

Иммуногенетические аспекты медленно прогрессирующего аутоиммунного диабета у взрослых (LADA)

Никонова Т.В.¹, Апанович П.В.², Пекарева Е.В.¹, Горелышева В.А.¹, Степанова С.М.¹, Тишина Ю.В.¹, Прокофьев С.А.¹, Карпукhin А.В.²

¹ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва
(директор — академик РАН и РАМН И.И. Дедов)

²Медико-генетический научный центр, Москва
(директор — академик РАМН Е.К. Гинтер)

Одним из вариантов течения аутоиммунного сахарного диабета является медленно прогрессирующий аутоиммунный диабет взрослых Latent autoimmune diabetes of adults (LADA). Он сопровождается клинической картиной, не типичной для классического сахарного диабета 1 типа (СД1). Несмотря на наличие положительных аутоантител характеризуется медленными темпами аутоиммунной деструкции, что не сразу приводит к развитию потребности в инсулине. Как и классический СД1, LADA связан с потерей иммунологической толерантности к собственным антигенам. Между тем, при LADA количественная и функциональная активность T^{reg} как центральных регуляторов иммунного ответа и главных носителей феномена иммунологической толерантности до сих пор остаются не изученными, как и их взаимосвязь с показателями апоптоза.

Цель. Определение количественных и функциональных изменений, происходящих на уровне регуляторного звена иммунитета у пациентов с различной длительностью LADA, их взаимосвязь с показателями апоптоза, иммунологическими и генетическими маркерами.

Материал и методы. В исследование были включены 74 больных (51 мужчина, 23 женщины) с различной длительностью заболевания, 56 человек составили контрольную группу. У всех обследуемых было проведено HLA-генотипирование, определение аутоантител к глутаматдекарбоксилазе, инсулину, тирозинфосфатазе, антигенам островковых клеток, определение субпопуляционного состава лимфоцитов CD3+, CD4+, CD8+, CD38+, HLA DR+, CD25+, CD4+25+, CD95, CD95L, интенсивность экспрессии гена FoxP3, C-пептида, HbA_{1c}.

Результаты. Начало заболевания LADA характеризуется показателями экспрессии гена FoxP3, не отличающимися от контрольных значений. При этом наблюдается достоверное повышение относительного количества CD4⁺25^{high}-T-лимфоцитов. Снижение экспрессии гена FoxP3 при диабете LADA, в отличие от СД1, наблюдается через 6–12 мес от начала заболевания, при этом количество CD4⁺25^{high}-T-лимфоцитов нормализуется и при дальнейшем течении заболевания не отличается от контрольных значений. В период от 1 до 5 лет вновь наблюдается нормализация экспрессии гена FoxP3, при длительности болезни более 5 лет — достоверное снижение. Уровень экспрессии маркеров апоптоза (CD95 и CD95L на лимфоцитах, а также их растворимых форм) у пациентов с LADA во всех группах был сопоставим с контролем.

Заключение. Впервые определена интенсивность экспрессии гена Fox P3 и количество CD4⁺CD25^{high} T-регуляторных лимфоцитов при различной длительности сахарного диабета LADA. Изменение экспрессии гена FoxP3 у пациентов с LADA носит волнообразный характер, а функциональный дефицит Treg отсрочен. Возможно, увеличение численности Treg компенсирует их функциональный дефицит. В этом случае увеличение численности популяции Treg в период до 6 мес от начала болезни может отражать их регулируемую роль — в подавлении аутоиммунитета, что проявляется в более плавном начале заболевания.

Ключевые слова: LADA, CD4+CD25+, T-регуляторные клетки, ген FoxP3, апоптоз, CD95, CD95L

Immunogenetic characteristics of LADA

Nikonova T.V.¹, Apanovich P.V.², Pekareva E.V.¹, Gorelysheva V.A.¹, Stepanova S.M.¹, Tishina Yu.V.¹, Prokofiev S.A.¹, Karpukhin A.V.²

¹Endocrinological Research Centre, Moscow

²Medico-Genetic Research Centre, Moscow

Latent autoimmune diabetes of adults (LADA) is a variant of autoimmune diabetes mellitus. Its clinical feature not typical for classical DM1 despite the presence of positive autoantibodies is characterized by the low rate of autoimmune destruction that accounts for the late development of insulin dependence. Similar to classical DM1, LADA is associated with the loss of immune tolerance to autoantibodies. However, the quantitative and functional activity of T^{reg} as key regulators of the immune response and main agents of immune tolerance remain as poorly known as their relationship with characteristics of apoptosis.

Aim. To elucidate qualitative and functional changes at the level of immunity regulation in patients with LADA of different duration and their relationships with characteristics of apoptosis, immunological and genetic markers.

Materials and methods. The study included 64 patients (45 men and 19 women) with LADA and 56 control subjects. The methods included HLA genotyping, detection of autoantibodies against GAD, insulin, tyrosine phosphatase, islet cell antigens, composition of CD3+, CD4+, CD38+, HLA DR+, CD25+, CD4+25+, CD95, CD95L lymphocyte subpopulations, FoxP3 and C-peptide expression, HbA_{1c} levels.

