

Маркеры апоптоза у больных сахарным диабетом 1 типа в дебюте заболевания

Е.В. Пекарева, Т.В. Никонова, В.А. Горелышева, С.А. Прокофьев, Я.С. Зверева, С.М. Степанова, О.М. Смирнова

ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва
(директор — академик РАН и РАМН И.И. Дедов)

Цель. Изучение активационных маркеров апоптоза (CD95, CD95L) на лимфоцитах периферической крови у больных сахарным диабетом 1 типа (СД1) в дебюте заболевания.

Материалы и методы. Обследовано 33 пациента (25 мужчин и 8 женщин), которые были разделены на две группы. Проведено биохимическое, генетическое и иммунологическое обследование.

Результаты. У больных с «классическим» вариантом дебюта СД1 выявлено достоверное снижение содержания лимфоцитов, экспрессирующих CD95, и увеличение CD95L+–лимфоцитов по сравнению с контрольной группой. Более высокие показатели лимфоидных клеток, экспрессирующих CD95L, отмечены у пациентов, имеющих гены высокого риска развития СД1.

Заключение. На основе полученных данных можно предположить, что при СД1 отмечается угнетение регуляторного механизма апоптоза активированных лимфоцитов, что может способствовать пролонгации аутоиммунного ответа.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа, апоптоз, CD95, CD95L

Markers of apoptosis in patients with type 1 diabetes mellitus at the onset of the disease

E.V. Pekareva, T.V. Nikonova, V.A. Gorel'sheva, S.A. Prokofiev, Ya.S. Zvereva, S.M. Stepanova, O.M. Smirnova
Endocrinological Research Centre, Moscow

Aim. This work was to study activation markers of apoptosis (CD95, CD95L) on peripheral blood lymphocytes of patients with type 1 diabetes mellitus (DM1) at the onset of the disease.

Materials and methods. A total of 33 patients (25 men and 8 women) divided into 2 groups were available for biochemical, genetic, and immunological examination.

Results. Those with the «classical» onset of DM1 had significantly fewer CD95-expressing lymphocytes and more CD95L+ lymphocytes than control subjects. Carriers of genes responsible for high risk of DM1 showed especially large number of lymphocytes expressing CD95L.

Conclusion. It is conjectured that DM1 is characterized by the suppression of mechanism controlling apoptosis of activated lymphocytes that may promote prolongation of the immune response.

Key words: type 1 diabetes mellitus, apoptosis, CD95, CD95L

Одной из актуальных проблем эндокринологии является изучение аутоиммунного процесса при сахарном диабете (СД). Важную роль в развитии патологических процессов, в том числе аутоиммунных, играет апоптоз (программированная гибель клеток). В иммунной системе он является одним из основных регуляторов численности популяций клеток. Именно этот процесс ограничивает экспансию активированных клонов, препятствуя развитию воспаления и аутоиммунных реакций.

Апоптоз может быть вызван различными индукторными факторами. «Активационный» апоптоз развивается в результате дисбаланса активационных сигналов и / или вследствие экспрессии и последующего связывания специализированных рецепторов индукции апоптоза. Хорошо изучена последовательность событий взаимодействия белка семейства TNF (tumor necrosis factor) со специфическими рецепторами, которая приводит к апоптозу клетки. Представителем этой группы является система Fas/Fas L. Для этой системы не известны другие функции, кроме как индукция апоптоза клетки. Fas/APO-1/CD95 – рецептор, по структуре относящийся к семейству TNF. Fas конститутивно экспрессируется на поверхности клеток многих типов: тимocyтах, лимфобластоидных клеточных линиях, активированных Т- и В-лимфоцитах, фибробластах, гепатоцитах, миелоидных клетках и ряде других. В цитоплазматической части этого рецептора имеется «домен гибели» (DD – death domain), который вовлекается в белок-белковое взаимодействие с цитоплазматическими белками, генерируя «сигнал смерти».

Fas-L/CD95L относится к трансмембранным протеинам II типа. Fas-L экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах, натуральных киллерах, а также на β-клетках. Fas-L существует в двух формах – нерастворимой, или

мембраносвязанной, и растворимой, отщепляемой от клетки с помощью металлопротеаз. Растворимая форма, попадая в циркуляцию, провоцирует клетки, имеющие на своей поверхности Fas-рецептор, к апоптозу.

