 4°C протягом години. Осад ресуспендували 5 хвилин за 10 об./хв., використовуючи ротор із горизонтальним розташуванням пробірок, і підраховували кількість розеткоутворюючих клітин. Активним титром тимуліну вважали максимальне розведення зразка плазми, у якому спостерігали 50% редукцію кількості сРУК порівняно з контролем. Одиниця вимірювання тимуліну — $1/\log_2$ титру — величина, зворотна \log_2 розведення сироватки, що тестується.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

З метою виявлення автоімунного процесу в підшлунковій залозі перед клінічною маніфестацією цукрового діабету в периферичній крові дітей з обтяженою спадковістю (які мали родичів першої лінії, хворих на цукровий діабет 1-го типу) визначали специфічні антитіла до антигенів β -клітин: глутаматдекарбоксилази (GAD), тирозинфосфатази (IA-2), а також інсуліну (IAA). Дослідження вмісту аутоантитіл (AAT) виконано співробітниками відділення профілактичної діабетології радіоімунологічним методом із використанням стандартних наборів фірми «CIS bio international», Франція. За результатами досліджень діти з обтяженою спадковістю були розподілені на 2 групи: позитивні (38 дітей) і негативні (31 дитина) щодо наявності в периферичній крові аутоантитіл до антигенів острівцевих β -клітин. Проведене у відділенні клініко-лабораторне обстеження нормоглікемічних дітей групи ризику не виявило суттєвої різниці ані між AAT-позитивними і AAT-негативними, ані між пацієнтами групи ризику та здоровими дітьми без обтяженої спадковості.

Аналіз результатів визначення вмісту тимуліну у здорових дітей і пацієнтів групи ризику показав, що вірогідні зміни ендокринної функції тимуса спостерігаються лише в осіб із позитивною реакцією на наявність аутоантитіл до антигенів β -клітин підшлункової залози (GAD, IA-2, IAA). Як свідчать наведені у таблиці дані, у дітей, серонегативних щодо аутоантитіл, показники вмісту тимуліну близькі до контрольних значень. Разом із тим, слід відзначити,

Таблиця
**Вміст тимуліну ($1/\log_2$ титру) у дітей і підлітків,
 серопозитивних і серонегативних щодо автоантитіл**

№	Група обстежених	n	$M \pm m$	p
1	Контроль (здорові діти)	39	6,18±0,16	
2	Серонегативні щодо автоантитіл	31	5,65±0,19	1-2 >0,05
3	Серопозитивні щодо автоантитіл	38	4,34±0,14	1-3 <0,001 2-3 <0,001
4	Діти групи ризику, які у подальшому захворіли на цукровий діабет 1-го типу	15	3,53±0,23	1-4 <0,001 2-4 <0,001 3-4 <0,01
5	Нещодавно виявлений цукровий діабет 1-го типу	18	3,06±0,19	1-5 <0,001 3-5 <0,001 4-5 >0,05

що у деяких пацієнтів (5 із 31, що складає 16% від загальної кількості пацієнтів у групі) рівень тимуліну був суттєво нижчим від норми (\log_2 — 3–4).

Більш істотне послаблення гормонпродукуючої функції тимуса встановлено у дітей групи ризику, у яких виявлено автоантитіла. Середні значення вмісту тимуліну у цієї категорії пацієнтів були майже в 1,5 разу нижчими від показників здорових дітей (4,34±0,14 і 6,18±0,16 відповідно, $p < 0,001$). У цій групі 24 дитини з 38 (63%) мали нижчий від норми рівень тимуліну.

У групі, позитивній щодо автоантитіл, 15 дітей у подальшому захворіли на цукровий діабет 1-го типу. Середні значення вмісту тимуліну у них склали 3,53±0,23, тобто були найнижчими серед усіх категорій дітей групи ризику ($p < 0,01$).

Після маніфестації цукрового діабету ендокринна функція тимуса продовжувала знижуватися. Так, у дітей із клінічними ознаками хвороби перед початком терапії інсуліном вміст тимуліну складав 3,06±0,19, що вдвічі нижче від показників контрольної групи ($p < 0,001$).