Results. FoxP3 expression at the onset of LADA was similar to that in control subjects while the relative amount of CD425^{high} T-lymphocytes increased. In contrast to DM1, FoxP3 expression began to decrease 6–12 months after the onset of LADA when the amount of CD425^{high} T-lymphocytes lowered to become normal with the progress of the disease. Within 1–5 years after the onset of LADA, FoxP3 expression became normal again but significantly increased when its duration exceeded 5 years. Expression of apoptosis markers (CD95 and CD95L) on lymphocytes and of their soluble forms in all LADA patients was comparable with control.

Conclusion. We for the first time determined intensity of FoxP3 expression and the amount of CD425^{high} T-lymphocytes in patients with different duration of LADA. FoxP3 expression varies periodically while functional deficit of Treg is delayed and appears to be compensated by a rise in their number. Increased population of Treg within 6 months after the onset of LADA may reflect their regulatory role (suppression of autoimmunity) accounting for the gradual development of the disease.

Key words: LADA, CD4+CD25+, regulatory T-cells, FoxP3 gene, apoptosis, CD95, CD95L

Сахарный диабет 1 типа (СД1) возникает в результате аутоиммунной деструкции инсулин-секретирующих клеток. При физиологических условиях существует баланс между эффекторными Т-клетками и регуляторными клетками, контролирующими аутоиммунитет. При СД1 и других аутоиммунных заболеваниях этот баланс нарушается [1]. T^{reg} — уникальная популяция Т-клеток, которая относится к $CD4^+CD25^+$ Т-лимфоцитам [2, 3, 4] и экспрессирует транскрипционный фактор FoxP3. От интенсивности экспрессии FoxP3 зависит их супрессивная активность. T^{reg} — хорошо известные иммунорегуляторы, которые могут подавлять пролиферацию эффекторных клеток путем ингибирования сигнальных путей активации IL-2 [5]. Они помогают иммунной системе сохранять гомеостаз Т-клеток, и это, в свою очередь, ведет к развитию воспалительных ответных реакций [6, 7]. T^{reg} стремятся ликвидировать активный ответ Т-клеток и предотвратить развитие аутоиммунных реакций, регулируя распространение популяции Т-клеток и их дифференциацию, а также функцию эффекторных Т-клеток [8]. Показано, что при СД1 наблюдаются нарушения функции T^{reg} [9, 10].

Одним из вариантов течения аутоиммунного сахарного диабета является медленно прогрессирующий аутоиммунный диабет взрослых — «latent autoimmune diabetes in adults» (LADA) [11, 12, 13]. Он сопровождается клинической картиной, не типичной для классического СД1. Несмотря на наличие положительных аутоантител, характеризуется медленными темпами аутоиммунной деструкции, что не сразу приводит к развитию потребности в инсулине. Эпидемиологические исследования показали, что LADA встречается в 2–12% всех случаев СД [14, 15]. Данная форма СД занимает промежуточное положение между СД1 и СД 2 типа (СД2) и в последней классификации не выделяется в отдельный тип. Тем не менее, при диагностике заболевания важно не забывать о существовании подобного варианта течения аутоиммунного СД. В попытках стандартизировать определение LADA иммунологическое общество диабета (Immunology of Diabetes Society) предложило учитывать следующие критерии — возраст выявления заболевания, наличие положительных титров аутоантител, отсутствие потребности в экзогенном инсулине, по крайней мере, в течение первых 6 мес заболевания. Таким образом, основное отличие данной формы от СД1 — наличие периода «инсулинонезависимости» после постановки диагноза, а от СД2 — присутствие маркеров аутоиммунной деструкции.

По данным литературы, возраст дебюта LADA колеблется в пределах от 25 до 40 лет [16, 17]. В большинстве случаев LADA выявляется у людей в возрасте 30–35 лет.

Чаше всего у пациентов с LADA на момент постановки диагноза отмечается избыточная масса тела (индекс массы тела (ИМТ) $>25 \text{ кг/м}^2$), что объединяет этот вариант с СД2. При этом абдоминальное ожирение, если оно имеет место, менее выражено. Также могут встречаться и нормальные значения массы тела, поэтому данный показатель нельзя рассматривать как диагностический.