Программированная гибель клеток играет особую роль в функционировании иммунной системы. Таким путем регулируется ответ иммунокомпетентных клеток на антигенные стимулы, определяется характер, динамика и длительность иммунного ответа, формирование иммунологической толерантности.

В иммунной системе CD95 и CD95L вовлечены в опосредованную Т-лимфоцитами цитотоксичность. Под влиянием антигенной стимуляции происходит индукция CD95L на поверхности клеток [1]. В основном CD95L экспрессируется активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками. На периферии зрелые Т-клетки, распознавая аутоантигены, элиминируются с участием Fas-рецепторов. Для обеспечения удаления активированных лимфоцитов в завершающей фазе иммунного ответа должен быть запущен процесс устранения лимфоцитов [2, 3]. Таким образом, система Fas/Fas-L занимает центральное место в регуляции периферического иммунного ответа.

Процессу апоптоза отводится ведущая роль как основному механизму деструкции β-клеток, возникающей при СД1 [1, 2, 4]. Между тем маркеры запрограммированной гибели клеток при аутоиммунном СД, в частности при медленно прогрессирующем аутоиммунном диабете взрослых – LADA, еще недостаточно исследованы.

При СД1 выявляется резистентность лимфоцитов к апоптозу, чем, возможно, объясняется характер и продолжительность аутоиммунного ответа при данном заболевании. Также наблюдается снижение экспрессии проапоптозного рецептора CD95 на поверхности Т-лимфоцитов [5, 6].

Целью данного исследования явилось изучение активационных маркеров программируемой клеточной гибели — CD95 и CD95L на лимфоцитах периферической крови у больных СД1 и LADA в дебюте заболевания.

Материалы и методы исследования

На базе ФГУ ЭНЦ было обследовано 33 пациента с СД1 в дебюте заболевания, которые были разделены на две группы. Первую группу составили 19 человек (11 мужчин, 8 женщин) с «классическим» СД1; вторую — 14 человек (все мужчины) — с LADA. Критериями исключения из исследования была вакцинация в течение предшествующего года, прием иммуномодулирующих препаратов. Контрольную группу составили восемь практически здоровых лиц (3 мужчин и 5 женщин), сопоставимых по возрасту с исследуемыми группами. Критериями включения в контрольную группу были: отсутствие нарушений углеводного обмена и отрицательные аутоантитела к антигенам β -клетки (GADA, IA-2, ICA, IAA).

Диагноз СД ставился на основании клинической картины и данных лабораторного обследования в соответствии с критериями ВОЗ [7]. «Классический» вариант дебюта СД1 ставился при наличии яркой клинической картины (полидипсия, полиурия, значительная потеря массы тела), кетонурии, значений С-пептида ниже порогового уровня. Пациентам с дебютом заболевания в возрасте старше 30 лет, более мягким началом, положительными аутоантителами к антигенам β -клетки, отсутствием кетонурии, нормальными значениями уровня С-пептида ставился диагноз медленно прогрессирующего аутоиммунного СД взрослых.

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили с помощью наборов пробоподготовки DNA prep. В настоящей работе ДНК-типирование выполнялось по аллельным вариантам трех генов HLA класса II: *DRB1* (14 специфичностей), *DQA1* (восемь аллелей) и *DQB1* (13 аллелей) методом мультипраймерной полимеразной цепной реакции. Для определения полиморфных аллелей данных генов применялись коммерческие наборы производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология». Полимеразная цепная реакция проводилась согласно регламенту, указанному производителем. Амплификацию проводили на амплификаторе «Терцик». Идентификацию продуктов амплификации проводили после электрофореза в трехпроцентном агарозном геле и окрашивания продуктов амплификации бромистым этидием. Гаплотипы составлялись на основе известных таблиц сцепления.

