

На правах рукописи

Пекарева Елена Владимировна

**Маркёры апоптоза и аутоиммунной деструкции β -клеток
при впервые выявленном сахарном диабете 1 типа**

14.01.02 – эндокринология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва 2010

Работа выполнена в ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России (директор – академик РАН и РАМН, профессор Иван Иванович Дедов)

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Ольга Михайловна Смирнова

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Тамара Леонидовна Кураева

доктор медицинских наук, профессор
Нина Александровна Петунина

Ведущая организация: ГУ «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»

Защита диссертации состоится « 22 » декабря 2010 года в 14:00 часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.126.01 в ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России по адресу: 117036, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России

Автореферат разослан « 22 » ноября 2010 года.

Ученый секретарь Диссертационного Совета
доктор медицинских наук, профессор

Е.А. Трошина

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Значительный рост заболеваемости сахарным диабетом (СД) обусловил принятие Организацией Объединённых Наций резолюции по СД в 2006 году, основной целью которой явилось углубление научных исследований в области СД. В настоящее время считается, что ведущими звеньями в патогенезе аутоиммунного поражения β -клеток поджелудочной железы является нарушение регуляции гомеостаза иммунокомпетентных клеток, что ведёт к появлению клонов аутореактивных лимфоцитов [Один В.И., 2003; Jahromi M., 2007]. В качестве одного из основных механизмов деструкции β -клеток при СД 1 типа (СД 1) рассматривается программированная гибель клеток – апоптоз. [Дедов И.И., 2003; Augstein P., 1998; Спор М., 2005]. С другой стороны при СД 1 выявляется резистентность лимфоцитов к апоптозу, который в норме участвует в элиминации аутореактивных Т-лимфоцитов [Gronski M, 2006]. Таким образом, в патогенезе СД 1 апоптотический процесс играет существенную роль в двух аспектах: нарушение элиминации избытка аутореактивных клеток иммунной системы и возрастание гибели собственно β -клеток. Поэтому нарушения процессов инициации и реализации программированной гибели клеток становятся основополагающими в определении характера течения заболевания.

Несмотря на большое количество работ, посвященных проблеме апоптоза при аутоиммунных заболеваниях, подобные исследования у человека, в том числе сравнивающие показатели иммунного статуса больных СД 1 и медленно прогрессирующим аутоиммунным диабетом взрослых (LADA) немногочисленны. В ряде работ, опубликованных за последние годы, было показано, что у пациентов с СД 1 имеется выраженный дефект в экспрессии CD 95 на В- и Т-лимфоцитах [Никонова Т.В., 2006; Giordano C., 1995, DeFranco S., 2001]. Это привело авторов к выдвижению гипотезы, что потеря толерантности лимфоцитами к аутоантигенам при СД 1 может быть частично объяснена дефектной экспрессией CD 95 на поверхности клетки. Данных по изучению особенностей иммунного статуса и экспрессии маркёров апоптоза у пациентов с LADA в литературе не найдено.

Таким образом, изучение экспрессии маркёров апоптоза на лимфоцитах периферической крови и поиск новых иммунологических маркёров для проведения дифференциальной диагностики подтипов аутоиммунного СД представляется актуальным.

Цель исследования

Изучить взаимосвязь показателей апоптоза, иммунологических и генетических маркёров с клиническими особенностями течения аутоиммунного сахарного диабета в дебюте и при динамическом обследовании.

Задачи исследования

1. Изучить особенности распределения HLA гаплотипов, оценить степень аутоиммунной агрессии, при различных клинических вариантах течения сахарного диабета 1 типа.

2. Оценить уровень экспрессии маркёров апоптоза (CD 95, CD 95L) на лимфоцитах периферической крови и концентрацию их растворимых форм (sCD 95, sCD 95L) в сыворотке крови у больных сахарным диабетом 1 типа в дебюте заболевания.

3. Изучить динамические изменения маркёров апоптоза, иммунологических маркёров, цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α , TNF- β , IFN- γ) у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 1 типа.

4. Оценить наличие взаимосвязи между поверхностными и растворимыми молекулами CD 95 и CD 95L у пациентов с сахарным диабетом 1 типа.

5. Оценить диагностическую значимость изучаемых маркёров.

Научная новизна

Впервые проведена комплексная оценка иммунологических и генетических показателей у лиц с впервые выявленным аутоиммунным СД. Впервые изучена экспрессия маркёров апоптоза (CD 95 и CD 95L) на лимфоцитах у пациентов с аутоиммунным СД в дебюте заболевания. Установлены различия в уровне экспрессии CD 95 и CD 95L на лимфоцитах периферической крови у больных с различными клиническими вариантами дебюта аутоиммунного диабета (“классический” СД 1 и LADA). Впервые проведено исследование растворимых форм маркёров апоптоза (sCD 95 и sCD 95L) в сыворотке крови у лиц с аутоиммунным СД. Впервые оценены изменения экспрессии маркёров апоптоза (CD 95 и CD 95L) на лимфоцитах и концентрации их растворимых форм в сыворотке крови (sCD 95 и sCD 95L) в течение первого года заболевания и при развитии ремиссии СД 1. Получены данные об отсутствии взаимосвязи уровня экспрессии маркёров апоптоза в дебюте заболевания с развитием наступления ремиссии.

Практическая значимость

Показана необходимость комплексного подхода для верификации подтипа аутоиммунного СД и выбора адекватной лечебной тактики. Полученные результаты могут послужить основой для использования определения маркёров апоптотического процесса и иммунного статуса в качестве дополнительного диагностического метода.

Апробация работы

Основные положения исследования доложены на IX региональной конференции по лечению сахарного диабета 2 типа (Берлин, Германия, 2009), V Всероссийском диабетологическом конгрессе (Москва, Россия, 2010), 46 сессии Европейской Ассоциации по изучению сахарного диабета (Стокгольм, Швеция, 2010). Апробация диссертации проведена на межотделенческой научной конференции ФГУ ЭНЦ 17 июня 2010 года. По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ в отечественных и зарубежных научных изданиях.

Структура и объём диссертации.

Диссертация включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы и практические рекомендации. Список литературы включает 143 источника. Диссертация изложена на 114 страницах и содержит 17 таблиц и 20 рисунков.