Аутоантитела к антигенам β -клетки являются маркерами аутоиммунного процесса. Диагноз LADA основывается на выявлении положительных титров хотя бы одного из следующих аутоантител: к глутаматдекарбоксилазе (GADA), поверхностным антигенам к β -клеткам (ICA), инсулину (IAA) и тирозин-фосфатаза-подобному белку IA (IA-2A) [18]. По данным UKPDS [17], при исследовании титров аутоантител, проведенном 3672 больным с типичным СД2, в 12% случаев были выявлены те или иные аутоантитела к антигенам β -клетки. Наличие аутоантител коррелировало с более молодым возрастом — в возрасте 25–34 лет в 21% выявлены ICA, в 34% GADA, а в возрасте 55–65 лет только 4% больных имели положительные титры ICA и 7% GADA. В скрининговых исследованиях пациентов с фенотипическим СД2 в 25–46% обнаруживается, по крайней

мере, один тип аутоантител [16, 17, 19]. По данным литературы, наиболее часто у пациентов с LADA обнаруживаются положительные титры GADA и ICA [16, 20], в то время как у пациентов с СД1 чаще выявляются GADA и IA-2. Как показано в работе Seissler J. и соавт., GADA и IA-2A встречаются в сыворотке крови приблизительно у 60% пациентов с СД1 и только у 37,5% людей с LADA [21]. Наличие аутоантител в сыворотке крови отличает LADA от СД2 [22]. Поэтому для своевременной диагностики LADA необходимо проведение иммунологического исследования пациентам в возрасте 30–45 лет с клинической картиной СД2 без ожирения.

Известно, что аллели *DRB1*03*, *DRB1*04* и *DQB1*0201*, *DQB1*0302* ассоциируются с повышенным риском развития СД1, а аллели *DRB1*15* и *DQB1*0301*, *DQB1*0602* являются протективными в отношении развития СД1. В европейских исследованиях показано, что у пациентов с LADA чаще выявляются «предрасполагающие» аллели, чем у здоровых людей [18, 17]. Интересно отметить, что по данным исследования, проведенного в Швейцарии, с положительными титрами GADA особенно часто ассоциировался аллель *DQB1*0302* [18]. Однако частота встречаемости генотипов высокого риска развития СД1 при LADA оказалась значительно ниже, чем при СД1 у детей и взрослых. При этом у пациентов с LADA чаще определялись «протективные» аллели *DQB1*0602*. Протекция, ассоциированная с *DRB1*15/DRB1*0602*, может объяснять возраст манифестации LADA. Таким образом, для LADA характерно одновременное присутствие как «предрасполагающих», так и «протективных» аллелей HLA II класса.

Одним из критериев LADA является отсутствие потребности в экзогенно вводимом инсулине, как минимум, в течение 6 мес после постановки диагноза СД [16, 17]. На длительность этого периода наибольшее влияние оказывают такие факторы, как выраженность аутоиммунного процесса, остаточная секреция инсулина, поддержание оптимального гликемического контроля.

Как и классический СД1, LADA связан с потерей иммунологической толерантности к собственным антигенам. Между тем, при LADA количественная и функциональная активность T^{reg} как центральных регуляторов иммунного ответа и главных носителей феномена иммунологической толерантности до сих пор остаются не изученными, как и их взаимосвязь с показателями апоптоза. При СД1 одной из причин развития аутоиммунитета является нарушение процесса элиминации аутореактивных иммунных лимфоидных клеток. В норме клоны аутореактивных клеток подвергаются апоптозу [23]. Система Fas-FasL является наиболее изученной системой активации апоптоза. Взаимодействие поверхностных маркерных молекул CD95(Fas) с лигандом — CD95L(FasL) запускает процесс клеточной гибели. Таким образом, уровень экспрессии CD 95 на поверхности клетки определяет ее готовность к вступлению в апоптоз. Однако маркеры апоптоза у пациентов с LADA недостаточно изучены.

Цель

Определение количественных и функциональных изменений, происходящих на уровне регуляторного звена иммунитета у пациентов с различной длительностью LADA, их взаимосвязь с показателями апоптоза, иммунологическими и генетическими маркерами.

Материалы и методы

В исследование были включены 74 пациента (51 мужчина, 23 женщины) с LADA. Больные были разделены на группы в зависимости от длительности заболевания: впервые выявленный LADA (первые 6 мес заболевания) (группа 1) — 14 че-

Таблица 1

Частота выявления аутоантител у пациентов с LADA при различной длительности заболевания				
Аутоантитела	группа 1 (n=14)	группа 2 (n=20)	группа 3 (n=26)	группа 4 (n=14)
GADA	5	7	17	3
ICA	2	2	3	1
IA-2A	1	1	2	1
IAA	1	0	0	0
GADA+ICA	3	5	4	1
GADA+IA-2A	0	2	0	0
Комбинации (3)	2	3	0	0
Отрицательные	0	0	0	9

людей, 6–12 мес (группа 2) – 20 человек, с длительностью СД от 1 года до 5 лет (группа 3) – 26, от 5 до 10 лет (группа 4) – 14. Диагноз медленно прогрессирующего аутоиммунного диабета взрослых – LADA, согласно критериям P. Zimmet, ставился пациентам с дебютом заболевания в возрасте старше 30 лет, постепенным началом, положительными аутоантителами к аутоантигенам β -клетки и/или инсулину, отсутствием кетонурии, нормальными значениями базальной концентрации С-пептида в сыворотке крови [13].