Иммунологическое исследование включало определение аутоантител к цитоплазматическим структурам β -клеток (ICA), к глутаматдекарбоксилазе (GADA), к тирозинфосфатазе (IA-2) и антиинсулиновым аутоантителам (IAA). Количественное определение ICA, GADA и IAA в сыворотке крови обследованных определяли с помощью иммуноферментных наборов Isletest-ICA, GADA, IAA фирмы Biomerica согласно методике производителя. Количественное определение IA-2 в сыворотке крови осуществляли методом иммуноферментного анализа с использованием наборов Medizym фирмы Medipan MGBH.

Содержание уровня гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC) на аппарате D-20 (Bio-Rad) по стандартной методике производителя.

Определение базального уровня С-пептида и инсулина для оценки функционального состояния β -клеток проводили иммунохемилюминисцентным методом на аппарате Elecsys 2010 (Roche).

Определение субпопуляционного состава лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+, CD38+, CD95+, CD95L+, HLA-DR+) периферической крови проводили на проточном цитометре FACSCalibur с использованием моно-

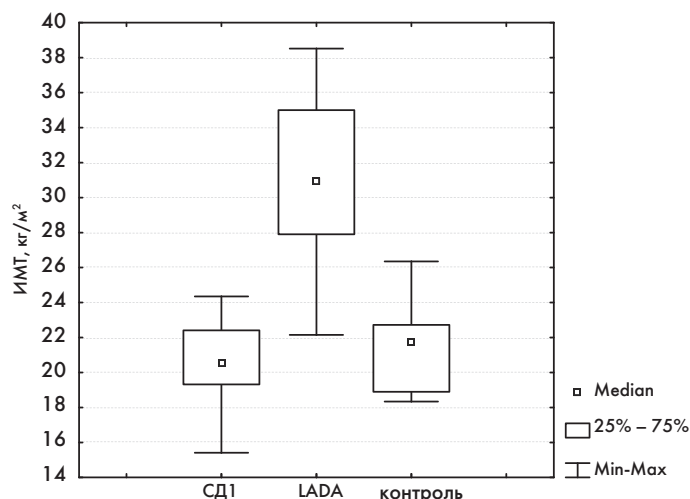


Рис. 1. Показатели ИМТ в исследуемых и контрольной группах

клональных антител (Becton Dickinson) к дифференцировочным антигенам лимфоцитов по стандартной методике. При этом оценивали процентное содержание субпопуляций лимфоидных клеток.

Статистическая обработка результатов исследования выполнена с помощью пакета прикладных программ Statistica v 6.0 for Windows. Сравнение показателей выделенных групп пациентов проводилось по U-критерию Манна-Уитни. Количественные показатели представлены в виде медианы и доверительного интервала (ДИ). Критический уровень значимости принимался равным 5%.

Результаты и их обсуждение

Средний возраст пациентов при постановке диагноза в первой группе ($n=19$) составил 27,8 лет (от 18 до 41), во второй ($n=14$) — 36,1 лет (от 25 до 46). Во второй группе индекс массы тела (ИМТ) на момент выявления заболевания был достоверно выше ($p<0,01$), чем в первой и контрольной группах, медиана и ДИ ИМТ составили 29,5 кг/м², ДИ [95%, 25,9; 34,1], 20,5 кг/м², ДИ [95%, 19,3; 22,0] и 21,7 кг/м², ДИ [95%, 19,0; 24,0] соответственно (рис. 1).

Уровень HbA_{1c} на момент выявления заболевания в обеих группах был сопоставим: 12,4%, ДИ [95%, 11,7; 13,8] в первой и 11,3%, ДИ [95%, 10,8; 13,1] во второй. Базальный уровень С-пептида был достоверно выше в группе больных с поздним аутоиммунным началом СД — 1,9 нг/мл, ДИ [95%, 1,3; 2,6] по сравнению с первой группой — 0,6 нг/мл, ДИ [95%, 0,4; 0,7] ($p<0,01$).