Материал и методы исследования

В исследование было включено 97 пациентов (64 мужчины, 33 женщины) с впервые выявленным СД, которые были разделены на 2 основные группы. 1 группу составили 63 пациента (37 мужчин, 26 женщин) в возрасте от 18 до 37 лет с «классическим» СД 1. В дебюте заболевания наблюдалась типичная клиническая картина, кетонурия, значения концентрации С-пептида в крови у них были ниже порогового уровня ($<1,0$ нг/мл). Во 2 группу были включены 34 пациента (27 мужчин, 7 женщин) в возрасте от 30 до 49 лет с более мягким началом заболевания, наличием положительных титров аутоантител к антигенам β -клетки и/или инсулину, отсутствием кетонурии и потери массы тела в дебюте СД, нормальными значениями базальной концентрации С-пептида в сыворотке крови ($>1,0$ нг/мл). Этим пациентам был установлен диагноз медленно прогрессирующего аутоиммунного диабета взрослых (LADA).

23 пациентам 2-й группы диагноз LADA был установлен первично. Остальные 11 пациентов были с первичным диагнозом СД 2 и получали в течение 6-10 мес. производные сульфонилмочевины в качестве монотерапии или в комбинации с другими пероральными сахароснижающими препаратами (ПССП) без значимого клинического эффекта. Дебют заболевания у этих больных был на фоне нормальной или избыточной массы тела, возраст на момент постановки диагноза СД был менее 40 лет. При обследовании у них были выявлены положительные титры аутоантител к антигенам β -клетки и HLA-гаплотипы высокого риска развития СД 1. Диагноз был изменен на медленно прогрессирующий аутоиммунный диабет взрослых.

Критериями исключения из исследования была вакцинация в течение предшествующего года, приём иммуномодулирующих препаратов и наличие других аутоиммунных заболеваний при первичном обследовании.

Группу сравнения составили 16 практически здоровых лиц (9 мужчин и 7 женщин), сопоставимых по возрасту с основными группами. Критериями включения в контрольную группу были: отсутствие нарушений углеводного обмена и отрицательные титры аутоантител к антигенам β -клетки и инсулину (GADA, IA-2A, ICA, IAA).

Клиническое обследование включало осмотр, анализ анамнеза заболевания и жизни, данных лабораторных показателей, уточнение наличия или отсутствия специфических осложнений СД.

Иммуногенетическое обследование

Количественное определение ICA, GADA, IAA и IA-2A в сыворотке крови осуществляли методом иммуноферментного анализа с использованием наборов “Isletest-ICA, GADA, IAA” (“Biomerica”, Германия) и “Medizym” (“Medipan GmbH”, Германия). Определение экспрессии поверхностных молекул на лимфоцитах периферической крови проводили на проточном цитофлуориметре “FACSCalibur” по стандартной методике с использованием моноклональных антител к CD 3, CD 4, CD 8, CD 16, CD 20, CD 38, HLA-DR (“Becton Dickinson”, США) и CD 95, CD 95L (“Immunotech”, Франция). При этом оценивали процентное содержание субпопуляций лимфоидных клеток. ДНК-типирование выполнялось методом мультипраймерной полимеразной цепной реакции по аллельным вариантам трех генов HLA класса II: *DRB1* (14 специфичностей), *DQA1* (8 аллелей) и *DQB1* (13 аллелей). Для определения полиморфных аллелей данных генов применялись коммерческие наборы производства

ЗАО “НПФ ДНК-Технология” (Россия). Амплификацию проводили на амплификаторе “Терцик” (Россия). Гаплотипы составлялись на основе известных таблиц сцепления. Указанные исследования выполнены в лаборатории генетики и клинической иммунологии ФГУ ЭНЦ (заведующий – к.м.н. Прокофьев С.А.).

Исследование концентрации цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α , TNF- β , IFN- γ в сыворотке крови проводили с помощью системы мультиплексного анализа FlowCytomix Th1/Th2 11 plex (“Bender Medsystems”, Австрия). Полученные пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (“Becton Dickinson”, США). Обработку цитометрических файлов осуществляли в программном обеспечении FlowCytomixPro 2.2.1 (“Bender Medsystems”, Австрия).

Биохимическое обследование

Содержание уровня HbA_{1c} определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления на аппарате D-10 (“Bio-Rad”, Франция) по стандартной методике производителя. Определение концентрации sCD 95 и sCD 95L в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа на диагностических наборах Human sAPO-1/Fas ELISA и Human sFas-L ELISA (“Bender MedSystems”, Австрия). Исследования выполнены в лаборатории клинической биохимии ФГУ ЭНЦ (заведующий – Ильин А.В.).

Определение концентрации С-пептида и инсулина в сыворотке крови проводили иммунохемолюминисцентным методом на аппарате “Elecsys 2010” (“Roche”, Германия) на базе гормональной лаборатории ФГУ ЭНЦ (заведующий – д.м.н., проф. Гончаров Н.П.).

Статистическая обработка результатов исследования была выполнена с помощью программ Microsoft Office Excel 2003, SPSS v 12.0 for Windows (SPSS Inc., США) и пакета прикладных программ Statistica v 6.0 for Windows (StatSoft Inc., США). Количественные показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [25-й и 75-й процентиля], если не оговорено иное. Для качественных признаков приведены доли. Сравнительный анализ полученных данных по количественному признаку в независимых выборках был проведен с помощью U-критерия Манна-Уитни, метода Краскела-Уоллиса; в зависимых выборках – критерия Вилкоксона для парных сравнений, непараметрического метода Фридмана, вычисления коэффициента конкордации Кендалла. Сравнение несвязанных групп по

качественным признакам осуществлялось путём анализа таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 . Оценка взаимосвязи признаков проводилась с помощью корреляционного анализа по Спирмену. Исследование влияния маркеров апоптоза на прогноз течения заболевания было проведено с помощью регрессионного логистического анализа. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Основные клиничко-лабораторные показатели участников на момент включения в исследование представлены в таблице 1. Медиана возраста пациентов, включённых в исследование, на момент постановки диагноза СД в 1-й группе составила 24 года, во 2-й – 35 лет. Данных за микро- и/или макрососудистые осложнения СД на момент постановки диагноза не выявлено ни у одного из пациентов.

Таблица 1. Общая характеристика участников исследования.

Параметр	1-я группа (n=63)	2-я группа (n=34)	группа сравнения (n=16)
Пол (м/ж)	37/26	27/7	9/7
Возраст, годы	24* [20; 32]	35* [32; 43]	33 [29; 37]
Длительность заболевания, мес.	1,2* [0; 2,5]	7,9* [5,7; 10,1]	—
ИМТ, кг/м ²	21,3* [19,9; 22,2]	27,7* [24,5; 32,9]	23,8 [21,3; 26,3]
НbA _{1c} , %	10,3 [7,9; 12,4]	10,1 [7,2; 12,8]	5,4 [5,1; 5,5]
С-пептид, нг/мл	0,7* [0,5; 1,1]	2,1* [1,8; 3,8]	2,3 [1,6; 2,4]

Примечание: * $p_{1-2} < 0,01$ (критерий Манна-Уитни).