Медиана возраста дебюта заболевания LADA составила 38,0 лет [30,0; 43,0], ИМТ 28,82 кг/м² [23,83; 31,23].

Контрольную группу составили 56 практически здоровых лиц (30 мужчин и 26 женщин), сопоставимых по возрасту с пациентами исследуемых групп. Критериями включения в контрольную группу были: отсутствие нарушений углеводного обмена и отрицательные аутоантитела к антигенам β -клетки (GADA, IA-2A, ICA, IAA). Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили с помощью наборов пробоподготовки «DNA ргтер». ДНК-типирование выполнялось по аллельным вариантам 3 генов HLA II класса: *DRB1* (14 специфичностей), *DQA1* (8 аллелей) и *DQB1* (13 аллелей) методом мультипраймерной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для определения полиморфных аллелей данных генов применялись коммерческие наборы производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология». ПЦР проводилась согласно регламенту, указанному производителем. Амплификацию проводили на амплификаторе «Терцик». Идентификацию продуктов амплификации проводили после электрофореза в 3% агарозном геле и окрашивания продуктов амплификации бромистым этидием. Гаплотипы составлялись на основе известных таблиц сцепления.

Иммунологическое исследование включало определение аутоантител к ICA, GADA, IA-2A и антиинсулиновых аутоантител 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-2A в сыворотке крови осуществляли методом иммуноферментного анализа с использованием наборов «Medizym» фирмы «Medipan MGBH».

Содержание гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC) на аппарате D-10 («Bio-Rad») по стандартной методике производителя.

Определение базальной концентрации С-пептида в крови для оценки функционального состояния β -клеток проводили иммунохемилюминесцентным методом на аппарате «Elecsys 2010» («Roche»).

Определение субпопуляционного состава лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD20⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD95⁺, CD95L⁺, DR⁺) периферической крови проводили на проточном цитометре «FACSCalibur» с использованием моноклональных антител одинарной и двойной меткой («Becton Dickinson»)

Таблица 2

Изменение HbA _{1c} , С-пептида и количества антител к GADA при различной длительности LADA				
	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа
	менее 6 мес	6-12 мес	1-5 лет	5-10 лет
HbA _{1c} %	10,9 [6,4; 11,1]	6,0 [5,3; 6,6]	6,6 [6,0; 7,2]	7,5 [6,3; 8,8]
С-пептид, нг/мл	1,8 [1,6; 2,6]	2,6 [2,4; 2,9]	2,1 [1,5; 2,3]	1,4 [0,8; 2,1]
GADA, Ед/мл	3,1 [2,4; 3,7]	1,2 [0; 1,6]	1,1 [0; 1,3]	—

Таблица 3

Частота комбинации различных гаплотипов в HLA-генотипе у пациентов с LADA	
Генотип (гаплотип/гаплотип)	n=74
Предрасполагающий/предрасполагающий	14 (18,9%)
Предрасполагающий нейтральный	16 (21,6%)
Предрасполагающий/протективный	24 (32,4%)
Протективный/нейтральный	11 (14,9%)
Протективный/протективный	4 (5,5%)
Нейтральный	5 (6,7%)

к дифференцировочным антигенам лимфоцитов по стандартной методике. При этом оценивали процентное содержание, экспрессию дифференцировочных антигенов и абсолютное количество указанных субпопуляций лимфоидных клеток.

Для определения интенсивности экспрессии гена Fox P3 проводилось выделение тотальной РНК из образцов крови данных групп пациентов и получение комплиментарного ДНК (кДНК) по матрице РНК. Определение интенсивности экспрессии гена Fox P3 было проведено методом ПЦР в режиме реального времени (Real-time PCR). Для проведения Real-time PCR были синтезированы праймеры и отработаны оптимальные условия амплификации. При оптимизации метода Real-time PCR был определен диапазон значений, в котором соблюдается линейная зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации кДНК.

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. Корреляционный анализ осуществлялся непараметрическим методом ранговой корреляции по Спирмену. Количественные показатели представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [Q25; Q75].

Критический уровень значимости принимался равным 5%.

Для определения диапазона нормальных показателей интенсивности экспрессии гена Fox P3 было обследовано 85 здоровых доноров.

Результаты и их обсуждение

У всех обследуемых пациентов с LADA в дебюте заболевания были выявлены положительные аутоантитела (табл. 1). Наиболее часто во всех группах встречались GADA.

Результаты определения HbA_{1c}, С-пептида и GADA как наиболее часто встречающихся аутоантител при LADA представлены в таблице 2.

Учитывая аутоиммунный характер СД и выраженную генетическую ассоциацию заболевания с генами (*DRB1*, *DQA1*, *DQB1*) локуса HLA класса II [20] нами были определен ряд генетических и иммунологических характеристик при LADA.

Анализировали частоту встречаемости различных комбинаций гаплотипов в генотипе HLA у пациентов LADA.