Аутоантитела к антигенам β -клеток были выявлены у 14 пациентов (73,7%) первой группы и 14 человек (100%) второй группы. Наиболее часто определялись GADA, реже IA-2 и ICA. Комбинации антител обнаружены у семи (23,3%) обследованных больных (четверо из первой и трое из второй). Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Частота выявления аутоантител к антигенам β -клетки у обследованных больных и в контрольной группе

Аутоантитела	Количество больных (абс. / относ.) в первой группе	Количество больных (абс. / относ.) во второй группе	Контрольная группа
GADA	4 (21,1%)	5 (35,7%)	0
ICA	2 (10,5%)	2 (14,3%)	0
IA-2	3 (15,8%)	4 (28,6%)	0
IAA	1 (5,3%)	0	0
Комбинации	4 (21,1%)	3 (21,4%)	0

Таблица 2

Распределение HLA-гаплотипов в исследуемых группах			
Гаплотипы	Первая группа (n=19)	Вторая группа (n=14)	Контрольная группа (n=8)
DRB1*17(03)-DQA1*0501-DQB1*0201	8	4	0
DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302	9	5	0
DRB1*01-DQA1*0101-DQB1*0501	2	3	2
DRB1*15-DQA1*0102-DQB1*0602-8	2	7	3
Остальные	2	4	3

При анализе распределения аллелей генов *DRB1-DQA1-DQB1* локуса HLA II класса отмечено преобладание гаплотипов сильной предрасположенности к развитию СД1 в исследуемых группах. Протективные аллели генов DQ чаще встречались во второй группе, однако ввиду небольшого объема выборки различия были статистически не достоверны. Данные представлены в таблице 2.

Основные субпопуляции лимфоидных клеток в исследуемых группах находились в пределах показателей контрольной группы. Наиболее выраженные изменения в исследуемых группах наблюдались в экспрессии маркерных молекул апоптоза по сравнению с контролем.

Экспрессия молекулы CD95 на мембране клетки характеризует ее возможность вступать в апоптоз. Индукторами этого процесса могут являться активированные лимфоциты, осуществляющие функцию иммунного надзора, и клетки с рецепторной молекулой CD95L.

При обследовании пациентов отмечено достоверное снижение процентного содержания лимфоидных клеток крови с маркерной молекулой CD95 в группе с «классическим» вариантом дебюта СД1 по сравнению со второй ($p=0,02$) и контрольной группами ($p=0,04$). Во второй исследуемой группе содержание лимфоцитов с CD95 не отличалось от контроля ($p=0,55$). Медиана и ДИ уровня лимфоцитов с рецептором CD95 составили в первой группе 28%, ДИ [95%, 24; 35], во второй – 34%, ДИ [95%, 32; 41], в контрольной – 33%, ДИ [95%, 32; 38]. Результаты представлены на рисунке 2.

Можно предположить, что наблюдаемое снижение количества лимфоидных клеток, экспрессирующих CD95, у пациентов с СД1 обуславливает относительную резистентность лимфоци-

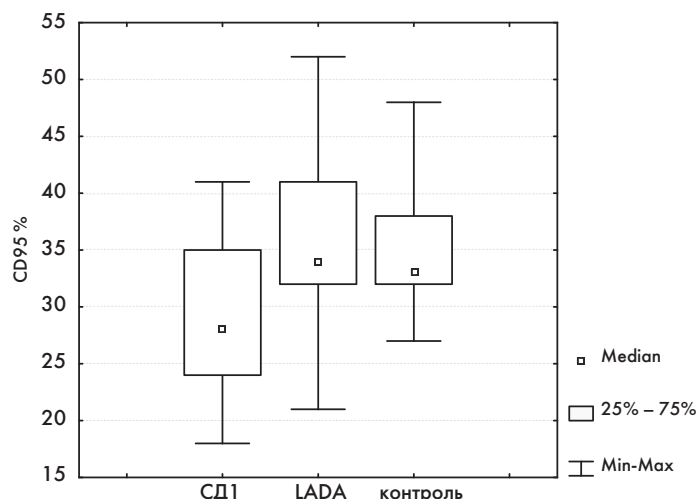


Рис. 2. Процентное содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD95, в исследуемых и контрольной группах

тов к апоптозу, чем, возможно, объясняется особенность ауто-иммунного ответа при данном заболевании. Устойчивость активированных лимфоцитов к апоптозу может приводить к пролонгации иммунного ответа.