Всем пациентам 1-й группы была назначена базис-болюсная инсулинотерапия. Суточная доза инсулина (Ме) на момент выписки из стационара у этих пациентов составила 0,53 Ед/кг. Пациенты 2-й группы получали как ПССП, так и инсулинотерапию. Из 11 больных с первичным диагнозом СД 6 человек в связи с неэффективностью проводимого лечения были переведены на интенсивную схему инсулинотерапии, 5 продолжили приём ПССП (метформин в виде монотерапии или в комбинации ингибиторами дипептидил-пептидазы IV). Из 23 пациентов, которым диагноз LADA был установлен первично, 13 – назначен метформин, 3 – метформин в комбинации с инсулином и 7 – базис-болюсная инсулинотерапия (суточная доза (Ме) на момент выписки из стационара 0,46 Ед/кг).

Сравнительная оценка иммуногенетических показателей

Титры GADA, ICA, IAA были определены у всех участников исследования, титры IA-2A – у 67 пациентов с СД (из 1-й группы 41 человек, из 2-й – 26) и у всех лиц

группы сравнения (n=16). Положительные титры исследуемых аутоантител были выявлены в 1-й группе у 47 пациентов (74,6%) и у всех 34 пациентов (100%) 2-й группы (табл. 2).

Таблица 2. Частота выявления аутоантител у обследованных больных.

Аутоантитела	СД 1 (n=63), абс. (относ.)		LADA (n=34), абс. (относ.)	
	изолированно	в комбинации	изолированно	в комбинации
GADA	12 (19,0%)	16 (25,4%)	11 (32,4%)	13 (38,2%)
ICA	5 (7,9%)	8 (12,7%)	3 (8,8%)	8 (23,5%)
IA-2A	9 (14,3%)	10 (15,9%)	5 (14,7%)	4 (11,8%)
IAA	3 (4,8%)	2 (3,2%)	2 (5,9%)	1 (2,9%)
Комбинации	18 (28,6%)		13 (38,2%)	
Положительные	47 (74,6%)		34 (100%)	
Отрицательные	16 (25,4%)		0	

Наиболее часто в обеих группах определялись GADA – в 44,4% (1-я группа) и в 70,6% (2-я группа), причём чаще они встречались в комбинации либо с ICA, либо с IA-2A, что согласуется с литературными данными [Cervin C., 2008, Tuomi T., 1993, Hosszufalusi N., 2003]. У пациентов с LADA титры GADA составили 3,1 Ед/мл, а у больных СД 1 – 1,4 Ед/л. Различия в частоте встречаемости и уровне титров GADA между группами оказались статистически значимы ($p < 0,05$). ICA выявлены у 13 (20,6%) больных СД 1 и у 11 (32,3%) пациентов с LADA. В обоих случаях чаще эти аутоантитела определялись в комбинации с GADA, чем отдельно – 12,7% и 23,5%, соответственно. Различия между группами в титрах ICA оказались статистически недостоверны ($p = 0,26$). Положительные титры IA-2A немного чаще встречались у пациентов с СД 1 и в обеих основных группах встречались у пациентов, несущих хотя бы один из HLA-гаплотипов высокого риска развития СД 1 (*DR 3-DQ 2*, *DR 4-DQ 8*). Статистически значимых различий в титрах IA-2A между 1-й и 2-й группами мы не выявили ($p = 0,34$).

Комбинации исследуемых аутоантител обнаружены в 1-й группе в 28,6%, во 2-й – в 38,2% случаев. У больных СД 1 одинаково часто встречались комбинации GADA + ICA и GADA + IA-2A (по 12,7%). У пациентов с LADA в два раза чаще определялась комбинация GADA + ICA по сравнению с GADA + IA-2A – 23,5% и 11,8%, соответственно, что также показано в исследованиях С. Cervin и соавт., N. Hosszufalusi и соавт.

Таким образом, у пациентов с LADA частота встречаемости GADA составила 70,6% (при СД 1 – 44,4%), при этом чаще встречалась комбинация GADA + ICA. Титры обоих аутоантител были выше у больных медленно прогрессирующим

аутоиммунным диабетом взрослых.

Исследование частоты встречаемости аллелей генов *DRB1*, *DQA1*, *DQB1* локуса HLA класса II было проведено у 113 человек: у 63 пациентов с СД 1, 34 пациентов с LADA и у 16 человек из группы сравнения (табл. 3). При анализе распределения указанных аллелей мы отметили преобладание HLA-гаплотипов высокого риска развития СД 1 в основных группах. В нашем исследовании в качестве “предрасполагающих” рассматривались следующие три гаплотипа: *DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201* (*DR 3-DQ 2*), *DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302* (*DR 4-DQ 8*) и *DRB1*01-DQA1*0101-DQB1*0501* (*DR 1-DQ 01*), в качестве “протективных” следующие комбинации: 1) аллель *DQA1*0501-DQB1*0301* с *DRB1*11*, *DRB1*12* или *DRB1*13*; 2) аллель *DQA1*0102-DQB1*0602-8* с *DRB1*13* или *DRB1*15*. Остальные HLA-гаплотипы мы рассматривали как “нейтральные”. Генотипы высокого риска развития СД 1 были выявлены преимущественно в основных исследуемых группах: в 1-й – в 28 (44,4%), во 2-й – в 8 (23,5%) случаях. “Протективные” генотипы выявлены у двух пациентов (3,2%) с СД 1 и у двух (5,9%) с LADA, в группе сравнения – у 3 (18,7%) человек.

Таблица 3. Распределение HLA-генотипов в исследуемых группах.

Генотип	СД 1 (n=63)	LADA (n=34)	Группа сравнения (n=16)
<i>DR 3-DQ 2/DR 3-DQ 2</i>	3	3	0
<i>DR 4-DQ 8/DR 4-DQ 8</i>	5	2	0
<i>DR 3-DQ 2/DR 4-DQ 8</i>	13	2	0
<i>DR 3-DQ 2/DR 1-DQ 01</i>	4	0	0
<i>DR 4-DQ 8/DR 1-DQ 01</i>	3	1	1
Всего “предрасполагающий”	28 (44,4%)	8 (23,5%)	1 (6,3%)
“предрасполагающий”/ “нейтральный”	17 (27%)	8 (23,5%)	2 (12,5%)
“предрасполагающий”/ “протективный”	10 (15,9%)	9 (26,5%)	2 (12,5%)
“протективный”/ “нейтральный”	2 (3,2%)	5 (14,7%)	3 (18,7%)
“протективный”	2 (3,2%)	2 (5,9%)	3 (18,7%)
“нейтральный”	4 (6,3%)	2 (5,9%)	5 (31,3%)

Таким образом, сочетание HLA-гаплотипов высокого риска развития СД 1 в 2 раза чаще встречается у пациентов с СД 1 по сравнению с LADA, при этом самая «агрессивная» комбинация *DR 3-DQ 2/DR 4-DQ 8* выявлена в 20,6% случаев при СД 1 и в 5,9% случаев при LADA. У пациентов с LADA “предрасполагающие” гаплотипы с одинаковой частотой выявлялись в комбинации с “нейтральными” и “протективными”,

что характерно для данного типа и может расцениваться в качестве отличительной особенности.

При проведении корреляционного анализа мы не обнаружили достоверной зависимости между титрами аутоантител (GADA, ICA, IA-2A, IAA) и базальной концентрацией С-пептида ($p > 0,1$), количеством CD 20⁺-лимфоцитов ($p > 0,1$), а также наличием определенных сочетаний HLA-гаплотипов ни в одной из исследуемых групп.

Иммунный статус

Определение показателей иммунного статуса было проведено 53 больным в дебюте заболевания: 32 пациентам (18 мужчин, 14 женщин) с СД 1 и 21 пациенту (16 мужчин, 5 женщин) с LADA. Результаты распределения основных субпопуляций лимфоидных клеток (CD 3⁺, CD 4⁺, CD 8⁺, CD 16⁺, CD 20⁺) в периферической крови представлены в таблице 4. У пациентов с «классическим» СД 1 в дебюте заболевания содержание цитотоксических CD 8⁺ Т-лимфоцитов было выше, чем у практически здоровых людей ($p = 0,02$), различия между основными группами были клинически значимы, но статистически не достоверны ($p = 0,12$). При этом количество CD 4⁺ Т-лимфоцитов между группами существенно не различалось ($p = 0,7$).

Таблица 4. Количество лимфоцитов, экспрессирующих различные маркёры.

	1-я группа (n=32)	2-я группа (n=21)	группа сравнения (n=16)
CD 3, %	69 [65; 72]	67 [65; 73]	65 [62; 69]
CD 4, %	40 [36; 44]	41 [37; 45]	41 [36; 47]
CD 8, %	31 [26; 34]	27 [25; 30]	26 [21; 28]
CD 16, %	14 [11; 16]	13 [11; 16]	14 [14; 19]
CD 20, %	13 [11; 16]	15 [12; 17]	13 [12; 15]
CD 95, %	27 [24; 32]	31 [26; 36]	33 [32; 37]
CD 95L, %	3,1 [1,2; 4,2]	1,6 [0,7; 3,6]	1,9 [1,6; 4,4]

Маркёры апоптоза

В дебюте СД 1 отмечено значимое снижение экспрессии CD 95 на лимфоцитах по сравнению с контрольной группой – 27% и 33%, соответственно ($p < 0,01$). У пациентов с LADA этот показатель составил 31% и при попарном сравнении достоверно не отличался от 1-й группы и контрольной ($p > 0,05$). Результаты представлены на рисунке 1. Наблюдаемое снижение количества CD 95⁺-лимфоидных клеток у пациентов с СД 1 может обуславливать относительную резистентность лимфоцитов к апоптозу и способствовать пролонгации иммунного ответа. Низкий уровень экспрессии CD 95 на Т- и В- лимфоцитах у пациентов с впервые выявленным

СД 1 также был определен в исследовании С. Giordano и соавт., что авторы связывали с нарушением поддержания нормальной периферической толерантности [Giordano С., 1995]. У пациентов 1-й группы с “предрасполагающими” HLA-гаплотипами уровень экспрессии CD 95 на лимфоцитах был несколько ниже (27%), чем у пациентов, имеющих “протективные” HLA-гаплотипы (32%). Однако эти различия оказались статистически незначимы ($p=0,26$), что, возможно, связано с небольшим объёмом выборки.

При оценке уровня экспрессии CD 95L на лимфоцитах периферической крови мы выявили, что данный показатель был несколько выше у пациентов с СД 1 – 3,1%, чем у пациентов с LADA – 1,6% и практически здоровых лиц – 1,9% (рис. 2). Различия между группами оказались статистически незначимы ($p_{1-2}=0,19$, $p_{1-к}=0,9$, $p_{2-к}=0,27$). Увеличение экспрессии CD 95L на поверхности свидетельствует об активации лимфоцитов.

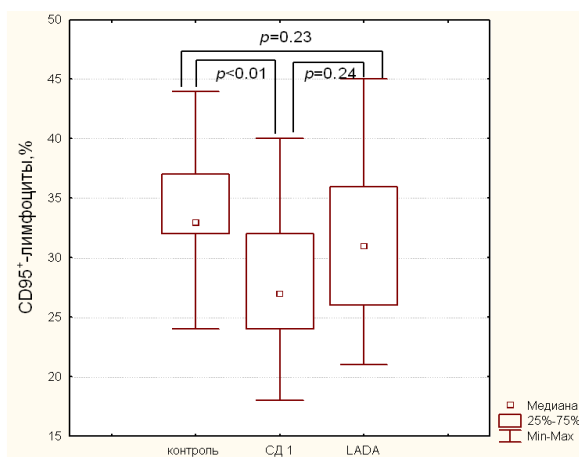


Рис. 1. Процентное содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD 95, в исследуемых группах.

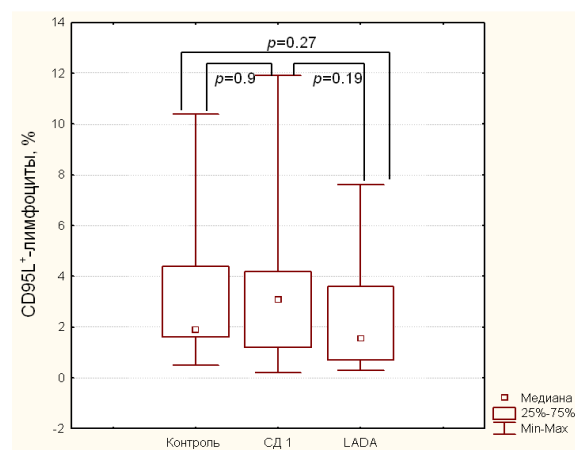


Рис. 2. Процентное содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD 95L, в исследуемых группах.

При СД 1 островки поджелудочной железы инфильтрированы в основном Т-лимфоцитами, которые продуцируют широкий спектр цитокинов, что в свою очередь сопровождается aberrантной экспрессией мембранных рецепторов. Moriawaki и соавт. показали, что под влиянием высокой концентрации глюкозы и цитокинов β -клетки начинают экспрессировать CD 95 на поверхности, в норме отсутствующий на этих клетках или определяющийся в незначительных количествах [Moriawaki M., 1999, Darville M.I., 2001]. Связывание лиганда с CD 95 инициирует возможность запуска процесса апоптоза. Таким образом, повышение экспрессии CD 95L на лимфоцитах свидетельствует об активации этих клеток при СД 1 и может косвенно свидетельствовать об усилении апоптоза β -клеток.

При разделении 1-й группы на подгруппы: (а) – пациенты, у которых за период наблюдения развилась ремиссия заболевания и (б) – пациенты, у которых ремиссии не было; мы отметили различия в уровне экспрессии маркёров апоптоза на лимфоцитах. В дебюте СД 1 у пациентов подгруппы (а) имелась тенденция к более высоким показателям экспрессии CD 95 – 30%, нежели у пациентов подгруппы (б) – 26% ($p=0,06$). Уровень экспрессии CD 95L на лимфоцитах оказался в подгруппе (а) несколько ниже, чем в подгруппе (б) – 1,5% и 3,5%, соответственно, однако, различия были статистически незначимы ($p=0,29$).

При проведении корреляционного анализа мы выявили тенденцию к увеличению уровня экспрессии CD 95 на периферических лимфоцитах при нарастании титра GADA у пациентов с СД 1 в дебюте заболевания ($r=0,51$, $p=0,09$). Взаимосвязи между уровнями экспрессии CD 95 и CD 95L на периферических лимфоцитах в исследуемых группах мы не обнаружили.

Определение концентрации растворимых маркёров апоптоза (sCD 95, sCD 95L) в сыворотке крови было проведено 27 пациентам 1-й группы, 17 пациентам 2-й группы и 10 практически здоровым лицам (группа сравнения). Максимальные показатели sCD 95 (рис. 3) мы обнаружили у пациентов с впервые выявленным СД 1 – 136,8 пг/мл, что в 1,9 раз превысило значения в группе контроля (72,5 пг/мл) и в 1,5 раз показатели у пациентов с LADA (92,7 пг/мл). При попарном сравнении исследуемых групп статистически значимые различия выявлены только между показателями 1-й и контрольной группы ($p=0,03$). Повышение концентрации sCD 95 в сыворотке крови у больных СД может оказывать влияние на баланс субпопуляций Т-лимфоцитов, создавая предпосылки к появлению аутореактивных клонов.

Концентрация sCD 95L в сыворотке крови у всех обследованных оказалась ниже пороговых значений (0,16 пг/мл). Корреляционный анализ не выявил статистически значимых взаимосвязей между экспрессией CD 95 и CD 95L на лимфоцитах и концентрацией sCD 95 в сыворотке крови у пациентов 1-й группы ($p>0,05$). У пациентов 2-й группы обнаружена отрицательная обратная связь средней силы между концентрацией sCD 95 и экспрессией CD 95 (рис. 4).

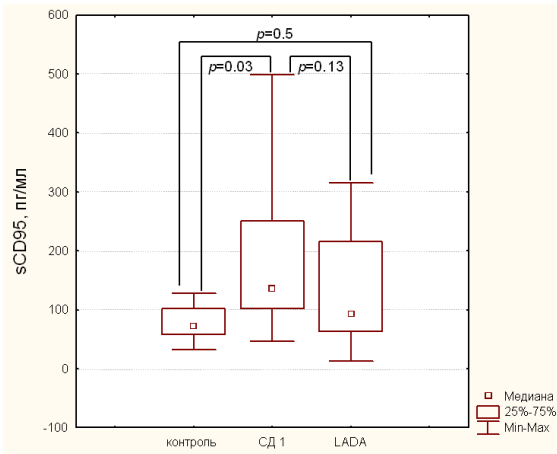


Рис. 3. Концентрация sCD 95 в исследуемых группах.

Цитокины

Определение концентрации цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α , TNF- β , IFN- γ) в сыворотке крови было проведено 19 пациентам из 1-й группы, 15 из 2-й группы и 10 из группы сравнения. В большинстве случаев концентрация исследуемых цитокинов оказалась ниже пороговых значений, в связи с чем сравнительный анализ между группами и корреляционный анализ проведены не были.

В дебюте СД 1 у 3 пациентов (15,8%) все изучаемые цитокины были выше пороговых значений, среди пациентов с LADA не выявлено ни одного случая, чтобы все изучаемые цитокины были выше пороговых значений. Наиболее часто в дебюте СД 1 (50% случаев) определялись IFN- γ и TNF- α , у больных с LADA – IFN- γ , TNF- α , IL-2, в группе контроля – TNF- α , однако, его концентрация была значительно ниже, чем в основных группах.

В группе сравнения у всех концентрация большинства цитокинов (IL-12p70, IL-2, IL-10, IL-6, IL-4, IL-5, TNF- β) была ниже пороговых значений.

Динамика иммунологических показателей и маркёров апоптоза у пациентов с СД 1 в течение первого года заболевания

Мы проанализировали изменения параметров у 25 пациентов с СД 1 в течение первого года заболевания. Обследование проводилось при установлении диагноза, через 5-7 месяцев и через 10-14 месяцев после выявления заболевания. Основные показатели динамического обследования представлены в таблице 5.

На момент постановки диагноза у 11 пациентов обнаружены положительные титры только одного из четырёх аутоантител, у 7 пациентов – различные комбинации

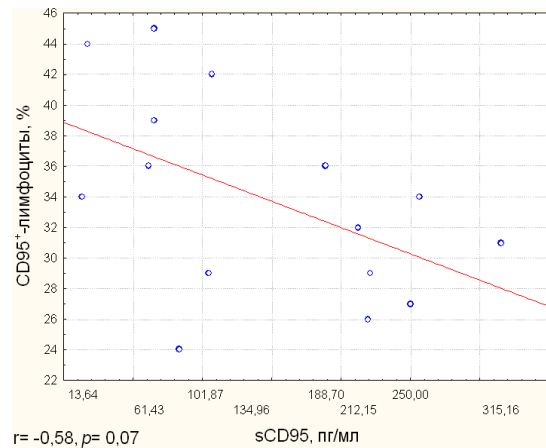


Рис. 4. Взаимосвязь между экспрессией CD 95 и концентрацией sCD 95 у пациентов с LADA.

аутоантител, у 7 человек титры всех исследуемых аутоантител были отрицательными. В течение первого года заболевания титры исследуемых аутоантител снижались, однако, статистически значимых изменений мы не отметили. На момент окончания динамического наблюдения комбинации аутоантител сохранялись у 3 пациентов, у 14 пациентов титры всех четырёх аутоантител были отрицательными.

Таблица 5. Результаты динамического обследования пациентов с СД 1.

	Дебют СД 1	5-7 мес.	10-14 мес.	<i>p</i>
НbA_{1с}, %	10,9 [10,3; 13,9]	7,0 [6,4; 8,2]	6,9 [6,3; 7,3]	<0,001
С-пептид, нг/мл	0,7 [0,5; 1,0]	0,8 [0,6; 1,2]	0,8 [0,6; 1,1]	0,57
Доза инсулина, Ед/кг/сут	0,52 [0,46; 0,59]	0,40 [0,21; 0,52]	0,43 [0,39; 0,49]	0,25
CD 4, %	40 [38; 43]	41 [36; 44]	41 [38; 45]	0,95
CD 8, %	30 [25; 34]	28 [27; 33]	28 [26; 32]	0,94
CD 16, %	14 [11; 16]	13 [9; 17]	14 [10; 16]	0,22
CD 20, %	13 [11; 16]	13 [12; 16]	13 [11; 14]	0,72
CD 95, %	27 [24; 33]	32 [31; 36]	33 [29; 40]	0,04
CD 95L, %	3,1 [1,2; 4,2]	2,6 [1,1; 2,8]	2,2 [0,7; 5,4]	0,81
sCD 95, пг/мл	120,3 [102; 226,8]	102 [50,4; 168,1]	98,3 [52,5; 104,6]	0,25

p дисперсионный анализ по Фридману

Как видно из таблицы 5 количество основных субпопуляций лимфоцитов (CD 4⁺, CD 8⁺, CD 16⁺, CD 20⁺) в периферической крови за время динамического наблюдения значительных изменений не претерпело.

Мы отметили изменение уровня экспрессии маркерных молекул апоптоза на лимфоцитах периферической крови в течение первого года заболевания (табл. 5). Количество лимфоидных клеток, экспрессирующих CD 95 на поверхности, значимо увеличилось (рис. 5), в то время как количество CD 95L⁺-лимфоцитов в течение периода наблюдения существенно не изменилось (*p*=0,81).

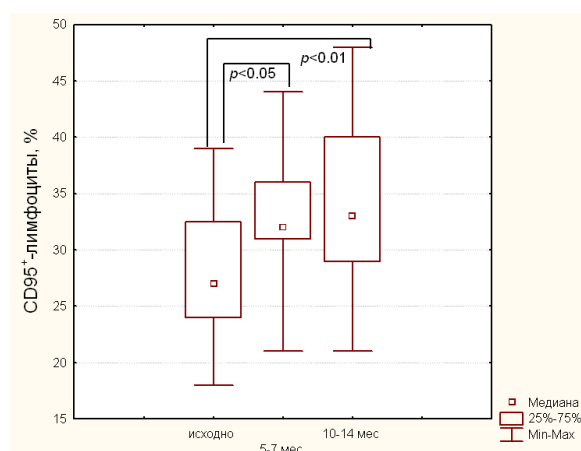


Рис. 5. Динамика изменения уровня экспрессии CD 95 на лимфоцитах у пациентов с СД 1 в течение года.

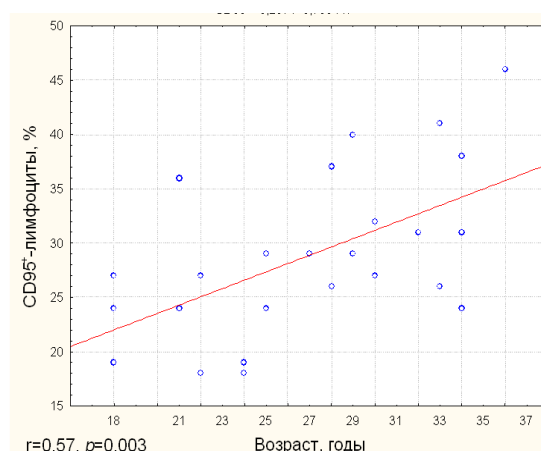


Рис. 6. Зависимость между возрастом и уровнем экспрессии CD 95 на лимфоцитах у пациентов с СД 1.

Корреляционный анализ выявил прямую зависимость между возрастом дебюта и уровнем экспрессии CD 95 на периферических лимфоцитах (рис. 6). Данная взаимосвязь может быть объяснена возрастными изменениями уровня экспрессии CD 95, описанными Н. Lechner и соавт. [Lechner Н., 1996]. При оценке динамических изменений растворимых маркёров апоптоза у пациентов с СД 1 отмечено незначительное снижение концентрации sCD 95 к концу первого года заболевания со 120,3 пг/мл до 98,3 пг/мл через 10-14 месяцев. У всех обследуемых пациентов данной группы на различных этапах наблюдения концентрация sCD 95L в сыворотке крови составила менее 0,16 пг/мл.

За время наблюдения у 13 (52%) человек (8 мужчин и 5 женщин) отмечена ремиссия заболевания (суточная потребность в экзогенном инсулине менее 0,4 Ед/кг; показатели гликемии в течение дня менее 10 ммоль/л; уровень HbA_{1c} менее 7,0%). В 10 (40%) случаях ремиссия была частичной и в 3 (12%) – полной. Пациенты с полной клинической ремиссией в дебюте заболевания имели отрицательные титры всех исследуемых аутоантител и несли “протективный” аллель *DQB1*0602-8*. Минимальный период от начала инсулинотерапии до момента развития ремиссии составил 2,5 месяца, максимальный – 5 месяца. Медиана суточной дозы экзогенного инсулина у пациентов с частичной клинической ремиссией составила 0,29 Ед/кг. Минимальная продолжительность периода ремиссии составила 4,5 месяца, максимальная – более 7 месяцев. На момент окончания периода наблюдения у 5 пациентов сохранялась ремиссия заболевания.

На момент ремиссии СД 1 отмечено статистически значимое повышение уровня экспрессии CD 95 на лимфоцитах и тенденция к снижению концентрации sCD 95 в сыворотке крови по сравнению с показателями в дебюте заболевания (табл. 6).

Таблица 6. Динамические изменения параметров у пациентов с ремиссией СД 1.

	Дебют СД 1	Период ремиссии	<i>p</i>
HbA_{1c}, %	10,1 [8,9; 11,2]	6,7 [6,2; 7,0]	0,01
С-пептид, нг/мл	0,7 [0,5; 1,0]	1,2 [0,8; 1,5]	0,02
CD 95, %	29 [26; 32]	34 [31; 39]	0,02
CD 95L, %	1,4 [0,7; 3,1]	2,6 [1,6; 5,4]	0,22
sCD 95, пг/мл	109,7 [87,2; 153,3]	83,5 [46,7; 102,0]	0,09

p по Вилкоксоу

Достоверных корреляционных связей между CD 95 и sCD 95 у пациентов с СД 1 мы не обнаружили ни на одном из этапов динамического наблюдения.

Мы провели логистический регрессионный анализ для оценки прогностического влияния маркёров апоптоза (CD 95, CD 95L, sCD 95), определённых в дебюте СД 1, на развитие ремиссии заболевания (табл. 7).

Таблица 7. Влияние маркёров апоптоза на развитие ремиссии СД 1.

Параметр	Относительный риск	<i>p</i>
CD 95	3,243	0,072
CD 95L	0,027	0,869
sCD 95	2,013	0,098

Как следует из таблицы 7, ни один из оцениваемых в нашем исследовании маркёров апоптоза не оказывает статистически значимого прогностического влияния на развитие ремиссии СД 1.

Таким образом, в течение первого года заболевания мы отметили увеличение количества CD 95⁺-лимфоцитов на фоне улучшения показателей углеводного обмена. В момент нахождения пациента в ремиссии заболевания наблюдались более высокие показатели экспрессии данного маркёра, чем в отсутствие таковой. Нормализация экспрессии CD 95 может свидетельствовать о восстановлении регуляторных процессов в отношении клеток иммунной системы, что возможно, способствует снижению количества аутоиммунных лимфоцитов.

Концентрация различных цитокинов в течение периода наблюдения уменьшилась на фоне снижения показателей гликемии. Достоверных различий профиля цитокинов у пациентов с СД 1 мы не обнаружили.

Динамические изменения исследуемых показателей у пациентов с LADA в течение периода наблюдения

13 пациентов с LADA, включённых в исследование, были обследованы в динамике через 9–13 месяцев. У 6 пациентов с первичным диагнозом LADA компенсация углеводного обмена была достигнута на фоне соблюдения диеты и приёма метформина в суточной дозе 1,7–2 г. Остальным 7 больным в дебюте СД была назначена инсулинотерапия по интенсивной схеме, которая после компенсации углеводного обмена была отменена у 4 человек. В 3 случаях инсулинотерапия продолжалась после окончания участия в исследовании. За период наблюдения уровень HbA_{1c} значительно снизился с 10,9% до 6,6% ($p < 0,01$). Базальная концентрация С-

пептида в сыворотке крови у всех пациентов оставалась в пределах референсных значений на протяжении всего периода наблюдения (табл. 8).

Таблица 8. Результаты динамического обследования у пациентов с LADA.

	Дебют LADA	9-13 мес.	<i>p</i>
HbA_{1c}, %	10,9 [9,1; 13,0]	6,6 [6,0; 7,1]	<0,01
C-пептид, нг/мл	2,1 [1,6; 3,6]	2,5 [1,5; 2,9]	0,96
CD 4, %	41 [37; 46]	39 [37; 42]	0,46
CD 8, %	27 [25; 30]	26 [23; 33]	0,94
CD 20, %	15 [12; 17]	15 [12; 16]	0,95
CD 95, %	31 [25; 36]	36 [29; 43]	0,13
CD 95L, %	1,7 [1,0; 3,6]	2,4 [1,4; 3,5]	0,84
sCD 95, пг/мл	92,7 [65,1; 219,5]	81,7 [54,1; 102,0]	0,14

p по Вилкоксоу

Как было показано выше, в дебюте заболевания у пациентов данной группы наиболее часто выявлялись положительные титры GADA и ICA. За время наблюдения мы не отметили существенных изменений в титрах исследуемых аутоантител. На момент окончания периода наблюдения у 4 человек титры всех четырёх аутоантител стали отрицательными.

Значимых различий в показателях иммунограммы при обследовании пациентов данной группы в динамике мы не получили (табл. 8). В отличие от пациентов с СД 1 при сравнительном анализе уровня экспрессии маркёрных молекул апоптоза на лимфоцитах в данной группе мы не отметили статистически значимых различий ни одного из показателей в течение периода наблюдения. Корреляционных связей между маркёрами апоптоза у пациентов с LADA мы также не выявили.

Значимых различий в концентрации цитокинов в сыворотке крови у пациентов с LADA в течение периода наблюдения мы не обнаружили.

Выводы

1. Гетерогенность клинической картины аутоиммунного сахарного диабета характеризуется иммунологической и генетической неоднородностью. В дебюте заболевания при “классическом” сахарном диабете 1 типа было выявлено увеличение количества цитотоксических CD8⁺-лимфоцитов и общего числа активированных лимфоцитов, преобладание HLA-гаплотипов высокого риска развития сахарного диабета (*DR 3-DQ 2, DR 4-DQ 8, DR 1-DQ 01*), особенно их комбинации (44,4%). При медленно прогрессирующем аутоиммунном диабете взрослых определялось нормальное количество активированных лимфоцитов, комбинации HLA-гаплотипов

высокого риска развития сахарного диабета с “протективными” (26,5%) или с “нейтральными” (23,5%).

2. В дебюте заболевания частота встречаемости и титры GADA были выше у пациентов с медленно прогрессирующим аутоиммунным диабетом взрослых (70,6%), чем у пациентов с сахарным диабетом 1 типа (44,4%). Комбинации аутоантител к компонентам β -клетки и инсулину также чаще выявлялись у лиц с медленно прогрессирующим аутоиммунным диабетом взрослых (38,2%), чем у пациентов с сахарным диабетом 1 типа (28,6%).

3. В дебюте аутоиммунного сахарного диабета отмечено снижение экспрессии ключевого маркера апоптоза (CD 95) на периферических лимфоцитах по сравнению со здоровыми лицами, что может быть косвенным признаком нарушения элиминации аутореактивных клеток, пролонгирующих иммунный ответ. Более выраженное снижение наблюдалось у пациентов с сахарным диабетом 1 типа по сравнению с больными LADA.

4. При динамическом обследовании наблюдалась нормализация количества CD 95⁺-лимфоцитов у пациентов с сахарным диабетом 1 типа и у больных с медленно прогрессирующим аутоиммунным диабетом взрослых на фоне компенсации углеводного обмена. Это может свидетельствовать о частичном восстановлении регуляторных иммунных механизмов в первые месяцы заболевания.

5. Установлено увеличение лиганда основного маркера апоптоза (CD 95L) на лимфоцитах при сахарном диабете 1 типа в дебюте заболевания по сравнению с медленно прогрессирующим аутоиммунным сахарным диабетом взрослых и здоровыми лицами. Повышенное количество CD 95L⁺-лимфоцитов у пациентов с сахарным диабетом 1 типа сохранялось в течение первого года заболевания, независимо от степени компенсации.

6. Фаза ремиссии характеризовалась нормализацией базальной концентрации С-пептида в крови, снижением титров аутоантител к компонентам β -клетки, повышением уровня экспрессии CD 95 и снижением CD 95L на лимфоцитах. Полная клиническая ремиссия наблюдалась только у пациентов, несущих протективный HLA аллель *DQB1*0602-8*.

7. Различий в концентрации цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α , TNF- β , IFN- γ) в сыворотке крови у больных с сахарным диабетом 1 типа по сравнению с пациентами с LADA при первичном и динамическом

обследовании не выявлено. И у больных сахарным диабетом 1 типа, и у больных медленно прогрессирующим аутоиммунным диабетом взрослых комбинации цитокинов наблюдались у лиц, несущих хотя бы один HLA-гаплотип высокого риска развития сахарного диабета 1 типа. Комбинации цитокинов (IL-1 β , IL-4, IL-5, TNF- α , IFN- γ) выявлены у 4 пациентов с сахарным диабетом 1 типа и у 3 с LADA, при динамическом наблюдении за ними существенных изменений концентрации этих цитокинов в сыворотке крови отмечено не было.

Практические рекомендации

1. Для верификации диагноза аутоиммунного сахарного диабета и у лиц старше 30 лет необходимо проведение комплексного обследования, включающего обязательную оценку иммунологических показателей (наличие аутоантител к компонентам β -клетки и инсулину).
2. Оценка уровня сывороточных маркёров активации и апоптоза иммунных клеток может быть использована в качестве дополнительного диагностического критерия в дифференциальной диагностике сахарного диабета 1 типа и медленно прогрессирующего аутоиммунного диабета взрослых.
3. Для выбора адекватной сахароснижающей терапии у лиц с медленно прогрессирующим аутоиммунным диабетом взрослых необходимо изучение функциональной активности β -клеток с использованием нагрузочных тестов.
4. Поскольку существенных и достоверных отличий в показателях иммунного статуса у пациентов с различными подтипами аутоиммунного сахарного диабета не выявлено, проведение данного исследования в дебюте заболевания следует считать нецелесообразным.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Никонова Т.В. Апоптоз при сахарном диабете 2 типа / Т.В. Никонова, С.А. Прокофьев, В.А. Горельшева, **Е.В. Пекарева**, О.М. Смирнова // IV Всероссийский диабетологический конгресс. Тезисы докладов. – М., 2008. – С. 13.
2. Никонова Т.В. Возможности клеточных технологий в лечении сахарного диабета / Т.В. Никонова, **Е.В. Пекарева**, Ю.И. Филиппов // Сахарный диабет. – 2008. – № 4. – С. 93-95.
3. Никонова Т. Строгий метаболический контроль – ключевой фактор развития ремиссии при сахарном диабете типа 1 / Т. Никонова, **Е. Пекарева** // Врач. – 2009. –

№ 11. – С. 30-32.

4. Пекарева Е.В. Маркёры 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 // Сахарный диабет. – 2009. – № 4. – С. 86-89.
5. Pekareva E.V. CD 95 and CD 95L expression in patients with onset autoimmune diabetes mellitus / **E.V. Pekareva**, T.V. Nikonova, V.A. Gorelysheva, S.A. Prokofyev, O.M. Smirnova // 9th Regional medical conference on the treatment of type 2 diabetes mellitus. Conference materials. – Berlin, 2009. – P. 33.
6. Пекарева Е.В. Роль апоптоза в патогенезе сахарного диабета 1 типа / **Е.В. Пекарева**, Т.В. Никонова, О.М. Смирнова // Сахарный диабет. – 2010. – № 1. – С. 45-49.
7. Харлашина Е.А. Дебют сахарного диабета 1 типа на фоне инфекционного мононуклеоза / Е.А. Харлашина, О.С. Шаповальянц, **Е.В. Пекарева**, Т.В. Никонова // Сахарный диабет. – 2010. - № 1. – С. 126-128.
8. Никонова Т. Роль вирусной инфекции в патогенезе сахарного диабета / Т. Никонова, О. Шаповальянц, **Е. Пекарева** // Врач. – 2010. – № 2. – С. 35-37.
9. Nikonova T. Role of regulatory T-cells in the development of the partial remission period in patients with type 1 diabetes / T. Nikonova, V. Gorelysheva, S. Prokofiev, **E. Pekareva**, I. Dedov // 12th European Congress of Endocrinology. Endocrine Abstract. – 2010. – Vol. 22. – P. 341.
10. Пекарева Е.В. Динамика показателей иммунного статуса у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 1 типа / **Е.В. Пекарева**, Т.В. Никонова, В.А. Горелышева, С.А. Прокофьев, С.М. Степанова, О.М. Смирнова // V Всероссийский диабетологический конгресс. Сборник тезисов. – М., 2010. – С. 83.
11. Пекарева Е. Медленнопрогрессирующий аутоиммунный сахарный диабет взрослых / **Е. Пекарева**, Т. Никонова // Врач. – 2010. – № 5. – С. 5-7.
12. Nikonova T.V. The role of regulatory CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes and FoxP3 expression in evolution and progression of type 1 diabetes / T.V. Nikonova, **E.V. Pekareva**, V.A. Gorelysheva, P.V. Apanovich, S.A. Prokofyev, I.I. Dedov // Diabetologia. – 2010. – Vol. 53 (Suppl 1). – P. S181-S182.
13. Pekareva E.V. Dynamic changes of CD 95 and CD 95L expression on lymphocytes in patients with new-onset type 1 diabetes mellitus / **E.V. Pekareva**, T.V. Nikonova, V.A. Gorelysheva, S.M. Stepanova, S.A. Prokofyev, O.M. Smirnova, I.I. Dedov // Diabetologia. – 2010. – Vol. 53 (Suppl 1). – P. S183.
14. Никонова Т.В. Роль регуляторных CD4⁺CD25^{high} Т-лимфоцитов и их

функциональной активности в развитии и прогрессировании сахарного диабета 1 типа / Т.В. Никонова, П.В. Апанович, **Е.В. Пекарева**, В.А. Горельшева, С.А. Прокофьев, А.В. Карпухин, И.И. Дедов // Сахарный диабет. – 2010. – № 3. – С. 25-29.

15. Никонова Т. Перспективы клеточных технологий в лечении сахарного диабета / Т. Никонова, **Е. Пекарева**, Ю. Филиппов // Врач. – 2010. – № 12 (принято в печать).

Список сокращений, использованных в работе

ПССП – пероральные сахароснижающие препараты

СД – сахарный диабет

IAA – аутоантитела к инсулину (insulin autoantibodies)

GADA – аутоантитела к глутаматдекарбоксилазе (autoantibodies to glutamic acid decarboxylase)

ICA – антитела к цитоплазматическим компонентам β -клетки (islet cell antibodies)

IA-2A – аутоантитела к тирозинфосфатаза-подобному белку (protein tyrosine phosphatase-like islet antigen 2)

IL – интерлейкин

LADA – медленно прогрессирующий аутоиммунный диабет взрослых (latent autoimmune diabetes in adult)