В качестве «предрасполагающих» и «протективных» к заболеванию анализировали следующие гаплотипы.

Таблица 4

Характеристика субпопуляционного состава лимфоидных клеток и экспрессии гена Fox P3 в группе больных LADA с различной продолжительностью заболевания					
	до 6 мес	До 1 года	До 5 лет	5-10 лет	контроль
CD3, %		65 [62; 69]	66 [63; 69]	66 [63; 72]	72 [65; 78]
Aбс	1030,44 [842,84; 1310,40]	1469,36 [1371,04; 1567,68]	1796,76 [1796,76; 1796,76]	1044,30 [970,90; 1317,20]	1267,7 [990,51; 1675,67]
CD4, %	40,5 [37; 43]	42 [39; 42]	41 [38; 44]	42 [36; 43]	37 [34; 45]
Aбс	641,15 [476,87; 806,40]	830,90 [775,72; 866,08]	1083,76 [975,72; 1109,50]	735,8 [564,9; 1020,44]	784,2 [615,43; 1020]
CD8, %	27 [25; 30]	29 [24; 36]	27 [25; 29]	24 [19; 33]	23 [19; 27]
Aбс	397,04 [315,00; 604,80]	654,16 [649,44; 658,88]	713,0 [658,08; 783,16]	516,8 [415,62; 807,05]	471,7 [385,8; 781,23]
CD38, %	36 [31; 42]	39 [32; 48]	44 [41; 48]	42,5 [31; 48]	23 [18; 26]
Aбс	557,48 [475,86; 747,77]	584,00 [577,28; 590,72]	1368,96 [1188,94; 1491,982]	1485,4 [1231,77; 1855,31]	412,1 [355,4; 581,25]
CD25, %	2,8 [0,5; 3,5]	2,1 [1,2; 2,95]	3,0 [1,8; 4,2]	2,7 [1,2; 2,8]	1,3 [1,0; 1,8]
Aбс	40,26 [11,40; 55,69]	43,27 [34,28; 52,26]	51,34 [49,37; 54,31]	41,0 [23,91; 59,31]	34,492 [49,9; 64,00]
CD4/25 ^{high} , %	2,10 [0,3; 2,3]	0,95 [0,4; 1,41]	2,6 [1,1; 4,2]	1,9 [0,7; 2,1]	0,8 [0,6; 0,8]
Aбс	30,19 [3,80; 40,25]	19,71 [14,43; 24,99]	31,37 [29,72; 33,35]	12,9 [8,25; 31,42]	30,49 [4,99; 56,00]
CD95, %	31 [25; 36]	36 [29; 38]	37 [32; 43]	35 [29; 39]	33 [32; 37]
Aбс	403,58 [399,24; 630,13]	630,13 [403,58; 870,36]	811,53 [482,06; 1010,24]	575,52 [403,58; 912,00]	528,00 [482,06; 811,53]
CD95L, %	1,9 [1,3; 4,2]	2,7 [1,2; 5,4]	4,9 [2,4; 7,4]	2,5 [1,2; 3,9]	1,9 [1,6; 4,4]
Aбс	45,46 [33,27; 57,28]	50,98 [4,54; 97,42]	68,45 [66,45; 71,50]	51,85 [34,89; 64,45]	94,10 [57,60; 130,61]
FoxP3	1,57 [0,78; 5,71]	0,43 [0,11; 0,75]	1,04 [0,84; 2,63]	0,19 [0,11; 0,34]	1,11 [0,66; 2,26]

«Предрасполагающие» гаплотипы:

1. *DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201*;
2. *DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302*;
3. *DRB1*01-DQA1*0101-DQB1*0501*.

«Протективные» гаплотипы:

4. *DRB1*13-DQA1*0102-DQB1*0602-8*;
5. *DRB1*15-DQA1*0102-DQB1*0602-8*;
6. *DRB1*11-DQA1*0501-DQB1*0301*;
7. *DRB1*13-DQA1*0501-DQB1*0301*.

Обращает на себя внимание, что в группе пациентов с LADA частота генотипов с двумя предрасполагающими гаплотипами значительно ниже (18,9%), чем с одним предрасполагающим гаплотипом в сочетании с протективным или нейтральным (54%) (табл. 3).

Возможно, отмеченные частотные генотипические отличия HLA локуса могут являться относительными критериями LADA в комбинации с другими диагностическими маркерами.

Исследование иммунологических показателей в различные сроки наблюдения может быть полезным для анализа степени выраженности аутоиммунного процесса и общей иммунореактивности. Учитывая значение T^{reg} в регуляции иммунных реакций, нами были проанализированы CD4⁺CD25⁺-лимфоциты и их активность по оценке экспрессии гена FOXP3, а также ряд маркерных молекул апоптоза.

Субпопуляционный состав лимфоидных клеток в группе больных LADA с различной продолжительностью заболевания представлен в таблице 4.

Не отмечено статистически значимых изменений основных субпопуляций лимфоидных клеток периферической крови при различной длительности заболевания LADA.

Для оценки регуляторного звена иммунитета были определены T^{reg}, экспрессия FoxP3 и показатели апоптоза на разных сроках LADA.

Прямая взаимосвязь между количеством T^{reg} и интенсивностью экспрессии гена FoxP3 выявлена только в контрольной группе.

Изменение экспрессии гена FoxP3 у пациентов с LADA носит волнообразный характер, что не наблюдается у пациентов с СД1. Начало заболевания характеризуется показателями экспрессии, не отличающимися от контрольных значений, при этом наблюдается достоверное повышение относительного количества CD4⁺25^{high}-T-лимфоцитов. Возможно, увеличение численности T^{reg} компенсирует их функциональный дефицит. Снижение экспрессии гена FoxP3 при диабете LADA, в отличие от СД1, наблюдается через 6–12 мес от начала заболевания, при этом количество CD4⁺25^{high}-T-лимфоцитов нормализуется и при дальнейшем течении заболевания не отличается от контрольных значений. В период от 1 до 5 лет вновь наблюдается нормализация экспрессии гена FoxP3, при длительности болезни более 5 лет — достоверное снижение (рис. 1 и рис. 2).

Нарастание процентного содержания T^{reg} в период до 6 мес может отражать их регулируемую роль на подавление активности аутоиммунитета.

В настоящей работе нами были исследованы маркеры апоптоза у пациентов с LADA.

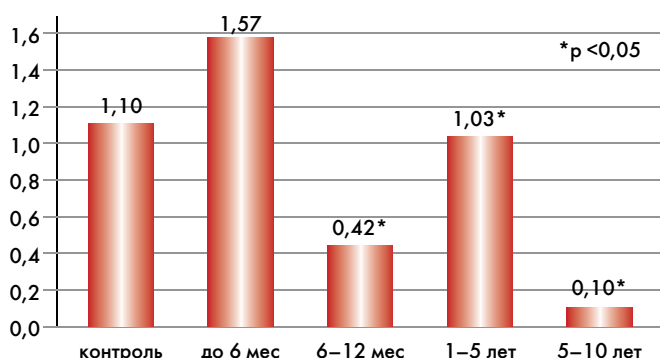
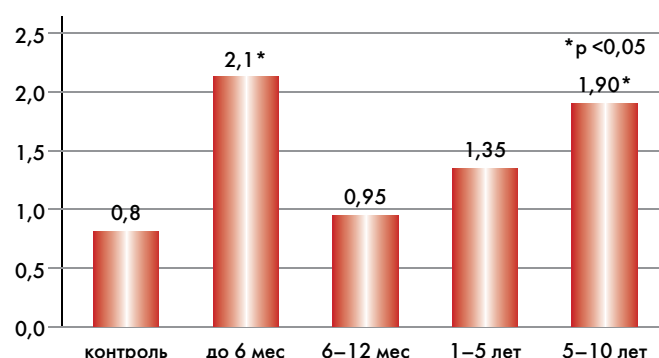


Рис. 1. Экспрессия гена FoxP3 у больных LADA

Рис. 2. Динамика CD4⁺CD25^{high} у больных LADA

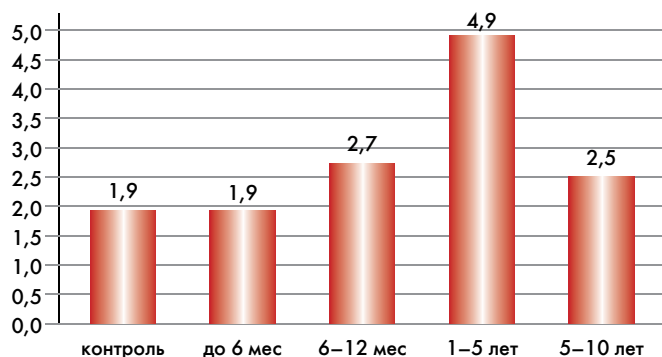


Рис. 3. Экспрессия CD95L на лимфоцитах у больных LADA

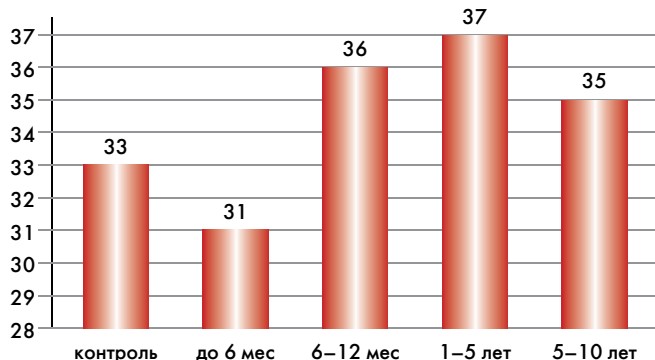


Рис. 4. Экспрессия CD95 на лимфоцитах у больных LADA

Известно, что CD95L экспрессируется на активированных лимфоцитах, а при взаимодействии рецептора CD95 с лигандом происходит индукция апоптоза клеток, несущих CD95 на поверхности.

Показатели в течение первого года были сопоставимы с контролем и не отличались между собой ($p > 0,05$).

Снижение экспрессии CD95 на клетках может свидетельствовать о резистентности лимфоцитов к апоптозу и способствовать пролонгации иммунного ответа.

Уровень экспрессии CD95 на лимфоцитах у пациентов с LADA во всех группах был сопоставим с контролем. Нарастание в период 1–5 лет маркерных молекул CD95 (в небольшой степени) и CD95L может отражать относительно вялотекущий аутоиммунный процесс до 1 года и его отсроченную (замедленную) активацию на более поздних этапах, что может быть одним из проявлений динамики процесса при LADA (рис. 3 и рис. 4).

Запуск апоптотического процесса может осуществляться и при взаимодействии с CD95 и его растворимого лиганда.

Исследована концентрация растворимых форм апоптотических маркеров в сыворотке крови (sCD95 и sCD95L) в течение первого года заболевания.

У пациентов с LADA концентрация sCD95 в сыворотке крови оказалась немного выше показателей группы контроля, однако различия статистически недостоверны на всех этапах наблюдения ($p > 0,05$). В дебюте — 92,7 пг/мл, через год — 81,7 пг/мл, в группе контроля — 72,2 пг/мл.

Концентрация sCD95L у всех пациентов и в группе контроля была ниже пороговых значений (0,16 пг/мл).

В исследованных группах была обнаружена умеренная обратная взаимосвязь между возрастом дебюта СД и:

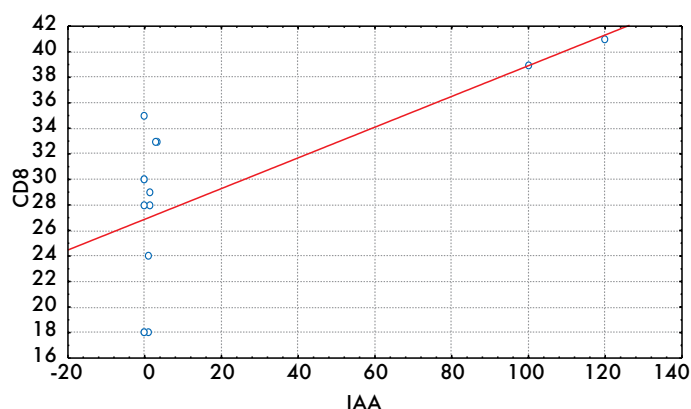


Рис. 5. Корреляция между титром IAA и количеством CD8

пациента ($r = -0,63$, $p = 0,004$), ИМТ ($r = -0,54$, $p = 0,018$), титром ICA ($r = -0,49$, $p = 0,030$). Между возрастом дебюта и концентрацией ИРИ была подтверждена выраженная обратная зависимость ($r = -0,81$, $p = 0,026$), а между ИМТ и концентрацией С-пептида — умеренная положительная ($r = 0,58$, $p = 0,02$). Выявленные закономерности позволяют утверждать, что чем больше ИМТ и содержание ИРИ, тем в более молодом возрасте может развиваться LADA. Для более молодого возраста дебюта характерен больший титр ICA ($p = 0,02$). При этом у пациентов не наблюдалось корреляции между содержанием С-пептида и титром аутоантител в крови. В то же время, между содержанием HbA_{1c} и С-пептида у обследованных пациентов обнаружена умеренно выраженная обратная зависимость ($r = -0,54$, $p = 0,05$).

При анализе взаимосвязи иммунологических маркеров СД и количественных показателей интенсивности апоптоза была обнаружена сильная положительная корреляция между количеством антител к GAD и содержанием CD95L (%) ($r = 0,94$, $p = 0,05$), умеренная обратная корреляция между концентрацией антител к GAD и относительным количеством CD20 ($r = -0,60$, $p = 0,02$) — маркером активных антител-продуцирующих β -клеток.

В ходе исследования была выявлена умеренная положительная корреляция между титром IAA и относительным количеством CD8 ($r = 0,54$, $p = 0,04$) (рис. 5).

Воздействие активированных CD8 цитотоксических Т-лимфоцитов на клетки-мишени может приводить к разному эффекту. После распознавания иммуногенного комплекса на клетке-мишени CD8-лимфоциты выделяют целый набор эффекторных молекул, совместное действие которых вызывает либо некроз, либо апоптоз этих клеток.

Таким образом, при заболевании LADA функциональный дефицит T^{reg} отсрочен, а прогрессирование индуцированной аутоиммунной реакции при длительности заболевания от 1 до 5 лет по неизвестным пока причинам замедляется, несмотря на наличие антител. Возможно, индукция аутоиммунного процесса происходит на фоне имеющейся периферической инсулинорезистентности, характерной для больных LADA.

Вероятно, высокие потребности в инсулине у инсулинрезистентных пациентов приводят их к диабету при меньшем повреждении β -клеток (у худых, с хорошей чувствительностью к инсулину требуются более серьезные повреждения β -клеток для развития клинической манифестации диабета).

Литература

1. Morran M.P., Omenn G.S., Pietropaolo M. Immunology and genetics of type 1 diabetes // Mt. Sinai J. Med. — 2008. — № 75. — P. 314–327.
2. Bendelac A. Mouse NK+1 T cells // Curr. Opin. Immunol. — 1995. — Vol. 7. — P. 367.
3. Mason D., Powrie F. Control of immune pathology by regulatory T cells // Curr. Opin. Immunol. — 1998. — № 10. — P. 649–655.
4. Putnam A.L., Vendrame F., Dotta F., Gottlieb P.A. CD+4 CD+25 high regulatory T cells in human autoimmune diabetes // J. Autoimmun. — 2005. — № 24. — P. 55–62.

5. Randolph D.A., Fathman C.G. CD4+CD25+ regulatory T cells and their therapeutic potential // *Annu. Rev. Med.* — 2006. — № 57. — P. 381—402.
6. Bluestone J.A., Tang Q. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? // *Curr. Opin. Immunol.* — 2005. — № 17. — P. 638—642.
7. St. Clair E.W., Turka L.A., Saxon A. et al. New reagents on the horizon for immune tolerance // *Annu. Rev. Med.* — 2007. — № 58. — P. 329—346.
8. Tang Q., Bluestone J.A. Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity // *Immunol. Rev.* — 2006. — № 212. — P. 217—237.
9. Brusko T.M., Wasserfall C.H., Clare-Salzler M.J. et al. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+CD25+ T-cells in type 1 diabetes // *Diabetes*. — 2005. — № 54. — P. 1407—1414.
10. Lindley S., Dayan C.M., Bishop A. et al. Defective suppressor function in CD4+CD25+ T cells from patients with type 1 diabetes // *Diabetes*. — 2005. — № 54. — P. 92—99.
11. Palmer J.P., Hirsch I.B. What's in a name: latent autoimmune diabetes of adults, type 1.5, adult-onset, and type 1 diabetes // *Diabetes Care*. — 2003. — Vol. 26. — P. 536—538.
12. Pozzilli P., Di Mario U. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of the adult): definition, characterization, and potential prevention // *Diabetes Care*. — 2001. — Vol. 24. — P. 1460—1467.
13. Zimmet P.Z., Tuomi T., Mackay I.R. et al. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency // *Diabet. Med.* — 1994. — № 11. — P. 299—303.
14. Borg H., Gottsäter A., Fernlund P., Sundkvist G. A 12-year prospective study of the relationship between islet antibodies and β -cell function at and after the diagnosis in patients with adult-onset diabetes // *Diabetes*. — 2002. — № 51. — P. 1754—1762.
15. Kobayashi T., Tamemoto K., Nakanishi K. et al. Immunogenetic and clinical characterization of slowly progressive IDDM // *Diabetes Care*. — 1993. — № 16. — P. 780—788.
16. Hosszafalusi N., Vatai A., Rajczy K. et al. Similar genetic features and different islet cell autoantibody pattern of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) compared with adult-onset type 1 diabetes with rapid progression // *Diabetes Care*. — 2003. — № 26. — P. 452—457.
17. Turner R., Stratton I., Horton V. et al. UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group // *Lancet*. — 1997. — № 350. — P. 1288—1293.
18. Tuomi T., Carlsson A., Li H. et al. Clinical and genetic characteristics of type 2 diabetes with and without GAD antibodies // *Diabetes*. — 1999. — № 48. — P. 150—157.
19. Кононенко И.В. Функциональное состояние β -клеток, периферическая чувствительность к инсулину, метаболизм глюкозы у больных с поздним аутоиммунным началом сахарного диабета в дебюте заболевания: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2003. — 21 с.
20. Cervin C., Lysenko V., Bakhtadze E. et al. Genetic similarities between latent autoimmune diabetes in adults, type 1 diabetes, and type 2 diabetes // *Diabetes*. — 2008. — № 57. — P. 1433—1437.

Никонова Татьяна Васильевна

к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник отделения программного обучения и лечения больных, ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва

E-mail: tatiana_nikonova@mail.ru

Апанович Павел Васильевич

научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики, Медико-генетический научный центр, Москва

Пекарева Елена Владимировна

научный сотрудник отделения программного обучения и лечения больных, ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва

Горелышева Вера Анатольевна

к.м.н., врач-эндокринолог отделения программного обучения и лечения больных, ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва

Степанова Светлана Михайловна

научный сотрудник лаборатории генетики и клинической иммунологии, ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва

Тишина Юлия Владимировна

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

Карпухин Александр Васильевич

д.б.н., зав. лабораторией молекулярной генетики, Медико-генетический научный центр, Москва