Определение содержания лимфоцитов в периферической крови, экспрессирующих CD95L, выявило, что у больных СД количество клеток с CD95L на поверхности было достоверно выше, чем у практически здоровых лиц ($p<0,01$). Показатели CD95L+-лимфоцитов в первой группе были выше, чем во второй, и составили 3,8%, ДИ [95%, 3,1; 5,6] и 2,7%, ДИ [95%, 1,2; 4,3] соответственно, однако различия между основными группами оказались статистически недостоверны ($p=0,21$), что может быть связано с недостаточным объемом выборки. При сравнении каждой исследуемой группы с контрольной были получены достоверные различия (рис. 3). В контрольной группе медиана составила 1,6%, ДИ [95%, 0,7; 1,9].

При сопоставлении исследуемых групп несколько более высокое содержание лимфоцитов, имеющих CD95L на поверхности клетки, определялось у больных с гаплотипами HLA класса II высокой степени предрасположенности к развитию СД1 – 4,35%, ДИ [95%, 3,75; 6,7] по сравнению с пациентами, несущими протективные гаплотипы риска заболевания – 1,6%, ДИ [95%, 1,4; 3,5]. Однако различия оказались статистически недостоверны ($p=0,06$), вероятно, в связи с небольшим объемом выборки (рис. 4).

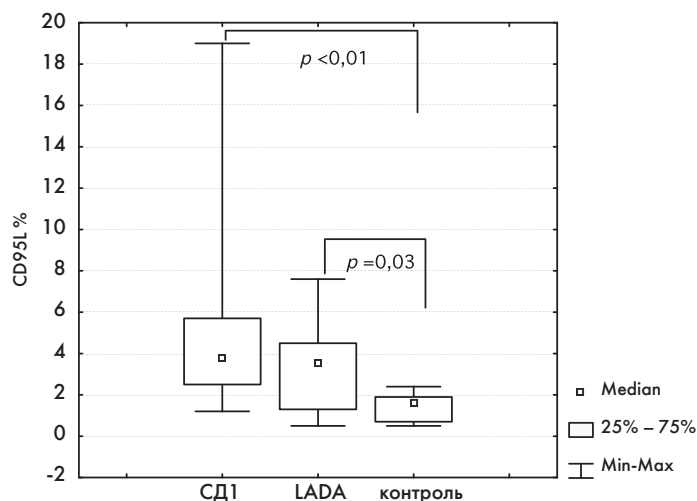


Рис. 3. Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD95L, в исследуемых и контрольной группах

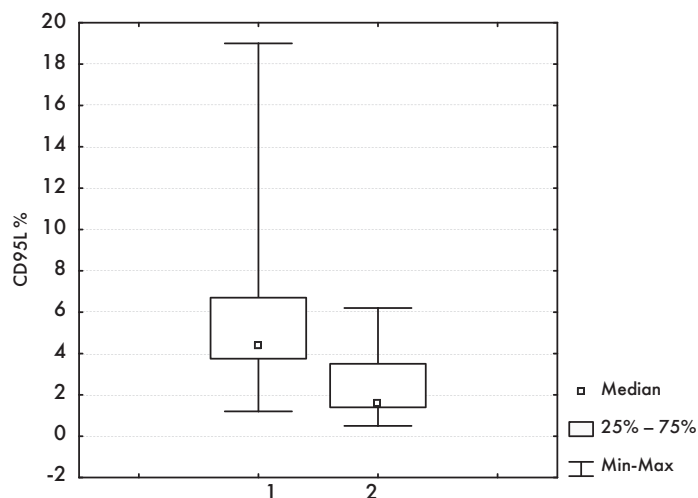


Рис. 4. Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD95L, у пациентов с аллелями высокого риска (1) и нейтрального риска (2) развития СД1

Покоящиеся Т-лимфоциты не экспрессируют Fas-лиганд. В основном CD95L экспрессируется активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками [8]. Th1-лимфоциты способны лизировать клетки-мишени более активно, чем Th2-лимфоциты путем Fas-опосредованного механизма [9]. При СД1 островки поджелудочной железы инфильтрированы в основном Т-лимфоцитами, продуцирующими широкий спектр цитокинов, что в свою очередь сопровождается aberrантной экспрессией мембранных рецепторов. По данным литературы, под влиянием высокой концентрации глюкозы, цитокинов β -клетки начинают экспрессировать CD95 на поверхности, отсутствующий в норме на этих клетках [10, 11]. Таким образом, выявленная повышенная экспрессия CD95L на лимфоидных клетках при СД1, возможно, обуславливает более выраженный апоптотический процесс в β -клетках поджелудочной железы.