Отримані результати підтверджують висновки наших попередніх експериментальних досліджень і узгоджуються з даними літератури. Очевидно, порушення роботи тимуса за цукрового діабету проявляються функціональною неповноцінністю епітеліальних клітин — продуцентів тимуліну.

Значне послаблення ендокринної функції тимуса у дітей групи ризику щодо ЦД 1-го типу може бути складовою частиною комплексу імунних дисфункцій, що визначає розвиток автоімунного процесу. Важко сказати напевне, яким чином нестача секреції тимічних гормонів може позначатися на формуванні автоагресивних клонів лімфоцитів: або

впливає на процес диференціювання Т-лімфоцитів у тимусі на етапі негативної селекції, або проявляється послабленням супресії автореактивних клітин на периферії [15].

Отже, проведені дослідження встановили суттєве зменшення рівня тимуліну в плазмі крові дітей групи ризику розвитку ЦД 1-го типу, які мають автоантитіла до антигенів β -клітин. Тобто зміни ендокринної функції тимуса відбуваються вже у період початку автоімунного процесу в підшлунковій залозі і виявляються значно раніше клінічних проявів хвороби. Отримані результати свідчать про доцільність визначення вмісту тимуліну у дітей групи ризику як одного з додаткових критеріїв оцінки ймовірності захворювання на ЦД 1-го типу.

ВИСНОВКИ

1. Середні показники ендокринної функції тимуса у дітей групи ризику щодо ЦД 1-го типу без наявності автоантитіл в циркуляції вірогідно не відрізняються від контролю.

2. У дітей групи ризику, в яких виявлено автоантитіла до антигенів β -клітин підшлункової залози, вміст тимуліну у сироватці крові суттєво (в 1,5 разу) знижується. Найзначніше зниження продукції тимічних гормонів спостерігається напередодні маніфестації захворювання.

3. Визначення вмісту тимуліну у крові дітей групи ризику можна використовувати як додатковий критерій оцінки ймовірності захворювання на ЦД 1-го типу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Gianani R., Eisenbarth G.S. The stages of type 1A diabetes // *Immunol. Rev.* — 2005. — Vol. 204. — P. 232–249.
2. Atkinson M.A. Thirty years of investigating the autoimmune basis for type 1 diabetes // *Diabetes.* — 2005. — Vol. 54. — P. 1253–1263.
3. Geenen V., Brilot F., Louis C. et al. Importance of a thymus dysfunction in the pathophysiology of type 1 diabetes // *Rev Med Liege.* — 2005. — Vol. 60, № 5–6. — P. 291–296.
4. Gallegos A., Bevan M.J. Central tolerance: good but imperfect // *Immunol. Rev.* — 2006. — Vol. 209. — P. 290–297.
5. Geenen V., Mottet M., Dardenne O. et al. Thymic self-antigens for the design of a negative/tolerogenic self-vaccination against type 1 diabetes // *Curr. Opin. Pharmacol.* — 2010. — Vol. 10, № 4. — P. 461–472.
6. Krenger W. Foreign and self — the challenge for the immune system // *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.* — 2007. — Vol. 96, № 6. — P. 199–204.

7. *Kwon H., Jun H.S., Yang Y et al.* Development of autoreactive diabetogenic T cells in the thymus of NOD mice // *J. Autoimmun.* — 2005. — Vol. 24, № 1. — P. 11–23.
8. *Bach J.-F., Dardenne M.* Thymulin, a zinc-dependent hormone // *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.* — 1989. — Vol. 6, № 1. — P. 25–29.
9. *Reggiani P.C., Morel G.R., Gloria M. Cónsole G.M. et al.* The thymus-neuroendocrine axis: physiology, molecular biology, and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2009. — Vol. 1153. — P. 98–106.
10. *Savino W., Dardenne M.* Neuroendocrine Control of Thymus Physiology // *Endocrine Reviews.* — 2000. — Vol. 21, № 4. — P. 412–443.
11. *Fabris N., Mocchegiani E.* Endocrine control of thymic serum factor production in young-adult and old mice // *Cell. Immunology.* — 1985. — Vol. 91, № 2. — P. 325–335.
12. *Чеботарев В.Ф.* Современные представления о механизмах аутоиммунного процесса. Аутоагрессия и проблема иммунореабилитации при эндокринной патологии // *Имунологія та алергологія.* — 1998. — № 1–2. — С. 59–63.
13. *Chebotarev V., Zubkova G., Zamotayeva G. et al.* Comparative study of thymic function and induced nonspecific immunity in children with complicated and insulin-dependent diabetes mellitus // *Abstr. I World Congress Child Health–2000 (Canada).* — 1995. — P.256.
14. *Vocchegiani E., Paolucci P., Granchi D. et al.* Plasma zinc level and thymic hormone activity in young cancer patients // *Blood.* — 1994. — Vol. 83. — P. 749–757.
15. *Bach J.-F.* Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease // *Endocrine Rev.* — 1994. — Vol. 15, № 4. — P. 516–542.

РЕЗЮМЕ

Состояние эндокринной функции тимуса у детей группы риска в доклинический период развития сахарного диабета 1-го типа

Г.А. Замотаева

Проведено исследование уровня тимулина (гормона, секретируемого эпителиальными клетками тимуса) в крови 69 нормогликемических детей, имеющих повышенный риск развития диабета 1-го типа (потомки первой линии родства и сибсы больных сахарным диабетом) и у 18 детей с впервые выявленным диабетом до начала инсулинотерапии. Контрольную группу составили 39 практически здоровых детей без отягощенной наслед-

ственности по сахарному диабету. У 38 детей из группы риска выявлены антитела к антигенам β -клеток поджелудочной железы (GAD, IA-2, IAA), у остальных детей этой группы (31 ребенок) аутоантитела (ААТ) в крови не обнаружены. Установлено, что у детей группы риска с позитивной реакцией на ААТ содержание тимулина в 1,5 раза ($p < 0,001$) ниже контрольных значений. Наиболее значительное снижение секреции тимулина наблюдается накануне манифестации диабета. Полученные данные свидетельствуют о нарушениях функции тимуса у детей с аутоиммунным процессом в поджелудочной железе. Снижение уровня тимулина в крови наблюдается в период, предшествующий развитию клинической фазы заболевания. Определение содержания тимулина у детей с отягощенной наследственностью может быть использовано в качестве дополнительного критерия оценки вероятности заболевания сахарным диабетом 1-го типа.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа, тимулин, аутоантитела, дети.

SUMMARY

Thymic endocrine function in children risk group in the preclinical period of type 1 diabetes mellitus

G. Zamotayeva

The authors present the results of a study of blood levels of thymulin (a hormone that is secreted by thymic epithelial cells) in 69 normoglycemic children being at increased risk of type 1 diabetes mellitus development (offsprings of first line kin and sibs of diabetes mellitus patients), and in 18 children with newly diagnosed diabetes before insulin therapy initiation. The control group consisted of 39 practically healthy children without a family history of diabetes mellitus. In 38 children from the risk group, antibodies to antigens of pancreatic beta cells (GAD, IA-2, IAA) were identified; in the rest of children from this group (31 children) autoantibodies (AAB) were not revealed in the blood. It has been established that in children from the risk group with a positive response to AAB, thymulin content was by 1.5 times ($p < 0.001$) lower compared with control values. The most significant decrease in thymulin secretion was observed on the eve of diabetes manifestation. The data obtained suggest the presence of thymic functional abnormalities in children with autoimmune process in the pancreas. A decrease in thymulin blood levels was noted in the period preceding the development of clinical phase of the disease. Thymulin level assay in children with a family history of diabetes may be used as an additional criterion for assessment of the likelihood of type 1 diabetes mellitus development.

Key words: Type 1 diabetes mellitus, thymulin, autoantibodies, children.

Дата надходження до редакції 23.08.2010 р.