

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ЭНДОКРИНОЛОГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.И. ДЕДОВА» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Голодников Иван Иванович

**Гетерогенность аутоиммунного сахарного диабета: концепция эндотипов и
потенциальные мишени для иммунологического воздействия**

3.1.19 Эндокринология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель: доктор медицинских наук

Шестакова Марина Владимировна

Москва 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

<i>ВВЕДЕНИЕ</i>	5
Актуальность темы исследования.....	5
Цель исследования	7
Задачи исследования	7
Научная новизна	7
Практическая значимость	8
Личный вклад автора.....	8
Основные положения, выносимые на защиту	8
<i>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</i>	10
1.1 Клиническое течение (фенотип) СД1 и LADA.....	10
1.2 Диагностика	12
1.3 Лечение аутоиммунного СД	13
1.4 Эндотипы СД	15
1.5 Генетические и иммунологические аспекты аутоиммунного СД.....	20
1.6 Секвенирование РНК одиночных клеток	30
<i>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</i>	36
2.1 Материалы исследования.....	36
2.1.1 Дизайн исследования	36
2.1.2 Условия проведения	36
2.1.3 Критерии соответствия	36
2.1.4 Распределение участников по группам	37
2.2 Методы исследования	38
2.2.1 Критерии постановки диагноза.....	38
2.2.2 Клинические данные	38
2.2.3 Лабораторные данные	38
2.2.4 Секвенирование РНК одиночных клеток (scRNAseq)	40

2.2.5 Биоинформатический анализ данных	47
2.2.6 Статистический анализ	61
2.2.7 Этическая экспертиза	62
<i>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</i>	63
3.1 Клиническая характеристика пациентов и здоровых добровольцев	63
3.2 Показатели углеводного обмена	65
3.3 Аутоантитела к β -клеткам	66
3.4 Терапия	68
3.5 Контроль качества исходных данных	69
3.6 Сравнительный анализ методов интеграции данных и аннотация клеточных популяций	71
3.7 Композиционный анализ на первом уровне клеточной аннотации	75
3.8 Композиционный анализ на втором уровне клеточной аннотации	77
3.9 Псевдобалковый дифференциальный анализ экспрессии генов в сравнении LADA со здоровыми добровольцами	80
3.10 Псевдобалковый дифференциальный анализ экспрессии генов в сравнении LADA и СД1	84
3.11 Специфические сигнальные изменения в иммунных клетках при LADA в сравнении со здоровыми добровольцами	85
3.12 Специфические сигнальные изменения в иммунных клетках при СД1 по сравнению со здоровыми добровольцами	90
3.13 Сравнение LADA и СД1: принципиальные отличия в регуляции аутоиммунного процесса через JAK-STAT и TRAIL	93
3.14 Сигнальные особенности эффекторных CD4 ⁺ Т-клеток при LADA и СД1	95
3.15 Сигнальные особенности эффекторных CD8 ⁺ Т-клеток при LADA и СД1	99
3.16 Изменения в антиген-презентирующих путях CD8 ⁺ эффекторных Т-клеток при LADA	101
3.17 Моноцит-хемоаттрактантный белок-1 при аутоиммунном СД	103
3.18 Эндотипы сахарного диабета	105

3.19 Ограничения исследования	108
3.20 Направления дальнейших исследований	108
<i>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</i>	<i>110</i>
<i>ВЫВОДЫ</i>	<i>112</i>
<i>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</i>	<i>114</i>
<i>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</i>	<i>117</i>

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Сахарный диабет (СД) представляет собой гетерогенную группу метаболических заболеваний, характеризующихся хронической гипергликемией, обусловленной дефектами секреции инсулина, действия инсулина или сочетанием этих факторов. По данным Международной федерации диабета, в 2024 году число пациентов с СД в мире достигло 589 миллионов человек. Прогнозируется дальнейший рост количества пациентов [1]. Увеличение распространённости СД сопровождается серьёзным социально-экономическим бременем, связанным с высоким риском сердечно-сосудистых осложнений, а также поражением почек, глаз и нервной системы.

Традиционно выделяют два основных типа СД: сахарный диабет 1 типа (СД1), связанный с аутоиммунным разрушением β -клеток поджелудочной железы и абсолютным дефицитом инсулина, и сахарный диабет 2 типа (СД2), характеризующийся инсулинорезистентностью и относительным дефицитом инсулина. Однако клиническая практика показывает, что данная классификация не всегда отражает всю сложность и гетерогенность заболевания. Например, наблюдаются случаи, когда пациенты с характерными для СД2 признаками ожирения и метаболического синдрома одновременно демонстрируют наличие аутоантител и прогрессирующую потерю функциональной активности β -клеток, что свойственно СД1.

Особое место в структуре СД занимает латентный аутоиммунный диабет взрослых (LADA — Latent Autoimmune Diabetes in Adults), который сочетает в себе характеристики как СД1, так и СД2. Пациенты с LADA имеют аутоантитела к β -клеткам, аналогичные тем, что наблюдаются при СД1, но при этом заболевание нередко протекает с более медленным снижением секреции инсулина и способностью длительно поддерживать контроль гликемии без инсулинотерапии [2]. Такая клиническая картина затрудняет дифференциальную диагностику, а также определение оптимальной тактики лечения. В тот же момент, для LADA характерно наличие терапевтического окна для вмешательства: на момент диагностики у пациентов сохраняется остаточная функция β -клеток, что открывает возможности для раннего применения иммуномодулирующих стратегий и замедления прогрессирования заболевания.

LADA представляет особый научный интерес, предлагая уникальную модель изучения патогенеза СД, поскольку сочетает аутоиммунные механизмы разрушения β -клеток и характерные для СД2 метаболические нарушения. Подобная двойственность течения создаёт предпосылки для более глубокого понимания природы гетерогенности СД. Гетерогенность СД выходит далеко за рамки привычного деления на формы:

инсулинзависимую и инсулиннезависимую. Изучение аутоиммунного воспаления, затрагивающего β -клетки, и факторов, способствующих сохранению или утрате их функциональной активности, может помочь выявить потенциальные мишени для терапевтического вмешательства не только при LADA, но и при других формах СД.

Современные методы молекулярной биологии предоставляют широкие возможности для исследования клеточных и молекулярных механизмов заболевания. Одним из таких методов является секвенирование РНК (рибонуклеиновая кислота) одиночных клеток (scRNAseq, single-cell RNA (ribonucleic acid) sequencing), позволяющее изучать транскриптом отдельных клеток, определять гетерогенность клеточных популяций, функциональные состояния клеток и активность сигнальных путей [3]. Преимущество scRNAseq заключается в способности детально охарактеризовать различные субпопуляции как иммунных, так и эндокринных клеток, что имеет ключевое значение при изучении сложных аутоиммунных и метаболических процессов.

Применение scRNAseq в исследовании LADA актуально с нескольких точек зрения. Во-первых, этот метод даёт возможность одновременно оценить состояние β -клеток и степень их повреждения при исследовании ткани панкреатических островков. Во-вторых, благодаря scRNAseq можно установить характерные паттерны активации или регуляции иммунных клеток (Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток, моноцитов и др.) при LADA, которые могут существенно отличаться от соответствующих изменений при СД1 и СД2. Наконец, систематическое сравнение транскриптомного профиля у пациентов с различными типами СД и здоровых добровольцев позволяет выявить специфические гены-маркеры, а также оценить, какие сигнальные пути играют критическую роль в «медленном» аутоиммунном процессе, характерном для LADA [4].

Таким образом, исследование LADA с использованием scRNAseq представляет собой перспективное направление, позволяющее выявить конкретные механизмы развития аутоиммунного СД и иммунной регуляции в патогенезе СД, а также помочь в разработке новых подходов к профилактике и лечению. В условиях неуклонного роста заболеваемости СД и высокого риска осложнений у этих пациентов поиск более эффективных методов диагностики и терапии становится особенно важным. Следовательно, комплексное исследование, основанное на анализе отдельных клеток, может стать основой для более точной стратификации пациентов и разработки персонализированных схем лечения.

Цель исследования

Усовершенствовать концепцию эндотипов у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом и предложить возможные патогенетически обоснованные мишени для иммунологического воздействия.

Задачи исследования

1. Выявить различия эндотипов аутоиммунного сахарного диабета на основе данных секвенирования РНК одиночных клеток (scRNAseq) и проанализировать вклад выявленных транскрипционных факторов в гетерогенность клинического течения заболевания.
2. Определить на основе транскриптного профиля периферических мононуклеаров крови соотношение различных субпопуляций иммунных клеток у пациентов с СД1, LADA, СД2 и здоровых добровольцев.
3. Выявить дифференциально экспрессируемые гены у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом по сравнению со здоровыми добровольцами и оценить их возможную роль в патогенезе.
4. Определить ключевые сигнальные пути, вовлечённые в аутоиммунную деструкцию β -клеток при СД1 и LADA, на основе данных транскриптного профиля периферических мононуклеаров крови, как потенциальные мишени для иммунологического воздействия.
5. Оценить уровень моноцит-хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1) у пациентов с СД1, LADA, СД2 и здоровых добровольцев и сопоставить его с клиническими показателями для выявления диагностической и прогностической значимости.

Научная новизна

Впервые в России проведён комплексный анализ аутоиммунного сахарного диабета с использованием метода секвенирования РНК одиночных клеток и одновременной оценки уровня MCP-1. Полученные результаты позволили выявить специфические сигнальные пути (JAK-STAT, TRAIL) и транскрипционные факторы (*FOXO1/FOXO3*, *RFX-комплекс*, *E2F1*, *MYC*, *HIF1A*, *STAT1/3*, *IRF1/3*), имеющие различную степень активации при LADA и СД1. Впервые установлены взаимосвязи между характером экспрессии ключевых генов иммунных клеток и активностью сигнальных путей с клиническими особенностями течения аутоиммунного СД. На основе выявленных различий установлены новые потенциальные мишени для иммунокоррекции (сигнальные пути JAK-STAT, TRAIL) у пациентов с LADA, что в перспективе открывает возможности для более

персонализированного подхода к лечению пациентов с различными формами аутоиммунного сахарного диабета.

Практическая значимость

Результаты данного исследования создают предпосылки для разработки новых таргетных препаратов и иммуномодулирующих стратегий, направленных на сохранение функциональной активности β -клеток при аутоиммунном сахарном диабете. Выявленные ключевые сигнальные пути (JAK-STAT, TRAIL) и транскрипционные факторы (*FOXO1/FOXO3*, *RFX-комплекс*, *E2F1*, *MYC*, *HIF1A*, *STAT1/3*, *IRF1/3*) могут служить перспективными мишенями для создания молекул, избирательно регулирующих избыточный или недостаточный иммунный ответ.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно формировал базу данных и организовывал включение пациентов: проводил поиск и отбор участников с разными формами СД1, СД2, LADA и здоровых добровольцев, разъяснял цели исследования, собирал анамнез, оформлял информированные согласия.

Автор лично выполнял выделение периферических мононуклеаров крови всех образцов, отвечал за пробоподготовку (центрифугирование, отмывка) и контролировал качество клеток. Все манипуляции по криоконсервации образцов также проводил самостоятельно.

Автор участвовал во всех этапах секвенирования РНК одиночных клеток — от разморозки и приготовления клеток до финальной сборки библиотек и секвенирования, включая оптимизацию методики и взаимодействие со специалистами по оборудованию. На этапе биоинформатического анализа принимал участие в фильтрации данных, аннотации клеточных кластеров, устранении технических артефактов, а также в интерпретации результатов (включая идентификацию сигнальных путей и анализ транскриптомного профиля), что послужило основой для итоговых выводов работы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Отличия в профилях экспрессии генов и активации сигнальных путей при аутоиммунном диабете, включая LADA и СД1, присутствуют в периферических мононуклеарах крови в системном кровотоке, если рассматривать их на уровне отдельных клеток. Эти различия присутствуют в ключевых субпопуляциях иммунных клеток — Т-клетках, В-клетках и НК-клетках.
2. У пациентов с LADA преимущественно активирован сигнальный каскад TRAIL на фоне сравнительно низкого уровня JAK-STAT, тогда как при СД1 доминирует

гиперактивация JAK-STAT на фоне сниженной активности TRAIL, что определяет разную степень активности аутоиммунной реакции.

3. У GAD-положительных пациентов (LADA и СД1) в популяциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток выявлена комплексная гиперактивация транскрипционных факторов (*FOXO1/FOXO3*, *RFX-комплекс*, *E2F1*, *MYC*, *HIF1A*), усиливающих антиген-презентацию, а также выживание и дифференцировку эффекторных Т-клеток. Это подтверждает выраженный аутоиммунный характер заболевания и объясняет гетерогенность его течения — от агрессивного СД1 до более «мягкого» LADA — без существенных сдвигов в пропорциях основных клеточных субпопуляций.

Внедрение результатов работы и апробация результатов

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 11 марта 2025 года на расширенной межкафедральной научной конференции ГНЦ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России.

Результаты работы представлены на 26th European Congress of Endocrinology 11-14 мая 2024 г., Стокгольм, Швеция; IV Конференции по диагностике и лечению сахарного диабета «Фундаментальная и клиническая диабетология в 21 веке: от теории к практике», 22–24 мая 2024 г., Россия; Всероссийской научной школе «Медицина молодая» / Международный фонд развития биомедицинских технологий им. В. П. Филатова, Москва, декабрь 2023г.; X (XXIX) Национальном конгрессе эндокринологов с международным участием «Персонализированная медицина и практическое здравоохранение», 23-26 мая 2023 г.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-15-2024-645 от 12 июля 2024 г.).

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 4 печатные работ, в том числе 2 в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки России, опубликованные за рубежом тезисы — 1 и опубликованные в сборниках Российских конференций тезисы — 1.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста; состоит из введения, трех глав, выводов и практических рекомендаций, иллюстрирована 28 рисунками и 7 таблицами. Библиография состоит из 242 наименований: 24 отечественных работы и 218 работ зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Клиническое течение (фенотип) СД1 и LADA

СД1 и LADA объединены общим аутоиммунным механизмом повреждения β -клеток поджелудочной железы, однако их клинические проявления и скорость прогрессирования имеют значительные отличия.

В 2022 году Международное общество по диабету у детей и подростков (ISPAD, International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes) представило концепцию стадийности развития СД1, выделив четыре основных стадии [5], в декабре 2024г. данная концепция была обновлена и разделена дополнительно на несколько стадий [6]:

Стадия 1:

Множественные аутоантитела к островковым клеткам (подтверждены ≥ 2 анализами), нормогликемия, отсутствие симптомов (прогрессирование до Стадии 3: $\sim 44\%$ за 5 лет, 80–90% за 15 лет).

Стадия 2:

Множественные аутоантитела и нарушения углеводного обмена:

- Глюкоза натощак повышена,
- Нарушенная толерантность к глюкозе (ПГТТ),
- HbA1c 5,7–6,5% или прирост $\geq 10\%$.

Подстадии:

- **2a:** минимальные нарушения,
- **2b:** значения близки к стадии 3.

(прогрессирование до стадии 3: $\sim 75\%$ за 5 лет)

Стадия 3:

Гипергликемия, соответствующая диагностическим критериям СД:

- **3a:** бессимптомное течение,
- **3b:** классические симптомы (полиурия, полидипсия, потеря веса).

Стадия 4:

Длительно текущий СД с возможными осложнениями и прогрессирующей недостаточностью β -клеток.

Альтернативный подход к стадийности был представлен в исследовании Yin W. и соавторов в 2022 году. В нём описана модель, включающая шесть этапов развития аутоиммунного СД, начиная с генетической предрасположенности и воздействия внешних триггеров на ранних стадиях (рисунок 1) [7].

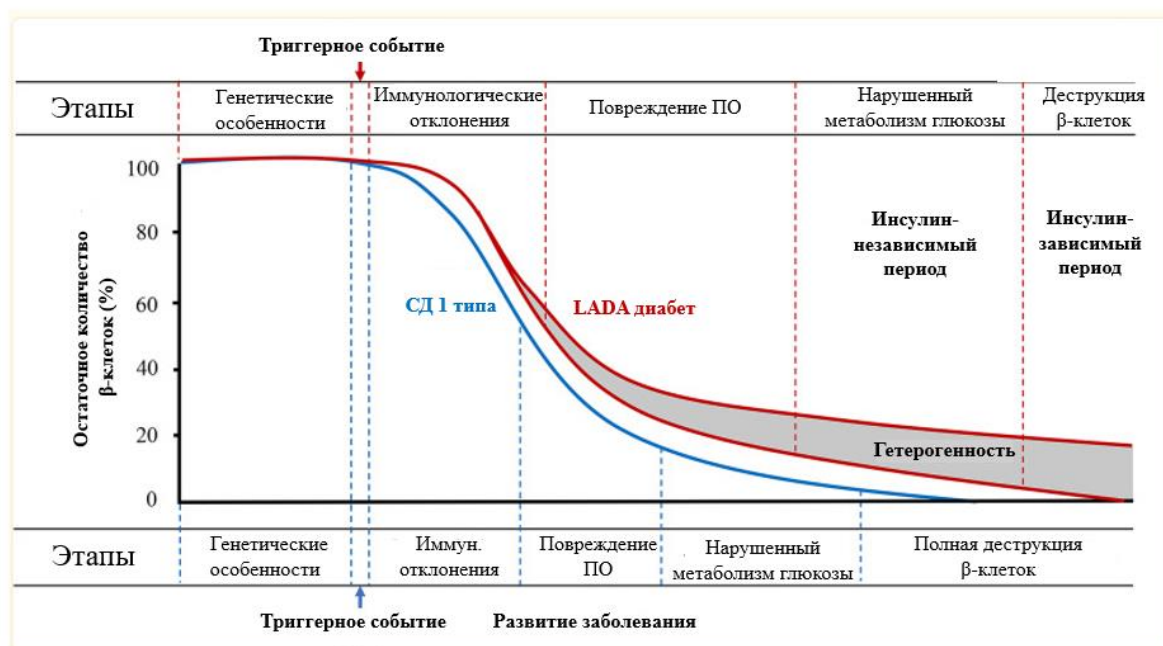


Рисунок 1 – Фазы развития аутоиммунного сахарного диабета. ПО – панкреатические островки, адаптировано по [7].

На этапе нарушенного метаболизма глюкозы сохраняется остаточная функция β-клеток: уровень С-пептида находится в пределах нижней границы нормы, и пациенты могут эффективно реагировать на пероральные сахароснижающие препараты. В отличие от СД1, который характеризуется быстрым и агрессивным течением с быстрым развитием абсолютного дефицита инсулина, LADA прогрессирует медленнее. У пациентов с LADA имеется период, в течение которого они могут обходиться без инсулинотерапии минимум шесть месяцев после установления диагноза [8].

У некоторых пациентов с LADA и низким уровнем аутоантител к глутаматдекарбоксилазе (GAD, Glutamic Acid Decarboxylase) снижение функции β-клеток происходит с той же скоростью, что и у пациентов с СД2 [9]. В случаях высокого титра аутоантител наблюдается более быстрое ухудшение функции β-клеток, что требует раннего назначения инсулинотерапии. Эти наблюдения подчёркивают гетерогенность клинического течения LADA и необходимость индивидуального подхода к лечению [10].

Таким образом, понимание особенностей клинического и патофизиологического течения СД1 и LADA имеет важное значение для своевременной диагностики, прогнозирования течения заболевания и выбора оптимальной тактики терапии. LADA, объединяя черты СД1 и СД2, представляет особый интерес как уникальная модель для изучения аутоиммунных процессов и механизмов сохранения функциональной активности β-клеток.

1.2 Диагностика

Диагностика СД1 основывается на сочетании клинических симптомов и лабораторных данных. Основные клинические признаки включают полиурию (частое мочеиспускание), полидипсию (усиленная жажда) и полифагию (повышенный аппетит). У пациентов также могут наблюдаться симптомы кетоацидоза: тошнота, рвота, боли в животе и запах ацетона изо рта.

Лабораторная диагностика включает определение уровня глюкозы в крови натощак и после нагрузочного теста. Диагноз подтверждается при наличии одного из следующих критериев:

- Уровень глюкозы натощак $\geq 7,0$ ммоль/л,
- Уровень глюкозы через 2 часа после перорального глюкозотолерантного теста $\geq 11,1$ ммоль/л,
- Случайный уровень глюкозы в крови $\geq 11,1$ ммоль/л при наличии симптомов гипергликемии.

Дополнительно проводится определение уровня гликированного гемоглобина (HbA1c) $\geq 6,5\%$. Для подтверждения аутоиммунной природы заболевания исследуют наличие специфических аутоантител к β -клеткам поджелудочной железы, таких как:

- Антитела к глутаматдекарбоксилазе (GAD),
- Антитела к островковым клеткам (ICA, Islet Cell Antibodies),
- Антитела к тирозинфосфатазе (IA-2, Insulinoma-Associated Protein 2 Antibodies),
- Инсулиновые аутоантитела (IAA, Insulin Autoantibodies),
- Антитела к транспортёру цинка (ZnT8, Zinc Transporter 8 Autoantibodies).

Определение уровня С-пептида помогает оценить остаточную функцию β -клеток. Ранняя и точная диагностика СД1 необходима для своевременного начала инсулинотерапии и предотвращения острых и хронических осложнений [11].

В настоящее время отсутствуют официально утверждённые диагностические критерии для LADA – как в России, так и в мире, включая рекомендации таких организаций, как Российская ассоциация эндокринологов, Американская диабетическая ассоциация или Европейская ассоциация по изучению диабета.

Наиболее признанными диагностическими критериями LADA сегодня являются рекомендации Общества иммунологии диабета (Immunology of Diabetes Society, IDS) [12]. Согласно этим рекомендациям, для установления диагноза LADA необходимо соответствие следующим трём критериям, представленным в таблице 1:

Таблица 1 – Диагностические критерии LADA.

1. Возраст старше 35 лет
2. Повышенный титр антител к β -клеткам
3. Отсутствие потребности в инсулинотерапии в течение не менее первых 6 месяцев после первоначального диагноза

Однако критерии IDS имеют существенный недостаток: необходимость проведения дорогостоящих лабораторных исследований для определения антител к β -клеткам. Это приводит к значительным финансовым затратам при дифференциальной диагностике LADA и СД2, что связано с необходимостью массового скрининга на наличие антител у всех пациентов с СД2 ввиду отсутствия других специфических маркеров.

1.3 Лечение аутоиммунного СД

Основным методом лечения СД1 является инсулинотерапия, направленная на замену отсутствующего инсулина в организме. Наиболее эффективным методом лечения является базисно-болюсный режим инсулинотерапии, имитирующий физиологическую секрецию инсулина: базальный инсулин длительного действия (например, инсулин гларгин, детемир или деглудек) вводится 1–2 раза в сутки для поддержания постоянного уровня инсулина между приемами пищи и во время сна, подавляя базальную продукцию глюкозы печенью; болюсный инсулин ультракороткого действия (например, инсулин аспарт, лизпро или глулизин) вводится перед каждым приемом пищи для контроля повышения уровня глюкозы после еды, обеспечивая возможность гибкой коррекции дозы в зависимости от количества потребляемых углеводов, уровня физической активности и текущего уровня гликемии [11].

В 2020 году был опубликован «Консенсус по ведению LADA у взрослых» [13], в котором предложена градация выбора стартовой терапии на основе уровня С-пептида:

1. **Уровень С-пептида менее 0,3 нмоль/л:** рекомендуется назначение инсулинотерапии (базальный и/или болюсный инсулин).
2. **Уровень С-пептида более 0,7 нмоль/л:** лечение проводится в соответствии с действующими алгоритмами терапии СД2.
3. **Уровень С-пептида от 0,3 до 0,7 нмоль/л:** это «серая зона», где ведение пациента определяется индивидуально (рисунок 2).

Такая схема терапии учитывает фенотипическое сходство пациентов с LADA и СД2. У них могут присутствовать компоненты метаболического синдрома, схожие уровни сердечно-сосудистых рисков, хроническая болезнь почек и сердечная недостаточность.

Таким образом, при дебюте LADA и уровне С-пептида выше 0,3 нмоль/л врач имеет возможность использовать весь спектр сахароснижающих препаратов. Важно лишь учитывать конкретные точки приложения каждого препарата (рисунок 2).

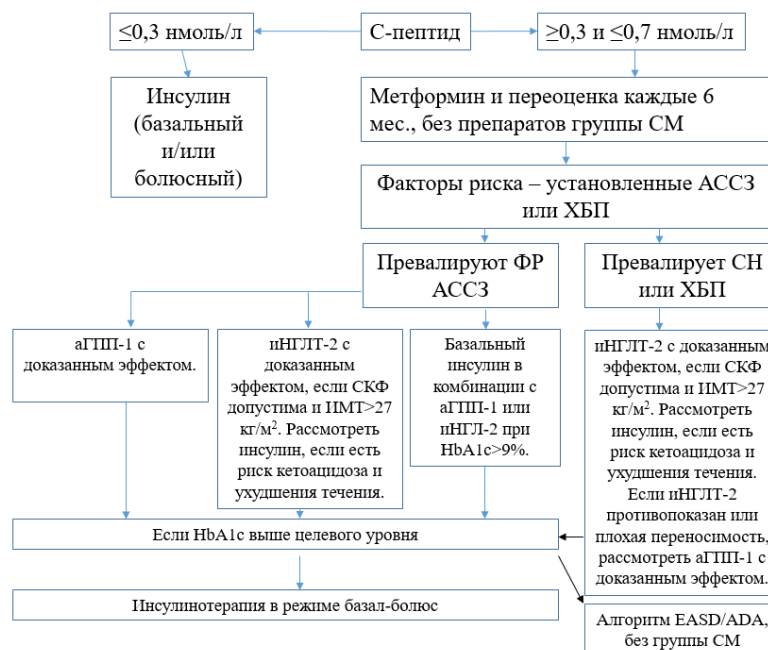


Рисунок 2 – Алгоритм ведения пациентов с LADA. АССЗ – атеросклеротические сердечно-сосудистые заболевания, аГПП-1 – агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида-1, иНГЛТ-2 – ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2 типа, ИМТ – индекс массы тела, СН – сердечная недостаточность, СМ – сульфонилмочевина, СКФ – скорость клубочковой фильтрации, ФР – факторы риска, ADA – American Diabetes Association, EASD – European Association for the Study of Diabetes, адаптировано по [13].

Эффективность сахароснижающей терапии при СД2 во многом зависит от сохранения эндогенной секреции инсулина. В случае развития аутоиммунного СД крайне важно продлить функциональную активность β -клеток поджелудочной железы. Это способствует снижению потребности в сахароснижающих препаратах и уменьшению вариабельности гликемии, что в конечном итоге положительно влияет на сердечно-сосудистые риски и общее качество жизни пациента. По мере прогрессирования аутоиммунного процесса LADA может трансформироваться в СД1, что обуславливает необходимость перехода на инсулинотерапию. У пациентов с LADA рекомендуется ограничивать или избегать применения препаратов группы сульфонилмочевины (СМ), ввиду их потенциального негативного влияния на остаточную функцию β -клеток поджелудочной железы, ускоряющего их истощение за счет чрезмерной стимуляции секреции инсулина. Кроме того, препараты СМ характеризуются высоким риском

гипогликемических состояний, особенно на фоне снижающейся эндогенной секреции инсулина, что может значительно ухудшать качество жизни пациентов и увеличивать риски осложнений.

1.4 Эндотипы СД

Понятие эндотип

СД — это сложное и неоднородное заболевание, объединяющее разнообразные патогенетические механизмы и клинические фенотипы. Традиционное разделение на СД1 и СД2 не всегда отражает всю глубину и разнообразие процессов, лежащих в основе заболевания, что обосновывает необходимость создания более точной классификации для персонализации диагностики и лечения.

Эндотип — это подтип заболевания, основанный на специфических патобиологических механизмах, формирующих клиническое течение. В отличие от фенотипа, который описывает внешние проявления болезни, эндотип фокусируется на внутренних процессах, таких как генетические, иммунологические и метаболические изменения [14, 15]. Например, один эндотип может быть связан с ранней утратой толерантности к инсулину, связанной с *HLA-DR4* (Human Leukocyte Antigen), а другой – с аутоантителами к GAD и *HLA-DR3* [16].

Одним из современных подходов к определению эндотипов сахарного диабета является модель «палитры», предложенная McCarthy и соавторами [17].

В этой модели заболевание представлено как палитра патогенетических факторов, представленных как цвета, комбинация которых у каждого пациента уникальна. Это позволяет представить СД не как строго разделенные типы, а как спектр состояний с различными сочетаниями патобиологических процессов.

Основные компоненты модели «палитры»:

- **Генетические факторы:** наличие специфических аллелей генов, ассоциированных с риском аутоиммунных заболеваний или инсулинорезистентности.
- **Иммунологические показатели:** присутствие аутоантител к β -клеткам и активность различных популяций иммунных клеток.
- **Метаболические параметры:** уровень инсулинорезистентности, остаточная функция β -клеток, показатели липидного обмена.

Использование этой модели особенно актуально для понимания LADA, который сочетает признаки как СД1, так и СД2. Применяя модель «палитры», можно более точно определить место LADA в спектре СД, учитывая его уникальные патогенетические особенности (рисунок 3).

Роль секвенирования РНК одиночных клеток (scRNAseq)

Применение scRNAseq в исследовании СД открывает новые возможности для детального изучения клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе различных эндотипов. Этот метод позволяет:

- **Выявить гетерогенность клеточных популяций:** определить, какие именно клетки и насколько активно вовлечены в патологический процесс.
- **Изучить экспрессионные профили:** определить, какие гены активно экспрессируются или подавляются в отдельных клетках, что позволяет выявить специфические патогенетические механизмы.
- **Оценить межклеточные взаимодействия:** понять, как различные клетки влияют друг на друга в контексте заболевания.

В случае LADA использование scRNAseq позволяет сравнить молекулярные и клеточные особенности этого эндотипа с СД1 и СД2, выявить уникальные маркеры и потенциальные терапевтические мишени.

Введение понятия эндотипов и применение модели «палитры» способствует более глубокому пониманию гетерогенности СД. Это, в сочетании с современными методами исследования, такими как scRNAseq, открывает перспективы для разработки индивидуализированных подходов к диагностике и лечению. Для пациентов с LADA это особенно важно, так как это позволяет учитывать сложность патогенеза заболевания и подбирать персонализированные стратегии терапии [16, 18].

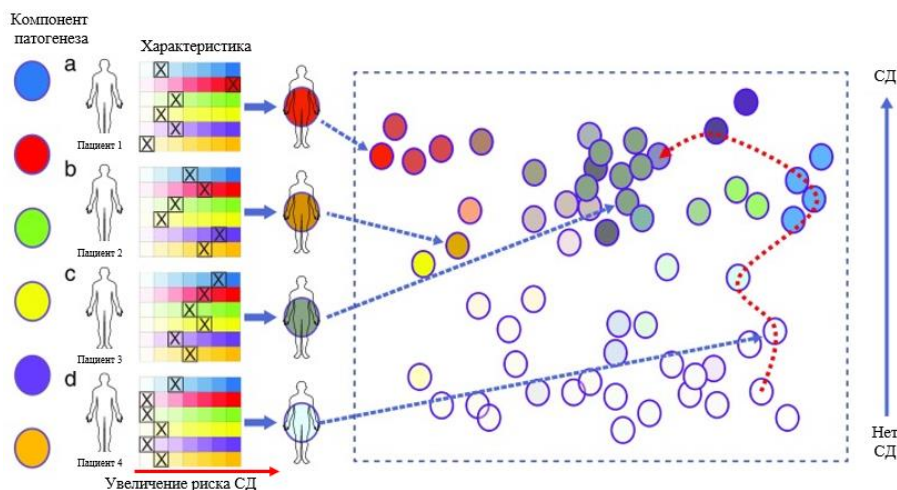


Рисунок 3 – Модель палитры. Рисунок иллюстрирует концепцию эндотипов СД, основанную на модели «палитры», предложенной McCarthy и соавторами. Диаграмма показывает четыре условных пациента (a, b, c, d) с различными комбинациями патогенетических факторов, обозначенных цветами, которые отражают уровень риска развития СД (от низкого до высокого). У каждого пациента комбинация факторов уникальна, что символизирует индивидуальные особенности патогенеза.

Патогенетические компоненты представлены в виде цветных кругов, которые распределены по спектру, переходящему от состояния «Нет СД к СД». Красные линии указывают на пути, по которым пациенты движутся к различным уровням риска развития СД. Схема подчёркивает сложность и неоднородность заболевания, отражая уникальные сочетания генетических, иммунологических и метаболических факторов у каждого пациента, адаптировано по [17].

Классификация эндотипов

Современное понимание СД основано на выделении пяти основных эндотипов, различающихся по патогенезу, клиническим проявлениям и прогнозу. Такой подход позволяет более точно диагностировать заболевание и выбирать оптимальные стратегии лечения.

1. Тяжёлый аутоиммунный диабет (SAID: Severe Autoimmune Diabetes)

SAID включает СД1 и частично LADA. Характеризуется аутоиммунным разрушением β -клеток поджелудочной железы, что приводит к абсолютному дефициту инсулина и ранней необходимости в инсулинотерапии [18].

Клинические особенности:

- Низкий ИМТ на момент диагностики.
- Высокий уровень гликированного гемоглобина (HbA1c).
- Присутствие аутоантител к GAD.
- Риск развития кетоацидоза [19].

Генетические факторы:

- Полиморфизмы в генах *PTPN22*, *INS*, *CTLA-4*, влияющие на иммунный ответ и толерантность [20, 21].
- Ассоциация с аллелями HLA класса II (*HLA-DR3*, *HLA-DR4*), влияющими на презентацию аутоантигенов [22, 23].

Молекулярные процессы:

- **Презентация аутоантигенов:** β -клетки представляют аутоантигены через МНС I и II (Major Histocompatibility Complex), распознаваемые аутоагрессивными Т-клетками.
- **Активация Т-клеток:** Взаимодействие Т-клеточных рецепторов с аутоантигенами стимулирует пролиферацию аутоагрессивных Т-клеток.
- **Продукция цитокинов:** Активированные Т-клетки и макрофаги выделяют провоспалительные цитокины (IFN- γ (Interferon Gamma), TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha), IL-1 β (Interleukin 1 Beta)), усиливающие повреждение β -клеток [24].

- **Апоптоз β -клеток:** Цитотоксическое действие CD8⁺ Т-клеток и воздействие цитокинов приводят к деструкции β -клеток [25].

Гетерогенность СД1: эндотипы СД1Э1 и СД1Э2

Современные исследования подчёркивают, что аутоиммунный СД1 (в рамках SAID) может существенно различаться по скорости потери β -клеток, степени воспалительного ответа и характеру аутоиммунитета. В частности, выделяют как минимум два эндотипа СД1 — СД1Э1 (Сахарный диабет 1 типа Эндотип 1) и СД1Э2 (Сахарный диабет 1 типа Эндотип 2).

Их различия связаны с возрастом манифестации, иммунологическими особенностями и степенью сохранённой функции β -клеток.

- **СД1Э1** (чаще у детей младше 7–8 лет):
 1. Ранняя и более быстрая утрата β -клеток.
 2. Выраженная инфильтрация ПО CD8⁺ Т-лимфоцитами и CD20⁺ В-лимфоцитами.
 3. Повышенное соотношение проинсулина к С-пептиду.
 4. Более высокая частота ассоциации с *HLA-DR4*, а также аутоантителами к инсулину (IAA) и IA-2 в раннем возрасте.
 5. Часто быстрое развитие клинических симптомов и необходимость в инсулинотерапии сразу после диагностики.
- **СД1Э2** (чаще у подростков и взрослых):
 1. Менее массивная лимфоцитарная инфильтрация (меньше CD8⁺ Т-клеток и очень мало CD20⁺ В-клеток).
 2. Более низкое или нормальное соотношение проинсулина к С-пептиду.
 3. Более медленное прогрессирование до полной инсулинозависимости.
 4. Преимущественно ассоциирован с *HLA-DR3* (и аутоантителами к GAD), нередко выявляется только одно аутоантитело.
 5. Может пересекаться с фенотипом LADA.

Несмотря на то, что у взрослых СД1 обычно относится к SAID, иммуноопосредованное повреждение β -клеток может протекать медленнее, а проявления СД1 (СД1Э2) нередко смешиваются с факторами инсулинорезистентности, что порождает феномен «двойного диабета». В этом случае аутоиммунный процесс накладывается на метаболические нарушения, характерные для СД2 (избыточная масса тела, ожирение, инсулинорезистентность), что ускоряет клиническую манифестацию СД.

Практическое значение эндотипов СД1

- Определение **СДЭ1** и **СД1Э2** может помочь в выборе иммуномодулирующей терапии. Предполагается, что при СД1Э1 (с более выраженным участием В-клеток) пациенты лучше отвечают на препараты, нацеленные на В-лимфоциты (например, ритуксимаб) или на CD3+ Т-клетки (теплизумаб).
- При **СД1Э2**, где аутоиммунный компонент выражен слабее, более перспективными могут оказаться другие подходы (например, вакцина, включающая рекомбинантный человеческий GAD65, Diamyd) [26].

В 2024 году концепция эндотипов СД1 была существенно расширена, где были дополнительно выделены СД1Э3-СД1Э6, разделив СД1 на 6 эндотипов, при этом LADA одновременно может подходить под 3-й, 4-й и 5-й эндотипы. В основе также находится титр аутоантител, уровень С-пептида, возраст манифестации и ИМТ [27].

2. Тяжёлый инсулинодефицитный диабет (SIDD: Severe Insulin-Deficient Diabetes)

SIDD характеризуется значительным дефицитом инсулина без аутоантител. Пациенты имеют низкий ИМТ, высокий HbA1c и сниженную секрецию инсулина. Клинически сходен с СД1, но с иной этиологией. Одной из особенностей данного эндотипа являются полиморфизмы в гене *TCF7L2*, влияющие на функцию β -клеток и секрецию инсулина [28].

3. Тяжёлый инсулинорезистентный диабет (SIRD: Severe Insulin-Resistant Diabetes)

SIRD характеризуется выраженной инсулинорезистентностью и часто сопровождается ожирением. Включает часть пациентов с СД2. К ведущим генетическим факторам относят полиморфизмы в генах *PPARG*, *TCF7L2*, *FTO*, связанные с инсулинорезистентностью и ожирением [29, 30]. Большую роль играют провоспалительные цитокины (TNF- α , IL-6), усиливающие инсулинорезистентность [31, 32].

4. Лёгкий диабет, связанный с ожирением (MOD: Mild Obesity-Related Diabetes)

MOD наблюдается у пациентов с высоким ИМТ, но без выраженной инсулинорезистентности. Чаще встречается у молодых людей с относительно лёгким течением заболевания [33]. К ведущим генетическим факторам относят полиморфизмы в генах, регулирующих массу тела и метаболизм глюкозы, например, *ZNF503* (Zinc Finger Protein 503) [34].

5. Лёгкий возраст-связанный диабет (MARD: Mild Age-Related Diabetes)

MARD развивается у пожилых пациентов с низким ИМТ и умеренной инсулинорезистентностью. Характеризуется относительно сохранённой функцией β -клеток и лёгким течением. Общая характеристика всех эндотипов представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Общая характеристика эндотипов.

Эндотип	Характеристики
SAID (Severe Autoimmune Diabetes)	Низкий ИМТ; Высокий HbA1c; Дефицит инсулина; Наличие антител к GAD; Кетоацидоз на момент диагноза.
SIDD (Severe Insulin-Deficient Diabetes)	Низкий ИМТ; Высокий HbA1c; Дефицит инсулина; Отсутствие антител к GAD; Кетоацидоз на момент диагноза.
SIRD (Severe Insulin-Resistant Diabetes)	Высокий ИМТ; Выраженная инсулинорезистентность; Отсутствие антител к GAD.
MOD (Mild Obesity-Related Diabetes)	Высокий ИМТ; Средняя инсулинорезистентность; Отсутствие антител к GAD.
MARD (Mild Age-Related Diabetes)	Низкий ИМТ; Отсутствие антител к GAD.

Эндотипы СД представляют собой особые подтипы заболевания, характеризующиеся различными патофизиологическими механизмами. Их выделение позволяет не только более точно диагностировать тип СД, но и предложить более персонализированные подходы к терапии. В то же время, понимание молекулярных механизмов, определяющих эндотипы, помогает выявить ключевые процессы, приводящие к деструкции β -клеток, инсулинорезистентности или нарушению секреции инсулина. Рассмотрение молекулярных изменений на клеточном уровне, таких как активация иммунных клеток, разрушение β -клеток и генетические полиморфизмы, позволяет глубже понять развитие каждого эндотипа и дополнить представление о патогенезе заболевания.

1.5 Генетические и иммунологические аспекты аутоиммунного СД

Генетические факторы

Генетическая предрасположенность к СД1 и LADA подтверждена многочисленными исследованиями. Ключевые генетические факторы включают аллели *HLA-DR* и *HLA-DQ*, относящиеся к классу II. Аллели *HLA-DR3* и *HLA-DR4* связаны с наибольшим риском развития СД1 [35, 36]. Помимо *HLA*-генов, в патогенезе участвуют и другие генетические локусы, такие как *INS* (insulin), *PTPN22* (Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 22) и *IL2RA* (Interleukin 2 Receptor Alpha) [37].

Современные геномные исследования, включая GWAS (Genome-Wide Association Studies), выявили более 50 локусов, связанных с повышенным риском развития СД1. Эти исследования подчеркивают сложность генетической предрасположенности, включающей взаимодействие множества генов, эпигенетических механизмов и факторов окружающей среды [38].

Иммунологические факторы

Основой СД1 и LADA является нарушение иммунологической толерантности. Главным патогенетическим механизмом является аутоиммунная атака CD8⁺ Т-лимфоцитов на β -клетки, возникающая в результате презентации аутоантигенов. Ключевые аутоантигены включают инсулин, GAD, IA-2, ICA и ZnT8 [39].

После созревания в первичных лимфоидных органах наивные Т-лимфоциты попадают в системный кровоток. При контакте с аутоантигенами β -клеток, представленными через молекулы МНС-II, Т-лимфоциты возвращаются в лимфатические узлы. Там происходит их клональная селекция и активация, приводящая к образованию Т-лимфоцитов, специфически реагирующих с β -клетками и вызывающих их разрушение. Альтернативно, аутоантигены β -клеток могут поступать в лимфатические узлы с кровотоком, где антигенпрезентирующие клетки представляют их наивным Т-лимфоцитам, вызывая их активацию и последующую пролиферацию. Точный механизм этого процесса до конца не изучен [40]. При этом функционально эти механизмы сходны для LADA и СД1.

Исследования показали, что у пациентов с LADA количество аутореактивных CD8⁺ Т-лимфоцитов, непосредственно повреждающих клетки поджелудочной железы (через белки перфорины и различные протеазы), снижено по сравнению с пациентами с СД1. Предполагается, что это одна из причин различий в скорости деструкции β -клеток и потери их функциональной активности [41].

CD4⁺ Т-лимфоциты или Т-хелперы также обнаружены в ткани поджелудочной железы у пациентов с LADA. Их основная роль — продукция IFN- γ , фактора некроза опухолей β (TNF- β , Tumor Necrosis Factor Beta), а также интерлейкинов 2 и 10 (IL-2 и IL-10). Активация CD4⁺ Т-лимфоцитов ведет к привлечению преимущественно провоспалительных макрофагов M1 и усилению эффекта CD8⁺ Т-лимфоцитов [42]. По сравнению с пациентами с СД1 количество CD4⁺ Т-лимфоцитов у пациентов с LADA снижено, но повышено относительно здоровых лиц [43]. Однако эти данные различаются в зависимости от длительности заболевания, степени компенсации углеводного обмена и применяемого метода количественной оценки клеток.

Особый интерес представляет популяция регуляторных Т-клеток (Treg, Regulatory T-cells) или Т-супрессоров. Их основная функция — поддержание иммунологической

толерантности к собственным тканям и предотвращение запуска аутоиммунного процесса [44]. Это достигается путем подавления индукции и пролиферации эффекторных Т-клеток, начиная от запуска апоптоза эффекторных клеток через высвобождение сериновой протеазы (гранзим В) [45], и заканчивая предотвращением ко-стимуляции через CD28 на эффекторных клетках за счет CTLA-4 (рисунок 4) [46, 47].

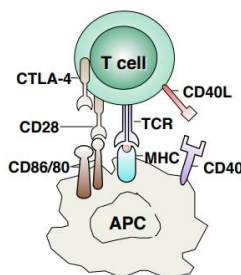


Рисунок 4 – CD28 и CTLA-4: Т-клеточные белки с сходными лигандами и противоположными функциями. CD28 экспрессируется преимущественно на поверхности Т-клеток, CTLA-4 преимущественно внутри клеток. CD80 и CD86 экспрессируются на поверхности антигенпрезентирующих клеток. APC – antigen-presenting cell, CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, MHC – major histocompatibility complex, TCR – T-cell receptor [46].

Патогенез аутоиммунного СД

Клетки врожденного иммунитета — дендритные клетки, макрофаги, нейтрофилы и НК-клетки (Natural Killer cells) — играют ключевую роль на ранних этапах развития СД1. Дендритные клетки в локальных панкреатических лимфатических узлах выступают в роли антигенпрезентирующих клеток и могут секретировать провоспалительные медиаторы, такие как IL-12 и IL-15, что способствует экспрессии ко-стимулирующих молекул и активации аутоагрессивных Т-клеток [48-50]. Макрофаги, находящиеся ПО поджелудочной железы, участвуют как в инициации, так и в поддержании деструкции β -клеток. Они выделяют интерлейкины (например, TNF и IL-1 β , которые могут стимулировать секрецию IL-6) и активные формы кислорода [51].

На мышях линии NOD (Non-Obese Diabetic) показано, что блокада PD-1/PD-L1 (Programmed Cell Death Protein 1, Programmed Death Ligand 1) может вызывать аутоиммунный СД через взаимодействие CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток с макрофагами. Активированные Т-клетки продуцируют IFN- γ (интерферон-гамма), который привлекает макрофаги, приобретающие цитотоксическую активность против β -клеток [52].

Нейтрофилы, расположенные в экзокринной части поджелудочной железы, также способствуют началу СД1, выделяя интерлейкины и хемоаттрактанты, влияющие на другие

иммунные клетки, включая макрофаги и дендритные клетки [53-55]. Однако роль НК-клеток при СД1 до конца не изучена, что, вероятно, связано с их функциональным разнообразием.

Интерлейкины

Провоспалительные интерлейкины

Провоспалительные интерлейкины — IL-1 α и TNF- α — участвуют в регуляции врожденного иммунитета при СД1. У пациентов с недавно диагностированным СД1 уровень IL-1 β , продуцируемого макрофагами, в сыворотке выше, чем у контрольной группы [56]. Кроме того, у мышей линии NOD и у людей с СД1 наблюдается повышенная экспрессия маркеров ответа на интерферон в клетках ПО и временная активация интерферон-стимулированных генов предшествует появлению аутоантител к островковым клеткам [57].

Блокировка рецептора IFN- α у молодых мышей NOD откладывала развитие СД, что указывает на важность этого цитокина на ранних стадиях заболевания [58]. Показано, что IFN- α способствует презентации аутоантигенов клетками островков и, следовательно, распознаванию этих клеток цитотоксическими Т-клетками. Кроме того, он инициирует секрецию различных хемокинов, участвующих в привлечении иммунных клеток, включая Т-клетки и НК-клетки [57]. Например, у пациентов с СД1 ПО экспрессируют гены, реагирующие на интерферон, которые участвуют в антигенной презентации, стрессовых реакциях в эндоплазматическом ретикулуме и апоптозе [59]. Полиморфизм гена *TYK2*, кодирующего киназу JAK (Janus Kinase), которая реагирует на IFN- α , связан с СД1, а нокаут данного гена в островках, полученных из человеческих стволовых клеток, снижает их чувствительность к разрушению Т-клетками [60].

Интерлейкин-6 (IL-6): IL-6 играет значительную роль в патогенезе СД1. Повышение уровня IL-6 в крови пациентов с СД1 и в экспериментальных моделях ассоциируется с усиленным воспалением и ускоренным разрушением β -клеток. IL-6 усиливает миграцию и активацию Т-клеток, инфильтрирующих ПО [61]. Эти данные указывают на перспективность ингибирования IL-6 как терапевтической мишени для замедления прогрессирования аутоиммунного процесса при различных заболеваниях [62].

Особое внимание в контексте СД уделяется хемокину MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1, моноцит-хемоаттрактантный белок-1). MCP-1 является ключевым медиатором привлечения моноцитов и макрофагов к очагам воспаления [63, 64]. Повышенный уровень MCP-1 наблюдается как при СД1 [65], так и при СД2 [66]. Исследования показывают, что при СД2 MCP-1 вовлечён в развитие инсулинорезистентности и воспаления в жировой ткани [67]. Учитывая значимость

воспалительных процессов в патогенезе различных типов сахарного диабета, изучение роли MCP-1 становится важным направлением для понимания воспалительных механизмов и разработки новых терапевтических стратегий.

Противовоспалительные интерлейкины

Противовоспалительные цитокины могут играть защитную роль, модулируя иммунные реакции и замедляя прогрессирование СД1.

Интерлейкин-10 (IL-10) и трансформирующий фактор роста β (TGF β , Transforming Growth Factor Beta): Эти цитокины подавляют активность эффекторных Т-клеток и способствуют развитию Treg, которые предотвращают разрушение β -клеток при аутоиммунном процессе [68, 69]. Экспериментальные данные на животных моделях СД1 показывают, что IL-10 может модулировать воспаление, способствуя толерогенным свойствам дендритных клеток и развитию регуляторных В-клеток (Breg). Это приводит к снижению уровня воспалительных цитокинов и замедлению аутоиммунного разрушения β -клеток [70].

Интерлейкин-2 (IL-2): IL-2 также играет важную роль в регуляции аутоиммунного процесса при СД1 [71]. В низких дозах IL-2 способствует пролиферации регуляторных Т-клеток, что может замедлить развитие заболевания и сохранить остаточную функцию β -клеток. В исследованиях на мышах линии NOD показано, что низкие дозы IL-2 эффективно предотвращают развитие СД за счёт увеличения количества Treg и подавления функциональной активности аутореактивных Т-клеток. Однако высокие дозы IL-2 могут оказывать противоположное действие, усиливая активность эффекторных Т-клеток и NK-клеток, что подчёркивает важность правильного подбора дозировки при потенциальной терапии [72, 73].

Цитокины оказывают сложное и взаимозависимое влияние на развитие и прогрессирование СД1. Провоспалительные цитокины, такие как IL-1, IL-6 и TNF- α , усиливают воспаление и способствуют разрушению β -клеток. В то же время противовоспалительные цитокины, такие как IL-10, TGF β и IL-2, могут способствовать восстановлению иммунного баланса и замедлению процесса разрушения β -клеток. Понимание механизмов действия этих молекул открывает перспективы разработки новых терапевтических подходов к СД1, включая стратегии, направленные на блокаду провоспалительных путей и модуляцию противовоспалительных сигналов.

Механизмы иммунной толерантности

Существует четыре основных механизма иммунологической толерантности, которые могут защищать β -клетки от разрушения аутоагрессивными Т-клетками:

1. **Отрицательная селекция в тимусе:** В процессе развития Т-клеток в тимусе происходит устранение самореактивных Т-клеток. Этот механизм обычно предотвращает выживание аутоагрессивных Т-клеток во время их дифференцировки. Однако аллели МНС класса I и II, ассоциированные с СД, могут снижать эффективность отрицательной селекции аутореактивных лимфоцитов. Это может происходить по нескольким причинам: недостаточная экспрессия антигенов островковых клеток в тимусе, слабая способность нативных (немодифицированных) аутоантигенов островков связываться с МНС I/II, а также повышенная устойчивость аутореактивных Т-клеток к индукции апоптоза [74-76]. Исследования GWAS связывают аллельные вариации в локусе *INS-VNTR (IDDM2)* с уровнем экспрессии инсулина в тимусе и развитием заболевания. Защитные аллели этого локуса способствуют более высокой экспрессии инсулина в тимусе, обеспечивая эффективную отрицательную селекцию инсулин-реактивных Т-клеток [77]. У генетически модифицированных мышей с пониженной экспрессией инсулина в тимусе наблюдается повышенная аутореактивность периферических Т- и В-клеток к инсулину [74]. Кроме того, в панкреатических лимфатических узлах мышей линии NOD на 3–5-й неделе жизни обнаруживаются уровни мРНК инсулина, превышающие ожидаемые [78]. Эти данные указывают на прямую связь между уровнем внепанкреатической экспрессии инсулина и реактивностью периферических лимфоцитов к инсулину, что свидетельствует о неэффективной отрицательной селекции у мышей NOD и людей с СД.
2. **Отсутствие антигена в периферических тканях:** Толерантность может сохраняться, если аутоагрессивный лимфоцит выживает в тимусе, но не встречает соответствующий антиген в периферических тканях. Этот путь играет ключевую роль в поддержании толерантности к аутоантигенам у В-клеток [79].
3. **Анергия:** Третий механизм — антиген-специфическая нечувствительность к собственным антигенам, или анергия. Это состояние характеризуется подавлением реакции иммунной системы на собственные антигены и достигается путем прямой индукции толерантности периферических лимфоцитов. Анергия CD4⁺ Т-клеток связана с экспрессией фолатного рецептора 4 и *CD73*, а также с низкой чувствительностью к стимуляции Т-клеточного рецептора (TCR, T-cell receptor) [80]. Предполагается модель, согласно которой нарушения метаболического регулирования влияют на уровень метилирования ДНК в области гена *Foxp3*, что способствует его экспрессии после выхода клеток из состояния анергии [81].
4. **Регуляторные Т-клетки (Treg) и механизмы регуляции и предотвращения аутоиммунных реакций:** Четвёртый механизм основан на роли тимусных и периферических регуляторных CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют транскрипционный

фактор *Foxp3*. *Foxp3* является ключевым регулятором активности, состояния и реактивности Treg. Мутации в гене *Foxp3* ассоциированы с развитием множества аутоиммунных заболеваний, что демонстрирует его роль в поддержании иммунологической толерантности [82]. Усиление активности Treg в поджелудочной железе рассматривается как потенциальный способ замедления деструкции β -клеток.

Кроме того, Treg-клетки могут подавлять эффекторные Т-клетки, специфичные к тем же или схожим мишеням, через механизм «связанного подавления» (linked suppression). Этот механизм заключается в способности регуляторных Т-клеток подавлять активацию эффекторных Т-клеток, распознающих тот же антиген на одной антигенпрезентирующей клетке (АПК). Было показано, что этот механизм работает в модели трансплантации сердца у мышей, где была индуцирована иммунная толерантность к различным чужеродным молекулам МНС [83]. Таким образом, выявление «связанных» мишеней для индукции толерантности CD4⁺ Т-клеток к антигенам аллотрансплантатов островков может представлять новую возможность для предотвращения отторжения трансплантатов у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, в том числе при трансплантации поджелудочной железы при СД1.

Механизм деструкции β -клеток

После созревания в первичных лимфоидных органах наивные Т-лимфоциты мигрируют в системный кровоток. При распознавании аутоантигенов β -клеток, представленных через молекулы МНС II на поверхности антигенпрезентирующих клеток, эти Т-лимфоциты возвращаются в лимфатические узлы, где происходит клональная селекция и активация. В результате формируются активированные Т-лимфоциты, специфичные к β -клеткам, что приводит к их разрушению. Альтернативно, аутоантигены β -клеток могут поступать в лимфатические узлы с кровотоком, где антигенпрезентирующие клетки представляют их наивным Т-лимфоцитам, вызывая их активацию. Однако точный механизм этого процесса до сих пор полностью не изучен [40]. Функционально эти механизмы одинаково значимы для патогенеза LADA и СД1.

Распределение CD8⁺ Т-клеток памяти

При СД1 распределение CD8⁺ Т-клеток памяти изменяется в зависимости от локализации и времени взаимодействия с антигеном. CD8⁺ Т-клетки памяти подразделяются на различные подтипы, такие как центральные Т-клетки памяти (TCM, Central Memory T-cells), эффекторные Т-клетки памяти (TEM, Effector Memory T-cells) и тканевые резидентные Т-клетки памяти (TRM, Tissue-Resident Memory T-cells), которые различаются по функциям и месту нахождения. Например, TCM преимущественно

находятся в лимфоузлах и периферической крови, тогда как TRM локализуются в тканях, таких как поджелудочная железа и кишечник [84].

Влияние антигенной стимуляции

Многочисленные контакты с антигеном влияют на фенотип и функции CD8⁺ Т-клеток памяти, вызывая изменения в их распределении, активности и функциональных свойствах. Это подтверждает динамическую природу соотношений периферических и тканевых резидентных Т-клеток памяти по мере прогрессирования заболевания [84, 85]. Иммунное окружение наивных CD8⁺ Т-клеток может влиять на их активацию, что приводит к дифференцировке в клетки памяти, истощённые, сенесцентные или другие фенотипы Т-клеток.

Роль пути Fas-FasL

Повторная антигенная стимуляция CD8⁺ Т-клеток снижает их способность к долгосрочной памяти и усиливает механизмы регуляции апоптоза через взаимодействие Fas-FasL (CD95/Fas-ligand) [86, 87]. После активации TCR экспрессия Fas и FasL на CD8⁺ Т-клетках постепенно повышается, иницируя сигнальные пути перфорина/гранзима В и регулируя гибель избыточно активированных клеток для предотвращения гиперактивности иммунного ответа [88, 89]. Это помогает поддерживать иммунный гомеостаз и не допускать чрезмерного воспаления. При СД1 антиген-специфические CD8⁺ Т-лимфоциты играют ключевую роль в аутоиммунном разрушении β -клеток, которые, инфильтрируя ПО, распознают аутоантигены, что приводит к активации пути Fas-FasL и, как следствие, к апоптозу β -клеток [90].

Фенотипическая гетерогенность CD8⁺ Т-клеток

CD8⁺ Т-клетки, участвующие в патогенезе СД1, обладают высокой фенотипической вариабельностью, обусловленной их функциональной пластичностью. Они могут находиться в различных функциональных и дифференцировочных состояниях, включая эффекторные клетки, регуляторные клетки, стволовые клетки памяти и клетки, находящиеся в истощенном состоянии (exhaustion). Циркулирующие CD8⁺ Т-клетки, специфичные к антигенам островков, демонстрируют широкий спектр фенотипов, отражающих динамику их дифференцировки— от ранних и переходных форм клеток памяти до конечных эффекторных клеток памяти. Состояние истощения этих клеток характеризуется прогрессирующей утратой эффекторных функций и устойчивой экспрессией различных ингибиторных рецепторов [91, 92]. Повторные контакты с антигеном, например, при многократных вакцинациях или инфекциях, увеличивают количество клеток памяти CD8⁺ Т и усиливают защиту организма при вторичных инфекциях. Исследования показывают, что после первичной инфекции или вакцинации

клетки памяти CD8⁺ Т сохраняются в организме длительное время, и их количество может увеличиваться при повторных воздействиях антигена, способствуя усиленной защите от патогенов [93].

Сосуществование разных типов CD8⁺ Т-клеток

В поджелудочной железе пациентов с СД1 могут одновременно присутствовать разные функциональные типы CD8⁺ Т-клеток: стволовые, эффекторные и истощенные. Стволовые CD8⁺ Т-клетки поддерживают резерв Т-клеток, эффекторные уничтожают β -клетки, а истощенные теряют способность эффективно атаковать β -клетки из-за продолжительной антигенной стимуляции [94]. Сосуществование различных типов Т-клеток и их взаимодействие является важной характеристикой аутоиммунного СД.

Истощенные CD8⁺ Т-клетки

В последние годы истощённые CD8⁺ Т-клетки (exhausted) стали объектом особого интереса в исследованиях аутоиммунных заболеваний, включая СД1 и онкологию [94].

По данным исследований при хронических вирусных инфекциях и онкологии, истощение CD8⁺ Т-клеток развивается под действием трёх ключевых механизмов: постоянной антигенной стимуляции, негативных костимулирующих сигналов и хронического воспаления [95, 96]. Этот процесс сопровождается утратой эффекторных функций, метаболическими изменениями и эпигенетическими модификациями [97].

Транскрипционные характеристики истощённых CD8⁺ Т-клеток

В истощённом состоянии CD8⁺ Т-клетки демонстрируют повышенную экспрессию ингибиторных рецепторов (*PDCDI/PD-1*, *KLRG1*, *TIGIT*), что может быть связано со снижением темпов деструкции β -клеток и регуляцией аутоиммунного ответа при СД. Клинические исследования показывают, что увеличение доли таких клеток коррелирует с менее агрессивным течением аутоиммунного процесса и позитивным ответом на анти-CD3 (теплизумаб) терапию [98, 99].

Терапевтические подходы с использованием истощённых CD8⁺ Т-клеток

Считается, что доля антиген-специфических CD8⁺ Т-клеток с признаками истощения обратно пропорциональна скорости прогрессирования СД1 [100, 101]. Показано, что подобные субпопуляции CD8⁺ Т-клеток способны сохранять эпигенетические программы, характерные для стволовых клеток памяти, что позволяет им гибко адаптироваться к изменяющейся антигенной нагрузке.

Влияние анти-CD3 терапии на Т-клеточные популяции

Теплизумаб (анти-CD3) увеличивает долю частично истощённых CD8⁺ Т-клеток (коэкспрессия *PD-1*, *KLRG1*, *TIGIT*), что ассоциируется с улучшением клинического течения и увеличением доли Treg [98, 102]. Предполагается, что такая модуляция иммунной

системы замедляет аутоиммунную атаку на β -клетки, способствуя сохранению их функциональной активности.

Исследования показали, что у пациентов с LADA уровень аутореактивных CD8+ Т-лимфоцитов, повреждающих клетки поджелудочной железы за счет перфоринов и протеаз, ниже по сравнению с пациентами с СД1. Это может быть одной из причин различий в скорости разрушения β -клеток и потери их функциональной активности [41].

У пациентов с LADA в ткани поджелудочной железы также обнаруживаются CD4+ Т-клетки, также известные как Т-хелперы. Их основная функция — выработка IFN- γ , TNF- β , а также IL-2 и IL-10. Активация CD4+ Т-клеток способствует привлечению провоспалительных макрофагов M1 и активации CD8+ Т-лимфоцитов. Количество CD4+ Т-клеток у пациентов с LADA ниже, чем при СД1, но выше, чем у здоровых людей [43].

Эффекторные Т-клетки

Эффекторные Т-клетки (Teff, T effector cells) играют ключевую роль в патогенезе аутоиммунного СД. Их способность распознавать антигены, активироваться, пролиферировать и выполнять свои функции значительно влияет на иммунные процессы, ведущие к заболеванию.

Эффекторные Т-клетки подразделяются на несколько подтипов в зависимости от их характеристик:

- **CD4+ Т-лимфоциты** координируют аутоиммунную реакцию, главным образом продуцируя различные цитокины. Они делятся на подгруппы Th1 (T helper cells), Th2, Th17 и Treg. В контексте СД1 CD4+ клетки играют важную роль на начальной стадии заболевания за счет выработки провоспалительных цитокинов, например, IFN- γ .
- **CD8+ Т-лимфоциты** участвуют в прямом уничтожении инфицированных и опухолевых клеток. В поджелудочной железе пациентов с СД1 CD8+ Т-лимфоциты идентифицированы как основные эффекторные клетки, ответственные за разрушение β -клеток, что подтверждается их повышенным количеством в ПО [103, 104].

Нарушение иммунной толерантности при СД1

У пациентов с СД1 наблюдается нарушение периферической иммунологической толерантности, связанное с дисфункцией Treg и сниженной чувствительностью Teff-клеток к супрессивному воздействию Treg. Это проявляется в невосприимчивости эффекторных CD4+ Т-клеток к регуляции со стороны CD4+FOXP3+Treg, что способствует прогрессированию воспалительного процесса и аутоиммунному разрушению β -клеток поджелудочной железы [105].

Резистентность Teff к супрессии Treg и роль IL-6

Резистентность Teff к подавлению Treg не зависит от конкретного подтипа клеток или их маркеров, а связана с их активационным статусом и воздействием провоспалительных цитокинов, особенно IL-6. Исследования показывают, что эта резистентность связана с активацией сигнального пути STAT3 под воздействием IL-6, а не прямой продукцией или ответом Т-клеток на него. Фосфорилирование STAT3 необходимо для того, чтобы IL-6 мог блокировать функцию Treg и способствовать развитию аутоиммунных заболеваний, включая СД1. Кроме того, STAT3 активируется при сильной стимуляции через TCR, что делает Teff устойчивыми к супрессии со стороны Treg. Понимание этого процесса важно для раскрытия механизмов потери толерантности при хроническом воспалении, что может объяснять более выраженный ответ Т-клеток на аутоантигены у детей с СД1 по сравнению со взрослыми [106].

1.6 Секвенирование РНК одиночных клеток

Одним из перспективных направлений изучения этиологии и патогенеза СД является scRNAseq, которое позволяет точно идентифицировать тип клеток, их поверхностные маркеры, пути развития и функциональную активность.

Традиционное секвенирование РНК (bulk) использует усреднённый подход, при котором все интересующие клетки объединяются в один образец перед секвенированием. Напротив, scRNAseq позволяет выделять отдельные клетки. Транскрипты каждой клетки маркируются бар-кодом — уникальным молекулярным идентификатором, который предотвращает систематические ошибки амплификации, — перед объединением для секвенирования. Это даёт возможность количественно оценить экспрессию каждого гена в каждой отдельной клетке, что позволяет точно определить фенотипы и гетерогенность изучаемых клеток [107].

Применение scRNAseq для изучения развития иммунной реакции при СД1 и LADA открывает новые возможности для понимания патогенеза этих заболеваний.

Принцип работы метода scRNAseq

Основной принцип scRNAseq заключается в изоляции отдельных клеток из исследуемого образца (например, тканей поджелудочной железы или периферической крови), их лизисе и последующей обработке для выделения РНК, синтезе кДНК (комплементарной ДНК) и последующем секвенировании. Результаты секвенирования позволяют определить полный транскриптом каждой клетки, то есть набор всех экспрессируемых генов. В отличие от традиционных методов массового секвенирования, которые дают средний профиль экспрессии для всей клеточной популяции, scRNAseq

позволяет изучить клеточные популяции на индивидуальном уровне, выявить редкие субпопуляции и определить межклеточные различия (рисунок 5) [108].

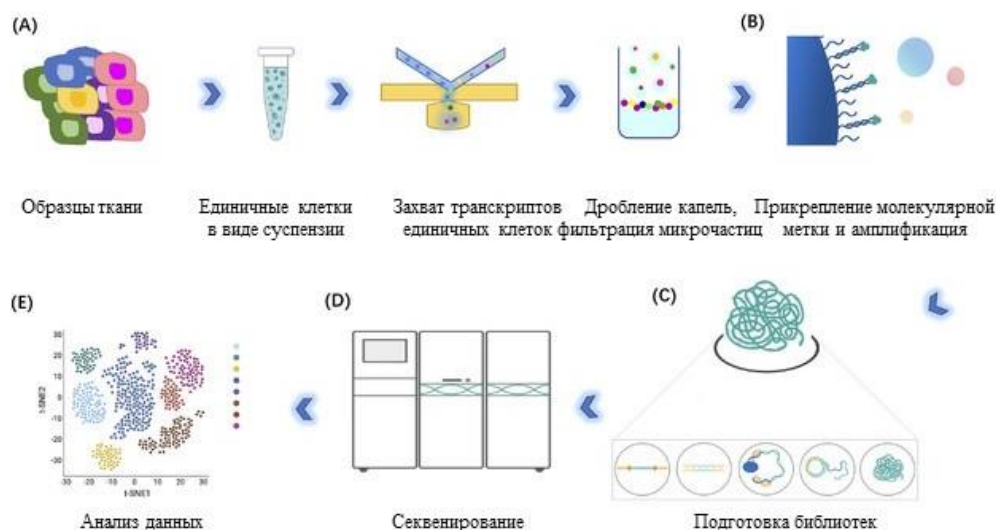


Рисунок 5 – Схематичное описание методики scRNAseq, адаптировано по [109].

Возможности scRNAseq

СД1 является аутоиммунным заболеванием, характеризующимся разрушением инсулин-продуцирующих β -клеток поджелудочной железы иммунной системой. В этом процессе задействованы различные субпопуляции иммунных клеток, включая Т-лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки и В-лимфоциты. Использование scRNAseq позволяет более глубоко исследовать роль этих клеток в патогенезе СД1, а также их взаимодействие с β -клетками.

1. **Исследование иммунных клеток:** scRNAseq позволяет детально изучить фенотипы и функциональные состояния иммунных клеток, участвующих в аутоиммунной атаке на β -клетки. Например, в периферической крови пациентов с СД1 с помощью этой методики можно выявить различные субпопуляции Т-лимфоцитов, включая цитотоксические Т-клетки (CD8+) и Treg, и оценить их вклад в аутоиммунный процесс. scRNAseq позволяет не только выявить клетки, активированные в контексте аутоиммунной реакции, но и определить уникальные генетические паттерны, ассоциированные с прогрессированием заболевания [110].

2. **Гетерогенность β -клеток:** СД1 характеризуется прогрессивной деструкцией β -клеток, однако не все клетки подвержены аутоиммунной деструкции в одинаковой степени. scRNAseq позволяет изучать β -клетки на индивидуальном уровне, выявляя различия в экспрессии генов между повреждёнными и относительно сохранёнными клетками. Это особенно важно для понимания того, почему некоторые β -клетки могут быть более

устойчивыми к иммунной агрессии, что открывает перспективы для разработки новых методов защиты β -клеток. Кроме того, scRNAseq позволяет исследовать изменения в экспрессии генов β -клеток на разных стадиях заболевания, что важно для изучения механизмов регенерации и возможных путей восстановления β -клеточной массы. Подобные исследования также актуальны для СД2 [111].

3. Выявление редких клеток: Методика scRNAseq также эффективна для обнаружения редких клеточных популяций, которые могут играть ключевую роль в патогенезе заболевания, но которые было бы сложно выявить традиционными методами. Например, в ходе исследования можно выявить небольшие субпопуляции воспалительных клеток или β -клеток с необычными свойствами, что может помочь в разработке персонализированной терапии. [112]

Ограничения метода

- 1. Высокая стоимость и ресурсозатратность:** проведение scRNAseq требует значительных финансовых затрат и специализированного оборудования, что может ограничивать его доступность для некоторых исследовательских групп.
- 2. Сложность обработки и анализа данных:** генерируемые данные занимают большой объем и являются сложными для интерпретации, требуя применения продвинутых биоинформатических методов и значительных вычислительных ресурсов.
- 3. Технические ограничения:** процедуры выделения отдельных клеток могут приводить к потере или повреждению клеток, а также к отклонениям, связанным с эффективностью обратной транскрипции и амплификации.
- 4. Интерпретация биологической значимости:** не всегда ясно, как изменения в экспрессии генов на уровне отдельных клеток влияют на физиологию органа в целом, что затрудняет перевод полученных данных в клиническую практику.

scRNAseq и СД1

Использование scRNAseq значительно продвинуло понимание механизмов, лежащих в основе аутоиммунного СД, особенно СД1.

Одно из исследований, в котором применяли методику patch-seq, сочетающую scRNAseq и оценку электрофизиологических измерений на клеточном уровне, выявило ключевые генные сети, связанные с функционированием и дисфункцией β -клеток в ПО. Анализируя 1369 клеток от доноров с СД и без него, исследователи идентифицировали 484 гена, ассоциированных с электрофизиологическими характеристиками β -клеток. У доноров с СД2 отмечалось нарушение экзоцитоза в β -клетках, тогда как у доноров с СД1 наблюдались изменения в α -клетках, приводящие к нарушению секреции глюкагона [113]. Это исследование подчёркивает различные клеточные изменения, происходящие при

разных типах СД, и важность динамической оценки функции β -клеток по мере прогрессирования заболевания.

Дальнейшее изучение гетерогенности клеток поджелудочной железы было проведено в другой работе, в которой был проведён транскриптомный анализ на уровне отдельных клеток ПО человека, включая образцы от детей, взрослых и пациентов с СД1 и СД2. Результаты показали, что у детей и пациентов с СД2 α - и β -клетки демонстрируют более незрелые транскриптомные профили, указывающие на процесс частичной дедифференцировки. Кроме того, авторы выявили активность сигнального пути *Sonic hedgehog* в пролиферирующих α -клетках [4]. Эти данные свидетельствуют о том, что нарушение дедифференцировки и измененные сигнальные пути могут способствовать дисфункции β -клеток при СД.

Исследуя пластичность клеток, другое исследование продемонстрировало, что при потере β -клеток у мышей, α -клетки способны трансдифференцироваться в β -клетки. Этот процесс регулируется генами *Arx* и *Dnmt1*. Эксперименты показали, что деактивация этих генов приводит к тому, что α -клетки приобретают функциональные свойства β -клеток, включая секрецию инсулина в ответ на глюкозу. Подобные наблюдения были сделаны у пациентов с СД1, у которых некоторые α -клетки вырабатывали инсулин, что указывает на возможные механизмы регенерации клеток при СД [114]. Это открытие создаёт перспективы для разработки новых стратегий, направленных на изучение трансдифференцировки α -клеток в β -клетки.

В исследованиях по разработке клеточной терапии была продемонстрирована дифференцировка β -клеток из человеческих эмбриональных стволовых клеток. Используя анализ экспрессии генов на уровне отдельных клеток, исследователи выявили различные пути развития эндокринных клеток, ведущие к формированию β -клеток. Важным открытием стало, что ключевой фактор транскрипции *NKX6.1*, необходимый для дифференцировки β -клеток, может активироваться как до, так и после окончательной дифференцировки стволовых клеток. Это может способствовать созданию более эффективных методов регенерации β -клеток при аутоиммунном СД [115].

В другой работе была изучена роль ТФ *TCF7* в поддержании гомеостаза глюкозы у мышей. Исследования показали, что деактивация *TCF7* в клетках печени и β -клетках ПО не оказывает значимого влияния на регуляцию уровня глюкозы и инсулина. Более того, исследователи обнаружили, что экспрессия *TCF7* в ПО связана преимущественно с иммунными клетками, а не с β -клетками. Это исследование показало, что *TCF7* не является критическим регулятором уровня глюкозы у мышей [116].

Иммунная система играет ключевую роль в патогенезе СД1. Исследования показывают, что сигнальные пути интерферона I типа (IFN-I) значительно влияют на иммунные реакции при аутоиммунном СД. В экспериментальной модели на крысах, лишённых рецептора IFNAR1, наблюдалось снижение частоты развития СД после вирусной инфекции, что связано с изменениями в популяциях иммунных клеток. В частности, отмечено уменьшение числа CD8⁺ Т-клеток и увеличение количества нейтрофилов. Также отмечены изменения в экспрессии генов, связанных с хемотаксисом нейтрофилов и молекулами МНС II класса в моноцитах и макрофагах, что подтверждает важную роль IFN-I в патогенезе диабета [117].

Сосредотачиваясь на иммунной микросреде ПО, исследования выявили ключевые гены и клеточные типы, участвующие в прогрессировании СД1. В одном из исследований изучали роль генов *CIQB* и *NKG7* в иммунной микросреде ПО на основе scRNAseq. Анализ показал, что макрофаги и Т-лимфоциты являются ключевыми клетками в этой микросреде. *CIQB* способствует дифференциации моноцитов в макрофаги, а *NKG7* активирует Т-лимфоциты. Ингибирование этих генов уменьшает повреждение β-клеток и замедляет прогрессирование СД1 [118].

Другое исследование изучало роль молекулы клеточной адгезии *CADMI* в патогенезе СД1. Исследования на ПО людей с СД1 и мышей показали, что *CADMI* способствует взаимодействию между цитотоксическими CD8⁺ Т-клетками и клетками ПО, особенно с макрофагами и α-клетками. Это взаимодействие облегчает инфильтрацию Т-клеток в островки, что ускоряет разрушение β-клеток. В результате *CADMI* рассматривается как потенциальная терапевтическая мишень для предотвращения прогрессирования СД1 [119].

Уникальные характеристики иммунных клеток у пациентов с СД1, особенно у детей, являются предметом исследований. Одно из исследований сосредоточилось на транскриптомном профиле CD8⁺ Т-лимфоцитов у детей с СД1. Были выявлены значительные различия в профилях экспрессии генов и белков между пациентами детского возраста и взрослыми. Более выраженные нарушения были выявлены у детей. В образцах от детей CD8⁺ Т-клетки демонстрировали комбинацию эффекторных молекул (перфорин, гранзим В) и регуляторных молекул (TGF-β, рецептор IL-10), что коррелировало с высоким уровнем аутоантител и HbA1c [120].

Значимую роль в аутоиммунных реакциях, помимо Т-клеток, играют дендритные клетки (ДК). Анализ транскрипционных профилей ДК у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, включая ревматоидный артрит, системную красную волчанку и СД1, выявил ключевые различия. У пациентов с аутоиммунными заболеваниями наблюдалась

повышенная экспрессия генов *TAP1*, *IRF7* и *IFNAR1*. В частности, у пациентов с СД1 была снижена экспрессия генов *PTPN6*, *TGFB* и *TYROBP* [121].

Раннее обнаружение иммунных нарушений имеет решающее значение для того, чтобы отсрочить или предотвратить манифестацию СД1. В одном исследовании, посвящённом детям, у которых выявлены антитела к β -клеткам, но отсутствует СД1 был проанализирован транскриптомный профиль CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток с использованием scRNAseq. Исследование выявило, что IL32 играет ключевую роль в патогенезе, модулируя иммунный ответ до появления аутоантител. Экспрессия *IL32* была связана с активированными Т-клетками и NK-клетками [122]. Данные результаты предполагают, что IL32 может служить потенциальным ранним биомаркером и терапевтической мишенью при СД1.

В совокупности эти исследования демонстрируют потенциал scRNAseq в раскрытии клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе аутоиммунного СД. scRNAseq является мощным инструментом для изучения клеточной гетерогенности, профилей экспрессии генов и межклеточных взаимодействий, способствуя более глубокому пониманию патогенеза заболевания и идентификации новых терапевтических мишеней.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы исследования

2.1.1 Дизайн исследования

В соответствии с поставленной целью и задачами было проведено одноцентровое одномоментное сравнительное исследование. В исследование включены пациенты, соответствующие критериям включения и исключения, с диагнозами: «Сахарный диабет 1 типа» (E10 по МКБ), «Сахарный диабет 2 типа» (E11 по МКБ), «Сахарный диабет тип LADA (E10 или E11 по МКБ) и здоровые добровольцы (группа сравнения).

2.1.2 Условия проведения

Набор пациентов проводился на базе ГНЦ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России (Москва, РФ), в отделении прогнозирования и инноваций диабета (зав. отделением – к.м.н. Ибрагимова Л.И.), консультативно-диагностическом отделении (зав. отделением – д.м.н. Волеводз Н.Н.), а также из числа пациентов, включенных в базу данных клинико-эпидемиологического мониторинга сахарного диабета на территории Российской Федерации, регион Москва. Набор здоровых добровольцев проводился из числа сотрудников ГНЦ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России и добровольцев, откликнувшихся на внешние объявления о наборе.

2.1.3 Критерии соответствия

В исследование были включены 2 группы: пациенты с сахарным диабетом (1, 2 типа и LADA) и здоровые добровольцы. Для каждой из популяций были применены следующие критерии включения и исключения:

1) Пациенты с СД:

Критерии включения

1. Наличие подписанного информированного согласия.
2. Пол: мужской и женский.
3. Возраст от 18 до 55 лет.
4. Индекс массы тела $<35 \text{ кг/м}^2$

Подпункты 5-7 выполняются альтернативно:

5. Сахарный диабет 1 типа (E10 по МКБ) – длительность до 1 года.
6. Сахарный диабет 2 типа (E11 по МКБ) – длительность до 5 лет.
7. Латентный аутоиммунный диабет взрослых (LADA) (E11 или E10 по МКБ) – длительность до 5 лет.

Критерии исключения

1. Наличие другого системного аутоиммунного заболевания (со слов пациента).

2. Заболевания поджелудочной железы или перенесенные ранее хирургические вмешательства на поджелудочной железе (со слов пациента).
3. Прием иммуносупрессивной терапии в течение предыдущего года (со слов пациента).

1) *Здоровые добровольцы:*

Критерии включения

1. Наличие подписанного информированного согласия.
2. Пол: мужской и женский.
3. Возраст от 18 до 55 лет.
4. Индекс массы тела $<35 \text{ кг/м}^2$

Критерии исключения

1. Сахарный диабет – независимо от типа.
2. Нарушенная толерантность к глюкозе/нарушенная гликемия натощак.
3. Наличие другого системного аутоиммунного заболевания (со слов пациента).
4. Заболевания поджелудочной железы или перенесенные ранее хирургические вмешательства на поджелудочной железе (со слов пациента).
5. Прием иммуносупрессивной терапии в течение предыдущего года (со слов, пациента).

2.1.4 Распределение участников по группам

Набор пациентов осуществлялся в период с 01 февраля по 20 ноября 2023 года. Всего было отобрано 82 участника исследования, включая группу сравнения. Поточковая диаграмма представлена на рисунке 6. Формирование выборки произведено произвольным образом с равным соотношением мужчин и женщин (50/50%) за исключением группы СД2, в которой набор пациентов осуществлялся в соотношении 90/10%.



Рисунок 6 – Распределение участников по группам.

Включение в исследование группы пациентов с СД2 обусловлено необходимостью оценки того, в какой мере изменения в клеточном составе (по данным scRNAseq) и уровень аутоантител связаны именно с аутоиммунным процессом, а не с общими нарушениями гомеостаза глюкозы, характерными в том числе для СД2.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Критерии постановки диагноза

Все пациенты на момент включения в исследование имели установленный диагноз СД1 или СД2 в соответствии с диагностическими критериями СД и других нарушений гликемии (ВОЗ, 1999–2013). Для выделения группы с диагнозом LADA были использованы следующие обязательные критерии:

- 1) Повышенный титр антител к β -клеткам.
- 2) Отсутствие потребности в инсулинотерапии в течение по крайней мере первых 6 месяцев после первоначального диагноза.

Отсутствие нарушений углеводного обмена у здоровых добровольцев оценивалось по уровню HbA1c и глюкозе натощак, находящихся в пределах референсного диапазона ($\text{HbA1c} < 6,0\%$ и глюкоза венозной плазмы натощак $< 6,1$ ммоль/л).

2.2.2 Клинические данные

Первичный осмотр проводился в условиях стационара и клинико-диагностического отделения. У всех пациентов был собран анамнез о длительности заболевания, применяемой терапии, дате перехода на инсулинотерапию в группе LADA, наличии родственников с установленным СД. Проводились лабораторные и генетические исследования. Соответствие критериям включения было оценено на основании данных анамнеза и по результатам первичного обследования.

Антропометрическая оценка включала измерение роста, веса и вычисление ИМТ по формуле: $\text{ИМТ (кг/м}^2\text{)} = \text{масса (кг)} / \text{рост}^2 \text{ (м}^2\text{)}$.

2.2.3 Лабораторные данные

Все участники исследования были обследованы по единой схеме: лабораторные данные (биохимический анализ, гормональный анализ, общий анализ крови, анализ на антитела к β -клеткам и генетический анализ), для этого у участников была взята венозная кровь в соответствии с рисунком 7.

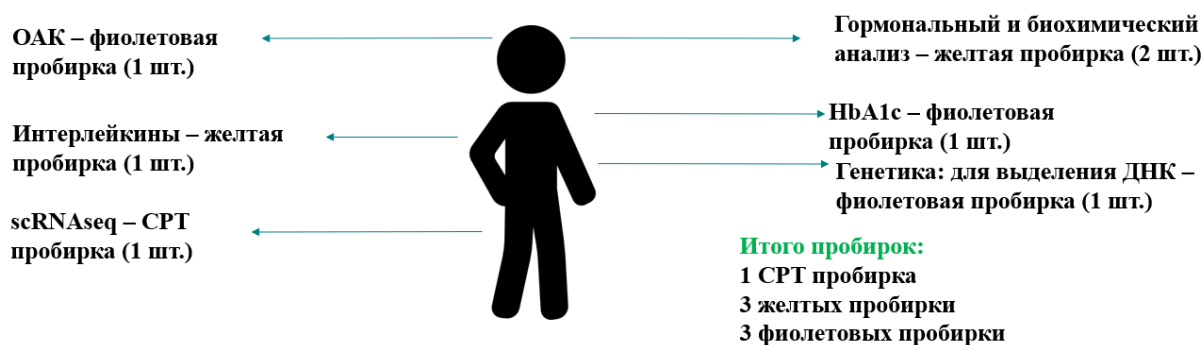


Рисунок 7 – Схема забора венозной крови. ОАК – общий анализ крови. В скобках указано количество пробирок. Желтые пробирки - гель разделитель, фиолетовые - К2ЭДТА (двукальеая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты) соответственно, объемом 4 мл (BD Vacutainer, США), CPT (Cell Preparation Tube) — пробирки с антикоагулянт (гепарином натрия), разделительным гелем и разделительной жидкостью (Фиколл).

Хранение образцов сыворотки и крови, необходимых для проведения исследования осуществлялось в центре биобанкирования ГНЦ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России (зав. центром – к.м.н. Бондаренко Е.В.).

Гормональные, биохимические исследования и анализ на антитела к β -клеткам проводились в клиничко-диагностической лаборатории ГНЦ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России (зав. лабораторией – к.м.н. Никанкина Л.В.). Общая характеристика применяемого оборудования и референсных показателей представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Используемые лабораторные методы

Группа анализов/параметр	Референсный интервал	Единица измерения	Прибор
Общий анализ крови (82 образца)			Sysmex XN-1000 («Sysmex Corp.», Япония)
Биохимический анализ (82 образца)	-	-	«Architect c8000» («Abbott Laboratories», США)
Глюкоза	3,1 – 6,1	ммоль/л	
Гормональный анализ (82 образца)			«Architect c8000» («Abbott Laboratories», США)
С-пептид	1,1 – 4,4	нг/мл	
Инсулин	2,6-24,9	мкЕ/мл	
Антитела (82 образца)	-	-	ИФА (ELISA) при помощи стандартного набора Euroimmun,

			Germany, для определения антител ниже в списке
АТ к GAD	0-10	Ед/мл	
АТ ICA	0-1	Ед/мл	
АТ к инсулину	0-10	Ед/мл	
АТ IA 2	0-10	Ед/мл	
HbA1c (82 образца)	4-6	%	D10 (BioRad, США)
МСП-1 (80 образцов; ограничение обусловлено возможностями коммерческого набора)	-	пг/мл	Human MCP-1 ELISA kit, ThermoFisher, США

2.2.4 Секвенирование РНК одиночных клеток (scRNAseq)

Генетические исследования проводились в лаборатории общей, молекулярной и популяционной генетики ГНЦ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России в составе коллектива, состоящего из младших научных сотрудников Подшиваловой Е.С. и Зубрицкого А.В., а также лаборанта-исследователя Матросовой А.А. (зав. лабораторией – к.б.н. Попов С.В.).

2.2.4.1 Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (ПМНК)

Для выделения ПМНК использовались пробирки СРТ (Cell Preparation Tube, BD Vacutainer СРТ, США) с антикоагулянтом (гепарин натрия), разделительным гелем и разделительной жидкостью (Фиколл). BD Vacutainer® СРТ™ представляет собой полностью закрытую систему для выделения мононуклеарных клеток из цельной крови, в которой их разделение осуществляется непосредственно в первичной пробирке для сбора крови. Это снижает сложность этапов выделения мононуклеарных клеток, тем самым минимизируя вариабельность обработки образцов. Процедура начиналась с забора 8 мл периферической венозной крови в СРТ пробирки, которые затем плавно переворачивали 10 раз для равномерного смешивания крови с антикоагулянтом и предотвращения свертывания. Пробирки хранили и транспортировали при комнатной температуре в вертикальном положении. Далее следовало центрифугирование при 1800x g в течение 20 минут (включая разгон и торможение с минимальным ускорением) при комнатной температуре, что позволило разделить кровь на слои, включающие плазму, мононуклеарные клетки (периферические мононуклеары крови, ПМНК) и эритроциты.

2.2.4.2 Приготовление растворов для промывки:

- В состав промывочного раствора входили 800 мл 1х фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (SIGMA-ALDRICH, MERCK, США), 8 мл термически инактивированной фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и 1600 мкл этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), pH 8,0.
- Финальная концентрация компонентов 1х буфера для лизиса эритроцитов: Хлорид аммония 154,95 мМ, Гидрокарбонат калия 9,99 мМ, ЭДТА 0,1 мМ

Для очистки и подготовки образцов ПМНК к криохранению готовили однократные растворы: 1х раствор для промывки, 1х раствор для лизиса эритроцитов.

2.2.4.3 Промывка и криоконсервация ПМНК:

1. В центрифужные пробирки объемом 50 мл вносили 40 мл 1х раствора для промывки, переносили плазму с фракцией мононуклеаров, после чего образцы аккуратно перемешивали переворачиванием и центрифугировали при 300x g в течение 10 минут для отделения супернатанта при температуре 12°C.
2. Осадок клеток бережно ресуспендировали в 5 мл буфера для лизиса эритроцитов, инкубировали 5 минут, после чего добавляли 25 мл промывочного раствора и снова центрифугировали 300x g в течение 10 минут
3. По завершению второго этапа промывки супернатант удаляли, а осадок клеток аккуратно ресуспендировали в 3 мл промывочного раствора.
4. Из полученной суспензии отбирали 10 мкл и смешивали с 10 мкл раствора трипанового синего для оценки жизнеспособности клеток с использованием автоматического счетчика клеток Countess 3 FL Automated Cell Counter (Thermo FS, США).
5. После этого образцы вновь центрифугировали (300x g, 10 минут). Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 1 мл криопротекторного раствора CryoStor® CS10 (STEMCELL Technologies, США). Криопробирки помещали в специальную камеру для контролируемого охлаждения (Thermo Scientific, Mr. Frosty Freezing Container, США) при температуре –80°C на 24 часа. По завершению предварительного замораживания пробирки переносили в криохранилище при температуре -150°C для длительного хранения, рисунки 8 и 9.

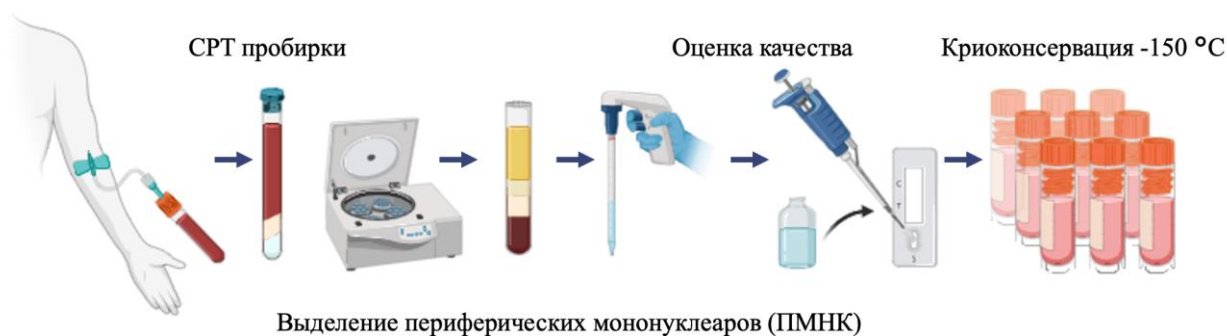


Рисунок 8 – Схема выделения ПМНК.

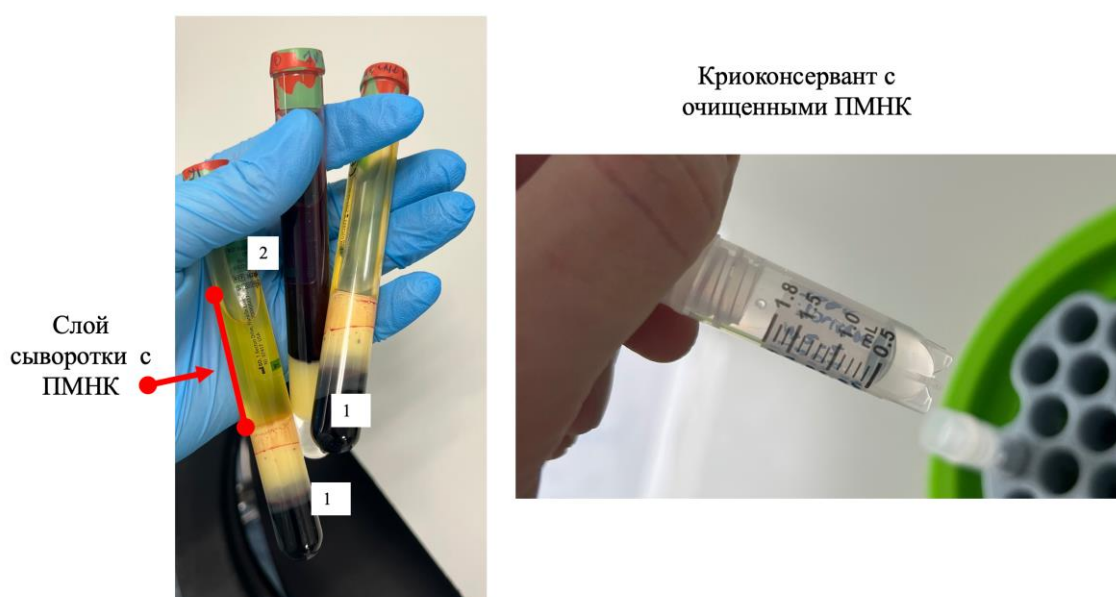


Рисунок 9 – Номер 1 – СРТ-пробирка после центрифугирования (1) и до центрифугирования (2). Справа – выделенные ПМНК в криоконсерванте.

Затем для проведения scRNAseq было выполнено четыре этапа.

2.2.4.5 Этап 1. Подготовка клеток после разморозки для scRNAseq

Размораживание и промывка клеток ПМНК

ПМНК, ранее замороженные в криопротекторе CryoStor CS10 при -150°C , размораживали на водяной бане в течение трех минут при $+37^{\circ}\text{C}$. Сразу после размораживания клетки ресуспендировали и переносили в фальконы, содержащие 12 мл стерильного промывочного раствора, состоящего из среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) и 10% термически инактивированного ФБС, для удаления криопротектора. Фальконы с клетками центрифугировали при $300\times g$ в течение 10 минут при температуре 12°C . Надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в 3 мл RPMI-1640 с 10% ФБС и помещали на лед для снижения деградации РНК. Дальнейшие манипуляции с клетками до момента секвенирования проводили на льду.

Подготовка клеточной суспензии для секвенирования

Суспензию пропускали через фильтр MACS 30 мкм (Miltenyi Biotec, Германия) для удаления агрегатов клеток и получения однородной суспензии одиночных клеток ПМНК. Количество клеток в полученных образцах и их жизнеспособность оценивали с использованием автоматического счетчика Countess 3 FL. Для проверки жизнеспособности клеток смешивали 10 мкл профильтрованной клеточной суспензии с 10 мкл трипанового синего. Жизнеспособность клеток в суспензии оценивали по показаниям счетчика автоматически как соотношение живых клеток (неокрашенные клетки) к мертвым клеткам (окрашенные клетки). Жизнеспособность более 90% свидетельствовала о хорошей сохранности образцов в процессе криохранения. Для дальнейших расчетов и манипуляций использовали значение живых клеток.

Концентрацию клеток после подсчета доводили до 3000 клеток/мкл с использованием среды RPMI-1640 с 10% содержанием ФБС. Точность концентрации обеспечивалась за счет последовательного подсчета и коррекции объема клеточной суспензии.

Все образцы секвенировали индивидуально, внося в лунку микрофлюидного чипа для генерирования GEM (Gel Beads-in-emulsion) частиц по 50 000 клеток. Для каждой лунки стремились к получению одинакового количества клеток, чтобы минимизировать вариативность между образцами.

2.2.4.6 Этап 2. Генерация GEMs и баркодирование клеток

Процедура проводилась с использованием наборов Chromium Next GEM Single Cell 5' Kit v2 и Chromium Next GEM Chip K Single Cell Kit (10x Genomics, США) согласно протоколу производителя Chromium Next GEM Single Cell 5' Reagent Kits v2 (Dual Index) CG000331 Rev E.

Подготовка мастер-микса и создание GEM

Клеточную суспензию объемом 16,7 мкл, содержащую около 50 000 клеток, смешивали с мастер-миксом, содержащим реагенты для обратной транскрипции РНК: RT Reagent B, Poly-dT RT Primer и Reducing Agent B. Все манипуляции проводили на льду для предотвращения деградации РНК. Готовую смесь, содержащую ПМНК, загружали в чип Chromium Next GEM Chip K. Чип помещали в прибор Chromium Controller (10x Genomic, США), в котором на основе принципов микрожидкостной микрофлюидики формировались капли GEM (Gel Beads-in-emulsion), содержащие одну клетку ПМНК, реагенты для обратной транскрипции и гелевую частицу с уникальным баркодом 10X Genomics. Далее суспензию частиц GEM помещали в термоциклер, где при температурном режиме, в соответствии с протоколом 10x Genomics, в каждой частице происходил лизис клеток и

обратная транскрипция клеточной РНК до кДНК с присоединением к 5'-концу каждой молекулы клеточной РНК уникальных баркодов для идентификации каждой клетки (рисунок 10).

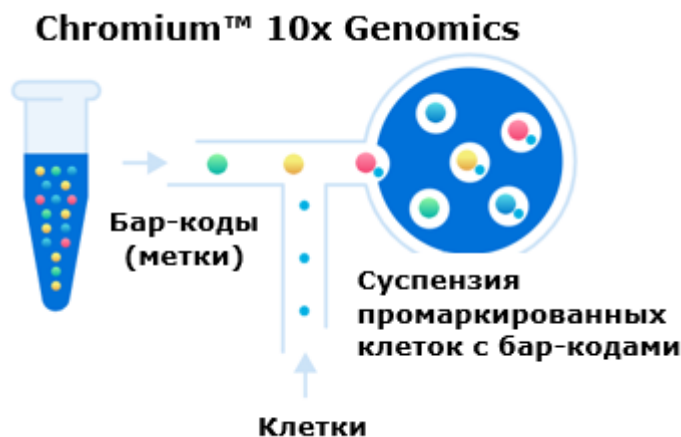


Рисунок 10 – Формирование GEMs (Gel Beads-in-emulsion)

Очистка и амплификация кДНК

После обратной транскрипции гибридные РНК-кДНК (комплементарная ДНК) фрагменты очищали с помощью магнитных частиц Dynabeads MyOne SILANE для удаления остатков реагентов. Затем одноцепочечную кДНК достраивали до двуцепочечной и амплифицировали посредством ПЦР для получения достаточного количества материала для последующего секвенирования, при этом сохранялись уникальные баркоды, для отслеживания принадлежности каждой молекулы кДНК к определенной клетке.

2.2.4.7 Этап 3. Подготовка библиотек

Фрагментация кДНК

Амплифицированную кДНК фрагментировали с 3'-конца до целевого размера фрагментов, подходящего для секвенирования. Оптимальная длина фрагментов составляла 200–500 пар оснований (п.о.), что обеспечивало высокое разрешение при секвенировании на платформе Illumina. После фрагментации проводили этап «репарации концов (end repair)», во время которого восстанавливали «липкие» концы двуцепочечных молекул кДНК до «тупых», чтобы подготовить фрагменты ДНК для универсального лигирования в библиотеке секвенирования.

Добавление А-хвостов, лигирование адаптеров и амплификация библиотек

На следующем этапе к «тупым» концам фрагментированной кДНК добавляли А-хвосты для подготовки к лигированию адаптеров. На этапе А-тейлинга (A-tailing) к 3'-концам фрагментов добавляли адениновые нуклеотиды (А-хвосты). Это делало концы фрагментов совместимыми с адаптерами для последующего лигирования и одновременно предотвращало нецелевое лигирование фрагментов.

Процесс А-тейлинга обеспечил совместимость с адаптерами и предотвратил нецелевое лигирование фрагментов друг с другом (рисунок 11).

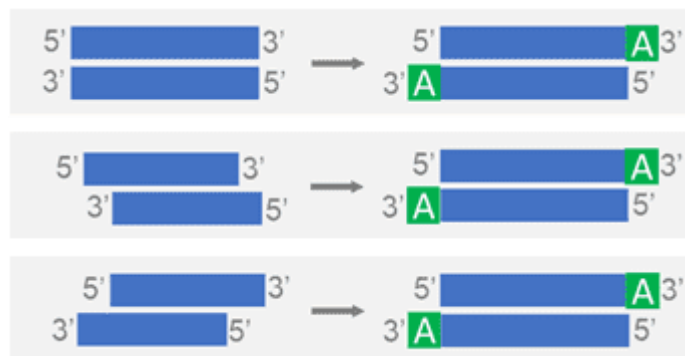


Рисунок 11 – А-тейлинг. Схема.

После добавления А-хвостов проводили этап лигирования адаптеров к фрагментам кДНК. Адаптеры содержали необходимые последовательности для отжига праймеров, используемых при секвенировании на платформе Illumina. Фрагментированные библиотеки с пришитыми адаптерами затем амплифицировали с помощью ПЦР для восстановления полноценной двухцепочечной структуры молекул после лигирования адаптеров и увеличения количества ДНК, необходимого для успешного секвенирования.

Индексирование библиотек

Финальный этап подготовки библиотек – индексирование. Для каждой библиотеки всем молекулам ДНК с обоих концов инкорпорировали уникальный индекс длиной 10 нуклеотидов из набора Dual Index Kit TT Set A (10x Genomics, США), который позволял идентифицировать принадлежность последовательности каждого ДНК-фрагмента конкретному пациенту после секвенирования. Индексирование библиотек также позволяло мультиплексировать образцы от разных пациентов в общий пул для секвенирования на платформе Illumina Novaseq 6000.

2.2.4.8 Этап 4. Секвенирование

Подготовка библиотек к загрузке на секвенатор

Перед загрузкой проводили качественный и количественный анализ готовых библиотек. Концентрацию ДНК-фрагментов измеряли с помощью Qubit 4 Fluorometer и набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Scientific, США). Для качественного анализа использовали систему Agilent Bioanalyzer и набор HS NGS Fragment Kit (1-6000 п.о.) (Agilent, США) и оценивали длину ДНК-фрагментов библиотек в соответствии с протоколом производителя. Целевая средняя длина фрагментов составляла 400-500 п.о. После подтверждения качества библиотеки мультиплексировали в эквимоллярных

концентрациях, соблюдая уникальность индексов в каждом пуле, чтобы одновременно секвенировать несколько образцов в одном запуске.

Загрузка на секвенатор

Для секвенирования готовых библиотек использовали платформу Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, США) и наборы реагентов для секвенирования NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 (300 cycles), которые обеспечивали максимальную производительность. На каждую ячейку для секвенирования загружали пул из 12 библиотек. Перед запуском концентрацию каждого пула библиотек нормализовали до $\sim 1,3$ нмоль/л, что соответствовало рекомендациям производителя для достижения оптимальной плотности кластеров на платформе с учетом длин библиотек.

Параметры секвенирования

Для секвенирования использовали режим paired-end sequencing (парноконцевое секвенирование) с длиной чтения 150 пар оснований. Для каждого образца было запланировано получение около 800 миллионов прочтений, что обеспечивало высокую глубину покрытия для подробного анализа экспрессии генов на уровне отдельных клеток. Целевая глубина покрытия составляла около 70 000–80 000 прочтений на клетку для большинства образцов, что позволяло получить высокое разрешение транскриптомного профилирования и обеспечить точный количественный анализ даже для редких транскриптов, принципиальная схема на рисунке 12.

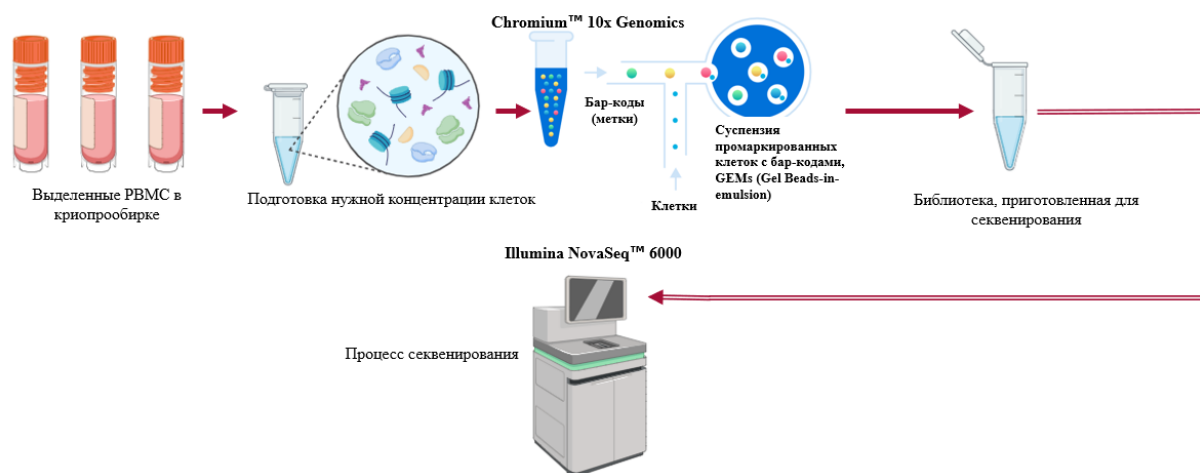


Рисунок 12 – Схематическое отображение этапов для проведения scRNAseq.

2.2.5 Биоинформатический анализ данных

Биоинформатический анализ проводился совместно с к.м.н. Чечехиным В.И.

Для этого проводилось последовательное использование ряда программ:

1. Cell Ranger (10x Genomics) и bcl2fastq2 представляют собой специализированные программные инструменты, предназначенные для первичной обработки «сырых» данных высокопроизводительного секвенирования, полученных на платформе Illumina NovaSeq 6000. Эти программы обеспечивают автоматизированное преобразование файлов BCL (Base Call Format) в формат FASTQ, а также выполнение первичной обработки прочтений (ридов), включая их картирование на референсный геном GRCh38 и подсчет уникальных молекулярных индексов (UMI, Unique Molecular Identifiers). Применение этих инструментов осуществляется на раннем этапе после завершения сеанса секвенирования с целью формирования высококачественных матриц экспрессии и расчета ключевых метрических параметров, таких как Sequencing Saturation (степень насыщения секвенирования).

2. SoupX — программный пакет на языке R, предназначенный для коррекции фоновой РНК (ambient RNA), которая может присутствовать в эмульсионных каплях (GEM), не содержащих полноценных клеток, и приводить к появлению ложных сигналов в данных секвенирования. Методология SoupX основана на построении модели «загрязнения» транскриптома и последующем устранении артефактных сигналов путем корректировки количественных значений экспрессии. Этот инструмент применяется сразу после формирования первичных матриц экспрессии (результатов работы Cell Ranger) с целью минимизации систематических ошибок и повышения надежности полученных данных.

3. scDblFinder — это метод, реализованный на языке R, предназначенный для выявления и исключения капель (GEM), содержащих более одной клетки (дублетов). Наличие дублетов в данных секвенирования одиночных клеток может приводить к искажению истинных профилей экспрессии и ошибочной аннотации клеточных субпопуляций. Применение scDblFinder проведено после этапа коррекции фоновой РНК, но до выполнения кластерного анализа и интеграции партийных (батч, batch effect) эффектов. Это позволяет минимизировать артефакты, связанные с присутствием смешанных транскриптомных сигналов, и повысить точность биологической интерпретации данных.

4. Scanpy — это высокопроизводительный программный пакет на языке Python, предназначенный для обработки и анализа данных секвенирования одиночных клеток. Он включает в себя ключевые этапы предобработки, такие как фильтрация клеток (например, по доле транскриптов митохондриальных генов), логарифмическая нормализация экспрессии, выделение переменных генов, кластеризация и построение двумерных

проекций с использованием алгоритмов UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection).

Scanpy использован после завершения первичной очистки данных, так как он позволяет определить основные клеточные кластеры, оценить показатели качества данных и подготовить основу для дальнейшего углубленного анализа, включая коррекцию партийных эффектов.

5. Harmony, BBKNN, scVI, scANVI, scGen и Seurat RPCA — это набор алгоритмов, предназначенных для интеграции данных секвенирования РНК одиночных клеток, полученных из различных партий. Их основная задача — устранение технических различий (batch effect) при анализе нескольких независимых экспериментальных запусков, обеспечивая сопоставимость данных без потери биологически значимых сигналов. Каждый из этих методов основан на специфическом статистическом подходе: например, Harmony применяет итеративную коррекцию главных компонент (PCA-based batch correction), BBKNN использует модифицированный алгоритм ближайших соседей, а scVI/scANVI/scGen реализуют подходы, основанные на вариационных автокодировщиках (VAE, Variational Autoencoder). Эти алгоритмы интеграции данных применяются после этапа базовой фильтрации клеток, но до их аннотации, что позволяет объединить все образцы в единую согласованную структуру, сохраняя при этом биологическую интерпретацию полученных кластеров.

6. scParadise и Azimuth — это инструменты для аннотации клеточных кластеров на основе сопоставления выявленных маркерных генов с обширными эталонными базами данных, такими как PBMC (peripheral blood mononuclear cells) reference datasets. Их применение позволяет формально присвоить клеточным группам конкретные иммунные фенотипы, что критически важно для биологической интерпретации данных секвенирования одиночных клеток. scParadise использует методы машинного обучения, а также заранее заданные маркерные гены для детальной субтипизации популяций Т-лимфоцитов (например, CD4⁺ naive, Treg и другие). В отличие от него, Azimuth представляет собой инструмент с удобным интерфейсом, который позволяет быстро и автоматически сопоставлять кластеры клеток с референсными профилями на основе предобученных моделей. Эти методы применены после интеграции партийных эффектов и первичной кластеризации, что обеспечивает стандартизированный и воспроизводимый процесс аннотации клеточных популяций.

7. PyDESeq2 — это адаптированная версия классического метода дифференциальной экспрессии DESeq2, реализованная на языке Python и оптимизированная для анализа псевдобалковых данных (pseudobulk), полученных методом

scRNAseq. Метод основан на моделировании отрицательного биномиального распределения, что позволяет корректно оценивать различия в уровне генной экспрессии между исследуемыми группами (например, LADA относительно здоровых) с учетом статистических поправок, таких как метод Бенджамини–Хохберга (False discovery rate, FDR-коррекция). Использование PyDESeq2 выполнено на завершающем этапе анализа, после аннотации клеток и формирования псевдобалковых матриц для каждой клеточной субпопуляции. Это позволяет статистически значимо выявить дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ), что критически важно для последующей биологической интерпретации полученных данных.

8. decoupler, PROGENy и g:Profiler — это совокупность инструментов, предназначенная для функциональной интерпретации выявленных различий в транскриптом, позволяющая связать дифференциальную экспрессию генов с биологическими процессами и сигнальными путями. Decoupler (реализован на языке R) рассчитывает активность сигнальных путей (JAK-STAT, NF-κB, WNT и др.) и транскрипционных факторов, используя модели линейной регрессии, основанные на экспрессии целевых генов. PROGENy (Pathway RespOnsive GENes) агрегирует экспрессию специфических признаков генов и сводит её к интегральному показателю активности конкретного сигнального пути, что позволяет количественно оценить изменения в клеточной сигнальной сети. g:Profiler (доступен в виде веб-сервиса и R-пакета) выполняет функциональную аннотацию генов и анализ функционального обогащения (enrichment analysis) по базам данных GO (Gene Ontology), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) и другим онтологиям. Эти инструменты применены на завершающем этапе анализа, когда было необходимо интерпретировать статистически значимые гены в контексте биологических процессов, сигнальных каскадов и клеточных механизмов, что критически важно для формулирования биологических гипотез и последующих исследований.

2.2.5.1 Cell Ranger (версия 7.1.0, 10x Genomics) совместно с bcl2fastq2 (версия 2.20)

(1) *Первичная обработка секвенированных данных.* Исходные данные, полученные в виде файлов в бинарном формате BCL (Base Call File) с секвенатора Illumina NovaSeq 6000, предварительно преобразуются в текстовый формат FASTQ при помощи программы bcl2fastq2. В процессе этого преобразования для каждого прочтения (рида, англ. read) вычисляется показатель качества — Phred score. Чем выше значение Phred score, тем меньше вероятность ошибки при идентификации конкретного нуклеотида.

(2) *Связывание прочтений с клетками посредством баркодов.* В технологии scRNAseq от 10x Genomics каждая капля эмульсии (GEM) несёт уникальный клеточный баркод (barcode). Все риды, помеченные идентичным баркодом, относят к единой клетке при условии отсутствия признаков так называемого «дублета» (doublet), то есть случайного попадания двух клеток в одну микрокаплю. Подобная процедура группировки позволяет однозначно соотнести каждый рид с транскриптом конкретной клетки.

(3) *Выравнивание прочтений и контроль их качества.* После формирования FASTQ-файлов запускается программное обеспечение Cell Ranger, осуществляющее выравнивание полученных прочтений на референсный геном человека (в данной работе применена версия — GRCh38-2020-A). Выравнивание проводилось с помощью встроенного алгоритма, являющегося модифицированной версией программы STAR (Spliced Transcripts Alignment to a Reference). При выполнении выравнивания учитываются стандартные показатели качества выравнивания, аналогичные MAPQ (Mapping Quality Score), общее количество совпадений с референсным геномом, а также наличие множественных (неоднозначных) выравниваний. Риды низкого качества исключались из анализа или получали сниженный весовой коэффициент.

(4) *Подсчёт уникальных молекулярных идентификаторов и фильтрация микрокапель.* Для исключения повторного подсчёта амплификационных дублей в Cell Ranger применялась специализированная статистическая модель, основанная на анализе комбинаций «баркод клетки (barcode) + уникальный молекулярный идентификатор (UMI, Unique Molecular Identifier) + транскрипт». Кроме того, программа реализует алгоритм фильтрации и отбраковки «пустых» микрокапель, содержащих крайне низкое количество транскриптов, что существенно снижает уровень фонового шума в итоговых данных и позволяет сформировать качественную матрицу типа «клетка × ген».

(5) *Формирование матриц экспрессии генов и расчёт вспомогательных метрик.* В результате работы программы Cell Ranger создаются файлы, содержащие количественные данные о геномном экспрессионном профиле клеток в формате .h5 (HDF5) или .mtx (Matrix Market Exchange Format), а также файлы расчётных показателей качества (например, доля прочтений, относящихся к клеткам — Fraction Reads in Cells, среднее число прочтений на одну клетку — Mean Reads per Cell и другие параметры). Кроме того, формируется сводный отчёт (Web Summary), включающий ключевые статистические показатели, графики и таблицы для оценки глубины секвенирования и уровня фонового сигнала. Таким образом, совместное применение программ Cell Ranger и bcl2fastq2 создаёт надёжную основу для дальнейших этапов анализа данных секвенирования РНК одиночных клеток.

2.2.5.2 SoupX (версия 1.6.2) для языка программирования R (версия 4.2.1)

(1) *Постановка задачи и входные данные.* Программа SoupX, реализованная на языке программирования R, предназначена для устранения ложной экспрессии генов, возникающей вследствие контаминации данных транскриптомов одиночных клеток посторонней (фоновой, ambient) РНК. Подобная контаминация наблюдается при попадании небольшого количества свободных транскриптов в микрокапли, не содержащие полноценные клетки. На вход алгоритму поступает матрица формата «клетка × ген», полученная в результате первичного анализа данных (после обработки с помощью программы Cell Ranger), в которой уже определены клеточные баркоды и произведён подсчёт уникальных молекулярных идентификаторов (UMI), соответствующих отдельным молекулам мРНК.

(2) *Алгоритм выявления фоновой («суповой» от англ. soup) РНК.* Изначально алгоритм SoupX идентифицирует гены, экспрессия которых в исследуемой популяции клеток априори невозможна или крайне маловероятна (так называемые псевдонегативные маркеры). Присутствие даже незначительного уровня экспрессии таких генов рассматривается как следствие фонового загрязнения данных. На основе этих наблюдений алгоритм создаёт математическую модель фонового сигнала («модель супа»), позволяющую количественно оценить вклад фоновой экспрессии в каждый ген.

(3) *Коррекция исходной матрицы.* После определения доли фонового сигнала для каждого гена алгоритм вычисляет объём контаминирующей («суповой») РНК, приходящийся на каждую клетку. Вычисленное значение вычитается из исходных показателей экспрессии генов в каждой клетке, что позволяет устранить вклад случайных транскриптов. Алгоритм реализует процедуру коррекции таким образом, чтобы итоговые значения экспрессии никогда не становились отрицательными. Параметры коррекции подбираются путём итеративного процесса, который продолжается до тех пор, пока распределения псевдонегативных генов не достигнут ожидаемого низкого уровня (стремящегося к нулю).

(4) *Контроль качества проведённой коррекции.* Хотя алгоритм SoupX не рассчитывает традиционные р-значения, он предоставляет внутренние контрольные метрики, отражающие успешность устранения нежелательной фоновой экспрессии, особенно в области так называемой «хвостовой» экспрессии (низко экспрессируемых генов).

(5) *Итоговые данные и практическая значимость.* Результатом работы алгоритма SoupX является очищенная матрица формата «клетка × ген», предоставляемая в виде файлов формата .RDS (R Data Serialization) или .h5 (HDF5). Эта скорректированная матрица используется на последующих этапах анализа, включая фильтрацию клеток и генов, а также процедуры кластеризации. Таким образом, применение SoupX способствует повышению точности оценки истинного транскриптомного профиля отдельных клеток и обеспечивает более надёжную интерпретацию данных секвенирования РНК одиночных клеток.

2.2.5.3 scDblFinder (версия 1.12.0) для языка программирования R (версия 4.2.1)

(1) *Основная задача и входные данные.* Программный пакет scDblFinder, реализованный на языке программирования R, предназначен для выявления так называемых «дублетов» (англ. doublets) — ситуаций, когда в одной микрокапле оказываются одновременно две и более клеток, что приводит к формированию смешанного транскриптомного профиля. На вход алгоритму подаётся матрица экспрессии генов формата «клетка × ген», предварительно очищенная от фоновой РНК с помощью пакета SoupX. Основная цель применения scDblFinder заключается в обнаружении и последующем исключении клеток-дублетов, которые способны исказить результаты последующей кластеризации и аннотации клеточных популяций.

(2) *Генерация искусственных («модельных») дублетов.* Центральным элементом алгоритма scDblFinder является процедура создания искусственных дублетов, которые формируются путём попарного объединения (суммирования) транскриптомных профилей случайно выбранных реальных клеток из исследуемого набора данных. Таким образом создаются искусственные (модельные) профили смешанных клеток, максимально приближенные к биологическим дублетам, что позволяет использовать их в качестве эталонных профилей при дальнейших расчётах.

(3) *Сравнение реальных клеток с искусственными дублетами.* На следующем этапе алгоритм рассчитывает степень сходства транскриптомного профиля каждой реальной клетки с набором созданных искусственных дублетов. В качестве метрики сходства может применяться коэффициент корреляции Пирсона или другие расстояния (метрики). В случае если наблюдаемое сходство реальной клетки с модельными дублетами превышает заданный уровень, эта клетка помечается как потенциальный («возможный») дублет.

(4) *Расчёт вероятностного показателя (score) и выбор порога отсеечения.* Алгоритм формирует распределение рассчитанных мер сходства и устанавливает пороговое значение (threshold), разделяющее клетки на три категории: одиночные клетки (singlets), дублеты (doublets) и клетки с неопределённым статусом (uncertain). Программа scDblFinder не рассчитывает традиционные р-значения, вместо этого используются внутренние

эвристические показатели, такие как вероятностный скор (score), представленный в виде логарифмической вероятностной шкалы. Итоговый порог отсекается устанавливается с учётом распределения этих показателей.

(5) *Результирующие данные и их практическая значимость.* Итогом работы алгоритма scDblFinder является таблица, в которой каждой исследуемой клетке присваивается метка («одиночная клетка» или «дублет») и соответствующее численное значение вероятностного показателя (score). В дальнейшем клетки, идентифицированные как дублиеты, могут быть удалены из датасета или подвергнуты дополнительной ручной проверке. Таким образом, использование пакета scDblFinder позволяет существенно повысить точность кластеризации клеток и аннотации клеточных типов за счёт своевременного обнаружения и исключения искажений, связанных с наличием смешанных транскриптомных профилей.

2.2.5.4 Scanpy (версия 1.10.2) для языка программирования Python (версия 3.9.16)

(1) *Входные данные и первичная фильтрация клеток.* Пакет Scanpy (версия 1.10.2, язык программирования Python версии 3.9.16) принимает на вход матрицу экспрессии генов формата AnnData («клетка × ген»), полученную после предварительной обработки с использованием программ Cell Ranger и SoupX. На начальном этапе анализа проведена фильтрация клеток по следующим критериям: минимальное число экспрессируемых генов в клетке — 200, максимально допустимый процент транскриптов митохондриальных генов — 6 %, максимально допустимый процент экспрессии генов теплового шока (Heat Shock Genes) — 2 %. Эти пороговые значения выбраны эмпирически и позволили исключить низкокачественные клетки, которые могли бы исказить результаты последующих шагов анализа.

(2) *Нормализация данных, логарифмическое преобразование и выделение высоковариабельных генов (HVGs).* После первичной фильтрации выполняется нормализация данных: значения экспрессии генов в каждой клетке приводятся к единому масштабу путём деления на суммарное число уникальных молекулярных идентификаторов (UMI) в клетке с последующим умножением на коэффициент масштабирования (обычно 10^4). Далее к нормализованным данным применяется логарифмическое преобразование по формуле $\ln(1 + \text{нормализованное значение экспрессии})$. На следующем этапе выявляются высоковариабельные гены (HVGs, Highly Variable Genes), с использованием метода Seurat v3, который вычисляет дисперсию (variance) генов и Z-оценки (Z-score), отражающие степень вариабельности генов в популяции клеток. Гены с Z-оценками выше заданного порога классифицируются как высоковариабельные и используются в дальнейших аналитических процедурах.

(3) *Снижение размерности с использованием главных компонент (PCA) и построение графа ближайших соседей (kNN).* Для снижения размерности данных и уменьшения влияния шумовых эффектов применяется метод анализа главных компонент (PCA, Principal Component Analysis). PCA реализует декомпозицию исходной матрицы экспрессии X на матрицы T (scores) и P (loadings) по формуле $X = T \times P^T + E$, где E представляет собой остаточные ошибки. Данные затем представлены в пространстве первых k главных компонент. После этого строится граф ближайших соседей (k-Nearest Neighbors, kNN), в котором расстояния между клетками в PCA-пространстве рассчитываются с использованием одной из стандартных метрик, например, евклидова расстояния. Полученный kNN-граф является основой для последующей кластеризации клеток.

(4) *Кластеризация клеток методами Leiden и Louvain, визуализация результатов методом UMAP.* Для кластеризации клеток используются графовые методы Leiden и Louvain, которые оптимизируют разбиение клеточного графа путём итеративного повышения показателя модульности Q . В результате клетки группируются в оптимальные кластеры, отражающие сходство их транскриптомных профилей. Для визуализации полученных кластеров в двумерном пространстве применяется алгоритм UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection). UMAP представляет собой стохастический метод, позволяющий эффективно отобразить взаимное расположение клеточных кластеров без формального вычисления p -значений статистической значимости.

(5) *Дифференциальный анализ экспрессии генов и итоговые результаты.* С помощью функции `sc.tl.rank_genes_groups` в Scanpy проводится дифференциальный анализ экспрессии генов между кластерами, например, с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Полученные p -значения корректируются методом Бенджамини–Хохберга для контроля доли ложных открытий (False Discovery Rate, FDR). Итоговые результаты, включающие информацию о высоковариабельных генах (HVGs), главных компонентах (PCA), принадлежности клеток к кластерам и другие метаданные, сохраняются в формате AnnData (.h5ad). Таким образом, Scanpy обеспечивает стандартизированный и интегрированный метод обработки и анализа данных секвенирования транскриптома одиночных клеток, объединяя первичную фильтрацию, нормализацию, кластеризацию и выявление маркерных генов в рамках единого аналитического процесса.

2.2.5.5 Интеграция данных: scVI, scANVI (scvi-tools 1.1.5), Seurat RPCA (Seurat 5.1.0), Harmony (harmony-pytorch 0.1.8), scGen (2.1.1), BBKNN (1.6.0)

(1) *Причины применения методов интеграции данных.* При объединении данных транскриптомного анализа одиночных клеток, полученных в разных партиях образцов, возникает феномен так называемого «батчэффекта» (batch effect). Батчэффект характеризуется систематическим искажением данных, обусловленным техническими различиями между партиями образцов (например, подготовкой библиотек, условиями секвенирования, типом оборудования). Эти технические отклонения могут маскировать или преувеличивать биологические различия, затрудняя интерпретацию результатов. Для преодоления батчэффекта разработаны специальные методы интеграции данных, среди которых выделяют: scVI/scANVI, Seurat RPCA, Harmony, scGen и BBKNN.

(2) *scVI и scANVI (scvi-tools 1.1.5).* Методы интеграции scVI (single-cell Variational Inference) и его расширение scANVI (single-cell Annotation using Variational Inference) базируются на подходе вариационных автокодировщиков (Variational Autoencoders, VAE). Это вероятностные модели машинного обучения, которые переводят исходные данные в латентное (скрытое) пространство более низкой размерности. В таком латентном представлении влияние технических факторов (батчей) минимизируется. Метод scANVI дополнительно позволяет использовать предварительно известные клеточные аннотации (например, тип клеток) для предотвращения нежелательного смешивания различных клеточных популяций, что повышает биологическую точность интеграции.

(3) *Seurat RPCA и Harmony (Seurat 5.1.0, harmony-pytorch 0.1.8).* Seurat RPCA (Reciprocal PCA) представляет собой метод, основанный на поиске «якорных» клеток («anchors») между батчами. Эти «якорные» клетки являются транскриптомно сходными образцами, обнаруженными в разных партиях образцов. На основе таких якорей проводится коррекция данных, позволяющая минимизировать технические различия, но сохранить биологическую информацию. Harmony использует другой подход, который основан на итеративном процессе согласования данных между партиями. Суть метода заключается в том, что он последовательно минимизирует различия между партиями путём корректировки положения клеток в пространстве главных компонент. При этом метод сохраняет кластерную структуру, стараясь не смешивать биологически разные типы клеток. Harmony позволяет достичь высокой степени интеграции партий данных при минимальных потерях биологического сигнала.

(4) *scGen* и *BBKNN* (*scGen* 2.1.1, *BBKNN* 1.6.0). *scGen* также относится к классу вариационных автокодировщиков, но его особенностью является способность моделировать не только технические различия между батчами, но и различия, вызванные экспериментальными условиями (например, различия в подготовке клеток). Благодаря этому *scGen* особенно полезен, когда требуется прогнозировать, как повлияют разные условия на транскриптомный профиль клетки.

BBKNN (Batch Balanced K-Nearest Neighbors) является графовым методом интеграции, который строит сбалансированный граф ближайших соседей. Его ключевая особенность состоит в том, что каждая партия данных представлена в графе равномерно, что предотвращает доминирование клеток из какого-либо одного батча. Такой подход обеспечивает корректное представление каждого образца и уменьшает техническое смещение при последующей кластеризации.

(5) *Метрики оценки интеграции и статистическая значимость*. Ни один из перечисленных выше методов интеграции не предоставляет напрямую классических p -значений, что связано с их конструкцией и алгоритмами. Вместо этого для оценки эффективности интеграции данных и успешности устранения батчэффекта применяются специализированные метрики качества, наиболее распространённые из которых включают:

1. ASW (Average Silhouette Width) — оценивает компактность и чёткость кластеров после интеграции.
2. kBET (k-nearest neighbor Batch Effect Test) — количественно оценивает, насколько равномерно представлены партии данных среди ближайших соседей клеток.
3. LISI (Local Inverse Simpson Index) — измеряет степень смешивания партий в локальном окружении клеток.
4. PCR_batch — оценивает процент дисперсии, объясняемый батчэффектом, после интеграции.
5. ARI (Adjusted Rand Index) — количественно сравнивает соответствие кластерных решений до и после интеграции с заранее известными аннотациями клеток.

Статистическая значимость достигнутых улучшений интеграции дополнительно оценивается непараметрическими методами, такими как перестановочные тесты (permutation tests) и бутстрэп-анализ (bootstrap analysis). Это позволяет объективно подтвердить устойчивость полученных результатов и их биологическую значимость.

Таким образом, применение указанных методов интеграции (*scVI/scANVI*, *Seurat RPCA*, *Harmony*, *scGen* и *BBKNN*) даёт возможность существенно снизить влияние батчэффекта, повысить качество анализа транскриптомных данных и обеспечить точность последующих биологических выводов при анализе одиночных клеток.

2.2.5.6 Автоматическая аннотация клеток: scParadise и Azimuth

(1) *Общие принципы автоматической аннотации.* При анализе данных транскриптома одиночных клеток после этапа кластеризации возникает задача биологической интерпретации кластеров, то есть присвоения клеткам соответствующих клеточных типов (например, CD4⁺ T naïve, B memory и др.). Для автоматического выполнения этой задачи используются специализированные инструменты, такие как scParadise и Azimuth, которые сопоставляют клетки из анализируемого набора («запросные» или query-клетки) с заранее аннотированными клетками из эталонного набора («референсные» или reference-клетки). Результатом такой аннотации становится автоматическое присвоение клеточных типов каждой клетке с указанием степени уверенности такого присвоения.

(2) *scParadise: нейросетевая классификация.* Метод scParadise реализует подход, основанный на машинном обучении с использованием многоступенчатой нейросетевой классификации. Вначале выполняется снижение размерности данных, например, с помощью вариационного автокодировщика или метода главных компонент. Затем данные подаются на многоуровневый классификатор, реализованный в виде нейронной сети или алгоритма градиентного бустинга. В процессе обучения классификатора используется функция потерь, основанная на мультиклассовой кросс-энтропии, оптимизирующая модель таким образом, чтобы минимизировать ошибки классификации клеток по типам.

Для повышения стабильности и обобщающей способности модели дополнительно применяются регуляризующие техники, такие как L2-регуляризация и метод Dropout. Итогом работы метода scParadise является вероятностный вывод — модель для каждой клетки вычисляет вероятность принадлежности к каждому из заданных биологических типов. Чем выше вычисленная вероятность, тем увереннее модель присваивает метку данному типу клеток. Хотя scParadise не рассчитывает формальных статистических значений, инструмент предоставляет энтропийные показатели («entropy scores»), позволяющие косвенно оценить надёжность автоматической классификации.

(3) *Azimuth: подход на основе поиска якорных клеток (anchors).* Метод Azimuth (использующий алгоритмическую основу инструмента Seurat) реализует подход, основанный на поиске ближайших «якорных» (anchor) клеток в референсном наборе, уже размеченном по клеточным типам. Аннотация query-клеток производится методом взвешенного голосования: для каждой клетки определяется группа ближайших эталонных соседей, и клетка получает тот клеточный тип, который наиболее часто встречается среди её соседей.

Azimuth предоставляет внутренний показатель (prediction score от 0 до 1), отражающий степень согласованности соседей при голосовании. Чем выше этот показатель, тем более достоверной является присвоенная клетке аннотация. Несмотря на отсутствие прямых *p*-значений, этот индикатор позволяет косвенно оценивать статистическую значимость результатов аннотации.

(4) *Оценка качества аннотации и статистическая значимость.* Оба подхода (scParadise и Azimuth) позволяют количественно оценить качество аннотации при наличии набора клеток с заранее известными («истинными») метками. Для оценки используются классические показатели качества классификации, такие как точность (accuracy), интегральная метрика точности F1-score и площадь под кривой ROC (ROC-AUC).

В ситуациях, когда истинные аннотации известны лишь для части данных, дополнительно используют показатели согласованности кластеризации, такие как скорректированный индекс Рэнда (Adjusted Rand Index, ARI) или нормализованная взаимная информация (Normalized Mutual Information, NMI).

Статистическую значимость улучшений качества аннотации по сравнению со случайным присвоением меток определяют при помощи перестановочных тестов или аналогичных статистических процедур, позволяющих убедиться в том, что полученная аннотация значимо превосходит случайную.

(5) *Выводы.* Таким образом, методы автоматической аннотации scParadise (нейросетевая классификация с вероятностной оценкой) и Azimuth (метод якорных соседей с взвешенным голосованием) позволяют эффективно автоматизировать процесс присвоения биологических меток клеточным кластерам. Их применение обеспечивает быструю, воспроизводимую и биологически обоснованную идентификацию клеточных типов, существенно облегчая интерпретацию результатов анализа данных scRNA-seq.

2.2.5.7 Анализ дифференциальной экспрессии генов с помощью pydeseq2 (версия 0.4.10) и decoupler (версия 1.8.0)

(1) *Назначение инструментов pydeseq2 (0.4.10) и decoupler (1.8.0).* При сравнении различных групп клеток (например, «пациенты с LADA относительно здоровых добровольцев») необходимо корректно выявить дифференциально экспрессированные гены (ДЭГ), а также понять, какие биологические пути или транскрипционные факторы (ТФ) ответственны за наблюдаемые изменения. Для решения этих задач были применены два специализированных программных инструмента: pydeseq2 — реализация статистического подхода DESeq2 на языке Python, и decoupler — инструмент для последующего функционального анализа активации сигнальных путей и транскрипционных факторов.

(2) *Методика анализа дифференциальной экспрессии (pydeseq2)*. Алгоритм pydeseq2 использует статистическую модель на основе отрицательного биномиального распределения. Для каждого гена моделируется его экспрессия в виде отрицательного биномиального распределения, параметры которого зависят от среднего уровня экспрессии и дисперсии. Среднее значение экспрессии описывается с помощью лог-линейной регрессии, что позволяет учесть влияние исследуемых условий (например, принадлежность к группе пациентов или здоровых добровольцев).

Основным этапом анализа является проверка статистической значимости различий между группами при помощи теста Вальда. Этот тест проверяет нулевую гипотезу об отсутствии различий в экспрессии генов между группами. Поскольку анализ включает большое количество генов, полученные р-значения подвергаются обязательной поправке на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга.

(3) *Стабилизация оценок и эмпирическое сглаживание дисперсий*. Pydeseq2 также применяет специальный механизм эмпирического байесовского сглаживания («shrinkage») для оценки дисперсий генов. Это позволяет стабилизировать оценки дисперсии, особенно для генов с низким уровнем экспрессии, уменьшая вероятность ложных находок. Итогом работы метода является надёжный список дифференциально экспрессированных генов с указанием степени и направления изменений (значение \log_2 fold change), а также скорректированных FDR-значений, отражающих статистическую значимость наблюдаемых различий.

(4) *Анализ сигнальных путей и транскрипционных факторов (decoupler)*. После выявления дифференциально экспрессированных генов возникает вопрос о том, какие сигнальные пути и транскрипционные факторы задействованы в наблюдаемых изменениях. Для этого применяется инструмент decoupler, который позволяет количественно оценить активацию или подавление сигнальных путей и транскрипционных факторов. В основе подхода лежит использование предварительно известных моделей и баз данных регуляторных взаимодействий, что позволяет рассчитать интегральные показатели («scores») активности каждого пути или транскрипционного фактора.

Для оценки статистической значимости активации или подавления сигнальных путей и факторов применяются стандартные статистические критерии, такие как t-тест или тест Манна–Уитни, после чего полученные р-значения также подвергаются коррекции методом Бенджамини–Хохберга.

(5) *Результат и биологическая интерпретация.* Совместное применение методов pydeseq2 и decoupler позволяет получить комплексное представление о биологических изменениях: определяется набор достоверно дифференциально экспрессированных генов, а также устанавливаются потенциальные сигнальные механизмы и транскрипционные факторы, ответственные за эти изменения (например, активация сигнального пути JAK-STAT или подавление PI3K-каскада). В результате достигается интегрированная биологически осмысленная картина, связывающая наблюдаемые изменения генов с конкретными регуляторными сетями и клеточными процессами.

Таким образом, инструменты pydeseq2 и decoupler обеспечивают получение надёжных, статистически подтверждённых и биологически интерпретируемых результатов, существенно облегчая понимание механизмов, лежащих в основе дифференциальной экспрессии при сравнении различных групп клеток.

2.2.5.8 Композиционный анализ клеточных типов с помощью Pertpy (версия 0.9.4)

(1) *Цель и общие принципы композиционного анализа.* Композиционный анализ с использованием программного пакета Pertpy (версия 0.9.4) был направлен на выявление статистически значимых различий в пропорциях различных субпопуляций иммунных клеток (например, CD4+ T-naïve, CD8+ T-effector, В-клетки памяти и др.) между группами пациентов (СД1, LADA, СД2) и здоровыми добровольцами. Общая логика подхода включает автоматическую аннотацию клеток по типам, последующий подсчёт клеток каждого типа в исследуемых группах и статистическое сопоставление полученных пропорций.

(2) *Формирование таблицы сопряжённости и вычисление пропорций.* Данные для композиционного анализа представлялись в виде таблицы сопряжённости («группа × клеточный тип»). В этой таблице строки соответствуют исследуемым группам (например, «СД1», «LADA», «здоровые»), а столбцы – различным клеточным типам. Каждая ячейка таблицы содержит число клеток соответствующего типа, обнаруженных в конкретной группе. Затем рассчитываются относительные доли каждого клеточного типа внутри групп (отношение количества клеток данного типа к общему числу клеток в группе). Эти доли и подвергаются дальнейшему статистическому анализу.

(3) *Используемые статистические тесты.* Для оценки статистической значимости различий пропорций между группами применяются следующие статистические методы:

1. χ^2 -тест (тест хи-квадрат) — используется для общей оценки наличия статистически значимых различий в распределении пропорций клеточных типов между исследуемыми группами. Чем больше значение χ^2 -статистики, тем менее вероятно, что наблюдаемые различия случайны.

2. Точный тест Фишера — применяется при небольшом числе наблюдений, когда в некоторых ячейках таблицы сопряжённости находится менее пяти клеток. Данный тест вычисляет точное р-значение.
3. GLM (Generalized Linear Models, обобщённые линейные модели) — позволяют учитывать дополнительные переменные (например, возраст или пол пациента). В таком случае используется логистическая регрессия, в которой пропорция клеточного типа моделируется с учётом указанных факторов. Это даёт возможность оценить влияние групп на пропорции клеток с поправкой на другие характеристики пациентов.

(4) *Коррекция на множественные сравнения.* Поскольку одновременно анализируется несколько клеточных типов была использована поправка на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга. Итоговые скорректированные р-значения (p_{adj}) менее 0,05 трактовались как статистически значимые. Например, если у пациентов с LADA значительно снижается доля наивных CD4⁺ Т-клеток, этот результат будет подтверждён соответствующим скорректированным р-значением.

(5) *Биологическая значимость и выводы композиционного анализа.* Композиционный анализ с помощью Pertpy позволяет надёжно и статистически обоснованно выявить различия в составе иммунных клеток между исследуемыми группами. В результате можно получить чёткие выводы о специфических иммунологических паттернах, таких как увеличение доли эффекторных Т-клеток при СД1 или смещение пропорций в пользу В-клеток памяти при СД2. Подобная информация существенно дополняет данные анализа дифференциальной экспрессии генов и формирует более целостную картину иммунного статуса изучаемых групп [123-139].

2.2.6 Статистический анализ

Анализ данных производился в пакете статистических программ IBM SPSS Statistics 26 (IBM Corp, США). Описательная статистика: количественные признаки представлены в виде медианы и 1-го, 3-го квартилей (Me [Q1; Q3]), а качественные параметры — в виде абсолютных (n) и относительных (%) частот. Сравнение трех и более независимых групп проводили с использованием теста Краскела-Уоллиса с последующим post-hoc анализом. Для анализа качественных данных применен метод Хи-квадрат. Для оценки диагностической точности теста использовали ROC-анализ с вычислением AUC (площадь под ROC-кривой). Критический уровень значимости определяли как $p < 0,05$. Для устранения эффекта множественных сравнений использовалась поправка Бонферрони. Значения p , превышающие порог статистической значимости, но менее 0,05,

интерпретировались как тенденция к статистической значимости. Имеющиеся пропуски данных не заполнялись, чтобы избежать статистического смещения результатов.

При биоинформатическом анализе применены следующие методы: нормализация данных методом логарифмирования (shifted logarithm normalization) для матриц экспрессии генов; анализ главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) и построение графа ближайших соседей (k-Nearest Neighbors, kNN) для снижения размерности и оценки сходства транскриптомных профилей клеток; кластеризация клеток алгоритмами Leiden и Louvain для выделения клеточных субпопуляций; оценка дифференциальной экспрессии генов между исследуемыми группами с использованием теста Вальда с отрицательным биномиальным распределением; композиционный анализ клеточных популяций (χ^2 -тест, точный тест Фишера) для сравнения пропорций клеточных типов между группами; а также анализ активности сигнальных путей и транскрипционных факторов с использованием одномерных и многомерных линейных моделей для функциональной интерпретации данных дифференциальной экспрессии. Также применялся тест Краскела-Уоллиса с последующим тестом Тьюки. Для анализа данных секвенирования РНК одиночных клеток применяли поправку на множественные сравнения методом Бенджамини-Хохберга.

2.2.7 Этическая экспертиза

Локальный этический комитет при ГНЦ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России одобрил возможность проведения данной научно-исследовательской работы, выписка из протокола №18 от 12 октября 2022г. Всеми пациентами подписано информированное согласие на участие в исследовании.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Клиническая характеристика пациентов и здоровых добровольцев

3.1.1 Результаты

В исследование было включено 82 участника (23 пациента с СД1, 22 с СД2, 15 с LADA и 22 здоровых добровольца). Ключевые демографические и антропометрические показатели представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Основные клинические характеристики пациентов, включенных в исследование.

Показатели	СД1 N = 23	СД2 N = 22	LADA N = 15	Здоровые добровольцы N = 22	P*
Пол – муж, n (%)	12 (52%)	19 (86%)	7 (47%)	11 (50%)	0,03*
Возраст, лет	26 [21; 31]	41 [34; 51]	40 [34; 45]	33,5 [27; 42]	<0,001**
Длительность заболевания, месяцев	6 [2; 8]	5 [3; 24]	38 [19; 53]	Не применимо	<0,001
ИМТ, кг/м ²	22,3 [20,1; 23,8]	30,1 [28,9; 31,8]	23 [20,1; 23,9]	24,8 [20,6; 28,3]	<0,001

*Сравнение качественных признаков между группами проведено методом Хи-квадрат, ожидаемые частоты в каждой из групп были более 5. **Сравнение количественных признаков проведено при помощи критерия Краскала-Уоллиса, применена поправка на множественность сравнений методом Бонферрони, уровнем статистической значимости считали $p < 0,008$.

Анализ распределения по полу показал, что в группе СД1 мужчины составили 52%, что согласуется с общемировыми данными о небольшом преобладании мужского пола в Европейской популяции [140]. В группе СД2 отмечалось преобладание мужчин (86%), что связано с целенаправленным формированием более однородной выборки по половому признаку. В группе LADA доля мужчин (47%) приблизительно соответствовала литературным данным, указывающим на отсутствие выраженной гендерной разницы в распространённости [141]. В группе сравнения здоровых добровольцев мужчины и женщины были представлены в равной пропорции (50%), что обеспечивает необходимую репрезентативность для сопоставления с пациентами.

Медиана возраста пациентов с СД1 составила 26 [21; 31] лет, что отражает характерную манифестацию СД1 в молодом возрасте. Для СД2 и LADA, напротив, средний возраст (41 год [34; 51] и 40 лет [34; 45] соответственно) соответствует диапазону, при котором обычно диагностируются данные формы СД. В группе сравнения медиана возраста (33,5 года [27; 42]) была сопоставима с показателями в исследуемых группах, повышая корректность сравнительного анализа.

Длительность заболевания для пациентов с СД1 и СД2 составляла 6 и 5 месяцев (медианы), соответственно, с момента дебюта, что говорит о недавней диагностике и минимальном влиянии длительной терапии на иммунную систему, соответственно, возраст дебюта и возраст на момент включения в исследование были близки. В группе LADA длительность заболевания достигала медианы в 38 месяцев, отражая более медленное прогрессирование аутоиммунного процесса и дебют заболевания за несколько лет до включения в исследование.

Показатели ИМТ продемонстрировали ожидаемые различия, связанные со спецификой типов СД. У пациентов с СД1 и LADA ИМТ соответствовал нормальным референсным значениям, в то время как в группе СД2 преобладал избыточный вес (ИМТ около 30 кг/м²), что согласуется с известной ролью ожирения как ведущего звена патогенеза при СД2. У здоровых добровольцев ИМТ находился в пределах нормальных значений.

3.1.2 Обсуждение

Сформированные группы пациентов и здоровых добровольцев демонстрируют высокую степень репрезентативности и соответствуют мировым эпидемиологическим данным по возрасту и гендерному составу.

Медина возраста пациентов группы с СД1, находящихся в третьем десятилетии жизни, подтверждает известные данные о манифестации данного типа диабета в молодом возрасте. Последние исследования показывают, что до 62% случаев СД1 диагностируются после 20 лет [142]. Для пациентов с СД2 и LADA характерен более поздний возраст на момент постановки диагноза (40–50 лет), что соответствует клинической практике [143]. В группе здоровых добровольцев возрастной диапазон сопоставим с пациентами, что снижает риск возрастных искажений в сравнительном анализе.

Продуманный подбор групп, в том числе осознанное ограничение доли женщин в выборке пациентов с СД2, позволил минимизировать потенциальные гормонально-зависимые вариации экспрессии генов, связанных с метаболизмом глюкозы и инсулинорезистентностью в связи с возрастными изменениями репродуктивной системы (например, менопауза).

Важным методологическим аспектом работы является различие между СД1 и LADA по длительности заболевания на момент включения в исследование. Однако уравнивать временные промежутки для обеих групп практически невозможно, поскольку пациенты с LADA, как правило, позднее получают подтверждение диагноза в связи с более плавным началом и медленным снижением собственной секреции инсулина. Напротив, манифестация СД1 носит острый характер, что приводит к ранней постановке диагноза и, соответственно, меньшей длительности заболевания к моменту включения в исследование.

Подобное несоответствие по стажу заболевания может вносить вклад в различия иммунных показателей. Однако следует учитывать, что у пациентов с LADA сохраняются аутоантитела к β -клеткам и ряд специфических иммунных изменений, свидетельствующих о продолжающемся аутоиммунном процессе. Это указывает на то, что, помимо стажа болезни, важную роль играют патофизиологические отличия (в частности, темпы деструкции β -клеток и характер иммунной активации), определяющие разные варианты течения аутоиммунного СД.

Таким образом, более длительный анамнез у пациентов с LADA не нивелирует ценность их сопоставления с группой СД1, поскольку именно за счёт особенностей клинической динамики, включающей позднее выявление диагноза, LADA фактически представляет самостоятельный эндотип сахарного диабета, а не просто СД1 с иным сроком наблюдения.

Ещё одним ключевым отличием между СД1 и LADA стал возраст пациентов на момент включения в исследование. Как правило, манифестация СД1 происходит в более молодом возрасте, тогда как LADA диагностируют у лиц старше 30-35 лет. Соответственно, уравнивать эти группы по среднему возрасту практически невозможно, так как сам термин «латентный аутоиммунный диабет взрослых» подразумевает более поздний дебют.

Отличия в ИМТ между группами подтверждают патогенетическую гетерогенность СД: при СД2 чаще диагностируется ожирение, тогда как LADA обычно не ассоциирован с наличием ожирения [12]. Более короткая продолжительность заболевания у пациентов с СД1 и СД2 снижает вероятность искажения результатов длительной терапией, тогда как большая длительность заболевания у лиц с LADA отражает иную клиническую динамику — относительно медленное снижение функции β -клеток.

3.2 Показатели углеводного обмена

3.2.1 Результаты

Анализ уровня гликированного гемоглобина (HbA1c) подтвердил наличие хронической гипергликемии у пациентов во всех исследуемых группах (СД1, СД2, LADA) в сравнении со здоровыми добровольцами ($p < 0,001$). Между группами СД1, СД2 и LADA статистически значимых различий по уровню HbA1c не выявлено ($p > 0,05$), что указывает на сопоставимую степень компенсации СД на момент обследования, таблица 5.

Уровень С-пептида был самым высоким в группе СД2 (3,79 [2,7; 4,5] нг/мл), значительно превышая показатели у пациентов с СД1 и LADA, а также у здоровых добровольцев ($p < 0,001$). Между СД1 и LADA статистически значимых отличий по С-пептиду не обнаружено ($p = 0,637$), ряд пациентов в группе СД1 имел около нормальные значения С-пептида, что обусловлено небольшой длительностью течения, до 1 года. Низкие

уровни С-пептида в группах СД1 и LADA указывают на снижение β -клеточной секреции инсулина, отличающееся от сохраненной функции β -клеток при СД2.

3.2.2 Обсуждение

Сходный уровень HbA1c во всех группах СД подтверждает наличие хронической гипергликемии, характерной для СД. Тем не менее, значительное повышение С-пептида при СД2 свидетельствует о сохраненном резерве β -клеток, контрастирующем со сниженной функцией β -клеток у пациентов с СД1 и LADA.

3.3 Аутоантитела к β -клеткам

3.3.1 Результаты

Повышенные уровни антител к глутаматдекарбоксилазе (АТ к GAD) обнаружены у большинства пациентов с СД1 и у всех пациентов с LADA ($p < 0,001$), что свидетельствует об аутоиммунном характере данных состояний. В группах СД2 и среди здоровых добровольцев уровни АТ к GAD соответствовали норме. Антитела к островковым клеткам (ICA) отсутствовали во всех группах. Антитела к инсулину были положительными только у 2 пациентов в группе LADA, в группе здоровых добровольцев также выявлено превышение референса (на уровне погрешности метода) у 2 пациентов, что было интерпретировано как норма. Уровень антител к тирозинфосфатазе (АТ IA-2) был повышен преимущественно в группе СД1.

3.3.2 Обсуждение

Результаты анализа антител указывают на аутоиммунный патогенез при СД1 и LADA, что соотносится с низким уровнем С-пептида и подтверждает системное вовлечение иммунных механизмов в повреждение β -клеток. Отсутствие статистических различий по антителам к ICA и инсулину может отражать их меньшую диагностическую чувствительность в данном контексте [144]. Сочетание высоких титров АТ к GAD и IA-2 выступает в качестве основных серологических маркеров аутоиммунного характера СД1 и LADA, тогда как при СД2 аутоантитела к β -клеткам отсутствовали, таблица 5. Согласно исследованию, опубликованному в журнале *Frontiers in Physiology*, АТ к GAD являются наиболее распространенными аутоантителами при LADA, что подтверждает аутоиммунную природу заболевания [145].

Таблица 5 – Основные показатели углеводного обмена.

Показатели	СД1 - 1 N = 23	СД2 - 2 N = 22	LADA - 3 N = 15	Здоровые добровольцы - 4 N = 22	P*
Глюкоза, ммоль/л	7,39 [6,1; 8,7]	6,9 [5,6; 8,3]	6,39 [5,9; 10,2]	4,66 [4,3; 5,2]	<0,001 p1-2=0,459 p1-3=0,505 p1-4<0,001 p2-3=0,988 p2-4<0,001 p3-4<0,001
HbA1c, %	7,8 [6,4; 10,4]	6,9 [6,25; 8,35]	7,1 [6,6; 8,8]	5,1 [4,9; 5,4]	<0,001 p1-2=0,265 p1-3=0,535 p1-4<0,001 p2-3=0,531 p2-4<0,001 p3-4<0,001
С-пептид, нг/мл	0,99 [0,8; 1,6]	3,79 [2,7; 4,5]	1,05 [0,4; 1,5]	1,9 [1,4; 2,5]	<0,001 p1-2<0,001 p1-3=0,637 p1-4=0,001 p2-3<0,001 p2-4<0,001 p3-4<0,001
АТ к GAD, ед/мл (число пациентов с превышением референсного значения)	247,3 [65,6; 1577,8] (21)	0,1 [0,1; 0,6] (1)	1586,7 [121,7; 2000] (15)	0,6 [0,1; 1,3] (0)	<0,001
ICA, ед/мл (число пациентов с превышением референсного значения)	0,42 [0,32; 0,45] (0)	0,35 [0,28; 0,45] (0)	0,42 [0,37; 0,49] (0)	0,37 [0,31; 0,45] (0)	0,336
АТ к инсулину, ед/мл (число пациентов с превышением референсного значения)	3,6 [2,5; 4,8] (0)	2,85 [2,04; 4,04] (0)	3,2 [2,87; 5,24] (2)	2,9 [1,82; 4,3] (2)	0,341
IA-2, ед/мл (число пациентов с превышением референсного значения)	37,2 [1; 291,35] (12)	1 [0,6; 1] (0)	2 [1; 103,25] (5)	1 [0,89; 1,3] (1)	<0,001

*Примечания: количественные показатели представлены в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона [Q1; Q3]. Сравнение количественных признаков между группами проведено при помощи критерия Краскала-Уоллиса и post hoc тестов для

показателей глюкозы, HbA1c, C-пептида; для уровня антител post hoc тесты не проводились так как количество пациентов с повышением уровней антител было крайне низким или отсутствовало вовсе в отдельных группах (особенно в отношении антител к ICA и к инсулину). Проведение парных сравнений в подобных условиях статистически нецелесообразно ввиду недостаточной мощности анализа и невозможности получения статистически значимых результатов. В связи с этим для оценки различий было ограничено применением только общего непараметрического анализа (критерий Краскала-Уоллиса). Поправка на множественность сравнений методом Бонферрони, уровнем статистической значимости считали $p < 0,008$.

3.4 Терапия

3.4.1 Результаты

Соответствие назначенной терапии типу СД отмечено во всех группах:

- СД1: 100% пациентов находились на инсулинотерапии.
- СД2: 18 из 22 участников получали пероральные сахароснижающие препараты, 2 — комбинированную терапию (таблетированные препараты + инсулин).
- LADA: У 11 из 15 пациентов инсулинотерапия, 2 участника получали таблетированные препараты и 2 находились на комбинированной схеме, таблица 6.

3.4.2 Обсуждение

Распределение методов лечения соответствует клинической практике: СД1 требует заместительной терапии инсулином, что обусловлено полной деструкцией β -клеток, таблица 6. При СД2 большинство пациентов длительное время поддерживают гликемический контроль с помощью таблетированных препаратов, отражая сохраненную функцию β -клеток. Группа LADA демонстрирует необходимость применения разного вида терапии: длительное сохранение части β -клеточной функции позволяет некоторым пациентам обходиться таблетированными средствами, однако у большинства в конечном итоге возникает потребность в инсулине, подтверждая аутоиммунную природу данного типа СД и более плавный характер снижения секреции инсулина по сравнению с СД1.

Таблица 6 – Виды терапии у пациентов с различными типами СД

		Терапия			Всего пациентов
		Инсулинотерапия	Таблетированные препараты	Комбинированная терапия	
Тип СД	СД1	23	0	0	23
	СД2	2	18	2	22
	LADA	11	2	2	15

Медианная длительность терапии пероральными сахароснижающими препаратами до начала инсулинотерапии в группе LADA составила 35 [11; 45] месяцев.

3.5 Контроль качества исходных данных

3.5.1 Результаты

Во всех проанализированных образцах пациентов и здоровых добровольцев были получены высококачественные клетки, обеспечивающие надежные данные для последующего анализа. Среднее количество клеток, соответствующих критериям качества, на образец превышало 8 000. Для каждой клетки медианное количество обнаруженных генов составило около 1 700, а среднее количество прочтений (ридов) на клетку превышало 130 000. Риды (от англ. reads) — это короткие фрагменты последовательностей ДНК или РНК, получаемые в результате секвенирования. Эти фрагменты представляют собой отдельные «прочтения» молекул, позволяющие определить последовательность нуклеотидов и провести анализ экспрессии генов.

Глубина секвенирования во всех образцах (примерно 93% по метрике насыщения секвенирования (sequencing saturation)) подтверждает достаточное покрытие транскриптома, снижая вероятность пропуска низкоэкспрессируемых генов. Корректная детекция штрих-кодов (Valid Barcodes ~91,7%) и уникальных молекулярных индексов (Valid UMIs ~99,7%) свидетельствует о корректном разделении клеток и минимальном уровне технических артефактов. В качестве примера на рисунке 13 представлены параметры контроля качества для одного из образцов («Donor_6_GEX»).

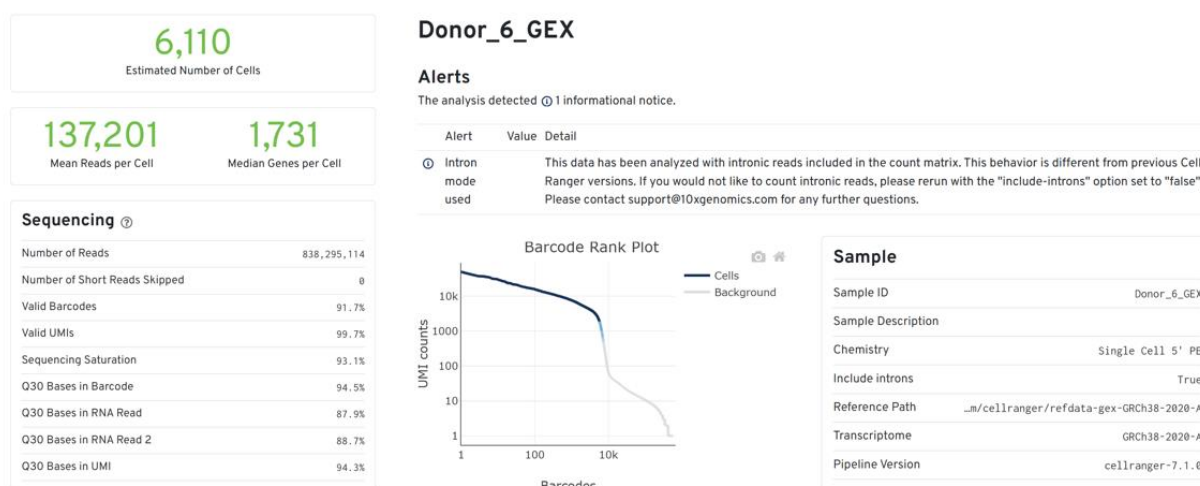


Рисунок 13 – Параметры контроля качества данных на примере образца «Donor_6_GEX».

Данные программы Cell Ranger 7.1.0.

Для интегральной оценки качества по всем группам были построены распределения ключевых метрик (рисунок 14), включая количество генов и транскриптов (total_counts) на

клетку. Скрипочные диаграммы (violin plots) показали сопоставимые диапазоны данных для образцов пациентов с СД1, СД2, LADA и здоровых добровольцев, что указывает на равномерное качество библиотек. Библиотека в данном контексте — это совокупность фрагментов ДНК или РНК, подготовленных для секвенирования, которые содержат информацию о генах и транскриптах, экспрессируемых в клетках. Доля митохондриальных транскриптов (pct_counts_mt) во всех образцах не превышала 5–6%, что находится в допустимых пределах для клеток крови [146]. Низкая доля транскриптов белков теплового шока (pct_counts_hsp) свидетельствует об отсутствии выраженного стресса во время пробоподготовки [147].

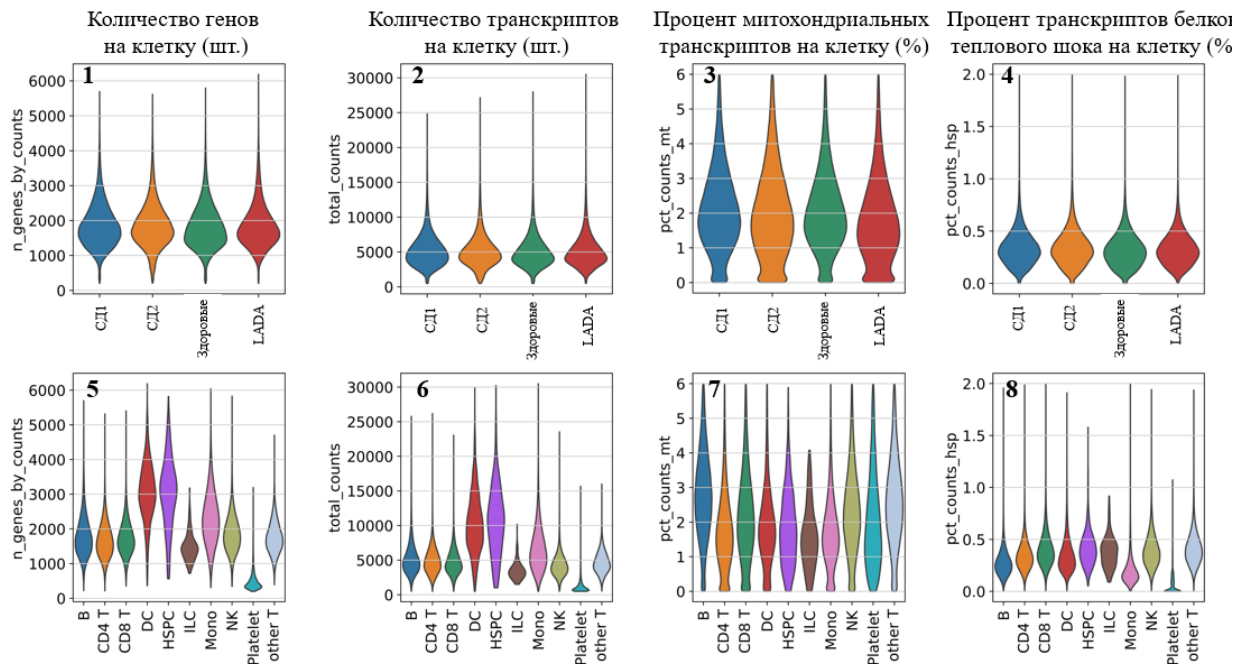


Рисунок 14 – Ключевые метрики контроля качества (1–4 – сравнение между группами, 5–8 – сравнение между различными типами клеток): (1) и (5) – количество генов на клетку (n_genes_by_counts, общее число уникальных генов с зарегистрированной экспрессией), (2) и (6) – количество транскриптов на клетку (total_counts, общее число обнаруженных транскриптов), (3) и (7) – процент митохондриальных транскриптов (pct_counts_mt, доля транскриптов митохондриальных генов, что может свидетельствовать о клеточном стрессе или повреждении), (4) и (8) – процент транскриптов белков теплового шока (pct_counts_hsp, доля транскриптов, связанных с тепловым шоком и стресс-реакцией). Диаграммы (1–4) демонстрируют сравнение этих показателей между четырьмя группами (21 пациент с СД1, 20 – с СД2, 15 – с LADA и 22 здоровых добровольца), а диаграммы (5–8) – между различными типами клеток (В-, Т-клетки, моноциты и др.). Для статистического анализа применён критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Бенджамини–Хохберга, статистически значимых между группами на графиках 1-4 не выявлено.

Анализ этих же метрик по клеточным типам (Т-, В-клетки, моноциты, дендритные клетки, НК-клетки, мегакариоцитарно-производные клетки и др.) продемонстрировал биологически обоснованную вариацию в зависимости от функционального статуса клеток. Широкий разброс количественных показателей у HSPC (Hematopoietic stem and progenitor cell) и моноцитов согласуется с их высокой транскрипционной активностью и вариабельностью [148]. Существенных межгрупповых искажений не выявлено, что подтверждает отсутствие значимых технических артефактов.

В итоговую выборку для анализа дифференциальной экспрессии и сигнальных путей после контроля качества вошли 78 из 82 исходных образцов: СД1 – 21 человек, СД2 – 20 человек, LADA – 15 человек и 22 здоровых добровольца. Четыре образца были исключены, так как доля фоновой РНК (ambient RNA) превышала допустимый уровень, установленный на основе внутренних контрольных критериев качества.

3.5.2 Обсуждение

Полученные метрики качества (число обнаруживаемых генов, процент митохондриальных транскриптов и транскриптов генов теплового шока) указывают на высокое качество секвенирования и равномерность подготовки библиотек. Доля митохондриальных генов на уровне 5–6% находится в диапазоне, характерном для периферических иммунных клеток [146], а низкий уровень транскриптов белков теплового шока свидетельствует о том, что процедура выделения клеток не вызвала значимого клеточного стресса. Совокупность этих показателей указывает на корректность отбора образцов и применения методов фильтрации.

Таким образом, данные результаты подтверждают, что исходные матрицы транскриптомных профилей обладают достаточным качеством для углубленного анализа. Равномерность распределения метрик качества между исследуемыми группами (СД1, СД2, LADA, здоровые добровольцы) означает, что дальнейшая дифференциальная интерпретация кластеров клеток не искажена межпартиями (батч эффект) или техническими артефактами. Эти выводы согласуются с работами, в которых подчёркивается важность строгого контроля качества при секвенировании РНК одиночных клеток для достоверности последующего биоинформатического анализа [149].

3.6 Сравнительный анализ методов интеграции данных и аннотация клеточных популяций

3.6.1 Результаты

Для устранения батч эффекта и сохранения биологической вариации были протестированы несколько подходов (scVI, scANVI, Harmony, BBKNN, scGEN, Seurat RPCA), выбор ведущего метода интеграции данных был выполнен с помощью пакета Scib

(версия 1.1.5). Итоговые показатели (рисунок 15) включали метрики ASW_label (средняя ширина кластера по меткам), ASW_label/batch, PCR_batch (оценка батч эффекта), isolated_label_silhouette (степень изоляции кластеров), а также graph_conn, измеренные в каждом случае интеграции. Сохранение биологической вариативности (biological variance conservation) определили как среднее между метриками ASW_label и isolated_label_silhouette. Устранение батч эффекта определяли как среднее между метриками PCR_batch, graph_conn и ASW_label/batch. Общую оценку метода интеграции осуществляли путем сложения 60% сохранения биологической вариативности и 40% устранения батч эффекта. Для статистической обработки методы интеграции и расчет метрик качества были запущены 5 раз. Однако, во всех запусках методы интеграции давали одинаковые результаты работы. В связи с этим невозможно провести статистическое сравнение методов интеграции, так как полученные абсолютные значения не отличаются между запусками.

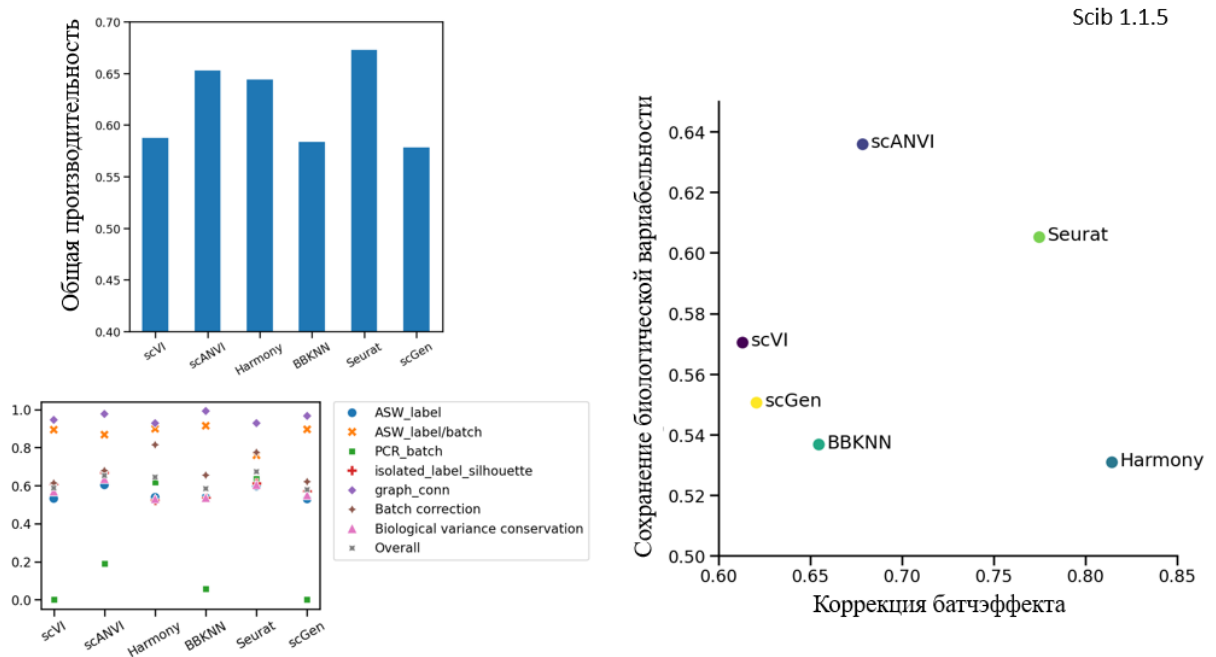


Рисунок 15 – Сравнение методов интеграции одноклеточных транскриптомных данных (scVI, scANVI, Harmony, BBKNN, scGen и Seurat RPCA), проведенное с использованием пакета Scib (версия 1.1.5). В левой верхней части показана гистограмма *Общая производительность* (ось Y, условная шкала качества от 0 до 1) для каждого метода (ось X). Ниже расположена диаграмма, где по оси X указаны те же методы, а по оси Y (от 0 до 1) приведены значения отдельных метрик: *ASW_label* (средняя ширина кластера по меткам), *PCR_batch* (оценка устранения батч-эффекта), *isolated_label_silhouette* (степень изоляции кластеров), *graph_conn* (связность графа), *biological variance conservation* (сохранение биологической вариации) и суммарная оценка *Overall* (общая оценка метода).

Справа представлена двухмерная диаграмма, где ось X отражает эффективность устранения батч-эффекта, от 0 до 1, а ось Y – сохранение биологической вариации, от 0 до 1.

1. Каждая точка на диаграмме соответствует определённому методу; чем правее расположена точка, тем лучше устраняется батч-эффект, а чем выше – тем больше сохраняется биологическая вариация. На основании рисунка можно заключить, что наилучший баланс между этими показателями демонстрируют Seurat RPCA и scANVI, в то время как Harmony и BBKNN показывают удовлетворительные, но несколько менее высокие результаты, а scVI и scGen занимают промежуточные позиции.

Наибольшую эффективность продемонстрировали Seurat RPCA и scANVI, превосходя прочие инструменты по соотношению качества устранения батч-эффекта и сохранения биологической вариативности [149]. Harmony и BBKNN показали удовлетворительный результат, однако в некоторых метриках уступили лидирующим методам. scVI и scGen заняли промежуточные позиции, обеспечив корректную, но менее оптимальную интеграцию.

После выбора методов Seurat RPCA и scANVI для финальной интеграции проведена аннотация клеток на основе экспрессии маркерных генов. Для аннотации клеточных типов использовались следующие гены: CD14⁺ классические моноциты (*LYZ*, *CD14*), CD16⁺ неклассические моноциты (*MS4A7*, *FCGR3A*), промежуточные моноциты (*FCGR3A*, *CD14*), классические дендритные клетки 1 типа (*IDO1*, *CST3*, *CLEC9A*), классические дендритные клетки 2 типа (*CST3*, *FCER1A*, *CLEC10A*), плазмоцитоидные дендритные клетки (*IRF8*, *IRF7*, *TCF4*), AXL⁺ дендритные клетки (*AXL*, *SCT*, *LILRA4*), CD4⁺ наивные Т клетки (*CD4*, *TCF7*, *SELL*, *IL7R*), CD4⁺ эффекторные Т клетки памяти (*CD4*, *KLRB1*, *GZMK*), CD4⁺ центральные Т клетки памяти (*CD4*, *IL7R*, *TCF7*, *ITGB1*), CD8⁺ наивные Т клетки (*CD8B*, *CD8A*, *TCF7*, *CCR7*), CD8⁺ эффекторные Т клетки памяти (*CD8B*, *CD8A*, *GZMH*, *GZMA*, *GZMB*), CD8⁺ центральные Т клетки памяти (*CD8B*, *CD8A*, *GZMK*, *CCR7*), регуляторные Т клетки (*CD4*, *FOXP3*, *IKZF2*), Т клетки, ассоциированные со слизистыми (*TRAV1-2*, *SLC4A10*), гамма-дельта Т клетки (*TRGV9*, *TRDV2*, *TRDC*, *TRGC1*), NK CD56 яркие клетки (*XCL2*, *XCL1*, *KLRF1*, *PRF1*), NK CD56 тусклые клетки (*PRF1*, *KLRF1*, *NKG7*), пролиферирующие NK клетки (*TYMS*, *TK1*, *PRF1*, *KLRF1*), тромбоциты (*PPBP*, *PF4*, *TUBB1*, *CAVIN2*), врожденные лимфоидные клетки (*KIT*, *ITM2C*), гематopoэтические стволовые и прогениторные клетки (*GATA2*, *PRSS57*, *CDK6*, *CD34*), плазмобласты (*JCHAIN*, *TNFRSF17*, *TNFRSF13B*), наивные В клетки (*IGHD*, *TCL1A*, *IGHM*) и В клетки памяти (*IGHA1*, *CD27*).

Полученные визуализации, построенные с использованием метода UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection — метод аппроксимации и проекции на

многообразии), демонстрируют чёткое разделение основных иммунных субпопуляций, включая Т-, В-, NK-клетки, моноциты, дендритные клетки (DC), плазмобласты, гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки (HSPC) и другие иммунные популяции (рисунок 16). Аннотация фенотипических маркеров показала высокую степень точности [150].

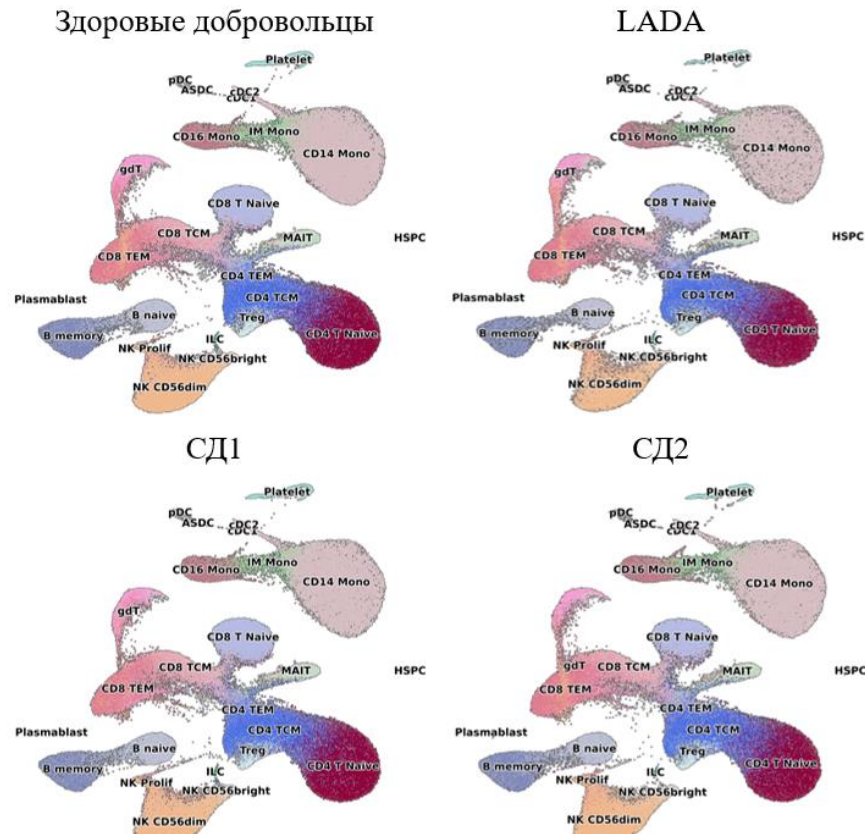


Рисунок 16 – UMAP-визуализации иммунных клеточных популяций (Т-, В-, NK-клетки, моноциты, дендритные клетки, плазмобласты, гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки и др.) у здоровых добровольцев, а также при LADA, СД1 и СД2.

После интеграции данных методами Seurat RPCA и scANVI аннотация клеток была проведена на основе экспрессии маркерных генов, что обеспечило чёткое разделение кластеров и высокую точность идентификации субпопуляций. Данные для 21 пациента с СД1, 20 – с СД2, 15 – с LADA и 22 здоровых добровольцев.

3.6.2 Обсуждение

Результаты оценки методов интеграции подтвердили высокий уровень эффективности Seurat RPCA и scANVI при коррекции батчэффекта, что согласуется с предыдущими исследованиями, в которых эти алгоритмы получили высокие оценки за баланс между сохранением биологической вариабельности и уменьшением технических

артефактов [151, 152]. Методы Harmony и BBKNN также демонстрируют приемлемые результаты и могут использоваться в ряде задач, однако при анализе сложных иммунных популяций, представленных в данном исследовании, они уступили выбранным методам по ряду показателей.

Полученные после интеграции и аннотации кластеров данные чётко разграничивают субпопуляции иммунных клеток, что согласуется с описанными в литературе профилями экспрессии маркерных генов для T-naïve, TCM, TEM, NK subtypes, B-naïve, B-memory и других субпопуляций [153]. Высокая степень разделения кластеров позволяет статистически значимо проводить сравнительный анализ между группами (СД1, СД2, LADA и здоровые), не опасаясь систематических искажений от батч эффекта или технических артефактов.

Таким образом, оптимальный выбор методов интеграции (Seurat RPCA и scANVI) и всесторонняя аннотация клеток предоставили качественную основу для дальнейших аналитических этапов: выявления дифференциальных генов, оценки сигнальных путей и функциональных сетей. Данные выводы согласуются с тенденциями, описанными в работах по анализу scRNAseq и подтверждают целесообразность применения комплексного подхода к интеграции разных партий экспериментов с последующей подробной аннотацией клеточных типов [154].

3.7 Композиционный анализ на первом уровне клеточной аннотации

3.7.1 Результаты

Клеточная аннотация в контексте секвенирования РНК одиночных клеток представляет собой процесс классификации и идентификации клеточных популяций на основе транскриптомных данных. Различают несколько уровней аннотации, где 1-й уровень включает укрупнённые категории клеток (например, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, моноциты, NK-клетки), а 2-й уровень представляет более детальную классификацию, разделяя клетки внутри основных популяций (например, CD4⁺ T-naïve, CD8⁺ T-effector memory, различные подтипы NK-клеток и моноцитов). Анализ на 1-м уровне позволяет выявить общие закономерности распределения крупных иммунных популяций, тогда как 2-й уровень необходим для изучения более тонких фенотипических различий, отражающих специфические механизмы иммунного ответа.

Первичный композиционный анализ на 1 уровне аннотации позволил оценить общий состав иммунных клеток у пациентов с LADA, СД1, СД2 и здоровых добровольцев без учёта детальной фенотипической классификации. Каждая крупная группа (Т-клетки, В-клетки, моноциты, дендритные клетки (DC), NK-клетки, HSPC и др.) рассматривалась в целом (рисунок 17).

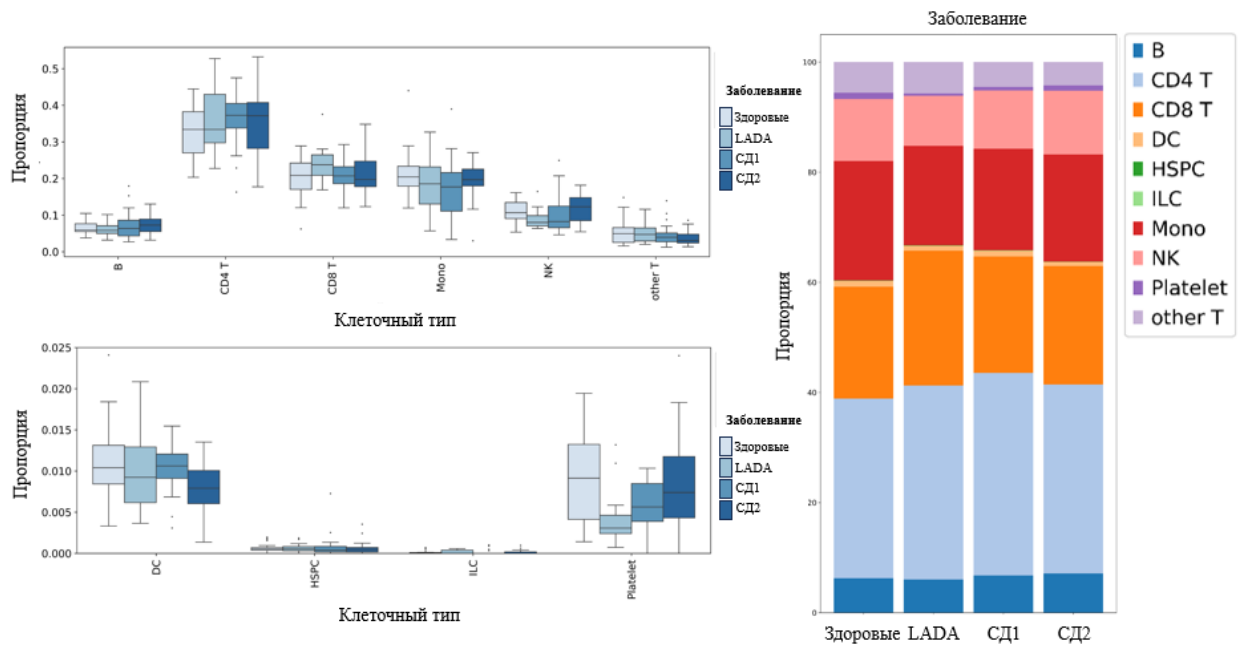


Рисунок 17 – Композиционный анализ (1 уровень аннотации) для здоровых добровольцев (n=22), LADA (n=15), CD1 (n=21) и CD2 (n=20), всего 78 образцов. Диаграммы размаха (boxplots; верхний и нижний ряды) отражают долю клеток каждой укрупнённой иммунной популяции (В-, Т-, NK-клетки и др.) по отношению к общему числу ПНМК у каждого участника. Ось Y показывает часть (от 0 до 1) или процент клеток данного типа в образце (размерность — безразмерная доля). Столбчатая диаграмма (справа) представляет средние пропорции клеточных типов в каждой группе (здоровые, LADA, CD1, CD2), выраженные в долях от 0% до 100%. Тест Краскела-Уоллиса с последующим тестом Тьюки.

Анализ пропорций выявил ряд визуальных отличий между группами:

- **Т-клетки:** Наблюдается умеренная тенденция к увеличению CD8+ Т-клеточного пула при LADA по сравнению с контролем.
- **Моноциты:** Снижение относительной доли моноцитов у пациентов с CD1, однако разница не достигала статистической значимости.
- **В-клетки, NK-клетки и DC:** Небольшие вариации между группами, не подтверждённые критериями значимости.

Таким образом, выявленные различия не прошли порог статистической значимости, и следовательно, не могут быть расценены как патогенетические сдвиги на данном уровне разрешения. Все группы (LADA, CD1, CD2 и здоровые добровольцы) характеризуются приблизительно сходными пропорциями основных клеточных категорий, несмотря на наличие аутоиммунного компонента у пациентов с LADA и CD1 и выраженный метаболический компонент у CD2.

3.7.2 Обсуждение

Отсутствие статистически значимых различий при укрупнённом рассмотрении клеточных популяций может отражать несколько аспектов:

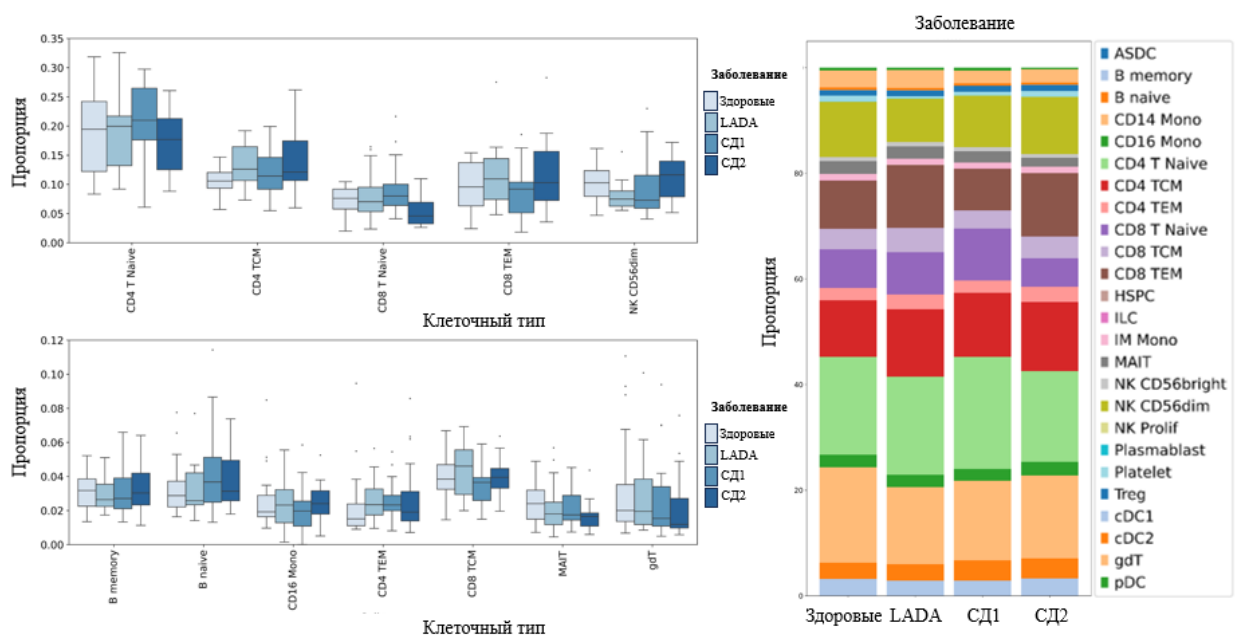
1. **Грубая детализация клеточных групп:** на 1 уровне клеточной аннотации отдельные функционально-разнородные субпопуляции (например, CD8⁺ T Naive, CD8⁺ TEM) объединены в одну категорию. Реальные сдвиги могут сглаживаться в рамках крупных групп [155].
2. **Промежуточный характер изменений:** для LADA характерно более медленное и сбалансированное течение аутоиммунного процесса, а для СД1 — агрессивное, но узконаправленное разрушение β -клеток. Подобные патогенетические различия могут не приводить к крупным сдвигам в целом на уровне укрупнённой классификации [7].

Широкая вариабельность экспрессии у HSPC и моноцитов ещё раз подчёркивает, что эти популяции функционально и фенотипически неоднородны [156]. Таким образом, первичный композиционный анализ на 1 уровне не выявил статистически значимых различий между группами.

3.8 Композиционный анализ на втором уровне клеточной аннотации

3.8.1 Результаты

На втором уровне клеточной аннотации укрупнённые категории клеток (Т-, В-, NK-клетки, моноциты и др.) были разделены на функционально специализированные и фенотипически более однородные подтипы (CD4⁺ T Naive/TCM/TEM, CD8⁺ T Naive/TCM/TEM, Treg, B naive/memory, CD14/16/IM моноциты, NK CD56bright/dim, MAIT, плазмобласты, дендритные клетки cDC1/cDC2/pDC и т.д.) (рисунок 18).



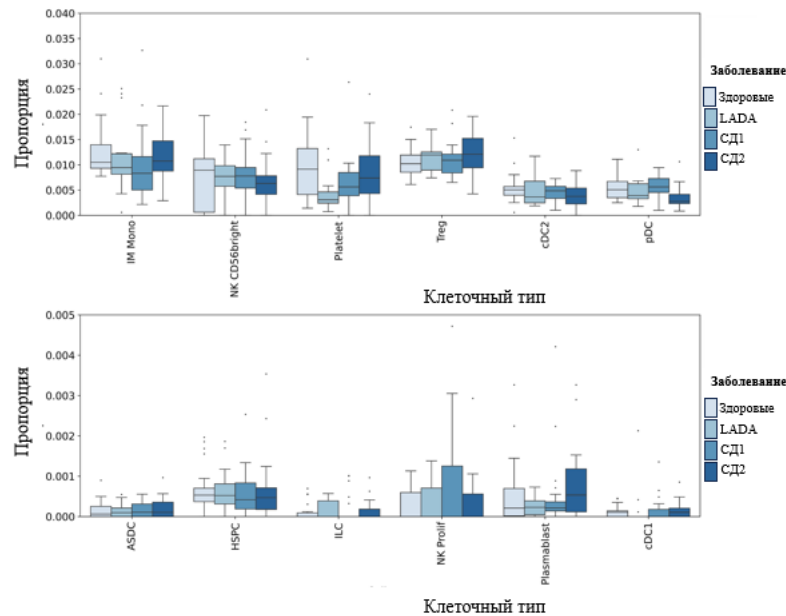


Рисунок 18 – Композиционный анализ (2 уровень аннотации) для здоровых добровольцев (n=22), LADA (n=15), СД1 (n=21) и СД2 (n=20), всего 78 образцов. Диаграммы размаха (boxplots; верхний и нижний ряды) отражают долю клеток каждой укрупнённой иммунной популяции (В-, Т-, НК-клетки и др.) в отношении к общему числу ПНМК у каждого участника. Ось Y показывает часть (от 0 до 1) или процент клеток данного типа в образце (размерность — безразмерная доля). Столбчатая диаграмма (справа) представляет средние пропорции клеточных типов в каждой группе (здоровые, LADA, СД1, СД2), выраженные в долях от 0% до 100%. Тест Краскела-Уоллиса с последующим тестом Тьюки.

Результаты второго уровня анализа показали отсутствие статистически значимых различий по пропорциям указанных субтипов между группами. В то же время, были отмечены слабые тенденции:

- **Т-клеточные субпопуляции:** Незначительное повышение CD8⁺ ТЕМ в группе LADA; сниженная пропорция наивных Т-клеток при СД1.
- **В-клетки:** Незначительная тенденция к повышению В-клеток памяти при СД2, однако без статистической значимости.
- **Моноциты и дендритные клетки:** Лёгкие вариации в подтипах (CD16 Mono, pDC), которые не достигли статистической значимости.
- **НК-клетки:** Субпопуляции NK CD56bright, NK CD56dim, NK Prolif варьировали в пределах нормы, без строгих различий между LADA и другими группами.

3.8.2 Обсуждение

Расширенная детализация на втором уровне позволила уточнить минорные подтипы иммунных клеток, однако и на этом уровне не были выявлены устойчивые статистически

значимые изменения между LADA, СД1, СД2 и здоровыми добровольцами. Подобная ситуация может иметь несколько объяснений:

1. **Гетерогенность и межиндивидуальная вариабельность:** для иммунных субпопуляций характерна высокая динамика и индивидуальные особенности [157]. Отсутствие статистически значимых различий может указывать на то, что формирование аутоиммунного ответа (LADA, СД1) или метаболических изменений (СД2) не обязательно ассоциировано с крупными сдвигами в пропорциях основных субтипов лимфоцитов и моноцитов.
2. **Скрытые молекулярные изменения:** отсутствие статистически значимых различий при анализе часто не исключает существования тонких паттернов дифференциальной экспрессии генов и сигнальных путей [158]. Визуально заметные тенденции (например, незначительное увеличение CD8⁺ TEM у LADA) могут указывать на скрытые механизмы иммунной регуляции, которые требуют более целенаправленных методов (псевдобалковый анализ, анализ сигнальных путей).

Сходные результаты были получены в исследовании, где было показано, что у взрослых пациентов с длительным течением СД1 выявлены две иммунологически различные подгруппы: СД1-А и СД1-В. Пациенты из СД1-А имели выраженный провоспалительный профиль с более низким содержанием Treg, увеличением доли CD4⁺ и CD8⁺ клеток с экспрессией CCR4, а также повышенной продукцией TNF- α и IFN γ при снижении IL-10. Однако эти отличия были найдены только при делении СД1 на более мелкие группы [159].

В другой работе было показано, что экспрессия гена *FoxP3* на начальном этапе заболевания не отличается от контрольных значений, однако наблюдается увеличение количества CD4⁺CD25⁺high Treg-клеток. В течение первых 6–12 месяцев после манифестации заболевания уровень экспрессии *FoxP3* снижается, а количество Treg возвращается к контрольным значениям. При длительности заболевания более 5 лет экспрессия *FoxP3* достоверно уменьшается, что может указывать на функциональный дефицит Treg-клеток. Эти изменения, возможно, компенсируются увеличением численности Treg на ранних этапах болезни, что способствует подавлению аутоиммунного процесса и более мягкому течению в дебюте заболевания [160]. В данной работе изменения анализировали только в одной популяции клеток и только в рамках группы LADA в динамике, вероятно, при оценке в динамике можно зафиксировать достоверные изменения в пропорции клеток ввиду развития аутоиммунного процесса.

Таким образом, анализ второго уровня детализации также подтверждает отсутствие статистически значимых межгрупповых различий в пропорциях отдельных функциональных субтипов.

3.9 Псевдобалковый дифференциальный анализ экспрессии генов в сравнении LADA со здоровыми добровольцами

3.9.1 Результаты

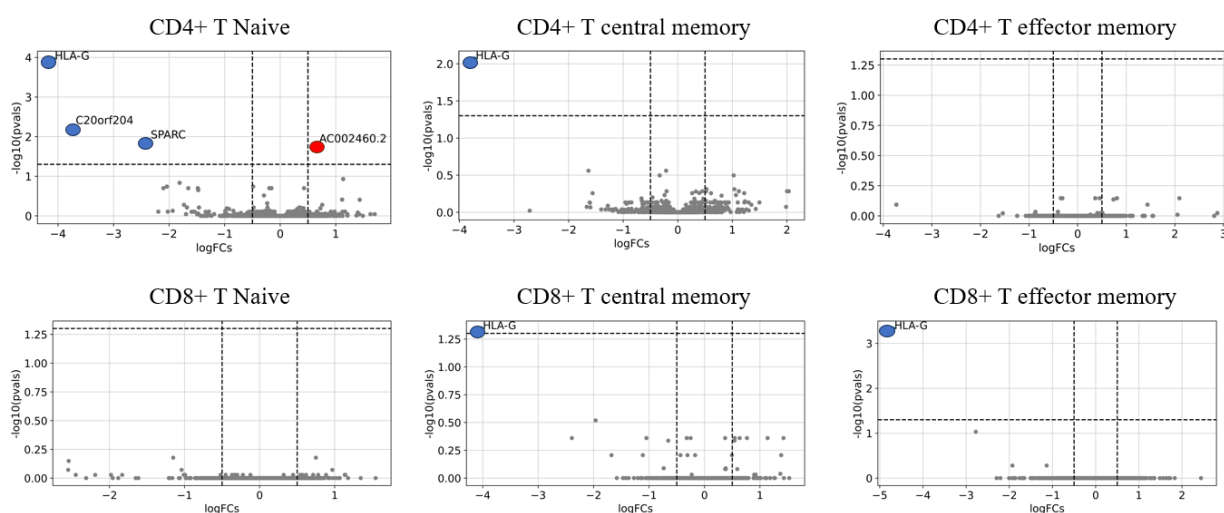
Выполненный псевдобалковый дифференциальный анализ (pyDEseq2, версия 0.4.10) позволил агрегировать транскриптомные профили клеток внутри отдельных иммунных субпопуляций (CD4+ T Naïve, CD8+ TEM, NK CD56dim и др.) и провести сравнение между LADA и здоровыми добровольцами. При этом были выявлены гены, статистически значимо снижающие свою экспрессию у пациентов с LADA по сравнению со здоровыми добровольцами. Среди них:

1. ***HLA-G* (CD4+ T Naïve, CD4+ T central memory, CD8+ T central memory, CD8+ T effector memory, NK CD56 dim, CD14 monocytes):** Неклассическая молекула МНС класса I с иммуномодулирующими функциями.
2. ***SPARC* (CD4+ T Naïve):** Белок, регулирующий взаимодействие с внеклеточным матриксом и участвующий в регуляции воспалительных процессов.
3. ***C20orf204* (CD4+ T Naïve):** некодирующий транскрипт.

Также была выявлена гиперэкспрессия 2 генов:

1. ***RAB34* (NK CD56dim):** фермент семейства Rab, влияющий на везикулярный транспорт и цитотоксическую активность НК-клеток.
2. ***AC002460.2* (CD4+ T Naïve):** некодирующий транскрипт.

На графике рассеяния для большого массива данных (рисунок 19) видно, что эти гены (кроме *RAB34* и *AC002460.2*) попадают в зону статистических изменений, указывая на более низкий уровень экспрессии при LADA по сравнению со здоровыми добровольцами.



LADA относительно здоровых добровольцев

pydeseq2 0.4.10

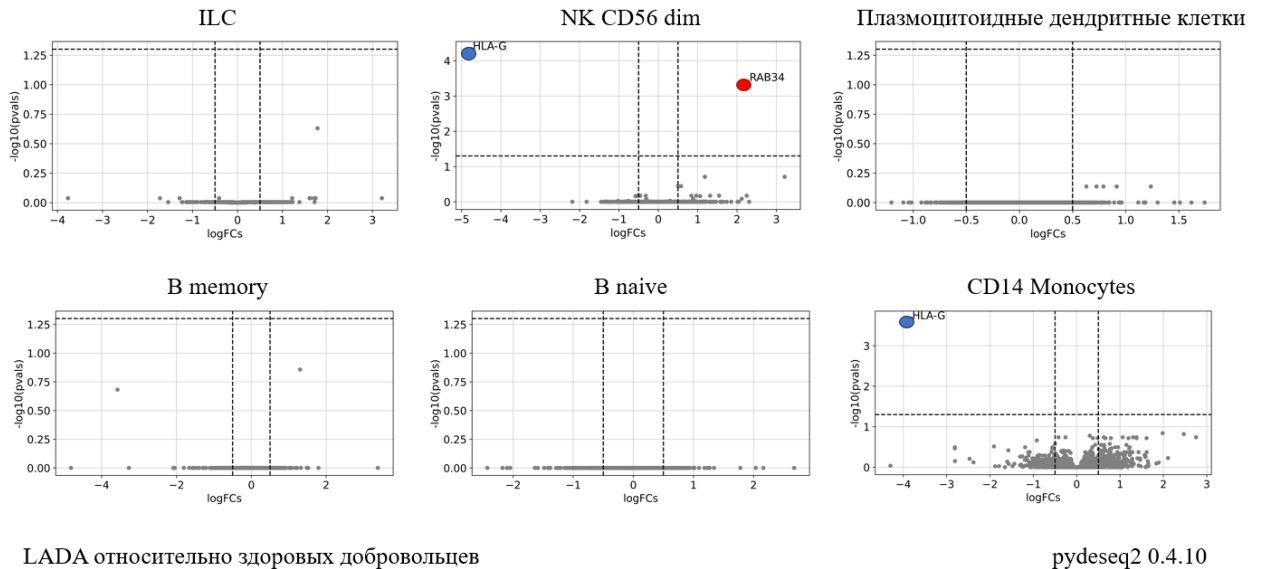


Рисунок 19 – Дифференциальная экспрессия генов при сравнении LADA и здоровых пациентов. На графике рассеяния представлены изменения экспрессии генов ($\log_2\text{FoldChange}$) в различных субпопуляциях иммунных клеток. Выявлена гипокспрессия *HLA-G* и *SPARC* (CD4+ T Naive), *C20orf204*. Повышение экспрессии выявлено для *RAB34* (NK CD56 dim) и *AC002460.2* (CD4+ T Naive). Здоровых добровольцев (n=22), LADA (n=15) - всего 37 образцов. Тест Вальда с поправкой Бенджамина-Хохберга. Синим обозначены гены, экспрессия которых статистически значимо снижена у пациентов с LADA относительно здоровых добровольцев ($p < 0,05$, $|\log_2\text{FoldChange}| > 0,5$). Красным обозначены гены, экспрессия которых статистически значимо повышена у пациентов с LADA относительно здоровых добровольцев ($p < 0,05$, $|\log_2\text{FoldChange}| > 0,5$).

3.9.2 Обсуждение

Гипокспрессия *HLA-G* и ослабление иммунорегуляции

Ген *HLA-G*, кодирующий неклассическую молекулу МНС I, обычно ассоциирован с формированием локальной иммунной толерантности, играет важную роль в тканях плаценты и при трансплантации органов [161, 162]. Снижение его экспрессии в наивных CD4+ Т-клетках при LADA по сравнению со здоровыми добровольцами может указывать на то, что механизм поддержания ауто толерантности у пациентов с LADA работает не в полной мере или активируется по-иному. Ряд работ показывает, что при СД1 (в качестве общего примера другого аутоиммунного процесса) повышенная экспрессия *HLA-G* может рассматриваться как компенсаторная реакция на избыточное воспаление [163]. В случае LADA, судя по нашим данным, более низкие уровни *HLA-G* могут отражать иной баланс

иммунной регуляции, при которой аутоиммунный процесс развивается медленнее, но сохраняет специфичность, чтобы вызывать прогрессирующее поражение β -клеток.

Уменьшение экспрессии *SPARC*, *C20orf204*: иная регуляция воспаления

- ***SPARC*:** известен как матричный белок, регулирующий воспаление и ремоделирование тканей [164]. Его пониженная экспрессия при LADA относительно здоровых добровольцев может указывать на меньшее вовлечение механизмов тканевого ремоделирования и более сдержанный воспалительный процесс. В ряде исследований в контексте СД у животных наблюдалась повышенная экспрессия *SPARC* в условиях гипертрофии сосудов и повреждения тканей [165]. Таким образом, низкий уровень *SPARC* при LADA может свидетельствовать о менее интенсивном воспалительном ответе и более медленном развитии сосудистых и тканевых изменений.
- ***C20orf204*:** Снижение экспрессии этого транскрипта, ранее классифицировавшегося как некодирующая РНК, может указывать на то, что LADA не активирует в полной мере те эпигенетические или посттранскрипционные каскады, которые при СД1 поддерживают активный аутоиммунный процесс. Возможно, в LADA задействованы альтернативные регуляторные элементы или эта РНК не достигает высокого уровня экспрессии из-за особенностей локальной иммунорегуляции.

Исследования показывают, что в развитии аутоиммунных заболеваний, таких как LADA могут участвовать альтернативные регуляторные элементы, влияющие на экспрессию РНК. Например, альтернативное полиаденилирование (АПА) - процесс, при котором мРНК приобретает различные 3'-концевые участки - может изменять стабильность и трансляцию мРНК, что, в свою очередь, влияет на иммунный ответ. Гибкая и многоуровневая регуляция АПА достигается через несколько механизмов, включая цис-регуляторные элементы в РНК и ДНК, а также факторы, контролирующие транскрипцию и посттранскрипционные процессы [166].

Кроме того, локальная иммунорегуляция может влиять на уровни экспрессии РНК. Структура хроматина и пространственная организация генома играют важную роль в координации быстрых и точных транскрипционных ответов иммунных клеток на патогены. Тканеспецифические иммунные клетки имеют уникальные функции и профили экспрессии, что обусловлено особыми механизмами регуляции и структурой хроматина [167].

Ранее была показана роль некодирующих РНК в патогенезе СД, включая LADA. Были выявлены значительные изменения в экспрессии некодирующей РНК между LADA, СД2 и здоровыми добровольцами. В частности, две новые некодирующие РНК (ENST00000608916 и ENST00000436373) были ассоциированы с генами-мишенями, такими как *BTG2* и *FLVCR1*, которые участвуют в регуляции воспаления и презентации антигенов

[168]. Эти данные подтверждают, что некодирующие РНК могут быть важными регуляторами иммунного ответа при LADA и потенциально служить диагностическими маркерами. При этом недавние данные (2021 г.) показывают, что в некоторых опухолевых клетках (гепатоцеллюлярная карцинома) данный ген может отвечать за синтез белка длиной 189 аминокислот, стимулируя синтез рибосомной РНК и, соответственно, ускоренный клеточный рост. В нормальной ткани печени подобная активность не отмечается, что подчёркивает специфическую роль *C20orf204* в определенных условиях [169].

***RAB34* в NK CD56dim: усиленная (но не экстремальная) цитотоксическая активность?**

NK CD56dim клетки отличаются более выраженным цитотоксическим потенциалом по сравнению с NK CD56bright [170]. Повышенная экспрессия *RAB34* при LADA может указывать на то, что NK-клетки сохраняют достаточный, но не чрезмерный уровень активности, что замедляет аутоиммунную атаку по сравнению с более выраженным аутоиммунным процессом при СД1. Это отражает более сбалансированный иммунный ландшафт, позволяющий β -клеткам функционировать дольше.

RAB34, являясь регулятором внутриклеточного транспорта и везикулярной динамики, играет ключевую роль в модуляции сигнальных путей, связанных с активацией NK-клеток. Повышение экспрессии этого белка может влиять на перераспределение лизосом и формирование цитотоксических гранул, что в конечном итоге определяет цитотоксический потенциал. Исследования показывают, что *RAB34* участвует в перемещении лизосом к перинуклеарной области клетки, взаимодействуя с белками, такими как RILP и динеин, что способствует ретроградному транспорту лизосом [171]. Кроме того, *RAB34* локализуется в комплексе Гольджи и регулирует его структуру, а также транспорт и олигомеризацию адипонектина, что подчёркивает его роль в секреторных путях клетки [172]. Роль *RAB34* не ограничивается регуляцией активности NK-клеток. Согласно данным, гипергликемия стимулирует экспрессию *RAB34*, что способствует секреции белков через взаимодействие с *munc13 homology domain 2* (MHD2). Этот путь, описанный в контексте диабетической нефропатии, подчёркивает важность *RAB34* в регуляции ответа клеток на гипергликемию [173].

При LADA же умеренно повышенный уровень *RAB34* может поддерживать достаточно активную, но не гиперагрессивную популяцию NK-клеток, способствуя менее агрессивному течению аутоиммунного процесса. Таким образом, *RAB34* выступает одним из ключевых регуляторов активности NK-клеток, определяя их способность уничтожать целевые клетки без полного разрушения β -клеточной популяции.

Потенциальные объяснения и направления будущих исследований

1. **Альтернативные пути регуляции толерантности:** можно предположить, что при LADA уменьшение экспрессии *HLA-G* и *SPARC* компенсируется задействованием других иммуномодулирующих факторов (например, PD-1/PD-L1), поддерживающих хроническое, но относительно «контролируемое» воспаление [174].
2. **Система перекрёстной презентации антигенов:** при LADA аутоиммунный процесс часто протекает со скрытой симптоматикой, что может сопровождаться меньшей вовлечённостью тех путей, которые требуют высокой экспрессии *HLA-G* и некодирующих РНК (например, *C20orf204*).
3. **Роль эпигенетических и цитокиновых сетей:** Повышение *RAB34* и некодирующих РНК у некоторых субпопуляций клеток может указывать на активацию специфических сигнальных путей при LADA, отличающихся от такового у здоровых добровольцев. Дополнительное исследование цитокинового окружения (IFN- γ , IL-21, IL-10) и эпигеномных факторов представляется перспективным для понимания механизма, который сочетает аутоиммунное воздействие и сохранение функционального резерва β -клеток [175].

Таким образом, при сравнении LADA с группой здоровых отмечена гипэкспрессия генов *HLA-G*, *SPARC* и *C20orf204*, гиперэкспрессия *AC002460.2* в CD4⁺ T-naïve и гиперэкспрессия *RAB34* в NK CD56dim-клетках, что отражает особенности иммунного ответа при LADA, связанные с его регуляцией и характером клеточной активности. При сравнении LADA и СД1 выявлена гипэкспрессия гена *C20orf204* в CD4⁺ T-naïve, что может указывать на различия в механизмах аутоиммунного ответа между LADA и СД1.

3.10 Псевдобалковый дифференциальный анализ экспрессии генов в сравнении LADA и СД1

3.10.1 Результаты

При сравнении группы пациентов с LADA и СД1, предполагая, что у LADA будет выявляться менее агрессивный аутоиммунный профиль, мы ожидали обнаружить широкий спектр дифференциально экспрессируемых генов. Однако итоговый анализ выявил только один транскрипт с статистически значимой изменённой экспрессией, причём исключительно в CD4⁺ Naïve T-клетках. Им оказался уже упоминавшийся *C20orf204*, продемонстрировавший гипэкспрессию при LADA по сравнению с СД1 (рисунок 20).

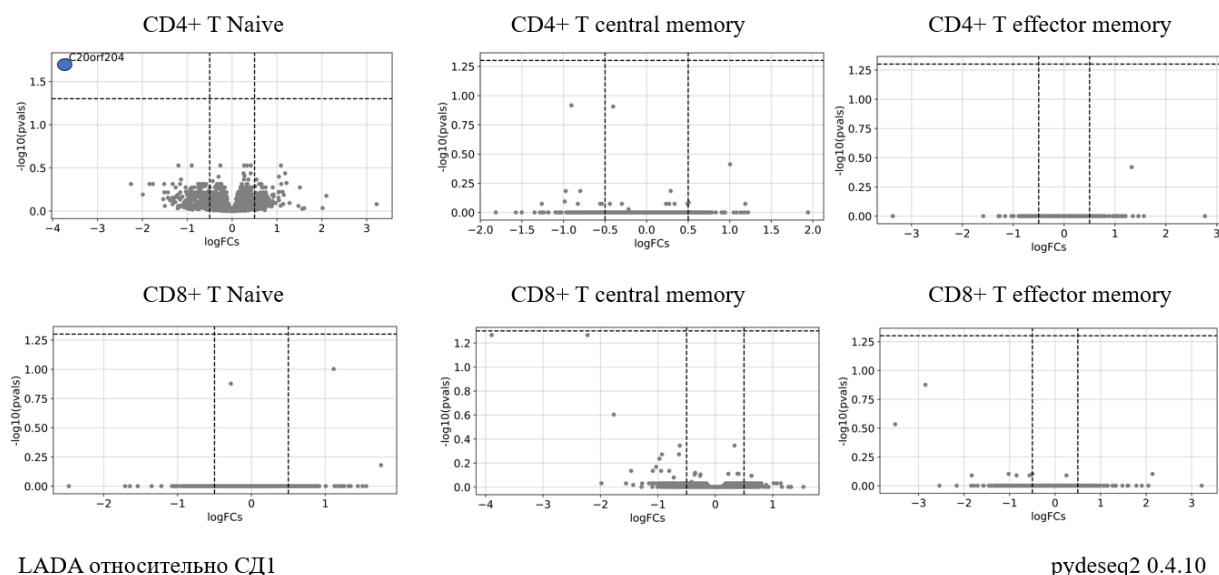


Рисунок 20 – Дифференциальная экспрессия генов при сравнении LADA и СД1. На графике рассеяния представлены изменения экспрессии генов ($\log_2\text{FoldChange}$) в различных субпопуляциях иммунных клеток. Выявлена гипокспрессия одного гена *C20orf204* в CD4+ Naive T-клетках. LADA (n=15), СД1 (n=21) - всего 36 образцов. Тест Вальда с поправкой Бенджамина-Хохберга. Синим обозначены гены, экспрессия которых статистически значимо снижена у пациентов с LADA относительно пациентов с СД1 ($p < 0,05$, $|\log_2\text{FoldChange}| > 0,5$).

3.10.2 Обсуждение

В контексте LADA гипокспрессия *C20orf204*, вероятно, отражает альтернативную эпигенетическую регуляцию, в которой экспрессия этого гена не достигает повышенных уровней, наблюдаемых при более агрессивном аутоиммунном процессе (например, СД1). Тем самым *C20orf204* может быть одним из факторов, способствующих более медленному, менее выраженному течению аутоиммунного воспаления у пациентов с LADA.

3.11 Специфические сигнальные изменения в иммунных клетках при LADA в сравнении со здоровыми добровольцами

3.11.1 Результаты

Для сравнения активности сигнальных путей между пациентами с LADA и здоровыми добровольцами мы использовали разницу в экспрессии генов, полученную при псевдобалковом анализе. При этом учитывали только степень изменения экспрессии ($\log_2\text{FoldChange}$) у пациентов с LADA относительно здоровых добровольцев. При сравнении транскриптомного сигнального профиля Т-лимфоцитов (CD4+ T Naive, CD4+ TCM, CD4+ TEM, CD8+ T Naive, CD8+ TCM, CD8+ TEM) и субпопуляций NK-клеток (NK

CD56bright, NK CD56dim), а также MAIT (Mucosal-associated invariant T cells), $\gamma\delta$ T и Treg-клеток между группой LADA и здоровыми добровольцами были выявлены значимые различия.

- **Путь JAK-STAT (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription)** продемонстрировал повышенный уровень активности (рисунок 21). Индекс активации каскада JAK-STAT составлял в среднем +4...+6 (по нормированной шкале), что свидетельствует об усиленной передаче сигналов цитокинов, ключевых регуляторов иммунного ответа.
- **Гипоксический путь HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha)** также оказался статистически значимо активирован. Это может быть связано с локальными метаболическими изменениями в микроокружении панкреатических островков поджелудочной железы и хроническим воспалением, что приводит к активации адаптационных механизмов клеток в условиях недостатка кислорода.
- **TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) и PI3K (phosphoinositide 3-kinase)** продемонстрировали повышенную активность: увеличение в среднем на +2...+3 единицы относительно группы сравнения. Усиление активности TRAIL может свидетельствовать о специфической регуляции апоптоза, направленной на уничтожение поврежденных или аномальных клеток, в то время как активация PI3K связана с обеспечением выживания, пролиферации и миграции иммунных клеток.
- **WNT (wingless-related integration site)** и гормонально-зависимые пути, включая пути активации рецепторов эстрогенов, также демонстрировали снижение активности, указывая на их сниженную роль в регуляции процессов клеточного роста, дифференцировки и воспалительных реакций у пациентов с LADA.

Кроме того, в популяции Treg-клеток при LADA наблюдалось сочетание повышенной активности JAK-STAT и PI3K на фоне умеренной активации TRAIL, что указывает на попытку сдерживать избыточную аутоагрессию. В NK-клетках (CD56bright и CD56dim), аналогично, наблюдалось усиление JAK-STAT пути, при этом NK CD56bright, обладающие более «регуляторным» фенотипом, демонстрировали умеренное снижение активности пути WNT, тогда как NK CD56dim с более цитотоксическим профилем демонстрировали сходное снижение активности пути WNT (рисунок 21).

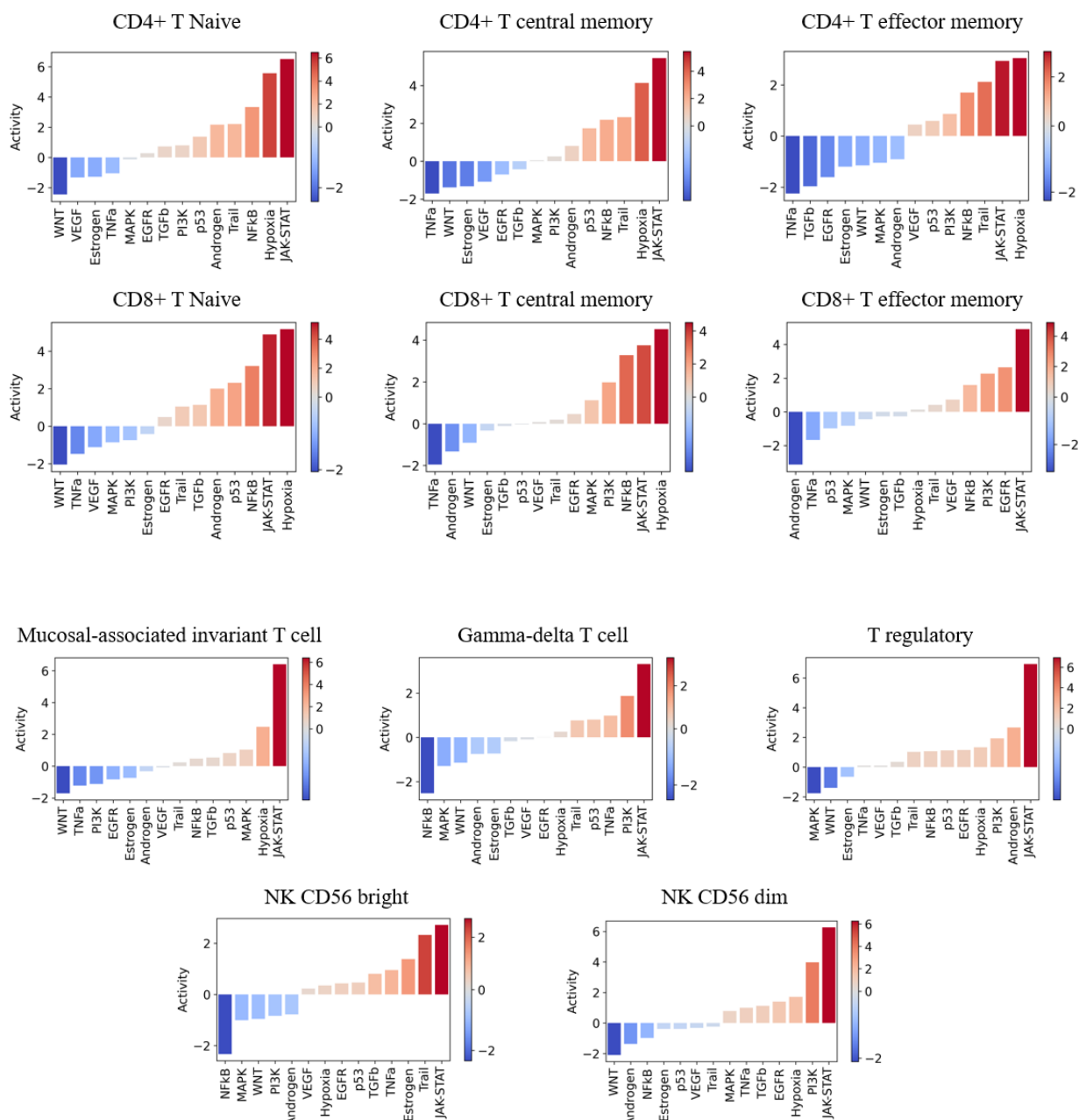


Рисунок 21 – Сравнение активности сигнальных путей между группой LADA (n=15) и здоровыми добровольцами (n=22) в различных субпопуляциях Т-лимфоцитов и NK-клеток. По оси X перечислены сигнальные пути (JAK-STAT, TRAIL, PI3K и др.), по оси Y – нормированная активность, где 0 соответствует средней активности того же пути у здоровых лиц. Столбики красного цвета (значения >0) указывают на усиленную активность соответствующего пути при LADA, синий цвет (значения <0) – на сниженную. Шкала справа представляет собой относительный уровень активности сигнального пути у пациентов с LADA по сравнению со здоровыми добровольцами. Каждый график соответствует конкретной субпопуляции иммунных клеток. Activity (рус. Активность) – относительный уровень активности у пациентов с LADA по сравнению со здоровыми добровольцами.

3.11.2 Обсуждение

Повышенная активность пути JAK-STAT у пациентов с LADA по сравнению со здоровыми добровольцами свидетельствует о том, что иммунная система находится в состоянии длительной, но контролируемой активации. Сходная нарушенная регуляция JAK-STAT пути отмечена при других нозологиях, в частности при гематологических и других солидных злокачественных новообразованиях, посредством различных онкогенных активационных мутаций в рецепторах, посредниках и ассоциированных транскрипционных факторах, таких как факторы транскрипции семейства STAT [176]. Путь JAK/STAT играет ключевую роль не только в регуляции иммунного ответа, но и в ряде других процессах, например, в повреждении подоцитов при хронической болезни почек на фоне СД. Исследования показали, что активация пути JAK/STAT в условиях гипергликемии приводит к угнетению аутофагии, усилению апоптоза и накоплению поврежденных белков и органелл, что усиливает повреждение подоцитов. Подобные механизмы могут быть частично применимы и к LADA, где путь JAK/STAT усиливает воспалительный фон, поддерживая хронический аутоиммунный процесс, что, в свою очередь, влияет на регуляцию аутофагии и другие адаптационные механизмы клеток. Использование ингибиторов JAK, таких как руксолитиниб, продемонстрировало эффективность в восстановлении аутофагии и уменьшении повреждения клеток, что подчёркивает потенциал таргетной терапии для коррекции нарушений, связанных с этим сигнальным каскадом [177].

Уровень антител к β -клеткам, являющийся диагностическим маркером аутоиммунного процесса, приводящего к разрушению β -клеток, коррелирует с концентрацией цитокинов. Для LADA характерна умеренная цитокиновая активация, поддерживающая хроническое воспаление, достаточное для медленного разрушения β -клеток. Однако эта активация не достигает уровня, характерного для острого и быстро прогрессирующего аутоиммунного процесса, наблюдаемого при классической форме СД1. Это отражается в сравнительно низких титрах аутоантител у пациентов с LADA [178]. Длительное поддержание активности пути JAK-STAT может приводить к повышенной продукции IL-21, IFN- γ , IL-10 и других цитокинов, формируя смешанный воспалительно-регуляторный профиль [179].

Нуроксия, TRAIL и PI3K

- **Нуроксия (HIF-1 α):** Наблюдаемая активация может отражать локальную тканевую гипоксию в инфильтрированных ПО. Взаимодействие HIF-1 α с иммунными клетками способствует их адаптации и увеличению их выживаемости в условиях ограниченного снабжения кислородом [180, 181]. Было показано, что при гипергликемии стабильность HIF-1 α нарушается из-за его неспособности взаимодействовать с Hsp90, что ускоряет его

разрушение через протеасомную деградацию. В результате подавляется ответ HIF-1/HRE, который играет ключевую роль для клеточной адаптации к гипоксии. Это особенно важно для клеток проксимальных канальцев нефрона, где недостаточная активация HIF-1 α снижает выработку сосудистого эндотелиального фактора роста и подавляет миграцию клеток, участвующих в восстановлении тканей [182].

- **TRAIL:** Усиление TRAIL-пути может быть механизмом селективной регуляции апоптоза, элиминирующего чрезмерно активированные лимфоциты [183]. При LADA это позволяет поддерживать хронический аутоиммунный фон, не приводящий к катастрофическим разрушениям β -клеток. В одном из исследований на мышах было показано, что недостаток TRAIL приводит к гипергликемии, нарушению толерантности к глюкозе, снижению уровня инсулина и функциональности β -клеток, а также увеличению инфильтрации макрофагами островков поджелудочной железы. Это подтверждает, что TRAIL не только участвует в регуляции воспалительных процессов, но и оказывает протективное действие на β -клетки. Кроме того, дефицит TRAIL приводит к нарушению регуляции липидов, включая повышение уровня холестерина и триглицеридов, что увеличивает риск атеросклероза и метаболических осложнений, что делает его важным фактором для изучения в контексте LADA [184]. Апоптоз является одним из факторов регуляции массы β -клеток наряду с пролиферацией имеющихся β -клеток, изменением их размера и неогенезом из общего пула панкреатических протоковых эпителиальных клеток [185].

- **PI3K:** один из ключевых путей регуляции метаболизма и выживаемости клеток. Его активация может играть роль в поддержании эффективности Т- и NK-клеток в условиях хронической стимуляции, создавая функционально активный, но не гиперагрессивный статус иммунных клеток [186].

Снижение WNT и гормонально-зависимых путей

Ослабление WNT-пути традиционно ассоциируется с утратой способности клеток к дифференцировке и переключением на провоспалительный фенотип, характерный для зрелых клеток [187]. При LADA это может отражать перераспределение приоритетов сигнальных сетей в пользу JAK-STAT и гипоксических каскадов. Аналогично, снижение активности эстроген- и андроген-зависимых сигналов (в большинстве подвидов клеток) свидетельствует о том, что модуляция иммунной системы через гормоны стероидного происхождения не играет определяющей роли в данном контексте, уступая место более специфическим цитокиновым и метаболическим путям.

Вовлечённость Treg и NK-клеток

- **Treg:** Наблюдаемое сочетание повышенной активности JAK-STAT и PI3K при снижении WNT указывает на важную роль Treg-клеток в поддержании хронической аутоиммунной толерантности [188]. Усиленная TRAIL-сигнализация может регулировать гиперактивные эффекторные Т-клетки, тем самым продлевая умеренное воспаление, характерное для LADA.
- **NK-клетки (NK CD56bright и CD56dim):** В обеих субпопуляциях наблюдается усиление JAK-STAT наряду с подавлением WNT, что согласуется с гипотезой об «адаптированном» цитотоксическом ответе, не переходящем в чрезмерную цитотоксичность. CD56bright обычно характеризуются регуляторным фенотипом, в то время как CD56dim характеризуются цитотоксичностью [189]. Подобная селективная модуляция путей (особенно PI3K, TRAIL) может поддерживать замедленную деструкцию β -клеток, в отличие от стремительного аутоиммунного разрушения β -клеток при СД1

Клинические и патогенетические выводы

1. **Хроническая, но регулируемая активация:** Усиленный JAK-STAT, Nuroxia, PI3K и TRAIL в совокупности указывают на формирование вялотекущего аутоиммунного процесса. При LADA пациенты сохраняют β -клеточную функцию дольше, чем при СД1.
2. **Исключение гормонального влияния:** Снижение андроген- и эстроген-зависимых путей свидетельствует о более существенной роли цитокинов и метаболических сигналов в LADA, что может отличаться от ситуации у здоровых лиц, где эти сигнальные пути вносят больший вклад в иммуномодуляцию [190].
3. **Перспективы терапии:** на фоне повышенного JAK-STAT может быть обосновано применение таргетных ингибиторов JAK, которые уже рассматриваются для лечения ряда аутоиммунных состояний [191]. Аналогично, модуляция сигнальных путей PI3K и TRAIL может стать основой для новых подходов к сохранению остаточной функции секреции β -клеток при LADA [192].

3.12 Специфические сигнальные изменения в иммунных клетках при СД1 по сравнению со здоровыми добровольцами

3.12.1 Результаты

Анализ сигнальных путей различных клеточных субпопуляций (Т- и В-лимфоциты, моноциты, регуляторные Т-клетки) у пациентов с СД1 по сравнению со здоровыми добровольцами (рисунок 22) продемонстрировал отчётливую активацию пути JAK-STAT во всех рассмотренных группах (показатель активности достигал от +5 до +20 при нормированной шкале). Это указывает на гиперактивное состояние иммунной системы, характерное для СД1.

1. Т-клетки (CD4+ Naïve, CD4+ TCM, CD4+ TEM, CD8+ Naïve, CD8+ TEM)

Среди сигнальных путей доминирующую активность продемонстрировал путь JAK-STAT, который в некоторых субпопуляциях клеток достигал пиковых значений (до +15...+20). Одновременно наблюдалась активация гипоксического пути HIF-1 α и PI3K, однако их уровень активности был значительно ниже по сравнению с JAK-STAT. Во всех Т-клеточных субпопуляциях отмечалась тенденция к снижению активности WNT-каскада и гормонально-зависимых путей, связанных с андрогенами и эстрогенами (частично). Это указывает на смещение иммунной регуляции в сторону провоспалительных и цитокиноопосредованных сигналов.

2. В-клетки (B naïve)

Аналогично Т-лимфоцитам, у В-клеток путь JAK-STAT занимал ведущие позиции по уровню активности, достигая значений до +10. В субпопуляции B naïve также наблюдалось повышение активности гипоксического пути HIF-1 α и NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). При этом подавление активности путей WNT, TRAIL и TNF- α было более выраженным по сравнению с некоторыми популяциями Т-клеток, что указывает на специфические особенности регуляции сигнальных путей в В-клетках.

3. Моноциты (CD14 Mono)

У субпопуляции моноцитов CD14+ (классические моноциты) отмечена высокая активность пути JAK-STAT достигающая значений до +15...+20, а также активация гипоксического пути HIF-1 α и PI3K. Кроме того, MAPK (mitogen-activated protein kinase) и NF- κ B пути демонстрировали повышение активности, что соответствует характеру агрессивного воспалительного ответа, характерного для СД1.

4. Регуляторные Т-клетки (Treg)

Несмотря на их регуляторную функцию, Treg-клетки при СД1 демонстрировали повышенные уровни активности пути JAK-STAT и гипоксического пути HIF-1 α достигающих значения до +5...+12. Это может свидетельствовать о компенсаторной реакции иммунорегуляторных механизмов, направленных на ограничение интенсивного воспалительного процесса. Однако снижение активности TRAIL и WNT путей может снижать эффективность Treg-клеток в подавлении аутоиммунной реакции.

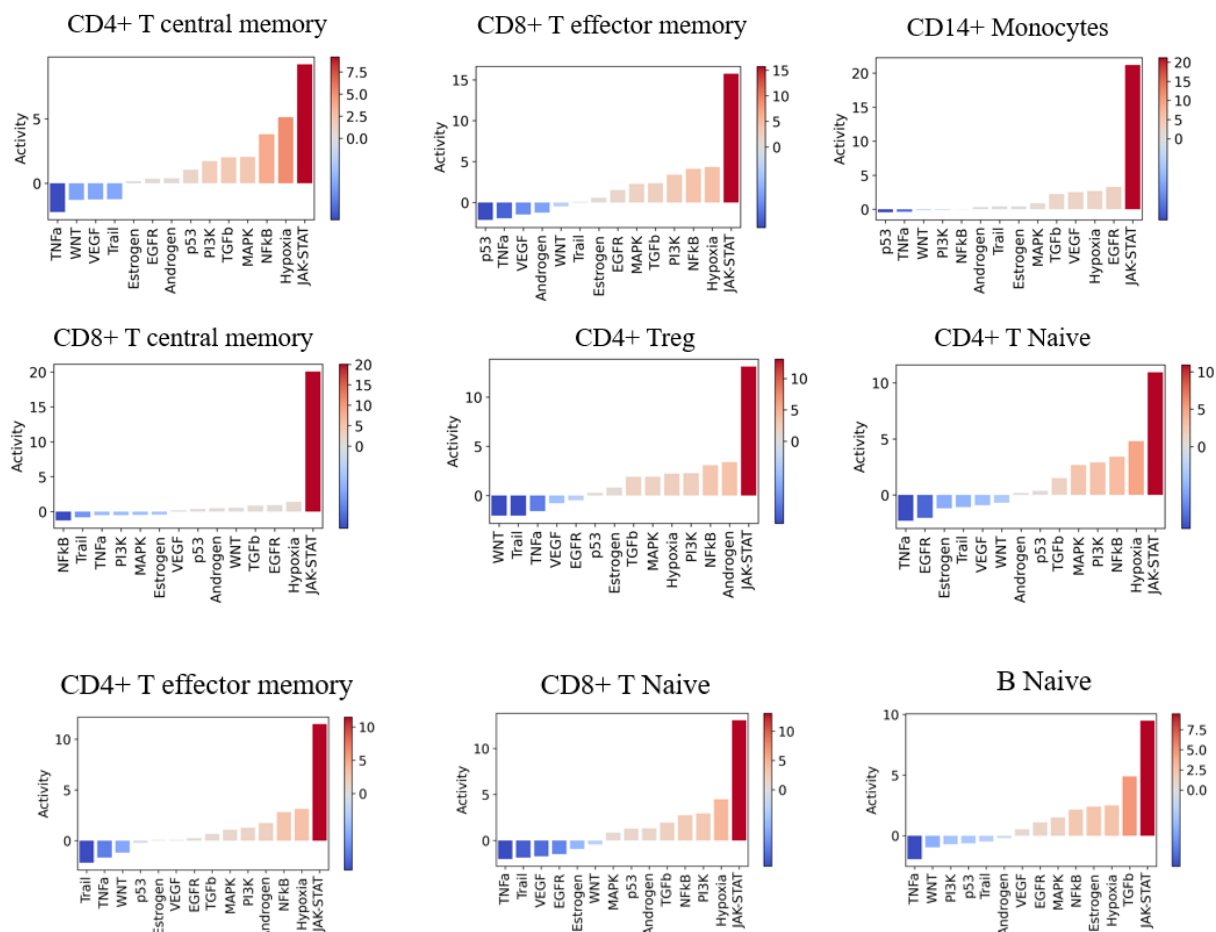


Рисунок 22 – Сравнение активности сигнальных путей между пациентами с СД1 (n=21) и здоровыми добровольцами (n=22) в ряде субпопуляций иммунных клеток. По оси X указаны названия путей (JAK-STAT, HIF-1α, PI3K, WNT и др.), по оси Y – нормированная «активность», где 0 соответствует средней активности того же пути у здоровых лиц.

Столбики красного цвета (значения >0) указывают на усиленную активность соответствующего пути при СД1, синий цвет (значения <0) – на сниженную. Шкала справа представляет собой относительный уровень активности сигнального пути у пациентов с

СД1 по сравнению со здоровыми добровольцами. Каждый график соответствует конкретной субпопуляции иммунных клеток. Activity (рус. Активность) – относительный уровень активности у пациентов с СД1 по сравнению со здоровыми добровольцами.

3.12.2 Обсуждение

Сравнение LADA с СД1

В предыдущем разделе (Раздел 3.11) было показано, что при LADA также наблюдается повышенная активность пути JAK-STAT, но в сочетании с более сбалансированными изменениями PI3K, TRAIL и гипоксического каскада, позволяющими замедлить аутоиммунную атаку. Напротив, при СД1 наблюдается резко выраженное повышение активности пути JAK-STAT (часто в диапазоне +10...+20), который доминирует

практически во всех субпопуляциях. Это указывает на более агрессивный, некомпенсированный аутоиммунный процесс, при котором регуляторные механизмы (TRAIL, WNT) значительно подавлены.

Значимость гиперактивации JAK-STAT пути

Активация JAK-STAT при СД1 поддерживает гипотезу о ключевой роли цитокин-зависимого воспаления (IFN- γ , IL-21 и др.) в быстром разрушении β -клеток [179]. В отличие от LADA, где JAK-STAT сохраняется на «умеренном» уровне, при СД1 формируется более активный аутоиммунный процесс. Высокие показатели активности пути JAK-STAT в Т- и В-клетках, моноцитах согласуются с предположениями, что при СД1 цитотоксические и провоспалительные механизмы реализуются гораздо быстрее и в более объёмном масштабе [193].

Роль HIF-1 α и PI3K

HIF-1 α (HIF-1 α) сигнальный путь усиленный одновременно с JAK-STAT, может дополнять агрессивную среду, поддерживая жизнеспособность иммунных клеток в тканях поджелудочной железы даже при нарушенной перфузии и локальном воспалении [181].

Подавление WNT, TNF- α и TRAIL

Примечательно, что при СД1 у большинства субпопуляций выявлено угнетение таких путей, как WNT, TNF- α и TRAIL. Если при LADA путь TRAIL играет роль в селективном удалении гиперактивных лимфоцитов [183], то при СД1 путь TRAIL, судя по данным, может быть сильно подавлен, что лишает иммунную систему механизма тонкой «саморегуляции». Снижение TNF- α также может отражать переключение на другие цитокиновые каскады (IFN, IL-21), которые более характерны для быстрого разрушения β -клеток. Угнетение WNT часто свидетельствует о смещении в сторону зрелого воспалительного фенотипа вместо процессов, связанных с клеточной пластичностью или восстановлением тканей, что ранее наблюдалось и в группе LADA.

3.13 Сравнение LADA и СД1: принципиальные отличия в регуляции аутоиммунного процесса через JAK-STAT и TRAIL

3.13.1 Результаты

Сопоставление сигнальных профилей иммунных клеток (Т- и NK-клеток различных фенотипов, включая CD4⁺ Naïve/TCM/TEM, CD8⁺ Naïve/TCM/TEM, Treg, NK CD56^{bright} и NK CD56^{dim}) между LADA и СД1 продемонстрировало неожиданный и принципиально важный феномен (рисунок 23): При LADA отмечается более низкая активность сигнального пути JAK-STAT, в то время как у пациентов с СД1 данный путь характеризуется системной гиперактивацией. Таким образом, у пациентов с СД1 JAK-STAT является ключевой детерминантой, определяющей скорость аутоиммунной деструкции β -клеток

поджелудочной железы, тогда как у пациентов с LADA его влияние носит менее выраженный характер.

Сигнальный путь TRAIL демонстрирует повышенную активность при LADA по сравнению с СД1, что подчёркивает его роль в избирательном удалении патологически активированных иммунных клеток. В условиях СД1 данный механизм оказывается недостаточно активным, что способствует быстрому прогрессированию аутоиммунного процесса. В то же время при LADA повышенная активность TRAIL способствует поддержанию динамического равновесия, которое препятствует развитию быстрой деструкции β -клеток. Иными словами, LADA характеризуется сдержанностью JAK-STAT и усиленной активностью TRAIL, в то время как при СД1 наблюдается противоположная ситуация, рис. 23.

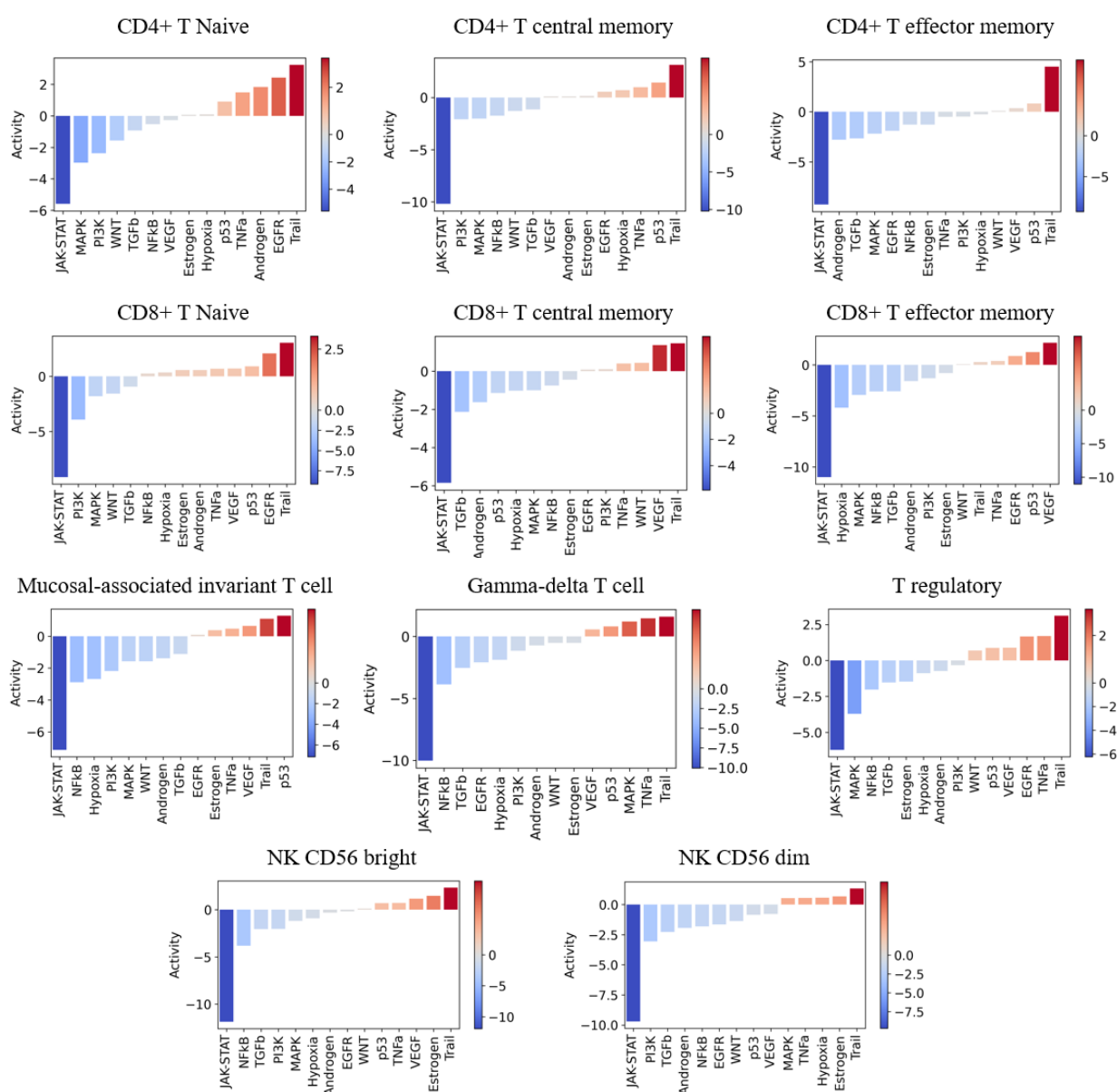


Рисунок 23 – Сравнение активности сигнальных путей между пациентами с LADA (n=15)

и СД1 (n=21) в ряде субпопуляций иммунных клеток. По оси X указаны названия путей, по оси Y – нормированная активность, где 0 соответствует средней активности того же пути у СД1. Столбики красного цвета (значения >0) указывают на усиленную активность соответствующего пути при LADA, синий цвет (значения <0) – на сниженную. Шкала справа представляет собой относительный уровень активности сигнального пути у пациентов с LADA по сравнению с СД1. Каждый график отвечает соответствующей субпопуляции иммунных клеток. Activity (рус. Активность) – относительный уровень активности у пациентов с LADA по сравнению с СД1.

3.13.2 Обсуждение

Качественно иная стратегия иммунной регуляции при LADA

При LADA наблюдается особая иммунная стратегия: вместо «быстрой» деструкции β -клеток, характерной для СД1, формируется хроническое, но менее агрессивное воспаление. Ключевые отличия включают пониженную активность JAK-STAT каскада и усиленную экспрессию TRAIL. Эта комбинация позволяет иммунной системе избирательно подавлять наиболее агрессивные клоны Т- и НК-клеток, сохраняя при этом умеренную аутоиммунную активность. В итоге β -клетки разрушаются медленнее, что даёт шанс дольше сохранять их функцию.

Эти данные подтверждают, что LADA — самостоятельный патогенетический вариант, а не просто «замедленная» форма СД1. Новые подходы к иммуномодуляции могут повысить эффективность лечения за счёт регуляции противовоспалительных механизмов и сохранения резерва β -клеток.

Таким образом, на основе транскриптомного профиля периферических мононуклеаров крови установлено, что у пациентов с СД1, LADA и СД2, а также здоровых добровольцев количественное соотношение субпопуляций иммунных клеток значимо не различается, но функциональная активность клеточного иммунитета (а именно, активность сигнальных путей) аутоиммунном СД различна, что указывает на функциональную перестройку клеточного иммунитета при различных типах диабета. В работе определены ключевые сигнальные пути, вовлечённые в аутоиммунную деструкцию β -клеток при СД1 и LADA. У пациентов с СД1 обнаружена гиперактивация JAK-STAT и подавление TRAIL, тогда как при LADA активность JAK-STAT умеренна, а TRAIL, наоборот, усиливается, что отражает различную динамику аутоиммунного процесса.

3.14 Сигнальные особенности эффекторных CD4+ Т-клеток при LADA и СД1

Транскрипционные факторы (transcription factors, TF, ТФ) формируют генные регуляторные сети, определяющие характер аутоиммунного ответа при СД1 и LADA. В частности, STAT- и IRF-белки (Signal Transducer and Activator of Transcription и Interferon

Regulatory Factors) играют ключевую роль в модуляции противовирусных и провоспалительных сигнальных каскадов, а также в формировании агрессивности Т-клеточного ответа. Помимо них, существует целый ряд других ТФ (например, из семейств NF-κB и других), которые совместно регулируют гены, связанные с активацией, пролиферацией и дифференцировкой эффекторных Т-лимфоцитов.

3.14.1 Результаты

Для сравнения активности транскрипционных факторов между пациентами с LADA и СД1 мы использовали разницу в экспрессии генов, полученную при псевдобалковом анализе. При этом учитывали только степень изменения экспрессии ($\log_2\text{FoldChange}$) у пациентов с LADA относительно пациентов с СД1. Анализ эффекторных Т-клеток памяти (CD4⁺ TEM) показал, что при LADA по сравнению с СД1 существенно снижается активность не только *STAT* и *IRF* факторов, но и ряда других транскрипционных регуляторов (рисунок 24). Ключевые ТФ, чья активность уменьшается, можно условно сгруппировать по функциональным доменам и вовлечённости в иммунные процессы:

1. Основные компоненты оси STAT-IRF:

STAT1, *STAT2*, *IRF1*, *IRF3*: Эти факторы играют центральную роль в противовирусных и провоспалительных реакциях, регулируя экспрессию интерферон-зависимых генов (*IFNG*, *ISG15*, *IFIT2*) и сигналов, усиливающих Т-клеточную активность, а также развитие NK-клеток [194, 195]. Снижение их активности при LADA указывает на снижение интенсивности провоспалительных и цитокино-опосредованных реакций, которые достигают более высокого уровня при СД1.

2. Факторы, связанные с NF-κB и AP-1 путями:

RELA (компонент NF-κB), *REL*, *NFKB1*, а также *MYC* и *ETS1*, участвующие в активации и пролиферации эффекторных лимфоцитов [196-198]. Снижение активности этих факторов при LADA может способствовать уменьшению интенсивности провоспалительных и цитокин-опосредованных реакций подобно тому, что наблюдается при снижении активности *STAT*- и *IRF*-факторов.

3. Регуляторы клеточного дифференцирования и фенотипирования Т-клеток:

RORC (связан с формированием Th17-клеток), *TCF7*, *ID1*, *SMAD3*, *CREB1* — факторы, вовлеченные в дифференцировку и функциональную специализацию Т-клеток [199-202]. Их пониженная активность при LADA может ограничивать формирование высокоспециализированных агрессивных клонов, способствуя более стабильному, но менее деструктивному аутоиммунному фенотипу.

4. Факторы с ролью в регуляции клеточного цикла и апоптоза:

DDIT3, *POU4F1*, *CUX1*, *ZNF148*, *STAT5A*, *ZNF382*: Некоторые из этих ТФ участвуют в контроле клеточного цикла, стрессовых ответах и апоптозе, а также в процессах дифференцировки [203-208]. Снижение активности этих факторов при LADA способствует поддержанию умеренной аутоиммунной активности, ограничивая избыточную пролиферацию и избыточное развитие аутоагрессивных Т-клеток

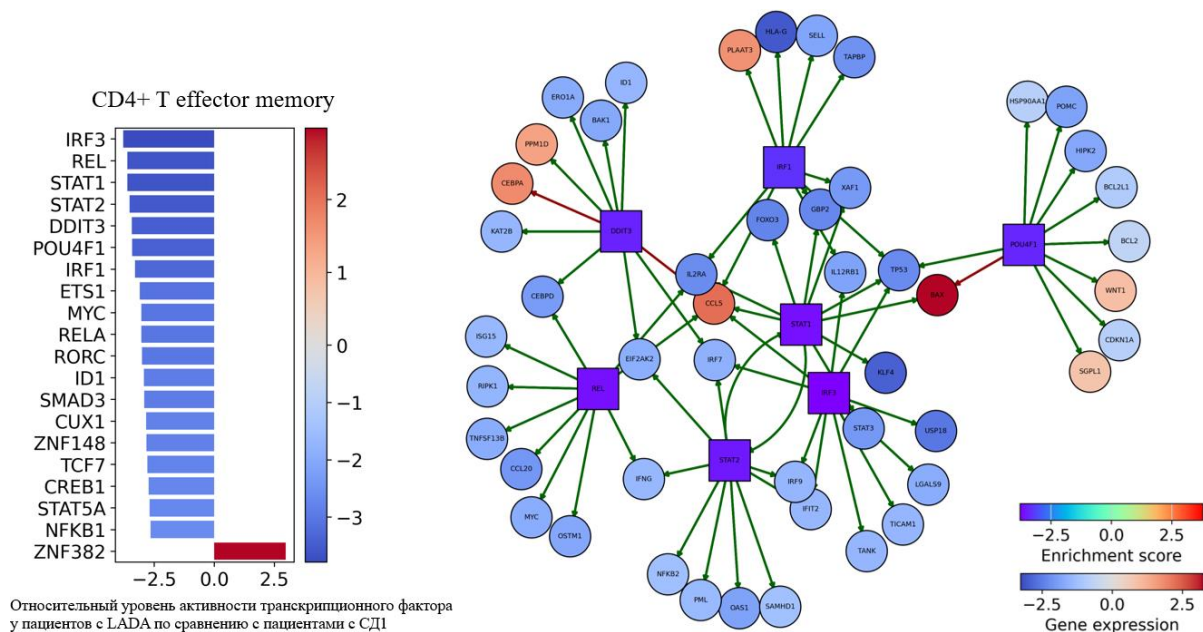


Рисунок 24 – Сравнительный анализ активности транскрипционных факторов (ТФ) и связанных с ними генов в эффекторных CD4+ Т-клетках памяти у пациентов с LADA (n=15) по сравнению с СД1 (n=21). Левая гистограмма: для каждого ТФ (ось Y) показана величина «индекса активности» (ось X, от -3 до +3), рассчитанная с учётом экспрессии целевых генов, ассоциированных с данным фактором. Значения >0 (красно-оранжевая гамма) указывают на более высокую активность у LADA, а <0 (синие оттенки) — на сниженную по отношению к СД1. Например, *STAT1*, *STAT2*, *IRF1*, *IRF3* и ряд других факторов демонстрируют отрицательные значения, отражая уменьшение их активности при LADA. Правая сетевая диаграмма: квадраты (фиолетовые/розовые) обозначают сами ТФ (например, *STAT1*, *IRF1*, *REL*), а окружности (голубые/оранжевые/красные) — целевые гены, регулируемые этими факторами. Цвет в каждой вершине (и соответствующая шкала в легенде) показывает степень обогащения/экспрессии: вершины с положительными (красными) оттенками имеют повышенную экспрессию или более высокий «enrichment score» при LADA, синие оттенки указывают на снижение. Соединяющие ребра (зелёные линии) отражают связь «ТФ ↔ ген-мишень» по данным регуляторных сетей (например, гены, регулируемые *IRF1*). Анализ проведён методом scRNAseq с последующей дифференциальной оценкой активности ТФ (инструментарий decoupler / scParadise), где за

«0» условно принимается средний уровень активности/экспрессии в группе СД1. Таким образом, положительные сдвиги говорят о более выраженной активности (или экспрессии) в LADA, а отрицательные — о её уменьшении.

На фоне снижения данных ТФ изменяется экспрессия целевых генов, связанных с антиген-презентацией (*HLA-G*, *TAPBP*), регулированием апоптоза (*BAX*, *BCL2L1*), клеточной миграцией (*CCL5*, *CCL20*), а также интерферон-зависимых генов (*ISG15*, *IFIT2*) [209-212]. В совокупности это свидетельствует о более сбалансированном транскрипционном профиле, который поддерживает хронический аутоиммунный ответ при LADA, ограничивая чрезмерную активацию и выраженный цитотоксический ответ, характерный для СД1.

3.14.2 Обсуждение:

Снижение активности не только *STAT-IRF* при LADA по сравнению с СД1, но и широкого круга других транскрипционных факторов, вовлеченных в провоспалительные, цитотоксические и дифференцировочные программы эффекторных Т-клеток, отражает более тонкий уровень регуляции аутоиммунного ответа при LADA [213]. При СД1 гиперактивация *STAT* и *IRF*, в сочетании с усилением *NF-κB* и *AP-1* каскадов, обеспечивает более агрессивное разрушение β-клеток. В отличие от этого, у пациентов с LADA понижение активности этих факторов создает условия для формирования менее агрессивной, но более длительной аутоиммунной реакции.

Выявленные изменения при LADA по сравнению с СД1, вероятно, связаны с тем, что организм адаптируется за счёт формирования компенсаторных механизмов в ответ на умеренную, но продолжительную антигенную нагрузку. Снижение активности *STAT-IRF* и связанных с ними ТФ приводит к уменьшению секреции ключевых цитокинов и хемоаттрактантов, необходимых для набора и активации чрезмерно агрессивных Т-клонов. Кроме того, понижается уровень проапоптотических сигналов, что замедляет быструю гибель β-клеток. Одновременно с этим сниженная активность факторов, отвечающих за формирование высокоспециализированных эффекторов (например, Th17-клеток через *RORC*), говорит о сохранении более гетерогенного и менее агрессивного пула Т-лимфоцитов. Ранее было показано, что *RORC* играет важную роль в регуляции секреции инсулина β-клетками. При СД2 выявлено значительное снижение экспрессии этого ТФ, что коррелирует с повышением уровня HbA1c и снижением секреции инсулина [214].

С точки зрения клинической практики, выявленные особенности транскрипционной регуляции подтверждают, что LADA следует рассматривать как особую форму аутоиммунного диабета. При ней разрушение β-клеток протекает медленнее и частично регулируется, что открывает возможности для терапии, нацеленной на поддержание

сбалансированной активности иммунных клеток. К таким подходам относятся воздействие на *STAT-IRF* путь, модификация активности отдельных транскрипционных факторов (например, снижение избыточной активности *IRF* при СД1 или поддержание низкой активности *STAT1* при LADA), а также регуляция ключевых генов-мишеней (*HLA-G*, *BAX*, *CCL5*).

3.15 Сигнальные особенности эффекторных CD8⁺ Т-клеток при LADA и СД1

3.15.1 Результаты

При анализе транскриптомного профиля CD8⁺ ТЕМ выявлено, что ряд ключевых ТФ, обычно ассоциируемых с агрессивным провоспалительным ответом, оказывается гипоактивированным в сравнении между LADA и СД1 (рисунок 25). К числу таких ТФ относятся:

- **STAT-семейство (*STAT1*, *STAT2*, *STAT3*):** Обычно данные ТФ отвечают за процесс активации иммунных клеток, в ответ на их стимуляцию цитокинами, в том числе при аутоиммунных заболеваниях. Наблюдаемое снижение их активности может указывать на ограничение активации иммунных клеток в ответ на цитокины.
- **Компоненты NF-κB каскада (*RELA*, *NFKB1*, *REL*):** Эти факторы регулируют интенсивность воспалительного ответа, а также миграцию и активацию иммунных клеток. Снижение их активности указывает на ослабление воспалительного процесса.
- ***IRF3*:** Ключевой регулятор интерферон-опосредованного ответа, чья сниженная активность указывает на ослабление интерферон-опосредованного ответа.
- ***SMAD2*:** Компонент TGF-β-зависимых путей, влияющий на дифференцировку и аутоотолерантность. Его сниженная активность может свидетельствовать о нарушении иммунного равновесия, ограничивая увеличение количества агрессивных клонов Т-клеток.

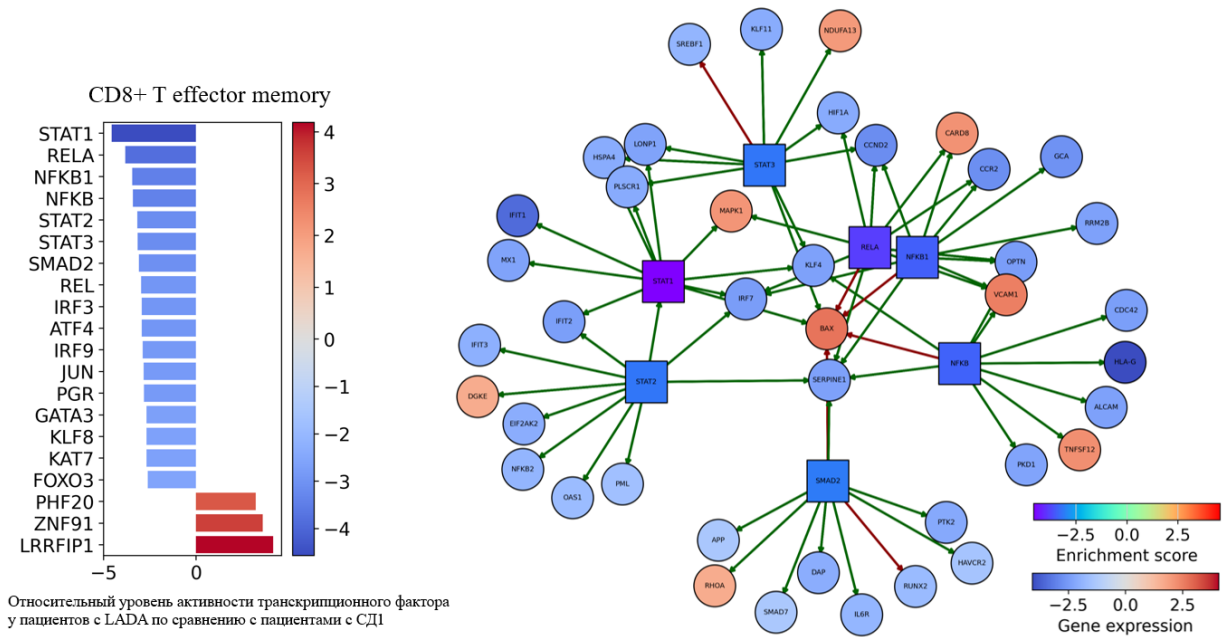


Рисунок 25 – Сравнительный анализ активности транскрипционных факторов (ТФ) и связанных с ними генов в эффекторных CD8+ Т-клетках памяти у пациентов с LADA (n=15) по сравнению с СД1 (n=21). Левая гистограмма: для каждого ТФ (ось Y) показана величина «индекса активности» (ось X, от -4 до +4), рассчитанная с учётом экспрессии целевых генов, ассоциированных с данным фактором. Значения >0 (красно-оранжевая гамма) указывают на более высокую активность у LADA, а <0 (синие оттенки) — на сниженную по отношению к СД1. Например, *STAT1*, *RELA*, *NFKB1* и ряд других факторов демонстрируют отрицательные значения, отражая уменьшение их активности при LADA.

Правая сетевая диаграмма: квадраты (фиолетовые/розовые) обозначают сами ТФ (например, *STAT1*, *STAT2*), а окружности (голубые/оранжевые) — целевые гены, регулируемые этими факторами. Цвет в каждой вершине (и соответствующая шкала в легенде) показывает степень обогащения/экспрессии: вершины с положительными (красными) оттенками имеют повышенную экспрессию или более высокий «enrichment score» при LADA, синие оттенки указывают на снижение. Соединяющие ребра (зелёные линии) отражают связь «ТФ ↔ ген-мишень» по данным регуляторных сетей (например, гены, регулируемые *IRF1*). Анализ проведён методом scRNAseq с последующей дифференциальной оценкой активности ТФ (инструментарий decoupler / scParadise), где за «0» условно принимается средний уровень активности/экспрессии в группе СД1. Таким образом, положительные сдвиги говорят о более выраженной активности (или экспрессии) в LADA, а отрицательные — о её уменьшении

Наряду с указанными ТФ, уменьшение их активности затрагивает и соответствующие мишени, включая гены, отвечающие за апоптоз (*BAX*), презентацию

антигенов (*HLA-G*), клеточную миграцию и адгезию (*VCAM1*, *ALCAM*), а также интерферон-зависимые гены (*ISG15*, *IFIT2*) [215].

3.15.2 Обсуждение

Сравнение с другими аутоиммунными патологиями

Известно, что JAK/STAT-, IRF- и NF-κB-зависимые пути играют центральную роль в ряде аутоиммунных заболеваний. Например, при системной красной волчанке, ревматоидном артрите, боковом амиотрофическом склерозе, где их активация коррелирует с тяжестью и прогрессированием заболевания [216-219]. Показано, что пациенты с СД1 имеют более высокий риск возникновения сопутствующих аутоиммунных заболеваний с возможностью их бессимптомного течения [220]. Снижение активности этих ТФ при LADA по сравнению с СД1 может указывать на менее выраженное участие провоспалительных механизмов. Это отражает функциональный профиль, при котором агрессия лимфоцитов остается более контролируемой, чем при СД1 или других аутоиммунных заболеваниях.

При некоторых аутоиммунных заболеваниях наблюдается феномен адаптивного снижения активности ключевых провоспалительных факторов в ответ на длительное воздействие аутоантигенов [221]. Аналогичный принцип можно предположить и для LADA: иммунная система, столкнувшись с длительной и умеренной антигенной стимуляцией, формирует транскрипционный профиль, предотвращающий переход в максимальную агрессивную стадию, подобную СД1. Это явление напоминает механизмы адаптивной толерантности, описанные при хронических вирусных инфекциях или длительных аутоиммунных процессах [221].

3.16 Изменения в антиген-презентирующих путях CD8+ эффекторных Т-клеток при LADA

3.16.1 Результаты:

При анализе транскриптного профиля CD8+ эффекторных Т-клеток (CD8+ TEM) при LADA по сравнению со здоровыми добровольцами выявлены изменения в группах ТФ и связанных с ними генов (рисунок 26). В частности, примечательно усиление активности RFX-комплекса (включающего *RFXANK*, *RFXAP*, *RFX5*) и коактиватора *CIITA*. Оба эти элемента играют ключевую роль в регуляции генов МНС класса II, что приводит к повышенной экспрессии ряда HLA-генов (*HLA-DP*, *DQ*, *DR*) [222, 223].

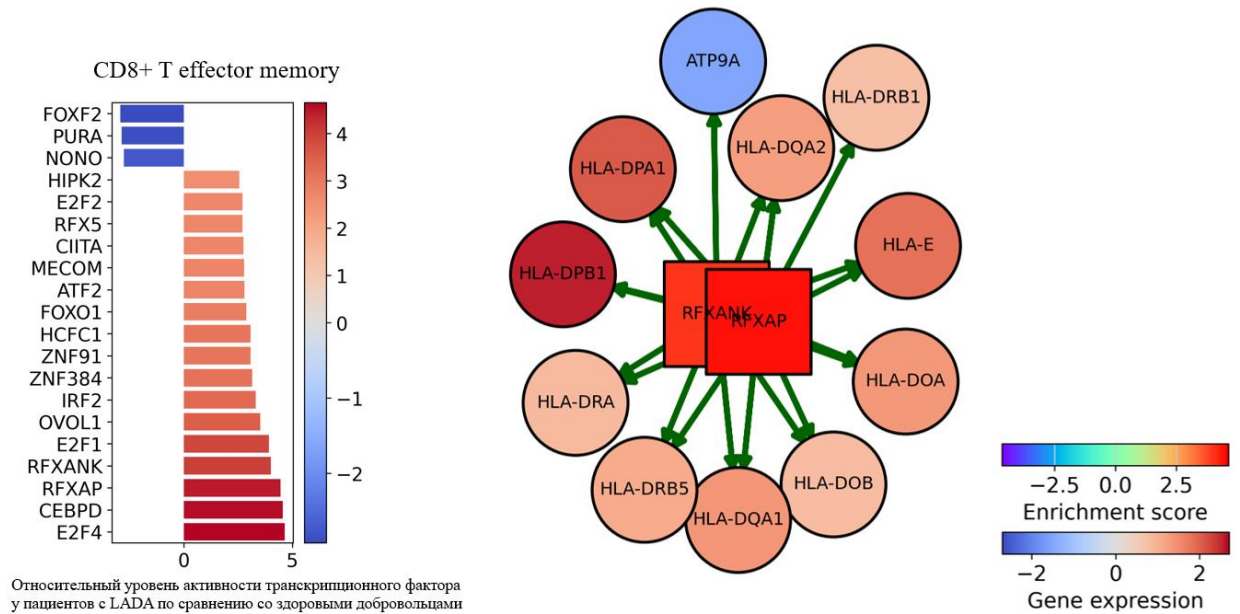


Рисунок 26 – Сравнительный анализ транскрипционных факторов (ТФ) и экспрессии соответствующих генов в CD8⁺ эффекторных Т-клетках (CD8⁺ TEM) у пациентов с LADA (n=15) по сравнению со здоровыми добровольцами (n=22). Левая гистограмма: показывает «индекс активности» (ось X, от -3 до +5) для каждого ТФ (ось Y). Положительные столбики (красно-оранжевая гамма) означают повышенную активность гена при LADA, а отрицательные (синие) — уменьшенную по отношению к здоровым. Отмечены факторы из комплекса *RFXANK/RFXAP/RFX5* и *CIITA*, регулирующие транскрипцию МНС класса II. Правая сетевая диаграмма: ТФ отображаются квадратами (например, *RFXANK*, *RFXAP*, *RFX5*, *CIITA*), а их потенциальные гены-мишени (*HLA-DP*, *DQ*, *DR* и др.) — кругами. Цвет каждой вершины отражает уровень экспрессии/обогащения: красные и оранжевые тона указывают на более высокую экспрессию, голубые — на пониженную. Зелёные стрелки показывают регуляторные связи «ТФ → ген-мишень»

Одновременно отмечено ослабление активности некоторых неспецифичных ТФ (*FOXF2*, *PURA*, *NONO*), что может отражать «специализацию» транскрипционного профиля в пользу более специфичного иммунного ответа [224-226]. В нижней части списка ТФ, имеющих повышенную активность, присутствуют такие факторы, как *ATF2*, *FOXO1*, *ZNF91*, *ZNF384*, *IRF2*, *E2F2*, *E2F4*, *CEBPD*, которые могут способствовать перестройке регуляторных сетей в сторону усиления антиген-презентирующих функций и адаптации CD8⁺ TEM к аутоиммунной среде.

3.16.2 Обсуждение

Повышенная активность *RFX*-комплекса и *CIITA* обычно характерна для «профессиональных» антиген-презентирующих клеток (например, дендритных клеток),

однако в условиях аутоиммунного процесса может проявляться и в Т-клетках, усиливая их способность к презентации антигенов или изменяя взаимодействия между иммунными клетками.

Изменение экспрессии МНС класса II и увеличение роли RFX/СІТА могут быть общим признаком аутоиммунных процессов, например, полиморфизм гена СІТА связан с увеличением риска развития ревматоидного артрита [227, 228]. В данном контексте LADA и СД1 могут отличаться не только интенсивностью провоспалительных каскадов, но и тем, как Т-клетки перестраивают свои антиген-презентирующие возможности. Если при СД1 преобладают стремительные и неконтролируемые механизмы, то при LADA это может быть более сбалансированный режим взаимодействия, который поддерживает хроническое, но не такое быстрое повреждение β -клеток, как при СД1.

Таким образом, на основе транскриптомного профиля периферических мононуклеаров крови подтверждено, что аутоиммунный сахарный диабет представлен как минимум двумя различными эндотипами — классическим СД1 и LADA. Результаты указывают на необходимость дифференцировать LADA и СД1 в клинических условиях, что необходимо для подбора персонализированной терапии.

3.17 Моноцит-хемоаттрактантный белок-1 при аутоиммунном СД

3.17.1 Результаты

В ходе исследования были проанализированы уровни моноцит-хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1) у пациентов с разными типами сахарного диабета (СД1, СД2, LADA), а также у здоровых добровольцев, таблица 7.

Таблица 7 – Уровень MCP-1 и различия в группах. Данные указаны в формате: медиана [25-й; 75-й процентиль].

Показатель	СД1 N = 22	СД2 N = 22	LADA N = 14	Здоровые добровольцы N = 22	P-значение*
MCP-1, пг/мл	213 [162; 263]	228 [168; 294]	218,51 [160; 268]	174,14 [151; 207]	0,089

*Критерий Краскела-Уоллиса. Применена поправка на множественность сравнений методом Бонферрони, уровнем статистической значимости считали $p < 0,008$.

Сравнение уровней MCP-1 между группами:

У пациентов с СД1 и СД2 содержание MCP-1 превышало показатели в группе сравнения, однако статистическая значимость не достигнута. Для пациентов с LADA была отмечена только тенденция к повышению MCP-1 относительно группы сравнения ($p > 0,05$), однако статистическая значимость также не достигнута. Проведённый ROC-анализ

(сравнение LADA относительно здоровых) продемонстрировал $AUC = 0,656$ ($p=0,119$), указывая на недостаточную чувствительность и специфичность МСР-1 в дифференциальной диагностике LADA (рисунок 27).

Таким образом, показано, что уровень МСР-1 не различался статистически значимо между пациентами с СД1, LADA и СД2, а также по сравнению со здоровыми добровольцами, что свидетельствует о необходимости поиска более специфичных маркеров.

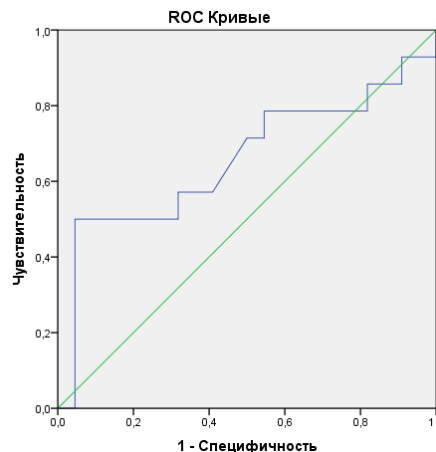


Рисунок 27 – ROC-кривая. Проверяемая переменная уровень МСР-1, а переменная состояния наличие LADA. Направление проверки по возрастанию.

3.17.2 Обсуждение

Полученные результаты частично подтверждают данные предыдущих исследований, показывающих повышение уровня МСР-1 у пациентов с СД. В работе Donath и Shoelson (2011) приведены данные о том, что МСР-1 играет ключевую роль в воспалительных процессах, связанных с СД2 и может способствовать развитию инсулинорезистентности и снижению функции β -клеток [229]. Данные результаты также согласуются с выводами Kolb и Mandrup-Poulsen (2005), которые указали на возможное участие МСР-1 в патогенезе СД2 через его влияние на воспалительный ответ [230].

Дополнительно, работа Tsvetelina V. Velikova и соавторов, подтверждает, что воспалительные цитокины, включая МСР-1, могут быть связаны с развитием СД2 и его осложнений [231]. В данной работе описывается роль МСР-1 в привлечении моноцитов и макрофагов к очагам воспаления, что сходится с нашими наблюдениями повышенных уровней МСР-1 у пациентов с различными типами диабета на уровне статистической тенденции.

3.18 Эндотипы сахарного диабета

3.18.1 Результаты

На рисунке 28 представлено сравнительное исследование активности клеточных путей и транскрипционных факторов в регуляторных Т-лимфоцитах у двух групп: GAD-положительных пациентов и здоровых добровольцев. Группа GAD-положительных пациентов соответствует эндотипам аутоиммунного СД, куда одновременно входят СД1 и LADA для которых характерен аутоиммунный компонент (наличие антител к GAD и низкий уровень С-пептида). Анализ показал, что при SAID изменяется активность ряда транскрипционных факторов.

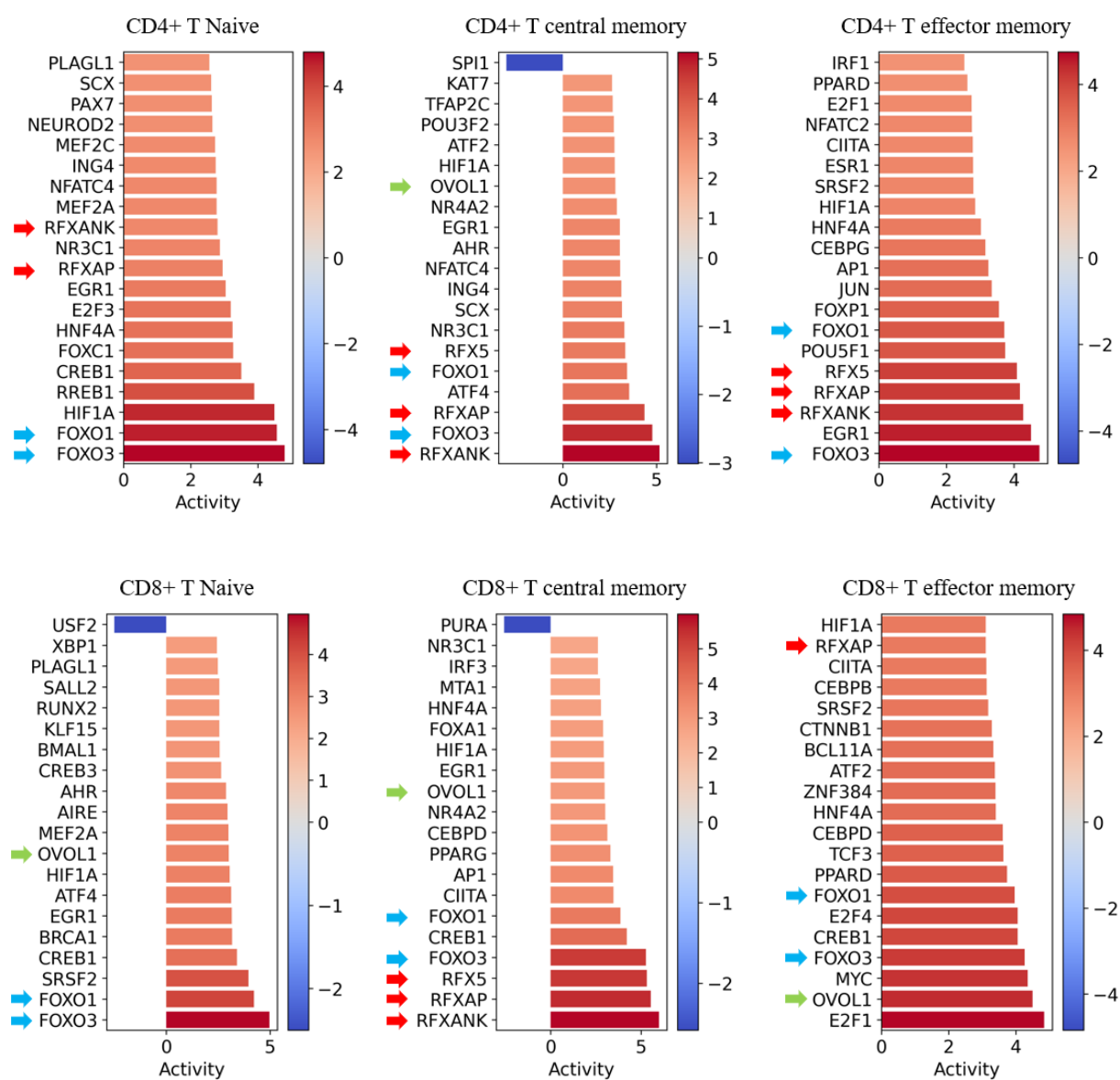


Рисунок 28 – Анализ активности транскрипционных факторов (ТФ) и их регулируемых генов в субпопуляциях CD4+ и CD8+ Т-клеток у GAD-положительных пациентов

(объединяющих СД1 и LADA) и здоровых добровольцев. Левая гистограмма: отражает «индекс активности» каждого ТФ (ось X), вычисленный по экспрессии связанных с ним генов. Положительные значения (красно-оранжевая гамма) означают повышенную активность при (GAD+), а отрицательные (синие тона) — сниженную по сравнению со здоровыми. Вертикальный список (ось Y) содержит названия ТФ (*FOXO1*, *FOXO3*, *RFXANK* и др.). Стрелки указывают на ключевые факторы, изменение активности которых наиболее актуально: красные стрелки – ТФ, связанные с МНС II (*RFX5*, *RFXAP*, *RFXANK*), синие стрелки – факторы из семейства FOXO, отвечающие за клеточную память/выживание, зеленые стрелки – ген *OVOL1*, ранее не описанные в контексте аутоиммунного СД при изучении ПМНК. Activity (рус. Активность) – Относительный уровень активности транскрипционного фактора у GAD+ пациентов по сравнению со здоровыми добровольцами.

CD4+ Т-лимфоциты

В CD4+ T Naïve клетках отчётливо гиперэкспрессированы *FOXO1*, *FOXO3*, *HIF1A*, *RFXAP*, *RFXANK* и *EGR1*; умеренно повышены *RREB1*, *CREB1*, *MEF2A*, *E2F3* и ряд других. Это указывает на вовлечение факторов, регулирующих выживание (*FOXO1/FOXO3*), метаболическую адаптацию (*HIF1A*) и антиген-презентацию (*RFX*-комплекс). В центральных клетках памяти лидируют *RFXANK*, *FOXO3*, *FOXO1*, а также заметна активация *NR3C1* (глюкокортикоидного рецептора), что может отражать компенсаторные или, наоборот, резистентные механизмы к глюкокортикоидам. В эффекторных клетках памяти особо выделяются *FOXO3*, *EGR1* и *RFX* (*RFXANK*, *RFXAP*, *RFX5*), а также *CIITA*, что указывает на усиленную экспрессию МНС II и персистирующее аутоиммунное воспаление. Кроме того, повышенные уровни *FOXP1/FOXP3* могут означать либо попытку регулировать воспаление, либо формировать специфические активированные генные сети в группе CD4 Т-клеток

CD8+ Т-лимфоциты

У CD8+ T Naïve почти все ТФ повышены (*FOXO1/FOXO3*, *SRSF2*, *CREB1*, *BRCA1*, *ATF4*, *EGR1*, *HIF1A*), за исключением единственного случая снижения *USF2*. В центральных клетках памяти CD8+ преобладают *RFX* (*RFXANK*, *RFXAP*, *RFX5*) *NR3C1*, *IRF3*, *MTA1*, *HNF4A*, *FOXA1*, *HIF1A* и *EGR1*, а также *OVOL1* и *NR4A2*, указывающие на сложные механизмы регуляции транскрипции и воспаления (например, *IRF3* может усиливать аутоиммунную реакцию). В эффекторных клетках памяти наиболее выражены *E2F1*, *MYC*, *FOXO3*, *FOXO1*, *RFXAP*, *CIITA*, *CEBPB* и *SRSF2*, что отражает активность клеточного цикла (*E2F1*, *MYC*) и нетипичную для CD8+ клеток экспрессию МНС II (*RFXAP* и *CIITA*), вероятно связанную с перекрёстными путями антиген-презентации.

Такие сдвиги в экспрессии ТФ подчёркивают усиленную аутоиммунную реакцию, характерную для пациентов с GAD+ антителами.

Таким образом, установлены отличия эндотипов аутоиммунного сахарного диабета (СД1 и LADA) при анализе транскриптомного профиля периферических мононуклеаров крови: повышенная активность транскрипционных факторов *FOXO1* и *FOXO3*, ответственных за формирование клеточной памяти и активацию Т-клеток; комплекса *RFXAP–RFXANK–RFX5* и *CIITA*, усиливающих антиген-презентацию; *HIF1A* и *MYC*, способствующих активации процессов пролиферации, выживания и функционирования эффекторных Т-клеток у GAD-положительных пациентов. Данные особенности объясняют гетерогенность клинических проявлений при классическом СД1 и LADA, обуславливая различия в скорости развития дисфункции β-клеток и, соответственно, сроках необходимости назначения инсулинотерапии.

3.18.2 Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что как у пациентов с СД1 и LADA Т-лимфоциты пребывают в состоянии повышенной транскрипционной активности множества генов, ответственных за:

Метаболическую перестройку и выживание клеток

Повышенная экспрессия *HIF1A*, *MYC* указывают на переключение клеток на более интенсивный метаболический режим. Подобные изменения были описаны в работах, где также отмечается, что регуляция метаболизма в Т-лимфоцитах может играть ключевую роль в развитии аутоиммунного процесса и ряда онкологических заболеваний [232, 233].

Усиленную антиген-презентацию

Комплекс *RFXAP*, *RFXANK*, *RFX5* и *CIITA* традиционно ассоциирован с регуляцией МНС класса II. Аналогичные данные представлены в исследованиях по СД1, где повышенная экспрессия МНС II на иммунных клетках коррелировала с тяжестью аутоиммунного процесса [234].

Клеточную память и активированный фенотип

FOXO1/FOXO3 активно вовлечены в формирование памяти Т-лимфоцитов и усиление аутоиммунной реакции. Ряд работ подтверждает, что FOXO-семейство, а также гены из FOXO-группы, могут с одной стороны поддерживать толерантность, а с другой — при определённых условиях (например, в присутствии провоспалительных цитокинов) усиливать патогенный потенциал Т-клеток [235, 236].

Расширение эффекторного пула

E2F1 и *MYC* традиционно являются ключевыми факторами пролиферации. Их гиперактивация в CD8+ эффекторных клетках памяти согласуется с гипотезой об усиленной цитотоксической активности против β -клеток при аутоиммунном СД [237, 238].

Полученные результаты согласуются с классическим представлением о том, что SAID характеризуется аутоиммунным воспалением, ассоциированным с усиленной презентацией антигенов и цитотоксической активностью Т-клеток [18]. Одновременно выявлено расширение участия транскрипционных факторов, ранее не всегда явно упоминавшихся в контексте СД (например, *OVOL1*, *PURA*, *KAT7*, *TFAP2C*). В исследованиях по аутоиммунным заболеваниям и онкологии эти факторы всё чаще упоминаются как дополнительные регуляторы дифференцировки и активности Т-лимфоцитов [239-242].

Таким образом, мы получили более детальную картину патогенеза SAID на уровне субпопуляций Т-клеток в сравнении со здоровыми донорами. Полученные данные расширяют традиционные представления, основанные только на наличии антител к GAD и ассоциированных HLA-аллелях, а также указывают на транскрипционные факторы, вовлечённые в аутоиммунную агрессию.

3.19 Ограничения исследования

Несмотря на важность полученных результатов и применение прогрессивных технологий, исследование остаётся одномоментным (поперечным), поэтому в нём не учитывается динамика аутоиммунных процессов на разных стадиях заболевания или под влиянием терапии.

Также следует учитывать высокую стоимость и сложность подготовки образцов для scRNAseq, что влияет на размер выборки и требует глубоких биоинформатических компетенций. Разные методы интеграции данных (Harmony, scVI, Seurat RPCA и др.) корректируют «батч эффект», однако невозможность выполнения секвенирования всех образцов одномоментно может накладывать технические артефакты. Тем не менее, в данной работе глубина покрытия транскриптома и разбор отдельных клеток составили более 90%, что подтверждает высокое качество полученных данных и указывает на перспективность такого подхода для дальнейших исследований с расширением выборки и более детальным анализом клеток панкреатических островков.

3.20 Направления дальнейших исследований

В дальнейшем особый интерес представляет исследование репертуара Т- и В-клеточных рецепторов с применением их одновременного single-cell секвенирования. Это позволит проследить путь (траекторию) развития иммунных клеток от наивного до

эффекторного или «истощённого» состояния, а также определить, какие именно антигены запускают аутоиммунную атаку. Анализ этих «критических» клонов даст возможность понять, как формируется аутоагрессивный иммунный ответ и возможно ли вмешаться на раннем этапе, чтобы предотвратить деструкцию β -клеток.

Дополнительно важным шагом являются исследование на животных моделях. Например, создание и тестирование нокаутных (генетически модифицированных) мышей, в которых «выключены» гены, ответственные за ключевые сигнальные пути (например, JAK-STAT, TRAIL или связанные с антиген-презентацией), такое исследование позволит уточнить как каждое из этих звеньев влияет на аутоиммунный процесс в целом. Результаты послужат основой для разработки точных панелей генов, которые могут применяться в клинической диагностике и мониторинге: начиная от раннего выявления аутоиммунных изменений и заканчивая подбором индивидуальной иммуномодулирующей терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования использовался метод секвенирования РНК одиночных клеток (scRNAseq) для сравнительного анализа транскриптомного профиля периферических мононуклеаров крови у пациентов с LADA, СД1, а также у здоровых добровольцев. Применение этого подхода позволило выявить не только общую похожесть основных иммунных субпопуляций (Т- и В-клеток, моноцитов, НК-клеток), но и более тонкие различия в экспрессии ключевых генов и сигнальных путей, отражающих особый характер аутоиммунного процесса при LADA.

В работе продемонстрировано, что при LADA сохраняется «сбалансированная» активность иммунных клеток. Анализ дифференциально экспрессированных генов показал гипоэкспрессию *HLA-G*, *SPARC*, *C20orf204*, гиперэкспрессию *AC002460.2* в CD4⁺ T naive у пациентов с LADA по сравнению со здоровыми добровольцами. При этом в NK CD56dim-клетках при LADA выявлена повышенная экспрессия *RAB34*, что указывает на иной сценарий вовлечения клеток врождённого иммунитета. В работе показано, что такое перераспределение экспрессии генов согласуется с более медленной аутоиммунной деструкцией β -клеток, позволяя дольше сохранять их функциональную активность.

В работе также проанализированы сигнальные пути, участвующие в патогенезе аутоиммунного СД. Выявлено, что при СД1 наблюдается гиперактивация JAK-STAT сигнального пути в Т- и В-лимфоцитах, моноцитах и регуляторных Т-клетках, сопровождающаяся подавлением TRAIL, что в совокупности способствует быстрому разрушению β -клеток. Напротив, у пациентов с LADA активность JAK-STAT остаётся относительно невысокой, а путь TRAIL, наоборот, усилен, обеспечивая селективное удаление агрессивных клонов лимфоцитов и тем самым ограничивая аутоиммунный процесс. В работе продемонстрировано, что эта «сдержанная» иммунная стратегия LADA находит отражение и в транскрипционных сетях, регулирующих эффекторные Т-клетки, где снижена активность STAT-, IRF- и NF- κ B-зависимых транскрипционных факторов по сравнению с СД1. Таким образом, полученные результаты подтверждают, что LADA следует рассматривать не как замедленную форму СД1, а как отдельный эндотип аутоиммунного диабета со своими специфическими сигнальными характеристиками.

Кроме того, в работе оценена роль моноцит-хемоаттрактантного белка (MCP-1). Показано, что его уровень у пациентов с LADA не отличается от группы сравнения и по данным ROC-анализа не может использоваться как дополнительный маркер для дифференциальной диагностики LADA.

Практическая значимость выводов заключается в том, что понимание специфических регуляторных путей (JAK-STAT, TRAIL) и генов (*HLA-G*, *SPARC*, *RAB34*)

открывает возможности для целенаправленных терапевтических вмешательств. При СД1, демонстрирующем гиперактивный воспалительный паттерн, потенциальное ингибирование JAK-STAT пути или усиление TRAIL может замедлить деструкцию β -клеток и сохранить их остаточную функцию. В случае LADA необходимы эти же стратегии, которые, возможно, смогут надолго отложить переход к полной инсулинозависимости.

В работе показано, что разные формы аутоиммунного СД имеют принципиально отличающиеся транскрипционные и сигнальные паттерны. Выявленные особенности позволяют подойти к аутоиммунному СД с позиций эндотипов, расширяя классическую классификацию и повышая эффективность лечения. Полученные результаты закладывают основу для разработки новых методов иммуномодуляции, учитывающих молекулярные особенности конкретного пациента, и позволяют глубже понять природу аутоиммунного поражения β -клеток, от которого зависит клиническое течение болезни и выбор оптимальной тактики терапии. Таким образом, поставленная в работе цель — усовершенствовать концепцию эндотипов и предложить возможные патогенетически обоснованные мишени для иммунологического воздействия у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом — была достигнута.

ВЫВОДЫ

1. На основе клинических характеристик заболевания и анализа транскриптомного профиля периферических мононуклеаров крови установлено, что аутоиммунный сахарный диабет представлен как минимум двумя различными эндотипами — классическим СД1 и LADA. Полученные результаты подчёркивают необходимость дифференциальной диагностики LADA и СД1 в клинической практике для обоснованного выбора персонифицированной терапии.
2. Установлены отличия эндотипов аутоиммунного сахарного диабета (СД1 и LADA) при анализе транскриптомного профиля периферических мононуклеаров крови: повышенная активность транскрипционных факторов *FOXO1* и *FOXO3*, ответственных за формирование клеточной памяти и активацию Т-клеток; комплекса *RFXAP–RFXANK–RFX5* и *CIITA*, усиливающих антиген-презентацию; *HIF1A* и *MYC*, способствующих активации процессов пролиферации, выживания и функционирования эффекторных Т-клеток у GAD-положительных пациентов. Данные особенности объясняют гетерогенность клинических проявлений при классическом СД1 и LADA, обуславливая различия в скорости развития дисфункции β-клеток и, соответственно, сроках необходимости назначения инсулинотерапии.
3. На основе транскриптомного профиля периферических мононуклеаров крови установлено, что у пациентов с СД1, LADA и СД2, а также здоровых добровольцев количественное соотношение субпопуляций иммунных клеток значимо не различается, но функциональная активность клеточного иммунитета (а именно, активность сигнальных путей) при аутоиммунном СД различна, что указывает на функциональную перестройку клеточного иммунитета при различных типах диабета.
4. При сравнении LADA с группой здоровых отмечена гипозэкспрессия генов *HLA-G*, *SPARC* и *C20orf204*, гиперэкспрессия *AC002460.2* в CD4⁺ T-naïve и гиперэкспрессия *RAB34* в NK CD56dim-клетках, что отражает особенности иммунного ответа при LADA, связанные с его регуляцией и характером клеточной активности. При сравнении LADA и СД1 выявлена гипозэкспрессия гена *C20orf204* в CD4⁺ T-naïve, что может указывать на различия в механизмах аутоиммунного ответа между LADA и СД1.
5. Определены ключевые сигнальные пути, вовлечённые в аутоиммунную деструкцию β-клеток при СД1 и LADA. У пациентов с СД1 обнаружена гиперактивация JAK-STAT и подавление TRAIL, тогда как при LADA активность JAK-STAT умеренна, а TRAIL, наоборот, усиливается, что отражает различную динамику аутоиммунного процесса.

6. Показано, что уровень МСР-1 не различался статистически значимо между пациентами с СД1, LADA и СД2, а также по сравнению со здоровыми добровольцами, что свидетельствует о необходимости поиска более специфичных маркеров.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При появлении у пациентов с сахарным диабетом потребности в инсулинотерапии на фоне эффективности таблетированных сахароснижающих препаратов в течение минимум 6 месяцев, целесообразно определить антитела к β -клеткам. Наличие аутоантител свидетельствует о сахарном диабете типа LADA, требующем интенсификации терапии и алгоритмов ведения, регламентированных для СД1.
2. Для пациентов с СД1 перспективным является избирательное снижение активности JAK-STAT сигнального пути, что может позволить ограничить аутоиммунную деструкцию β -клеток и сохранить их функцию. При LADA, напротив, таргетное усиление сигнального пути TRAIL может способствовать селективному подавлению наиболее агрессивных клонов лимфоцитов и замедлению аутоиммунного процесса.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- аГПП 1 – Агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида 1
- АССЗ – Атеросклеротические сердечно-сосудистые заболевания
- АТ – Антитела
- ГНЦ – Государственный научный центр
- ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота
- иНГЛТ 2 – Ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2 типа
- ИМТ – Индекс массы тела
- ИФА – Иммуноферментный анализ
- ПГТТ – Пероральный глюкозотолерантный тест
- ПМНК – Периферические моноклеары крови
- ПО – Панкреатические островки
- ПЦР – Полимеразная цепная реакция
- РНК – Рибонуклеиновая кислота
- СД – Сахарный диабет
- СД1 – Сахарный диабет 1 типа
- СД2 – Сахарный диабет 2 типа
- СМ – Сульфонилмочевина
- СКФ – Скорость клубочковой фильтрации
- СН – Сердечная недостаточность
- ТФ – Транскрипционные факторы
- ADA – American Diabetes Association
- AP-1 – Activator Protein 1
- APC – Antigen-Presenting Cells
- AUC – Area Under the Curve
- BBKNN – Batch Balanced K Nearest Neighbors
- cDC1 – Type 1 Conventional Dendritic Cells
- cDC2 – Type 2 Conventional Dendritic Cells
- CPT – Cell Preparation Tube
- CTLA-4 – Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
- EASD – European Association for the Study of Diabetes
- ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- FDR – False Discovery Rate

GAD – Glutamic Acid Decarboxylase
 GEM – Gel Bead-in-Emulsion
 GWAS – Genome-Wide Association Studies
 HbA1c – Hemoglobin A1c
 HIF – Hypoxia-Inducible Factor
 HLA – Human Leukocyte Antigen
 HSPC – Hematopoietic Stem and Progenitor Cells
 IA-2 – Insulinoma-Associated 2 (антиген)
 IAA – Insulin Autoantibodies
 ICA – Islet Cell Antibodies
 IDS – Immunology of Diabetes Society
 IFN – Interferon
 IFNAR1 – Interferon Alpha Receptor 1
 IL – Interleukin
 ISPAD – International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes
 JAK – Janus Kinase
 JAK-STAT – Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription (путь JAK-STAT)
 HVG – Highly Variable Gene
 kNN – k-Nearest Neighbors
 LADA – Latent Autoimmune Diabetes in Adults
 MAIT – Mucosal-Associated Invariant T-cells
 MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase
 MARD – Mild Age-Related Diabetes
 MCP-1 – Monocyte Chemoattractant Protein-1
 MHC – Major Histocompatibility Complex
 MOD – Mild Obesity-Related Diabetes
 NF- κ B – Nuclear Factor Kappa B
 NGS – Next Generation Sequencing
 NK – Natural Killer
 NKT – Natural Killer T-cells
 NOD – Non-Obese Diabetic (линия экспериментальных мышей)
 PBMC – Peripheral Blood Mononuclear Cells
 PCA – Principal Component Analysis

pDC – Plasmacytoid Dendritic Cells
PD-1 – Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1 – Programmed Death-Ligand 1
PI3K – Phosphoinositide 3-kinase
ROC – Receiver Operating Characteristic
RPCA – Reciprocal Principal Component Analysis
SAID – Severe Autoimmune Diabetes
scANVI – Single-cell ANnotation Variation Inference
scRNAseq – Single-Cell RNA Sequencing
scVI – Single-cell Variational Inference
SIDD – Severe Insulin-Deficient Diabetes
SIRD – Severe Insulin-Resistant Diabetes
STAT – Signal Transducer and Activator of Transcription
TCM – T Central Memory (Т-клетки памяти центрального типа)
TCR – T-Cell Receptor
Teff – T Effector (эффекторные Т-клетки)
TEM – T Effector Memory (Т-клетки памяти эффекторного типа)
TGF- β – Transforming Growth Factor Beta
TNF – Tumor Necrosis Factor
TRAIL – TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
Trm – Tissue-Resident Memory T-cells
Treg – Regulatory T-cells
VAE – Variational Autoencoders
UMAP – Uniform Manifold Approximation and Projection
UMI – Unique Molecular Identifier
ZnT8 – Zinc Transporter 8

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. IDF Diabetes Atlas: 11th edition, 2025 // International Diabetes Federation. — Brussels: IDF, 2025. — 234 p.
2. Кононенко И. В., Смирнова О. М., Майоров А. Ю. [и др.] Классификация сахарного диабета. ВОЗ 2019 г. Что нового? // Сахарный диабет. — 2020. — Т. 23, № 4. — С. 329-339.
3. Tang F., Barbacioru C., Wang Y. [et al.] mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell // Nat Methods. — 2009. — V. 6, № 5. — P. 377-82.
4. Wang Y. J., Schug J., Won K.-J. [et al.] Single-Cell Transcriptomics of the Human Endocrine Pancreas // Diabetes. — 2016. — V. 65, № 10. — P. 3028-3038.
5. Besser R. E. J., Bell K. J., Couper J. J. [et al.] ISPAD clinical practice consensus guidelines 2022: Stages of type 1 diabetes in children and adolescents // Pediatric Diabetes. — 2022. — V. 23, № 8. — P. 1175-1187.
6. Haller M. J., Bell K. J., Besser R. E. J. [et al.] ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2024: Screening, Staging, and Strategies to Preserve Beta Cell Function in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes // Hormone Research in Paediatrics. — 2024.10.1159/000543035. — P. 1-30.
7. Yin W., Luo S., Xiao Z. [et al.] Latent autoimmune diabetes in adults: a focus on β -cell protection and therapy // Front Endocrinol (Lausanne). — 2022. — V. 13. — P. 959011.
8. Дедов И. И., Шестакова М. В., Кураева Т. Л. [и др.] Нозологическая гетерогенность, молекулярная генетика и иммунология аутоиммунного сахарного диабета // Вестник РАМН. — 2015. — Т. 70, № 2. — С. 132-138.
9. Liu L., Li X., Xiang Y. [et al.] Latent autoimmune diabetes in adults with low-titer GAD antibodies: similar disease progression with type 2 diabetes: a nationwide, multicenter prospective study (LADA China Study 3) // Diabetes Care. — 2015. — V. 38, № 1. — P. 16-21.
10. Huang G., Yin M., Xiang Y. [et al.] Persistence of glutamic acid decarboxylase antibody (GADA) is associated with clinical characteristics of latent autoimmune diabetes in adults: a prospective study with 3-year follow-up // Diabetes Metab Res Rev. — 2016. — V. 32, № 6. — P. 615-22.
11. Дедов И. И., Шестакова М. В., Майоров А. Ю. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом // Сахарный диабет. — 2023. — Т. 26, № 2S.
12. Rajkumar V., Levine S. Latent Autoimmune Diabetes. — 2022 URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557897/> (дата обращения: 10.09.2022).
13. Buzzetti R., Tuomi T., Mauricio D. [et al.] Management of Latent Autoimmune Diabetes in Adults: A Consensus Statement From an International Expert Panel // Diabetes. — 2020. — V. 69, № 10. — P. 2037-2047.
14. Ray A., Das J., Wenzel S. E. Determining asthma endotypes and outcomes: Complementing existing clinical practice with modern machine learning // Cell Rep Med. — 2022. — V. 3, № 12. — P. 100857.
15. Авдеев С. Н., Ненашева Н. М., Жуденков К. В. [и др.] Распространенность, заболеваемость, фенотипы и другие характеристики тяжелой бронхиальной астмы в Российской Федерации // Пульмонология. — 2018. — Т. 28, № 3. — С. 341-358.
16. Battaglia M., Ahmed S., Anderson M. S. [et al.] Introducing the Endotype Concept to Address the Challenge of Disease Heterogeneity in Type 1 Diabetes // Diabetes Care. — 2020. — V. 43, № 1. — P. 5-12.
17. McCarthy M. I. Painting a new picture of personalised medicine for diabetes // Diabetologia. — 2017. — V. 60, № 5. — P. 793-799.
18. Herder C., Roden M. A novel diabetes typology: towards precision diabetology from pathogenesis to treatment // Diabetologia. — 2022. — V. 65, № 11. — P. 1770-1781.

19. Алимова И. Л. Клинические рекомендации «Сахарный диабет 1-го типа у детей, 2020»: что нужно знать педиатру // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2021. – Т. 66, № 5. – С. 109-117.
20. Репина Е. А. Общие генетические маркеры сахарного диабета 1 типа и аутоиммунных заболеваний щитовидной железы // Сахарный диабет. – 2011. – Т. 14, № 2. – С. 23-31.
21. Алексеев Л. П., Дедов И. И., Хаитов Р. М. [и др.] Иммуногенетика сахарного диабета 1 типа — от фундаментальных исследований к клинике // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2012. – Т. 67, № 1. – С. 75-80.
22. Tizaoui K., Shin J. I., Jeong G. H. [et al.] Genetic Polymorphism of PTPN22 in Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review // Medicina. – 2022. – V. 58, № 8. – P. 1034.
23. Yahaya T., Salisu T. Genes predisposing to type 1 diabetes mellitus and pathophysiology: a narrative review [Electronic resource] // Medical Journal of Indonesia. 2020. V. 29, №. 1.
24. Каштальян О. А., Ушакова Л. Ю. Цитокины как универсальная система регуляции // Медицинские новости. – 2017. № 9. – С. 3-7.
25. Giwa A. M., Ahmed R., Omidian Z. [et al.] Current understandings of the pathogenesis of type 1 diabetes: Genetics to environment // World J Diabetes. – 2020. – V. 11, № 1. – P. 13-25.
26. Redondo M. J., Morgan N. G. Heterogeneity and endotypes in type 1 diabetes mellitus // Nat Rev Endocrinol. – 2023. – V. 19, № 9. – P. 542-554.
27. Weston C. S., Boehm B. O., Pozzilli P. Type 1 diabetes: A new vision of the disease based on endotypes // Diabetes Metab Res Rev. – 2024. – V. 40, № 2. – P. e3770.
28. Ahlqvist E., Storm P., Käräjämäki A. [et al.] Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables // Lancet Diabetes Endocrinol. – 2018. – V. 6, № 5. – P. 361-369.
29. Verma S., Srivastava N., Banerjee M. Genetic polymorphisms in TCF7L2 and PPAR γ genes and susceptibility to Type 2 diabetes mellitus // Meta Gene. – 2021. – V. 28. – P. 100864.
30. Bego T., Čaušević A., Dujčić T. [et al.] Association of FTO Gene Variant (rs8050136) with Type 2 Diabetes and Markers of Obesity, Glycaemic Control and Inflammation // J Med Biochem. – 2019. – V. 38, № 2. – P. 153-163.
31. Sanches J. M., Zhao L. N., Salehi A. [et al.] Pathophysiology of type 2 diabetes and the impact of altered metabolic interorgan crosstalk // The FEBS Journal. – 2023. – V. 290, № 3. – P. 620-648.
32. Caturano A., D'Angelo M., Mormone A. [et al.] Oxidative Stress in Type 2 Diabetes: Impacts from Pathogenesis to Lifestyle Modifications // Curr Issues Mol Biol. – 2023. – V. 45, № 8. – P. 6651-6666.
33. Xing L., Peng F., Liang Q. [et al.] Clinical Characteristics and Risk of Diabetic Complications in Data-Driven Clusters Among Type 2 Diabetes // Frontiers in Endocrinology. – 2021. – V. 12.
34. Aly D. M., Dwivedi O. P., Prasad R. B. [et al.] Aetiological differences between novel subtypes of diabetes derived from genetic associations // medRxiv. – 2020.10.1101/2020.09.29.20203935. – P. 2020.09.29.20203935.
35. Noble J. A., Erlich H. A. Genetics of type 1 diabetes // Cold Spring Harb Perspect Med. – 2012. – V. 2, № 1. – P. a007732.
36. Дедов И. И., Хаитов Р. М., Алексеев Л. П. Иммунозависимые заболевания и иммуногенетика человека (достижения и перспективы) // Сахарный диабет. – 2016. – Т. 19, № 1. – С. 8-15.
37. Pociot F., Lernmark Å. Genetic risk factors for type 1 diabetes // Lancet. – 2016. – V. 387, № 10035. – P. 2331-2339.
38. Onengut-Gumuscu S., Chen W.-M., Burren O. [et al.] Fine mapping of type 1 diabetes susceptibility loci and evidence for colocalization of causal variants with lymphoid gene enhancers // Nature Genetics. – 2015. – V. 47, № 4. – P. 381-386.

39. Корнева К. Г., Стронгин Л. Г., Загайнов В. Е. Прогностические иммунологические маркеры риска развития сахарного диабета 1 типа // Сахарный диабет. – 2021. – Т. 24, № 2. – С. 167-174.
40. Janeway's Immunobiology: Tenth International Student Edition with Registration Card. / Murphy K. M., Weaver C.: W. W. Norton & Company; 10th edition, 2022.
41. Jörns A., Wedekind D., Jähne J. [et al.] Pancreas Pathology of Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA) in Patients and in a LADA Rat Model Compared With Type 1 Diabetes // Diabetes. – 2020. – V. 69, № 4. – P. 624-633.
42. Жгулева А. С., Зементова М. С., Сельков С. А. [и др.] Макрофаги M1/M2: происхождение, фенотип, способы получения, взаимодействие с естественными киллерами и трофобластом // Медицинская иммунология. – 2024. – Т. 26, № 3. – С. 425-448.
43. Yang Z., Zhou Z., Huang G. [et al.] The CD4(+) regulatory T-cells is decreased in adults with latent autoimmune diabetes // Diabetes Res Clin Pract. – 2007. – V. 76, № 1. – P. 126-31.
44. Никонова Т. В., Апанович П. В., Пекарева Е. В. [и др.] Роль регуляторных CD4+CD25+high Т-лимфоцитов и их функциональной активности в развитии и прогрессировании сахарного диабета 1 типа // Сахарный диабет. – 2010. – Т. 13, № 3. – С. 25-31.
45. Gondek D. C., Lu L. F., Quezada S. A. [et al.] Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism // J Immunol. – 2005. – V. 174, № 4. – P. 1783-6.
46. Walker L. S. K. EFIS Lecture: Understanding the CTLA-4 checkpoint in the maintenance of immune homeostasis // Immunol Lett. – 2017. – V. 184. – P. 43-50.
47. Гнатенко Д. А., Костюшев Д. С., Андреева А. В. [и др.] Молекулярные и клеточные мишени как основа доклинической диагностики сахарного диабета типа 1: проблемы и перспективы // Молекулярная медицина. – 2012. № 6.
48. Sun L., Xi S., He G. [et al.] Two to Tango: Dialogue between Adaptive and Innate Immunity in Type 1 Diabetes // J Diabetes Res. – 2020. – V. 2020. – P. 4106518.
49. Gilmour B. C., Corthay A., Øynebråten I. High production of IL-12 by human dendritic cells stimulated with combinations of pattern-recognition receptor agonists // npj Vaccines. – 2024. – V. 9, № 1. – P. 83.
50. Van Acker H. H., Anguille S., De Reu H. [et al.] Interleukin-15-Cultured Dendritic Cells Enhance Anti-Tumor Gamma Delta T Cell Functions through IL-15 Secretion // Front Immunol. – 2018. – V. 9. – P. 658.
51. Arango Duque G., Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases // Front Immunol. – 2014. – V. 5. – P. 491.
52. Hu H., Zakharov P. N., Peterson O. J. [et al.] Cytocidal macrophages in symbiosis with CD4 and CD8 T cells cause acute diabetes following checkpoint blockade of PD-1 in NOD mice // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2020. – V. 117, № 49. – P. 31319-31330.
53. Vecchio F., Lo Buono N., Stabilini A. [et al.] Abnormal neutrophil signature in the blood and pancreas of presymptomatic and symptomatic type 1 diabetes // JCI Insight. – 2018. – V. 3, № 18. P. e122146.
54. Wan J., Ren Y., Yang X. [et al.] The Role of Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in Acute Pancreatitis // Front Cell Dev Biol. – 2020. – V. 8. – P. 565758.
55. Huang J., Xiao Y., Xu A. [et al.] Neutrophils in type 1 diabetes // J Diabetes Investig. – 2016. – V. 7, № 5. – P. 652-63.
56. Hussain M. J., Peakman M., Gallati H. [et al.] Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM // Diabetologia. – 1996. – V. 39, № 1. – P. 60-9.
57. Apaolaza P. S., Balcacean D., Zapardiel-Gonzalo J. [et al.] Islet expression of type I interferon response sensors is associated with immune infiltration and viral infection in type 1 diabetes // Sci Adv. – 2021. – V. 7, № 9. P. eabd6527

58. Li Q., Xu B., Michie S. A. [et al.] Interferon-alpha initiates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – V. 105, № 34. – P. 12439-44.
59. Coomans de Brachène A., Dos Santos R. S., Marroqui L. [et al.] IFN- α induces a preferential long-lasting expression of MHC class I in human pancreatic beta cells // *Diabetologia.* – 2018. – V. 61, № 3. – P. 636-640.
60. Chandra V., Ibrahim H., Halliez C. [et al.] The type 1 diabetes gene TYK2 regulates β -cell development and its responses to interferon- α // *Nat Commun.* – 2022. – V. 13, № 1. – P. 6363.
61. Oliveira V. R., Paula C. C., Taniguchi S. [et al.] Pre-treatment with IL-6 potentiates β -cell death induced by pro-inflammatory cytokines // *BMC Molecular and Cell Biology.* – 2023. – V. 24, № 1. – P. 11.
62. Grebenciucova E., VanHaerents S. Interleukin 6: at the interface of human health and disease // *Frontiers in Immunology.* – 2023. – V. 14.
63. Melgarejo E., Medina M. A., Sánchez-Jiménez F. [et al.] Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2009. – V. 41, № 5. – P. 998-1001.
64. Нуржанова З. М., Башкина О. А., Самотрюева М. А. [и др.] Патогенетическая роль моноцитарного хемоаттрактанта // *Доктор.Ру.* – 2023. – Т. 22, № 7. – С. 53-57.
65. Zineh I., Beitelshes A. L., Silverstein J. H. [et al.] Serum monocyte chemoattractant protein-1 concentrations associate with diabetes status but not arterial stiffness in children with type 1 diabetes // *Diabetes Care.* – 2009. – V. 32, № 3. – P. 465-7.
66. Ngcobo S. R., Nkambule B. B., Nyambuya T. M. [et al.] Activated monocytes as a therapeutic target to attenuate vascular inflammation and lower cardiovascular disease-risk in patients with type 2 diabetes: A systematic review of preclinical and clinical studies // *Biomed Pharmacother.* – 2022. – V. 146. – P. 112579.
67. Hashimoto H., Eto T., Kawai K. [et al.] Expression of MCP-1 in white adipose tissues induce the resistin-hypersecretion in type 2 diabetes // *Obesity Medicine.* – 2020. – V. 20. – P. 100286.
68. Hsu P., Santner-Nanan B., Hu M. [et al.] IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1 // *The Journal of Immunology.* – 2015. – V. 195, № 8. – P. 3665-3674.
69. Komai T., Inoue M., Okamura T. [et al.] Transforming Growth Factor- β and Interleukin-10 Synergistically Regulate Humoral Immunity via Modulating Metabolic Signals // *Frontiers in Immunology.* – 2018. – V. 9.
70. Liu Y., Chen Z., Qiu J. [et al.] Altered Tim-1 and IL-10 Expression in Regulatory B Cell Subsets in Type 1 Diabetes // *Frontiers in Immunology.* – 2021. – V. 12.
71. Копылова О. И., Кураева Т. Л., Лаврикова Е. Ю. [и др.] Полиморфные маркеры генов IL2RA и IL2: популяционные различия в ассоциации с сахарным диабетом // *Сахарный диабет.* – 2012. – Т. 15, № 1. – С. 14-18.
72. Grinberg-Bleyer Y., Baeyens A., You S. [et al.] IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells // *Journal of Experimental Medicine.* – 2010. – V. 207, № 9. – P. 1871-1878.
73. Luo Z., Mejia-Cordova M., Hamze N. [et al.] Assessing the effectiveness of Interleukin-2 therapy in experimental type 1 diabetes // *Endocrine.* – 2024. – V. 85, № 2. – P. 626-637.
74. Chentoufi A. A., Polychronakos C. Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes // *Diabetes.* – 2002. – V. 51, № 5. – P. 1383-90.
75. Marrack P., Kappler J. W. Do MHCII-presented neoantigens drive type 1 diabetes and other autoimmune diseases? // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2012. – V. 2, № 9. – P. a007765.
76. Lamhamedi-Cherradi S. E., Luan J. J., Eloy L. [et al.] Resistance of T-cells to apoptosis in autoimmune diabetic (NOD) mice is increased early in life and is associated with dysregulated expression of Bcl-x // *Diabetologia.* – 1998. – V. 41, № 2. – P. 178-84.
77. Robertson C. C., Elgamal R. M., Henry-Kanarek B. A. [et al.] Untangling the genetics of beta cell dysfunction and death in type 1 diabetes // *Mol Metab.* – 2024. – V. 86. – P. 101973.

78. Regnault B., Osorio Y. F. J., Miao D. [et al.] Early over expression of messenger RNA for multiple genes, including insulin, in the Pancreatic Lymph Nodes of NOD mice is associated with Islet Autoimmunity // *BMC Med Genomics*. – 2009. – V. 2. – P. 63.
79. Bass L. E., Bonami R. H. Factors Governing B Cell Recognition of Autoantigen and Function in Type 1 Diabetes // *Antibodies (Basel)*. – 2024. – V. 13, № 2.
80. Martinez R. J., Zhang N., Thomas S. R. [et al.] Arthritogenic self-reactive CD4⁺ T cells acquire an FR4hiCD73hi anergic state in the presence of Foxp3⁺ regulatory T cells // *J Immunol*. – 2012. – V. 188, № 1. – P. 170-81.
81. Silva Morales M., Mueller D. Anergy into T regulatory cells: an integration of metabolic cues and epigenetic changes at the Foxp3 conserved non-coding sequence 2 // *F1000Res*. – 2018. – V. 7.
82. Georgiev P., Charbonnier L. M., Chatila T. A. Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3 // *J Clin Immunol*. – 2019. – V. 39, № 7. – P. 623-640.
83. Ito T., Yamada A., Batal I. [et al.] The Limits of Linked Suppression for Regulatory T Cells // *Frontiers in Immunology*. – 2016. – V. 7.
84. Chen Y., Zander R., Khatun A. [et al.] Transcriptional and Epigenetic Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation // *Front Immunol*. – 2018. – V. 9. – P. 2826.
85. Rai D., Martin M. D., Badovinac V. P. The longevity of memory CD8 T cell responses after repetitive antigen stimulations // *J Immunol*. – 2014. – V. 192, № 12. – P. 5652-9.
86. Rosenzweig M., Churlaud G., Mallone R. [et al.] Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients // *J Autoimmun*. – 2015. – V. 58. – P. 48-58.
87. Jaber-Douraki M., Pietropaolo M., Khadra A. Continuum model of T-cell avidity: Understanding autoreactive and regulatory T-cell responses in type 1 diabetes // *J Theor Biol*. – 2015. – V. 383. – P. 93-105.
88. Mustafa N., Mitxelena J., Infante A. [et al.] E2f2 Attenuates Apoptosis of Activated T Lymphocytes and Protects from Immune-Mediated Injury through Repression of Fas and FasL // *Int J Mol Sci*. – 2021. – V. 23, № 1.
89. Yajima T., Hoshino K., Muranushi R. [et al.] Fas/FasL signaling is critical for the survival of exhausted antigen-specific CD8(+) T cells during tumor immune response // *Mol Immunol*. – 2019. – V. 107. – P. 97-105.
90. Shi Z., Li Y., Jaber-Douraki M. Hybrid computational modeling demonstrates the utility of simulating complex cellular networks in type 1 diabetes // *PLoS Comput Biol*. – 2021. – V. 17, № 9. – P. e1009413.
91. Linsley P. S., Long S. A. Enforcing the checkpoints: harnessing T-cell exhaustion for therapy of T1D // *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. – 2019. – V. 26, № 4. – P. 213-218.
92. Kwong C. J., Selck C., Tahija K. [et al.] Harnessing CD8(+) T-cell exhaustion to treat type 1 diabetes // *Immunol Cell Biol*. – 2021. – V. 99, № 5. – P. 486-495.
93. Martin M. D., Kim M. T., Shan Q. [et al.] Phenotypic and Functional Alterations in Circulating Memory CD8 T Cells with Time after Primary Infection // *PLoS Pathog*. – 2015. – V. 11, № 10. – P. e1005219.
94. Diggins K. E., Serti E., Muir V. [et al.] Exhausted-like CD8⁺ T cell phenotypes linked to C-peptide preservation in alefacept-treated T1D subjects // *JCI Insight*. – 2021. – V. 6, № 3.
95. Kurachi M. CD8⁺ T cell exhaustion // *Seminars in Immunopathology*. – 2019. – V. 41, № 3. – P. 327-337.
96. Zhang L., Zhang B., Li L. [et al.] Novel targets for immunotherapy associated with exhausted CD8⁺ T cells in cancer // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2023. – V. 149, № 5. – P. 2243-2258.
97. Gao Z., Feng Y., Xu J. [et al.] T-cell exhaustion in immune-mediated inflammatory diseases: New implications for immunotherapy // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – V. 13. P. 977394
98. Long S. A., Thorpe J., Herold K. C. [et al.] Remodeling T cell compartments during anti-CD3 immunotherapy of type 1 diabetes // *Cell Immunol*. – 2017. – V. 319. – P. 3-9.

99. Tooley J. E., Vudattu N., Choi J. [et al.] Changes in T-cell subsets identify responders to FcR-nonbinding anti-CD3 mAb (teplizumab) in patients with type 1 diabetes // *Eur J Immunol.* – 2016. – V. 46, № 1. – P. 230-41.
100. Laban S., Suwandi J. S., van Unen V. [et al.] Heterogeneity of circulating CD8 T-cells specific to islet, neo-antigen and virus in patients with type 1 diabetes mellitus // *PLoS One.* – 2018. – V. 13, № 8. – P. e0200818.
101. Lugli E., Galletti G., Boi S. K. [et al.] Stem, Effector, and Hybrid States of Memory CD8(+) T Cells // *Trends Immunol.* – 2020. – V. 41, № 1. – P. 17-28.
102. Thakkar S., Chopra A., Nagendra L. [et al.] Teplizumab in Type 1 Diabetes Mellitus: An Updated Review // *touchREV Endocrinol.* – 2023. – V. 19, № 2. – P. 22-30.
103. Nakayama M., Michels A. W. Using the T Cell Receptor as a Biomarker in Type 1 Diabetes // *Front Immunol.* – 2021. – V. 12. – P. 777788.
104. Rodriguez-Calvo T., Christoffersson G., Bender C. [et al.] Means, Motive, and Opportunity: Do Non-Islet-Reactive Infiltrating T Cells Contribute to Autoimmunity in Type 1 Diabetes? // *Front Immunol.* – 2021. – V. 12. – P. 683091.
105. Lui P. P., Cho I., Ali N. Tissue regulatory T cells // *Immunology.* – 2020. – V. 161, № 1. – P. 4-17.
106. Goodman W. A., Young A. B., McCormick T. S. [et al.] Stat3 phosphorylation mediates resistance of primary human T cells to regulatory T cell suppression // *J Immunol.* – 2011. – V. 186, № 6. – P. 3336-45.
107. Hanna S. J., Tatovic D., Thayer T. C. [et al.] Insights From Single Cell RNA Sequencing Into the Immunology of Type 1 Diabetes- Cell Phenotypes and Antigen Specificity // *Front Immunol.* – 2021. – V. 12. – P. 751701.
108. Kuret T., Sodin-Šemrl S., Leskošek B. [et al.] Single Cell RNA Sequencing in Autoimmune Inflammatory Rheumatic Diseases: Current Applications, Challenges and a Step Toward Precision Medicine // *Frontiers in Medicine.* – 2022. – V. 8. P. 822804
109. Jovic D., Liang X., Zeng H. [et al.] Single-cell RNA sequencing technologies and applications: A brief overview // *Clin Transl Med.* – 2022. – V. 12, № 3. – P. e694.
110. Sun L., Su Y., Jiao A. [et al.] T cells in health and disease // *Signal Transduction and Targeted Therapy.* – 2023. – V. 8, № 1. – P. 235.
111. Xin Y., Kim J., Okamoto H. [et al.] RNA Sequencing of Single Human Islet Cells Reveals Type 2 Diabetes Genes // *Cell Metab.* – 2016. – V. 24, № 4. – P. 608-615.
112. Nicholas C. A., Smith M. J. Application of single-cell RNA sequencing methods to develop B cell targeted treatments for autoimmunity // *Frontiers in Immunology.* – 2023. – V. 14.
113. Camunas-Soler J., Dai X. Q., Hang Y. [et al.] Patch-Seq Links Single-Cell Transcriptomes to Human Islet Dysfunction in Diabetes // *Cell Metab.* – 2020. – V. 31, № 5. – P. 1017-1031.e4.
114. Chakravarthy H., Gu X., Enge M. [et al.] Converting Adult Pancreatic Islet α Cells into β Cells by Targeting Both Dnmt1 and Arx // *Cell Metab.* – 2017. – V. 25, № 3. – P. 622-634.
115. Petersen M. B. K., Azad A., Ingvorsen C. [et al.] Single-Cell Gene Expression Analysis of a Human ESC Model of Pancreatic Endocrine Development Reveals Different Paths to β -Cell Differentiation // *Stem Cell Reports.* – 2017. – V. 9, № 4. – P. 1246-1261.
116. Kaur K. D., Wong C. K., Baggio L. L. [et al.] TCF7 is not essential for glucose homeostasis in mice // *Mol Metab.* – 2021. – V. 48. – P. 101213.
117. Qaisar N., Arowosegbe A., Derr A. G. [et al.] Type I IFN-Driven Immune Cell Dysregulation in Rat Autoimmune Diabetes // *Immunohorizons.* – 2021. – V. 5, № 10. – P. 855-869.
118. Ji L., Guo W. Single-cell RNA sequencing highlights the roles of C1QB and NKG7 in the pancreatic islet immune microenvironment in type 1 diabetes mellitus // *Pharmacological Research.* – 2023. – V. 187. – P. 106588.
119. Sona C., Yeh Y. T., Patsalos A. [et al.] Evidence of islet CADM1-mediated immune cell interactions during human type 1 diabetes // *JCI Insight.* – 2022. – V. 7, № 6. P. e153136.

120. Hamel Y., Mauvais F. X., Pham H. P. [et al.] A unique CD8(+) T lymphocyte signature in pediatric type 1 diabetes // *J Autoimmun.* – 2016. – V. 73. – P. 54-63.
121. Ashton M. P., Eugster A., Dietz S. [et al.] Association of Dendritic Cell Signatures With Autoimmune Inflammation Revealed by Single-Cell Profiling // *Arthritis Rheumatol.* – 2019. – V. 71, № 5. – P. 817-828.
122. Kallionpää H., Somani J., Tuomela S. [et al.] Early Detection of Peripheral Blood Cell Signature in Children Developing β -Cell Autoimmunity at a Young Age // *Diabetes.* – 2019. – V. 68, № 10. – P. 2024-2034.
123. Ahlmann-Eltze C., Huber W. Comparison of transformations for single-cell RNA-seq data // *Nature Methods.* – 2023. – V. 20, № 5. – P. 665-672.
124. Badia-i-Mompel P. a. decoupleR: ensemble of computational methods to infer biological activities from omics data // *Bioinformatics Advances.* – 2022. – V. 2, № 1. – P. vbac016.
125. Butler A., Darby C., Hao Y. [et al.] Azimuth: A shiny app demonstrating a query-reference mapping algorithm for single-cell data // *Book Azimuth: A shiny app demonstrating a query-reference mapping algorithm for single-cell data* / Editor, 2021.
126. Chechekhina E., Tkachuk V., Chechekhin V. scParadise: Tunable highly accurate multi-task cell type annotation and surface protein abundance prediction // *bioRxiv.* – 2024.10.1101/2024.09.23.614509.
127. Gayoso A., Lopez R., Xing G. [et al.] A Python library for probabilistic analysis of single-cell omics data // *Nature biotechnology.* – 2022. – V. 40, № 2. – P. 163--166.
128. Hao Y., Stuart T., Kowalski M. H. [et al.] Dictionary learning for integrative, multimodal and scalable single-cell analysis // *Nature biotechnology.* – 2024. – V. 42, № 2. – P. 293-304.
129. Heumos L., Ji Y., May L. [et al.] Pertpy: an end-to-end framework for perturbation analysis // *bioRxiv.* – 2024. – P. 2008-2024.
130. Kolberg L., Raudvere U., Kuzmin I. [et al.] g: Profiler—interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping (2023 update) // *Nucleic acids research.* – 2023. – V. 51, № W1. – P. W207-W212.
131. Korsunsky I., Millard N., Fan J. [et al.] Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony // *Nature methods.* – 2019. – V. 16, № 12. – P. 1289-1296.
132. Lotfollahi M., Wolf F. A., Theis F. J. scGen predicts single-cell perturbation responses // *Nature methods.* – 2019. – V. 16, № 8. – P. 715-721.
133. Luecken M. D., Bttner M., Chaichoompu K. [et al.] Benchmarking atlas-level data integration in single-cell genomics // *Nature methods.* – 2022. – V. 19, № 1. – P. 41-50.
134. Muzellec B., Teleczuk M., Cabeli V. [et al.] PyDESeq2: a python package for bulk RNA-seq differential expression analysis // *Bioinformatics.* – 2023. – V. 39, № 9. – P. btad547.
135. Polaski K., Young M. D., Miao Z. [et al.] BBKNN: fast batch alignment of single cell transcriptomes // *Bioinformatics.* – 2020. – V. 36, № 3. – P. 964--965.
136. Stuart T., Butler A., Hoffman P. [et al.] Comprehensive integration of single-cell data // *Cell.* – 2019. – V. 177, № 7. – P. 1888-1902.
137. Wolf F. A., Angerer P., Theis F. J. SCANPY: large-scale single-cell gene expression data analysis // *Genome biology.* – 2018. – V. 19. – P. 1-5.
138. Xi N. M., Li J. J. Benchmarking computational doublet-detection methods for single-Cell RNA sequencing data // *Book Benchmarking computational doublet-detection methods for single-Cell RNA sequencing data* / Editor, 2021. – C. 176-194.
139. Young M. D., Behjati S. SoupX removes ambient RNA contamination from droplet-based single-cell RNA sequencing data // *Gigascience.* – 2020. – V. 9, № 12. – P. giaa151.
140. Tatti P., Pavandeep S. Gender Difference in Type 1 Diabetes: An Underevaluated Dimension of the Disease // *Diabetology.* – 2022. – V. 3, № 2. – P. 364-368.
141. Al-Zubairi T., Al-Habori M., Saif-Ali R. Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA) and its Metabolic Characteristics among Yemeni Type 2 Diabetes Mellitus Patients // *Diabetes Metab Syndr Obes.* – 2021. – V. 14. – P. 4223-4232.

142. Fang M., Wang D., Echouffo-Tcheugui J. B. [et al.] Age at Diagnosis in U.S. Adults With Type 1 Diabetes // *Annals of Internal Medicine*. – 2023. – V. 176, № 11. – P. 1567-1568.
143. Carrillo-Larco R. M., Guzman-Vilca W. C., Xu X. [et al.] Mean age and body mass index at type 2 diabetes diagnosis: Pooled analysis of 56 health surveys across income groups and world regions // *Diabet Med*. – 2024. – V. 41, № 2. – P. e15174.
144. Силко Ю. В., Никонова Т. В., Иванова О. Н. [и др.] Латентный аутоиммунный диабет взрослых: информативность аутоантител // *Терапевтический архив*. – 2016. – Т. 88, № 10. – С. 42-45.
145. Carlsson S. Etiology and Pathogenesis of Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA) Compared to Type 2 Diabetes // *Front Physiol*. – 2019. – V. 10. – P. 320.
146. Eddie C. G., Marta P. A. Single cell RNA-seq tutorial. Chapter 3 Quality Control. – 2021. – URL: https://mperalc.gitlab.io/scRNA-seq_workshop_2021/qc.html? (дата обращения: 16.12.24)
147. Singh M. K., Shin Y., Ju S. [et al.] Heat Shock Response and Heat Shock Proteins: Current Understanding and Future Opportunities in Human Diseases // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – V. 25, № 8. – P. 4209.
148. Hérault L., Poplineau M., Mazuel A. [et al.] Single-cell RNA-seq reveals a concomitant delay in differentiation and cell cycle of aged hematopoietic stem cells // *BMC Biology*. – 2021. – V. 19, № 1. – P. 19.
149. Stuart T., Butler A., Hoffman P. [et al.] Comprehensive Integration of Single-Cell Data // *Cell*. – 2019. – V. 177, № 7. – P. 1888-1902.e21.
150. Butler A., Hoffman P., Smibert P. [et al.] Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species // *Nature Biotechnology*. – 2018. – V. 36, № 5. – P. 411-420.
151. Tran H. T. N., Ang K. S., Chevrier M. [et al.] A benchmark of batch-effect correction methods for single-cell RNA sequencing data // *Genome Biology*. – 2020. – V. 21, № 1. – P. 12.
152. Korsunsky I., Millard N., Fan J. [et al.] Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony // *Nature Methods*. – 2019. – V. 16, № 12. – P. 1289-1296.
153. Wilk A. J., Rustagi A., Zhao N. Q. [et al.] A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19 // *Nature Medicine*. – 2020. – V. 26, № 7. – P. 1070-1076.
154. Luecken M. D., Theis F. J. Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial // *Mol Syst Biol*. – 2019. – V. 15, № 6. – P. e8746.
155. Girel S., Arpin C., Marvel J. [et al.] Model-Based Assessment of the Role of Uneven Partitioning of Molecular Content on Heterogeneity and Regulation of Differentiation in CD8 T-Cell Immune Responses // *Front Immunol*. – 2019. – V. 10. – P. 230.
156. Williams H., Mack C., Baraz R. [et al.] Monocyte Differentiation and Heterogeneity: Inter-Subset and Interindividual Differences // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – V. 24, № 10. – P. 8757.
157. Xiong J., Li Z., Tang H. [et al.] Bulk and single-cell characterisation of the immune heterogeneity of atherosclerosis identifies novel targets for immunotherapy // *BMC Biology*. – 2023. – V. 21, № 1. – P. 46.
158. Braun R., Cope L., Parmigiani G. Identifying differential correlation in gene/pathway combinations // *BMC Bioinformatics*. – 2008. – V. 9, № 1. – P. 488.
159. He X., Wang X., van Heck J. [et al.] Blood immune cell profiling in adults with longstanding type 1 diabetes is associated with macrovascular complications // *Frontiers in Immunology*. – 2024. – V. 15.
160. Nikonova T. V., Apanovich P. V., Pekareva E. V. [et al.] Immunogenetic aspects of slowly progressing autoimmune diabetes in adults (LADA) // *Diabetes Mellitus*. – 2011. – V. 14, № 1. – P. 28-34.
161. Mao J., Feng Y., Zhu X. [et al.] The Molecular Mechanisms of HLA-G Regulatory Function on Immune Cells during Early Pregnancy // *Biomolecules*. – 2023. – V. 13, № 8. – P. 1213.

162. Liu S., Bos N. A., Verschuuren E. A. M. [et al.] Biological Characteristics of HLA-G and Its Role in Solid Organ Transplantation // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – V. 13.
163. Feger U., Tolosa E., Huang Y.-H. [et al.] HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation // *Blood*. – 2007. – V. 110, № 2. – P. 568-577.
164. Atorrasagasti C., Onorato A. M., Mazzolini G. The role of SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) in the pathogenesis of obesity, type 2 diabetes, and non-alcoholic fatty liver disease // *Journal of Physiology and Biochemistry*. – 2023. – V. 79, № 4. – P. 815-831.
165. Jandeleit-Dahm K., Rumble J., Cox A. J. [et al.] SPARC Gene Expression Is Increased in Diabetes-Related Mesenteric Vascular Hypertrophy // *Microvascular Research*. – 2000. – V. 59, № 1. – P. 61-71.
166. Mitschka S., Mayr C. Context-specific regulation and function of mRNA alternative polyadenylation // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2022. – V. 23, № 12. – P. 779-796.
167. Devenish L. P., Mhlanga M. M., Negishi Y. Immune Regulation in Time and Space: The Role of Local- and Long-Range Genomic Interactions in Regulating Immune Responses // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – V. 12.
168. Pengyu Z., Yan Y., Xiyang F. [et al.] The Differential Expression of Long Noncoding RNAs in Type 2 Diabetes Mellitus and Latent Autoimmune Diabetes in Adults // *Int J Endocrinol*. – 2020. – V. 2020. – P. 9235329.
169. Burbano De Lara S., Tran D. D. H., Allister A. B. [et al.] C20orf204, a hepatocellular carcinoma-specific protein interacts with nucleolin and promotes cell proliferation // *Oncogenesis*. – 2021. – V. 10, № 3. – P. 31.
170. Portale F., Di Mitri D. NK Cells in Cancer: Mechanisms of Dysfunction and Therapeutic Potential // *Int J Mol Sci*. – 2023. – V. 24, № 11.
171. Kumar R., Khan M., Francis V. [et al.] DENND6A links Arl8b to a Rab34/RILP/dynein complex, regulating lysosomal positioning and autophagy // *Nature Communications*. – 2024. – V. 15, № 1. – P. 919.
172. López-Alcalá J., Gordon A., Trávez A. [et al.] Localization, traffic and function of Rab34 in adipocyte lipid and endocrine functions // *Journal of Biomedical Science*. – 2024. – V. 31, № 1. – P. 2.
173. Goldenberg N. M., Silverman M. Rab34 and its effector munc13-2 constitute a new pathway modulating protein secretion in the cellular response to hyperglycemia // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2009. – V. 297, № 4. – P. C1053-8.
174. Falcone M., Fousteri G. Role of the PD-1/PD-L1 Dyad in the Maintenance of Pancreatic Immune Tolerance for Prevention of Type 1 Diabetes // *Frontiers in Endocrinology*. – 2020. – V. 11.
175. Aguiar M. P. d., Vieira J. H. Entrance to the multifaceted world of CD4⁺ T cell subsets // *Exploration of Immunology*. – 2024. – V. 4, № 2. – P. 152-168.
176. Rah B., Rather R. A., Bhat G. R. [et al.] JAK/STAT Signaling: Molecular Targets, Therapeutic Opportunities, and Limitations of Targeted Inhibitions in Solid Malignancies // *Frontiers in Pharmacology*. – 2022. – V. 13.
177. Chen D., Liu Y., Chen J. [et al.] JAK/STAT pathway promotes the progression of diabetic kidney disease via autophagy in podocytes // *Eur J Pharmacol*. – 2021. – V. 902. – P. 174121.
178. Schloot N. C., Pham M. N., Hawa M. I. [et al.] Inverse Relationship Between Organ-Specific Autoantibodies and Systemic Immune Mediators in Type 1 Diabetes and Type 2 Diabetes: Action LADA 11 // *Diabetes Care*. – 2016. – V. 39, № 11. – P. 1932-1939.
179. Gotthardt D., Trifinopoulos J., Sexl V. [et al.] JAK/STAT Cytokine Signaling at the Crossroad of NK Cell Development and Maturation // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – V. 10.
180. Tang Y.-Y., Wang D.-C., Wang Y.-Q. [et al.] Emerging role of hypoxia-inducible factor-1 α in inflammatory autoimmune diseases: A comprehensive review // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – V. 13.

181. Palazon A., Goldrath A. W., Nizet V. [et al.] HIF transcription factors, inflammation, and immunity // *Immunity*. – 2014. – V. 41, № 4. – P. 518-28.
182. García-Pastor C., Benito-Martínez S., Moreno-Manzano V. [et al.] Mechanism and Consequences of The Impaired Hif-1 α Response to Hypoxia in Human Proximal Tubular HK-2 Cells Exposed to High Glucose // *Scientific Reports*. – 2019. – V. 9, № 1. – P. 15868.
183. Corazza N., Brumatti G., Jakob S. [et al.] TRAIL and thymocyte apoptosis: not so deadly? // *Cell Death & Differentiation*. – 2004. – V. 11, № 2. – P. S213-S215.
184. Di Bartolo B. A., Chan J., Bennett M. R. [et al.] TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) protects against diabetes and atherosclerosis in Apoe $^{-/-}$ mice // *Diabetologia*. – 2011. – V. 54, № 12. – P. 3157-3167.
185. Калмыкова З. А., Кононенко И. В., Смирнова О. М. [и др.] Сигнальные пути гибели β -клеток при сахарном диабете 2 типа: роль врожденного иммунитета // *Сахарный диабет*. – 2020. – Т. 23, № 2. – С. 174-184.
186. Handi J., Patterson S. J., Levings M. The Role of the PI3K Signaling Pathway in CD4 $^{+}$ T Cell Differentiation and Function // *Frontiers in Immunology*. – 2012. – V. 3.
187. Sharma M., Pruitt K. Wnt Pathway: An Integral Hub for Developmental and Oncogenic Signaling Networks // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – V. 21, № 21. – P. 8018.
188. Goswami T. K., Singh M., Dhawan M. [et al.] Regulatory T cells (Tregs) and their therapeutic potential against autoimmune disorders - Advances and challenges // *Hum Vaccin Immunother*. – 2022. – V. 18, № 1. – P. 2035117.
189. Michel T., Poli A., Cuapio A. [et al.] Human CD56bright NK Cells: An Update // *The Journal of Immunology*. – 2016. – V. 196, № 7. – P. 2923-2931.
190. Trenti A., Tedesco S., Boscaro C. [et al.] Estrogen, Angiogenesis, Immunity and Cell Metabolism: Solving the Puzzle // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – V. 19, № 3. – P. 859.
191. Alexander M., Luo Y., Raimondi G. [et al.] Jakinibs of All Trades: Inhibiting Cytokine Signaling in Immune-Mediated Pathologies // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2021. – V. 15, № 1.
192. Montinaro A., Walczak H. Harnessing TRAIL-induced cell death for cancer therapy: a long walk with thrilling discoveries // *Cell Death & Differentiation*. – 2023. – V. 30, № 2. – P. 237-249.
193. Голодников И. И., Русяева Н. В., Никонова Т. В. [и др.] Латентный аутоиммунный диабет взрослых — современное представление. Сахарный диабет // *Сахарный диабет*. – 2023. – Т. 26, № 3. – С. 262-274.
194. Sekrecka A., Kluzek K., Sekrecki M. [et al.] Time-dependent recruitment of GAF, ISGF3 and IRF1 complexes shapes IFN α and IFN γ -activated transcriptional responses and explains mechanistic and functional overlap // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2023. – V. 80, № 7. – P. 187.
195. Jefferies C. A. Regulating IRFs in IFN Driven Disease // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – V. 10.
196. UniProt C. UniProt Entry Q04206. – 2024. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q04206/> (дата обращения: 10.01.25).
197. Zacarías-Fluck M. F., Soucek L., Whitfield J. R. MYC: there is more to it than cancer // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2024. – V. 12.
198. Bi J., Wang X. Molecular Regulation of NK Cell Maturation // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – V. 11.
199. Weber B. N., Chi A. W.-S., Chavez A. [et al.] A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation // *Nature*. – 2011. – V. 476, № 7358. – P. 63-68.
200. Yahia-Cherbal H., Rybczynska M., Lovecchio D. [et al.] NFAT primes the human RORC locus for ROR γ t expression in CD4(+) T cells // *Nat Commun*. – 2019. – V. 10, № 1. – P. 4698.

201. Martinez G. J., Zhang Z., Chung Y. [et al.] Smad3 Differentially Regulates the Induction of Regulatory and Inflammatory T Cell Differentiation // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – V. 284, № 51. – P. 35283-35286.
202. Wen A. Y., Sakamoto K. M., Miller L. S. The role of the transcription factor CREB in immune function // *J Immunol*. – 2010. – V. 185, № 11. – P. 6413-9.
203. National Center for Biotechnology I. NCBI Gene: SMAD4 (SMAD family member 4) // Book NCBI Gene: SMAD4 (SMAD family member 4) / Editor, 2024.
204. UniProt C. UniProt Entry Q01851. PO4F1_HUMAN. – 2024. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q01851/entry> (дата обращения: 10.01.25).
205. Liu N., Sun Q., Wan L. [et al.] CUX1, A Controversial Player in Tumor Development // *Front Oncol*. – 2020. – V. 10. – P. 738.
206. Bakke J., Wright W. C., Zamora A. E. [et al.] Transcription factor ZNF148 is a negative regulator of human muscle differentiation // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7, № 1. – P. 8138.
207. Maurer B., Kollmann S., Pickem J. [et al.] STAT5A and STAT5B-Twins with Different Personalities in Hematopoiesis and Leukemia // *Cancers (Basel)*. – 2019. – V. 11, № 11.
208. Ma L., Yu L., Jiang B. C. [et al.] ZNF382 controls mouse neuropathic pain via silencer-based epigenetic inhibition of Cxcl13 in DRG neurons // *J Exp Med*. – 2021. – V. 218, № 12. P. e20210920
209. Jasinski-Bergner S., Eckstein M., Taubert H. [et al.] The Human Leukocyte Antigen G as an Immune Escape Mechanism and Novel Therapeutic Target in Urological Tumors // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – V. 13.
210. National Center for Biotechnology I. NCBI Gene: TAPBP (TAP binding protein) // Book NCBI Gene: TAPBP (TAP binding protein) / Editor, 2024.
211. Loo L. S. W., Soetedjo A. A. P., Lau H. H. [et al.] BCL-xL/BCL2L1 is a critical anti-apoptotic protein that promotes the survival of differentiating pancreatic cells from human pluripotent stem cells // *Cell Death & Disease*. – 2020. – V. 11, № 5. – P. 378.
212. Черников А. А., Северина А. С., Шамхалова М. Ш. [и др.] Роль механизмов «метаболической памяти» в развитии и прогрессировании сосудистых осложнений сахарного диабета // *Сахарный диабет*. – 2017. – Т. 20, № 2. – С. 126-134.
213. Бочкарева Л. А., Недосугова Л. В., Петунина Н. А. [и др.] Некоторые механизмы развития воспаления при сахарном диабете 2 типа // *Сахарный диабет*. – 2021. – Т. 24, № 4. – С. 334-341.
214. Taneera J., Mohammed A. K., Dhaiban S. [et al.] RORB and RORC associate with human islet dysfunction and inhibit insulin secretion in INS-1 cells // *Islets*. – 2019. – V. 11, № 1. – P. 10-20.
215. Chen J., Dai A. X., Tang H. L. [et al.] Increase of ALCAM and VCAM-1 in the plasma predicts the Alzheimer's disease // *Front Immunol*. – 2022. – V. 13. – P. 1097409.
216. Källstig E., McCabe B. D., Schneider B. L. The Links between ALS and NF-κB // *Int J Mol Sci*. – 2021. – V. 22, № 8.
217. Ding Q., Hu W., Wang R. [et al.] Signaling pathways in rheumatoid arthritis: implications for targeted therapy // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023. – V. 8, № 1. – P. 68.
218. Salloum R., Niewold T. B. Interferon regulatory factors in human lupus pathogenesis // *Transl Res*. – 2011. – V. 157, № 6. – P. 326-31.
219. Новиков А. А., Александрова Е. Н., Diatroptova M. A. [и др.] Роль цитокинов в патогенезе ревматоидного артрита // *Научно-практическая ревматология*. – 2010. – Т. 48, № 2. – С. 71-82.
220. Деревянко О. С., Никонова Т. В., Смирнова О. М. [и др.] Интеркуррентные аутоиммунные процессы при сахарном диабете 1-го типа // *Терапевтический архив*. – 2015. – Т. 87, № 10. – С. 50-53.
221. Соколов А. В., Шмидт А. А., Ломакин Я. А. В-клеточное звено в регуляции аутоиммунных заболеваний // *АКТА NATURAE*. – 2018. – Т. 10, № 3 (38). – С. 11-23.

222. Gobin S. J., Peijnenburg A., van Eggermond M. [et al.] The RFX complex is crucial for the constitutive and CIITA-mediated transactivation of MHC class I and beta2-microglobulin genes // *Immunity*. – 1998. – V. 9, № 4. – P. 531-41.
223. Durand B., Sperisen P., Emery P. [et al.] RFXAP, a novel subunit of the RFX DNA binding complex is mutated in MHC class II deficiency // *The EMBO Journal*. – 1997. – V. 16, № 5. – P. 1045-1055-1055.
224. Molitor L., Bacher S., Burczyk S. [et al.] The Molecular Function of PURA and Its Implications in Neurological Diseases // *Front Genet*. – 2021. – V. 12. – P. 638217.
225. Ronchetti D., Traini V., Silvestris I. [et al.] The pleiotropic nature of NONO, a master regulator of essential biological pathways in cancers // *Cancer Gene Therapy*. – 2024. – V. 31, № 7. – P. 984-994.
226. He W., Kang Y., Zhu W. [et al.] FOXF2 acts as a crucial molecule in tumours and embryonic development // *Cell Death & Disease*. – 2020. – V. 11, № 6. – P. 424.
227. Tsai S., Santamaria P. MHC Class II Polymorphisms, Autoreactive T-Cells, and Autoimmunity // *Frontiers in Immunology*. – 2013. – V. 4.
228. Ronninger M., Seddighzadeh M., Eike M. C. [et al.] Interaction analysis between HLA-DRB1 shared epitope alleles and MHC class II transactivator CIITA gene with regard to risk of rheumatoid arthritis // *PLoS One*. – 2012. – V. 7, № 3. – P. e32861.
229. Donath M. Y., Shoelson S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease // *Nat Rev Immunol*. – 2011. – V. 11, № 2. – P. 98-107.
230. Kolb H., Mandrup-Poulsen T. An immune origin of type 2 diabetes? // *Diabetologia*. – 2005. – V. 48, № 6. – P. 1038-50.
231. Velikova T. V., Kabakchieva P. P., Assyov Y. S. [et al.] Targeting Inflammatory Cytokines to Improve Type 2 Diabetes Control // *BioMed Research International*. – 2021. – V. 2021. – P. 7297419.
232. Шейбак В. М., Павлюковец А. Ю. Биохимическая гетерогенность т-лимфоцитов // *Вестник ВГМУ*. – 2018. – Т. 17, № 6. – С. 7-17.
233. Trop-Steinberg S., Azar Y. Is Myc an Important Biomarker? Myc Expression in Immune Disorders and Cancer // *The American Journal of the Medical Sciences*. – 2018. – V. 355, № 1. – P. 67-75.
234. Walter U., Scherbaum W. A., Buer J. MHC class II expression by beta cells in Type 1 diabetes: promoting or inhibiting the autoimmune process? A reply to D. W. R. Gray // *Diabetologia*. – 2004. – V. 47, № 9. – P. 1641-1642.
235. Hedrick S. M. The cunning little vixen: Foxo and the cycle of life and death // *Nat Immunol*. – 2009. – V. 10, № 10. – P. 1057-63.
236. Kerdiles Y. M., Stone E. L., Beisner D. R. [et al.] Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function // *Immunity*. – 2010. – V. 33, № 6. – P. 890-904.
237. Lewis D. A., Ly T. Cell Cycle Entry Control in Naïve and Memory CD8+ T Cells // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – V. 9, P. 727441
238. Toumi R., Deo R., Bhise S. [et al.] Exploring the role of c-Myc in defining the fate of exhausted CD8 T cells // *The Journal of Immunology*. – 2022. – V. 208, № 1_Supplement. – P. 182.32.
239. Sun P., Vu R., Dragan M. [et al.] OVOL1 Regulates Psoriasis-Like Skin Inflammation and Epidermal Hyperplasia // *J Invest Dermatol*. – 2021. – V. 141, № 6. – P. 1542-1552.
240. Heinlein M., Gandolfo L. C., Zhao K. [et al.] The acetyltransferase KAT7 is required for thymic epithelial cell expansion, expression of AIRE target genes, and thymic tolerance // *Science Immunology*. – 2022. – V. 7, № 67. – P. eabb6032.
241. Jin C., Luo Y., Liang Z. [et al.] Crucial role of the transcription factors family activator protein 2 in cancer: current clue and views // *Journal of Translational Medicine*. – 2023. – V. 21, № 1. – P. 371.

242. Lezon-Geyda K., Najfeld V., Johnson E. M. Deletions of PURA, at 5q31, and PURB, at 7p13, in myelodysplastic syndrome and progression to acute myelogenous leukemia // Leukemia. – 2001. – V. 15, № 6. – P. 954-62.