Апоптоз играет важную роль в элиминации аутореактивных клеток, контролирует длительность, интенсивность иммунного ответа, степень повреждения тканей и является механизмом, поддерживающим баланс лимфоидных клеток

в организме [8, 12]. При взаимодействии CD95+-лимфоцитов с лигандом (мембранным или растворимым) инициируется возможность запуска процесса апоптоза, который может быть подавлен антиапоптотическим действием продуктов генов, блокирующих апоптоз. Поэтому снижение процентного содержания лимфоцитов, чувствительных к индукции апоптоза, может обуславливать нарушение процесса элиминации активированных форм лимфоцитов.

Заключение

Таким образом, можно сделать выводы, что при СД1:

1) снижение количества клеток, экспрессирующих CD95, может быть косвенным признаком подавления запрограммированной гибели аутореактивных клеток, что способствует пролонгации иммунного ответа;

2) увеличение содержания CD95L+-лимфоцитов может способствовать усилению апоптотического процесса в островковых β -клетках, инфильтрированных лимфоцитами, макрофагами и натуральными киллерами.

Литература

1. Moulian N., Berrih-Aknin S. Fas/APO-1/CD95 in health and autoimmune disease: thymic and peripheral aspects // *Semin Immunol.* – 1998. – 10 (6). – P.449–456.
2. Gronski M.A., Weinem M. Death pathways in T cell homeostasis and their role in autoimmune diabetes // *Rev. Diabetic. Stud.* – 2006. – 3 (2). – P.88–95.
3. Kabelitz D., Pohl T., Pechhold K. Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes // *Immunol. Today*, 1993, 14 – P. 338–339.
4. Дедов И.И., Никонова Т.В., Смирнова О.М. и др. Роль цитокинов в регуляции иммунного ответа и механизмы гибели β -клеток при различных вариантах течения сахарного диабета типа 1 // *Проблемы эндокринологии.* – 2005. – том 51, №3. – С. 3–7.
5. Giordano C., De Maria R., Stassi G. et al. Defective expression of the apoptosis-inducing CD95 (Fas/APO-1) molecule on T- and B-cells in IDDM // *Diabetologia.* – 1995. – 38. – P.1449–1454.
6. DeFranco S., Bonissoni S., Cerutti F. et al. Defective function of Fas in patients with type 1 diabetes associated with other autoimmune diseases // *Diabetes.* – 2001. – 50 – P.483–488.
7. World Health Organization: Definition, Diagnosis, and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications: Report of a WHO consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva, World Health Organization, 1999 (WHO/NCD/NCS/99.2).
8. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. – Москва, 2000. – 582 с.
9. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. – Москва. – 2002. – 320 с.
10. Moriwaki M., Itoh N., Miyagawa J. et al. Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset type 1 diabetes mellitus // *Diabetologia.* – 1999. – 42 – P.1332–1340.
11. Darville M.L., Liu D., Chen M-C. et al. Molecular regulation of Fas expression in β -cells // *Diabetes.* – 2001. – 50 (Suppl. 1) – P.83.
12. Потапов М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // *Иммунология.* – 2002. – №4. – С.237–242.

Пекарева Елена Владимировна	аспирант Института диабета, ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва E-mail: pekarevaev@mail.ru
Никонова Татьяна Васильевна	к.м.н., ведущий научный сотрудник отделения обучения и психосоциальной реабилитации больных сахарным диабетом, ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва
Горелышева Вера Анатольевна	к.м.н., врач-эндокринолог отделения обучения и психосоциальной реабилитации больных сахарным диабетом, ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва
Зверева Яна Станиславовна	к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории генетики и клинической иммунологии, ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва
Степанова Светлана Михайловна	научный сотрудник лаборатории генетики и клинической иммунологии, ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва
Прокофьев Сергей Александрович	к.б.н., зав. лабораторией генетики и клинической иммунологии, ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва
Смирнова Ольга Михайловна	д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отделения обучения и психосоциальной реабилитации больных сахарным диабетом, ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва