

**Никонова Татьяна Васильевна**

**Сахарный диабет 1 типа и латентный  
аутоиммунный диабет взрослых (LADA):  
клинические, иммуно-генетические  
и гормонально-метаболические аспекты**

(14.01.02 – эндокринология)

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Москва — 2011 г.

Работа выполнена в ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития РФ (директор – академик РАН и РАМН Иван Иванович Дедов).

Научный консультант:

Академик РАН и РАМН, профессор, доктор медицинских наук  
**Дедов Иван Иванович**

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор,  
**Галстян Гагик Радикович**  
Доктор медицинских наук, профессор  
**Петунина Нина Александровна**  
Доктор медицинских наук, профессор  
**Бирюкова Елена Валерьевна**

Ведущее учреждение

ГБОУ ДПО «Российская Медицинская Академия Последипломного Образования» (РМАПО) МЗ СР РФ

Защита диссертации состоится « 21 » декабря 2011 г. в 14 часов на заседании специализированного совета Д 208.126.01 при ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития РФ по адресу: 117036 Москва, ул. Дм. Ульянова, д. 11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития РФ.

Автореферат разослан « 18 » ноября 2011 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,  
Доктор медицинских наук

Е.А. Трошина

## Общая характеристика работы

### Актуальность проблемы

По определению экспертов Всемирной Организации Здравоохранения: «Сахарный диабет является проблемой всех возрастов и всех стран». В связи с ранней инвалидизацией и высокой смертностью больных решение вопросов, связанных с этим заболеванием, поставлено во многих странах мира на государственный, федеральный уровень.

Сахарный диабет 1 типа (СД 1) составляет 10% всех случаев диабета. Он ассоциирован как с хроническими осложнениями, так и острыми, угрожающими жизни состояниями, такими как кетоацидоз и гипогликемия. В медицинской практике диагностика различных типов сахарного диабета (СД) основывается на клинических характеристиках и в типичных случаях не вызывает трудностей. В последние годы появились формы СД, которые не отвечают критериям принятой традиционной классификации ВОЗ (1999). Одним из вариантов течения аутоиммунного СД является латентный аутоиммунный диабет взрослых – «latent autoimmune diabetes in adults» (LADA) [Zimmet P.Z., 1995]. Он характеризуется клинической картиной не типичной для классического СД 1; несмотря на наличие аутоантител, аутоиммунная деструкция развивается медленно, что не сразу приводит к развитию потребности в инсулине. Данная форма СД занимает промежуточное положение между СД 1 и СД 2, и в последней классификации не выделяется в отдельную номенклатурную единицу. Наличие в дебюте заболевания клинической картины СД 2 затрудняет диагностику и своевременное начало инсулинотерапии у пациентов с LADA. В связи с этим разработка дифференциально-диагностических критериев LADA имеет большое практическое значение.

СД 1 является полигенным многофакторным заболеванием, то есть, проявление болезни определяется взаимодействием средовых и генетических факторов. Наибольшее значение из известных генетических маркеров СД 1 имеют гены, расположенные в области главного комплекса гистосовместимости человека (HLA) на хромосоме 6p21.3 (*IDDM1*) [Davies J.L., 1994]. В последние годы, в том числе и на основе полных геномных поисков, обнаружена ассоциация с СД 1 ряда новых локусов. Вторым по

значимости генетическим фактором определяющим предрасположенность к СД 1 является локус *IDDM2*, расположенный на хромосоме 11p15.5 и отождествляемый с геном инсулина (*INS*) [Bennett S.T., 1995]. Также, предрасположенность к СД 1 ассоциирована с геном *PTPN22*, кодирующим тирозиновую фосфатазу лимфоидных клеток, и отвечающим за супрессию иммунного ответа, осуществляемого Т-клетками [Bottini N., 2004; Smyth D., 2004]. Исследования ассоциации гена *PTPN22* с СД 1 в русской популяции немногочисленны [Носиков В.В., 2010], у пациентов с LADA до настоящего времени не проводились.

Как и классический СД 1, LADA связан с потерей иммунологической толерантности к собственным антигенам и характеризуется селективным разрушением  $\beta$ -клеток панкреатических островков лимфоцитами  $CD8^+$  (цитотоксическими) и  $CD4^+$  (эффекторными). В настоящее время основной группой лимфоидных клеток, отвечающих за поддержание ауто толерантности, считают пул  $CD4^+$  лимфоцитов, экспрессирующих маркерную молекулу  $CD25$  –  $\alpha$ -цепь рецептора IL-2 (IL-2R) [Sakaguchi S., 2001]. Субпопуляцию  $CD4^+CD25^{high}$  называют регуляторными Т-клетками (Treg). Treg стремятся ликвидировать активный ответ Т-клеток и предотвратить развитие аутоиммунных реакций, регулируя численность популяции Т-клеток и их дифференциацию, а также функцию эффекторных Т-клеток [Tang Q., 2006]. Функциональные свойства Treg опосредованы активностью FOXP3 (fork head box) [Zheng Y., 2007] – фактора транскрипции, непосредственно и косвенно регулирующего экспрессию более 300 генов. Супрессорная активность Treg непосредственно зависит от интенсивности экспрессии гена *FOXP3* [Pop S.M., 2005]. Снижение количества этих клеток или их супрессорной активности могут способствовать потере ауто толерантности к антигенам  $\beta$ -клеток и развитию аутоиммунного процесса. В литературе приводятся достаточно противоречивые данные по характеру изменений количественных и функциональных показателей Treg при различных заболеваниях, в том числе при СД 1. При LADA количественная и функциональная активность Treg, которые могут рассматриваться в качестве центральных регуляторов иммунного ответа и главных носителей феномена иммунологической толерантности, до сих пор остаются практически не изученными.

При СД 1 одной из причин развития аутоиммунитета является нарушение процесса элиминации аутореактивных иммунных лимфоидных клеток. В норме клоны аутореактивных клеток подвергаются апоптозу [Gronski M., 2006]. Взаимодействие

поверхностных маркерных молекул CD95 (Fas) с лигандом – CD95L (FasL) запускает процесс гибели клеток. Таким образом, уровень экспрессии CD95 на поверхности клетки определяет её готовность к вступлению в апоптоз. Однако маркёры апоптоза лимфоцитов у пациентов с LADA недостаточно изучены.

При СД1 важнейшую роль играет секреторная активность  $\beta$ -клеток, так как именно снижение секреции инсулина приводит к его абсолютному дефициту в крови. Между тем, определение содержания инсулина в периферической крови не точно отражает эндогенную секрецию инсулина. Инсулин и С-пептид секретируются поджелудочной железой в эквимолярных количествах, но 50% или более инсулина расщепляется при первом же прохождении через печень. Именно поэтому в большинстве исследований о секреции инсулина судят по концентрации С-пептида, измеренной после продолжительного голодания (более 10 часов) и на фоне стимуляции (GST, OGTT, ММТТ). В настоящее время в международных исследованиях в качестве «золотого стандарта» для оценки секреторной функции  $\beta$ -клеток принято использовать ММТТ с количественным определением концентрации С-пептида в крови [Greenbaum С., 2008]. Использование стандартного количества смешанной пищи считают более физиологичным стимулятором секреции инсулина, чем внутривенное введение глюкагона и пероральный приём раствора глюкозы. В связи с этим, вопросы сравнительного изменения секреторной активности  $\beta$ -клеток на фоне ММТТ при СД 1, LADA и СД2 представляют большой интерес.

После манифестации СД 1 у некоторых пациентов в первые месяцы после установления диагноза отмечается преходящее снижение потребности в инсулине, связанное с улучшением функции оставшихся  $\beta$ -клеток. Этот период наиболее благоприятного течения СД 1, характеризующийся снижением потребности в экзогенном инсулине, вплоть до его отмены называется “медовым месяцем” или клинической ремиссией. Несмотря на значимость ремиссии, которая свидетельствует о сохранной функции оставшихся  $\beta$ -клеток, что позволяет отсрочить осложнения сахарного диабета, имеются немногочисленные работы, посвященные роли ауторегуляторных процессов в её развитии.

## Цель исследования

Изучить гетерогенность аутоиммунного сахарного диабета 1 типа, варианты дебюта и прогрессирования заболевания на основании клинических, гормонально-метаболических и иммуно-генетических особенностей.

## Задачи исследования

1. Определить варианты развития и течения аутоиммунного сахарного диабета 1 типа:
  - «Классический» иммуноопосредованный СД 1;
  - Латентный аутоиммунный диабет взрослых (LADA).
2. Исследовать особенности распределения гаплотипов и генотипов генов HLA, оценить степень аутоиммунной агрессии при различных клинических вариантах течения СД 1.
3. Изучить ассоциацию полиморфных маркеров генов кандидатов, определяющих предрасположенность к аутоиммунному поражению  $\beta$ -клеток (полиморфного маркера *R620W* гена *PTPN22*, полиморфного маркера *-23HphI* гена *INS*), с различными вариантами течения СД 1.
4. Оценить уровень экспрессии маркёров апоптоза на лимфоцитах периферической крови у больных СД1, LADA, а также на фоне ремиссии СД1.
5. Изучить особенности распределения гаплотипов и генотипов генов HLA, показатели субпопуляционного состава лимфоцитов и экспрессию гена *FOXP3* у лиц из группы риска развития СД 1.
6. Оценить экспрессию гена *FOXP3* и количество регуляторных Т-лимфоцитов у больных СД 1 и LADA, а также на фоне ремиссии СД1.
7. Оценить функциональную возможность  $\beta$ -клеток и периферическую инсулинорезистентность у больных с СД1, LADA и в группе риска развития СД 1.
8. Оценить диагностическую значимость изучаемых маркёров.

## Научная новизна

- Впервые определены иммунологические особенности у пациентов с LADA в сравнении с пациентами СД 1, а также у лиц из группы риска развития СД 1: исследована экспрессия маркёров апоптоза лимфоцитов периферической крови; определена интенсивность экспрессии гена *FOXP3* и количество регуляторных Т-лимфоцитов типа  $CD4^+CD25^{high}$ .

- Впервые исследованы особенности иммунологических ауторегуляторных процессов у пациентов с различной длительностью СД 1 и LADA: определена интенсивность экспрессии гена *FOXP3* и количество регуляторных Т-клеток при различной длительности СД 1 и LADA.

- Впервые исследованы особенности иммунологических ауторегуляторных процессов у пациентов с ремиссией СД 1: определена интенсивность экспрессии гена *FOXP3* и количество регуляторных Т-клеток, исследована экспрессия маркёров апоптоза лимфоцитов периферической крови.

- Впервые в России проведено сравнительное исследование ассоциации полиморфных генетических маркеров *-23HphI* гена *INS* и *R620W* гена *PTPN22* с заболеванием LADA и СД 1.

- Впервые проведена сравнительная оценка функциональных возможностей  $\beta$ -клеток по их суммарному секреторному ответу в ходе ММТТ на фоне компенсации углеводного обмена у больных с СД 1 и СД 2, LADA и в группе риска развития СД 1.

- Впервые показано сочетание инсулинорезистентности и снижения функции  $\beta$ -клеток вследствие аутоиммунного процесса у пациентов с впервые выявленным заболеванием LADA (по данным НОМА–модели).

- На основе проведённых исследований впервые предложены критерии для клинико-лабораторной дифференциальной диагностики различных вариантов течения аутоиммунного СД (СД 1 и LADA) и СД 2.

## **Практическая значимость**

Проведённая работа позволила сформулировать критерии для максимально точной клинико-лабораторной дифференциальной диагностики различных вариантов течения аутоиммунного СД и СД 2. Показано, что верификация диагноза должна строиться не только на характерных особенностях клинической картины заболевания, но и на результатах исследования секреторной активности  $\beta$ -клеток и иммунного статуса, а также с учётом особенностей генотипа.

Показана значимость результатов генетического исследования не только локуса *HLA*, но и генов *INS* (маркер *-23HphI*) и *PTPN22* (маркер *R620W*) для проведения дифференциальной диагностики впервые выявленного СД.

Полученные результаты позволяют рекомендовать оценку функции  $\beta$ -клеток и инсулинорезистентности периферических тканей с использованием НОМА-модели, определение секреторной функции  $\beta$ -клеток с использованием ММТТ теста у взрослых пациентов с впервые выявленным СД для проведения дифференциальной диагностики и оптимизации лечения.

Полученные результаты расширяют представление о ключевых особенностях патогенеза различных вариантов течения аутоиммунного СД и могут служить основой для дальнейших исследований в этой области.

## **Апробация работы**

Основные положения исследования доложены на Российских диабетологических и эндокринологических конгрессах в г. Москва (2004, 2010), X конгрессе Международной Диабетологической Федерации (Париж, Франция, 2003), IX региональной конференции по лечению сахарного диабета 2 типа (Берлин, Германия, 2009), 46 сессии Европейской Ассоциации по изучению сахарного диабета (Стокгольм, Швеция, 2010), Европейских конгрессах эндокринологов. Апробация диссертации проведена на межотделенческой научной конференции ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития РФ 14 июня 2011 года. По теме диссертации опубликовано 56 печатных работ в отечественных и зарубежных научных изданиях. Вклад соавторов отражен в публикациях по теме.



## **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, характеристика материалов и методов исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, указатель литературы, включающий 391 источник. Диссертация изложена на 243 страницах и содержит 41 таблицу и 47 рисунков.

## **Внедрение результатов исследования**

Результаты работы внедрены в клиническую практику отделения программного обучения и лечения ФГБУ ЭНЦ Минздравсоцразвития РФ, используются в лекционном курсе и семинарских занятиях курсантов кафедры детской эндокринологии и диабетологии ФППО Первого МГМУ им. И.М.Сеченова.

## **Материалы и методы исследования**

### **Клиническая характеристика больных**

В исследование были включены 684 человека (382 мужчины, 302 женщины), которые были разделены на 3 основные и 2 контрольные группы.

#### **Три основные группы:**

- 1 группа — 387 пациентов (223 мужчины (57,6%), 164 женщины (42,4%)) с «классическим» дебютом СД 1; с различной длительностью заболевания, (149 чел.– с впервые выявленным СД (1-й год заболевания); 104– с длительностью СД от 1 года до 5 лет; 76– с длительностью СД от 5 до 10 лет; 58– с длительностью СД свыше 10 лет).

- 2 группа — 143 пациента (97 мужчин (68,5%), 46 женщин (31,5%)) с латентным аутоиммунным диабетом взрослых (LADA), с различной длительностью заболевания (52 чел.– с длительностью до 1 года; 49– с длительностью СД от 1 года до 5 лет; 35– с длительностью СД от 5 до 10 лет; 7– с длительностью СД свыше 10 лет).

- 3 группа — 33 человека (10 мужчин, 23 женщины), составили лица с положительными аутоантителами, ассоциированными с развитием СД 1 (GADA, IA-2A, ICA, IAA) (случайная выборка), группа была условно названа группой риска.

В качестве **контроля** были обследованы 2 группы (56 человек — контрольная группа здоровых лиц, 65 человек – контрольная группа пациентов с СД 2).

Диагноз СД устанавливался на основании клинической картины и данных лабораторного обследования в соответствии с критериями Всемирной Организации Здравоохранения [World Health Organization, 1999]. «Классический» вариант СД 1 диагностировался при наличии яркой клинической картины (полидипсия, полиурия, значительная потеря массы тела), кетонурии, низких значений С-пептида. Диагноз LADA, ставился пациентам с дебютом заболевания в возрасте старше 30 лет, постепенным началом, положительными аутоантителами к аутоантигенам  $\beta$ -клетки и/или инсулину, отсутствием кетонурии, нормальными значениями базальной концентрации С-пептида в сыворотке крови [P. Zimmet, 1994]. Во 2-ю группу (LADA) были включены 117 пациентов с первичным диагнозом СД 2 (что составило 82,8% от всей группы), с положительными титрами аутоантител, ассоциированных с СД, получавшие в течение не менее чем 6 мес. сахароснижающие пероральные препараты в качестве моно- или комбинированной терапии без значимого клинического эффекта и 26 пациентов, которым был сразу поставлен диагноз LADA.

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

Основные клиничко-лабораторные показатели больных СД в исследуемых группах на момент дебюта представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Клиничко-лабораторные показатели больных с впервые выявленным СД**

	<b>СД 1 (n=149)</b>	<b>LADA (n=52)</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Возраст дебюта, годы</b>	27,0 [21,0; 33,0]	38,0 [30,2; 43,1]	< 0,001
<b>ИМТ в дебюте, кг/м<sup>2</sup></b>	21,9 [20,6; 23,9]	28,8 [23,8; 31,2]	< 0,001
<b>HbA<sub>1c</sub>, %</b>	9,3 [7,3; 12,1]	8,3 [6,6; 10,9]	0,086
<b>С-пептид, нг/мл</b>	0,8 [0,6; 1,2]	1,8 [1,3; 2,6]	< 0,001
<b>ИРИ, мкЕд/мл</b>	2,7 [2,0; 4,5]	9,8 [3,2; 11,5]	0,021

ИРИ у больных СД 1 в дебюте представлен для пациентов, не получавших инсулин на момент обследования.

У 13 человек (8,7%) (8 мужчин и 5 женщин) из группы с впервые выявленным СД1 была отмечена ремиссия заболевания, из них у десяти (6,7%) - частичная (снижение потребности в экзогенном инсулине  $\leq 0,4$  Ед/кг/сут. на фоне компенсации СД), у трех

(2%) – полная ремиссия заболевания (восстановление нормогликемии без инсулинотерапии на срок более 2 недель) по критериям, утвержденным IDIG (International Diabetic Immunotherapy Group).

В третью группу (группу риска развития СД 1) вошли лица с положительными результатами повторного определения аутоантител, ассоциированных с развитием СД 1 (GADA, IA-2A, ICA, IAA). Обследуемые были в возрасте 28,5 лет [21,5; 35,5], с индексом массы тела (ИМТ) 26,03 кг/м<sup>2</sup> [22,77; 30,15], HbA<sub>1c</sub> 5,6 % [5,4; 5,7], базальным уровнем С-пептида в крови 1,7 нг/мл [1,2; 4,1], инсулина - 7,2 мкЕд/мл [5,4; 8,6]. У 3 человек из группы риска родственники первой степени родства болели СД 1.

Первую контрольную группу составили 56 практически здоровых лиц (30 мужчин и 26 женщин), в возрасте 34 года [24; 53], ИМТ составил 21,34 кг/м<sup>2</sup> [18,90; 30,67], HbA<sub>1c</sub> 5,4 % [4,8; 5,5], базальный уровень С-пептида в крови 2,3 нг/мл [1,5; 4,5], инсулина 7,3 мкЕд/мл [4,2; 9,2].

Критериями включения в контрольную группу были: отсутствие нарушений углеводного обмена и отрицательные аутоантитела к антигенам β-клетки (GADA, IA-2A, ICA, IAA).

Вторую контрольную группу составили 65 больных СД 2 (22 мужчин и 43 женщин), в возрасте 44,0 года [39,5; 51,0], ИМТ пациентов составил 30,68 кг/м<sup>2</sup> [25,95; 35,08], HbA<sub>1c</sub> 8,7 % [7,3; 10,8], базальный уровень С-пептида в крови 3,1 нг/мл [1,8; 4,0], инсулина - 17,9 мкЕд/мл [7,2; 22,0].

### **Иммуно-генетическое обследование**

Количественное определение ICA, GADA, IAA и IA-2A в сыворотке крови осуществляли методом иммуноферментного анализа с использованием наборов “Isletest-ICA, GADA, IAA” (“Biomerica”, Германия) и “Medizym” (“Medipan GmbH”, Германия).

Определение экспрессии поверхностных молекул на лимфоцитах периферической крови проводили на проточном цитометре “FACSCalibur” по стандартной методике с использованием моноклональных антител (одинарной и двойной меткой) к CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25, CD38, HLA-DR (“Becton Dickinson”, США) и CD95, CD95L (“Immunotech”, Франция). При этом оценивали процентное содержание субпопуляций лимфоидных клеток, экспрессию дифференцировочных антигенов и абсолютное

количество указанных субпопуляций лимфоидных клеток.

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили с помощью наборов пробоподготовки “DNA prep”. В настоящей работе ДНК-типирование выполнялось методом мультипраймерной полимеразной цепной реакции по аллельным вариантам трех генов HLA класса II: *DRB1* (14 специфичностей), *DQA1* (8 аллелей) и *DQB1* (13 аллелей). Для определения полиморфных аллелей данных генов применялись коммерческие наборы производства ЗАО “НПФ ДНК-Технология” (Россия). Полимеразная цепная реакция проводилась согласно регламенту, указанному производителем. Амплификацию проводили на амплификаторе “Терцик” (Россия). Гаплотипы составлялись на основе известных таблиц сцепления. Исследования выполнены в лаборатории генетики и клинической иммунологии ФГУ ЭНЦ (заведующий — к.м.н. Прокофьев С.А.).

Амплификацию полиморфного микросателитного маркера *R620W* гена *PTPN 22* и полиморфного участка *-23HphI* гена *INS* проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме “реального времени” на термоциклере “Dyad” (Bio-Rad). Обозначения полиморфных маркеров даны в соответствии с базой данных dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Анализ генотипов полиморфных маркеров ряда генов проводили методом детекции флуоресценции «по конечной точке» на термоциклере “ABI 7500 Fast” (Applied Biosystems) с помощью встроенных средств программного обеспечения SDS версии 1.4. Для исследования ассоциации полиморфных маркеров генов-кандидатов у пациентов с заболеванием LADA в сравнении с “классическим” СД 1 использовался подход «случай-контроль». Контрольная группа (206 чел.) представляла собой случайную выборку. Выборки были этнически однородны, составлены из русских (на основании паспортных данных), проживающих в г. Москве и не являющихся родственниками. В нашей работе распределение частот генотипов всех полиморфных маркеров исследуемых генов в группе здоровых индивидов соответствовало распределению Харди-Вайнберга, существенных отличий от частот аллелей и генотипов в европейских популяциях обнаружено не было (данные о частотах в европейской популяции взяты из проекта HarMap, [http:// harmap.org](http://harmap.org)).

Исследования выполнены в ФГУП «ГосНИИ генетика», г. Москва (директор – к.б.н. М.Ю. Бебуров, зав. лабораторией молекулярной диагностики и геномной дактилоскопии – д.б.н., проф. В.В. Носиков).

Для определения интенсивности экспрессии гена *FOXP3* проводилось выделение тотальной РНК из образцов крови данных групп пациентов при помощи набора для выделения РНК Yellow Solve (Клоноген, Санкт-Петербург). Концентрацию выделенной РНК определяли спектрофотометрически при помощи NanoDrop ND-1000 UV/VIS NanoDrop Technologies USA. Обратную транскрипцию проводили с использованием в качестве затравки случайных гексамеров и набора для обратной транскрипции ImProm - III<sup>M</sup> Reverse Transcription (Promega, США).

Количественное определение экспрессии генов осуществляли с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) на приборе Step One Plus фирмы Applied Biosystems (США). Каждое измерение проводили трехкратно. Для проведения ПЦР-РВ были синтезированы праймеры и отработаны оптимальные условия амплификации. В качестве эндогенного контроля использовали ген GAPDH. Для определения диапазона нормальных показателей интенсивности экспрессии гена *FOXP3* было обследовано 85 здоровых доноров.

Исследования выполнены в Медико-генетическом научном центре Российской академии медицинских наук, Москва (директор — академик РАМН Гинтер Е.К., зав. лабораторией молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний — д.б.н. Карпухин А.В.).

## **Биохимическое обследование**

Содержание уровня HbA<sub>1c</sub> определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC) на аппарате D-10 (“Bio-Rad”, Франция) по стандартной методике производителя. Исследование выполнено в лаборатории клинической биохимии ФГУ ЭНЦ (заведующий — Ильин А.В.).

Определение концентрации С-пептида и инсулина проводили иммунохемотропным методом на аппарате “Elecsys 2010” (“Roche”, Германия).

Для оценки функциональной возможности β- клеток был проведен тест ММТТ— (*mixed meal tolerance test*) с приёмом стандартного количества жидкой смешанной пищи (Ensure Plus). Определение базальной секреции происходило путём измерения концентрации С-пептида после длительного голодания (в течение 10 часов); определение выраженности секреторного ответа проводилось путём определения концентрации С-пептида через 30, 60, 90, 120, 180 минут в ходе ММТТ. Оценивался суммарный

секреторный ответ в виде площади под кривой значений концентрации С-пептида. Для характеристики общей функциональной активности  $\beta$ -клеток использовался относительный показатель – НОМА-F-индекс.

НОМА (homeostasis model assessment) – эмпирическая, математически обработанная модель, предназначенная для характеристики общей функциональной активности  $\beta$ -клеток и инсулинорезистентности на основании только базальных показателей глюкозы плазмы и инсулина, что доступно для выполнения и широко используется в исследованиях. Условно в норме функция  $\beta$ -клеток составляет 100%. Общая функциональная активность  $\beta$ -клеток =  $20 \times \text{ИРИО (мкЕд/мл)} / (\text{ГПН (ммоль/л)} - 3,5)$ . НОМА-IR-индекс – относительный параметр, характеризующий общую периферическую инсулинорезистентность. Индекс инсулинорезистентности =  $\text{ИРИО (мкЕд/мл)} \times \text{ГПН (ммоль/л)} / 22,5$ . По НОМА-модели условно инсулинорезистентность у здорового человека соответствует 1 баллу.

Исследования выполнены в гормональной лаборатории ФГУ ЭНЦ (заведующий — проф., д.м.н. Гончаров Н.П.).

### **Статистическая обработка полученных данных**

Проведена с использованием пакета прикладных программ statistica (StatSoft Inc. США, версия 6.0). Для анализа вида распределений применялись критерии Шапиро-Уилка и Лиллиефорса, дисперсии распределений признаков оценивались с помощью F-критерия в процедуре дисперсионного анализа ANOVA. Сравнение групп по количественным признакам осуществлялось непараметрическим методом с использованием U-критерия Манна-Уитни. Сравнение групп по качественным признакам осуществлялось непараметрическим методом путем анализа таблиц сопряженности с использованием двухстороннего точного критерия Фишера для несвязанных групп и критерия МакНемара для связанных групп. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . Анализ связи (корреляции) двух количественных признаков осуществлялся непараметрическим методом ранговой корреляции по Спирмену. Для сравнения частот аллелей и генотипов исследуемых полиморфных маркеров в группах с наличием и отсутствием заболевания нами использовался критерий  $\chi^2$ . Значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

Результаты исследований, обработанные статистически и представленные в виде

таблиц или диаграмм, дают возможность судить о динамике медианы параметра, достоверности и интерквартильном отрезке, а также связи с изменениями других параметров в соответствии с современными требованиями.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Учитывая аутоиммунный характер СД и выраженную генетическую ассоциацию заболевания с генами (*DRB1*, *DQA1*, *DQB1*) локуса HLA класса II нами были определены и проанализированы ряд генетических и иммунологических характеристик при СД 1 и LADA.

HLA-генотипирование было проведено всем обследуемым. Контрольная группа (149 чел.) представляла собой случайную выборку. Выборка была этнически однородна, составлена из русских (на основании паспортных данных), проживающих в г. Москве и не являющихся родственниками. Анализировали частоту встречаемости различных генотипов и комбинаций гаплотипов HLA у пациентов с СД 1, LADA и в контрольной группе (табл. 2).

При сравнительном анализе распределения генотипов HLA класса II у пациентов с СД 1, LADA и в контрольной группе наблюдались выраженные отличия по частоте как высоко предрасполагающих, так и протективных генотипов и гаплотипов.

В группе пациентов с СД 1 частота генотипов с двумя предрасполагающими гаплотипами оказалась значительно выше (55,7%), чем с одним предрасполагающим гаплотипом в сочетании с протективным или нейтральным (31,3%). Напротив, в группе пациентов с LADA, в отличие от СД 1, частота генотипов с двумя предрасполагающими гаплотипами значительно ниже (28,7%) ( $p < 0,001$ ), чем с одним предрасполагающим гаплотипом в сочетании с протективным или нейтральным (51,0%) ( $p < 0,001$ ). В контрольной группе преобладали генотипы с комбинацией протективных и нейтральных гаплотипов, частота генотипов с двумя предрасполагающими гаплотипами была статистически значимо ниже по сравнению с СД 1 и LADA. Таким образом, подтверждена ассоциация HLA класса II с развитием как LADA, так и СД 1. Вероятно, именно наличие только одного предрасполагающего гаплотипа в сочетании с протективным или нейтральным в генотипе больных LADA обуславливает менее агрессивное течение заболевания и может являться одной из характеристик LADA.

Таблица 2. Сравнение HLA генотипов в группах с СД 1 и у пациентов с LADA

Генотип	СД 1 (n=387)	LADA (n=143)	Контроль (n=149)	Различие между группами (p)
<b>Генотип с высоко предрасполагающими гаплотипами</b>				
<i>DRB1*04 –DQA1*0301- DQB1*0302/DRB1*04- DQA1*0301-DQB1*0302</i>	9%	1,4%	0%	p <sub>1-2</sub> =0,002 p <sub>1-3</sub> <0,001 p <sub>2-3</sub> =0,148
<i>DRB1*03-DQA1* 0501- DQB1*0201/DRB1*03- DQA1*0501-DQB1*0201</i>	8%	6,3%	1.3%	p <sub>1-2</sub> =0,507 p <sub>1-3</sub> =0,004 p <sub>2-3</sub> =0,026
<i>DRB1*04 –DQA1*0301- DQB1*0302/ DRB1*03- DQA1*0501-DQB1*0201</i>	28,9%	9,8 %	2.7%	p <sub>1-2</sub> <0,001 p <sub>1-3</sub> <0,001 p <sub>2-3</sub> =0,012
<b>Генотип с комбинацией предрасполагающих гаплотипов</b>				
<i>DRB1*03-DQA1* 0501- DQB1*0201/DRB1*01- DQA1*0501 -DQB1*0101</i>	3,9%	7,0%	2.7%	p <sub>1-2</sub> =0,133 p <sub>1-3</sub> =0,504 p <sub>2-3</sub> =0,085
<i>DRB1*04 –DQA1*0301- DQB1*0302/ DRB1*01- DQA1*0501 -DQB1*0101</i>	5,9%	4,2%	2.7%	p <sub>1-2</sub> =0,432 p <sub>1-3</sub> =0,122 p <sub>2-3</sub> =0,478
<b>Генотип с предрасполагающими и протективными гаплотипами</b>				
<i>DRB1*03 –DQA1*0501- DQB1*0201/ * Y</i>	4,9%	14%	6.7%	p <sub>1-2</sub> <0,001 p <sub>1-3</sub> =0,394 p <sub>2-3</sub> =0,041
<i>DRB1*04 –DQA1*0301- DQB1*0302/ * Y</i>	10,1%	16%	5.4%	p <sub>1-2</sub> =0,056 p <sub>1-3</sub> =0,084 p <sub>2-3</sub> =0,003
<i>DRB1*01- DQA1*0501 - DQB1*0101/ * Y</i>	2.1%	0%	4.7%	p <sub>1-3</sub> =0,098
<b>Генотип с предрасполагающими и нейтральными гаплотипами</b>				
<i>DRB1*03 –DQA1*0501- DQB1*0201/ *X</i>	4,9%	14%	8.0%	p <sub>1-2</sub> <0,001 p <sub>1-3</sub> =0,162 p <sub>2-3</sub> =0,105
<i>DRB1*04 –DQA1*0301- DQB1*0302/ *X</i>	8%	7,0%	2.7%	p <sub>1-2</sub> =0,697 p <sub>1-3</sub> =0,025 p <sub>2-3</sub> =0,085
<i>DRB1*01- DQA1*0501 - DQB1*0101/ *X</i>	1.3%	0%	2.7%)	p <sub>1-3</sub> =0,261
<b>Генотип с протективными и нейтральными гаплотипами</b>				
Гаплотип Y / гаплотип X	3,2%	9,8%	30.9%	p <sub>1-2</sub> =0,002 p <sub>1-3</sub> <0,001 p <sub>2-3</sub> <0,001
<b>Генотип с протективными гаплотипами</b>				
Гаплотип Y / гаплотип Y	3,9%	4,2%	18.1%	p <sub>1-2</sub> =0,867 p <sub>1-3</sub> <0,001 p <sub>2-3</sub> <0,001
<b>Генотип с нейтральными гаплотипами</b>				
Гаплотип X / гаплотип X	5,9%	6,3%	11.4 %	p <sub>1-2</sub> =0,88 p <sub>1-3</sub> =0,031 p <sub>2-3</sub> =0,125

X – нейтральный гаплотип; Y – протективный



При HLA-типировании в группе риска развития СД 1 были получены результаты преобладания частот протективных и нейтральных гаплотипов и генотипов по сравнению с классическими предрасполагающими. Поскольку исследование было проведено на малой выборке, полученные данные требуют дальнейшего анализа.

Область предрасположенности *IDDM2* содержит собственно ген *INS* и полиморфный минисателлит, расположенный в 5'-концевой части этого гена (5'-VNTR) в промоторной области. Он состоит из тандемно повторяющихся единиц размером 14-15 п.н. Генетический риск ассоциирован с разным числом повторов минисателлитного маркера VNTR. В зависимости от их числа аллели VNTR подразделяют на 3 класса. Аллели класса I содержат от 26 до 63 повторяющихся единиц, тогда как аллели класса III включают от 141 до 209 звеньев. Промежуточный по длине класс II редко встречается у европеоидов и состоит из аллелей, содержащих около 80 тандемных повторов. Аллели класса I гена инсулина были ассоциированы с предрасположенностью к СД1; в то время как аллели класса III ассоциированы с пониженным риском развития этого заболевания [Bennett S.T. 1995]. Накоплено достаточно данных о корреляции между аллелями VNTR гена *INS*, уровнем синтеза мРНК проинсулина и секрецией продукта этого гена в клетках поджелудочной железы и тимуса [Vafiadis P., 1997]. У носителей аллелей класса I уровень мРНК проинсулина в клетках поджелудочной железы в 1,5 – 2 раза выше, чем у носителей аллелей класса III. Противоположная ситуация наблюдается в клетках тимуса. У носителей аллелей класса III уровень мРНК проинсулина в 2 – 3 раза выше, чем у носителей аллелей класса I. Предполагается, что более высокие уровни экспрессии гена *INS* в тимусе способствуют развитию центральной толерантности, что может объяснять защитную роль этого полиморфного маркера. Во многих исследованиях для идентификации аллелей VNTR использовался сцепленный с ним полиморфный маркер *-23HphI (rs689)* гена *INS*. Для русской популяции подобное исследование показало высокий уровень ассоциации этого полиморфного маркера с СД 1 [Лаврикова Е.Ю. и соавт., 2010]. В настоящем исследовании изучалась ассоциация полиморфного маркера *-23HphI* гена *INS* у пациентов с заболеванием LADA в сравнении с “классическим” СД 1 с использованием подхода «случай-контроль». Результаты представлены в таблицах 3-5.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *-23HphI* гена *INS* в группе с СД1 и контрольной группе, а также в группе с LADA и контрольной группе показал наличие достоверных отличий. Достоверное увеличение частоты аллеля *A* в группе больных СД1 и LADA говорит об ассоциации

аллеля *A* и генотипа *AA* с повышенным риском развития как СД1, так и LADA. В то же время установлена ассоциация аллеля *T* и генотипа *TT* с пониженным риском развития СД1 и LADA. Достоверной разницы в распределении частот в группах LADA и СД1 обнаружено не было. Таким образом, полиморфный маркер *-23HphI* гена *INS* достоверно ассоциирован как с СД 1, так и с LADA.

**Таблица 3. Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *-23HphI* гена *INS* в контрольной группе и у пациентов с СД 1**

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение $\chi^2$	Уровень значимости $p$	OR	
	СД 1	Контроль			значение	CI 95%
	n = 177	n = 206				
Аллель <i>A</i>	289 / 0,816	283 / 0,687	16,88	0,00004	2,03	1,44 - 2,85
Аллель <i>T</i>	65 / 0,184	129 / 0,313			0,49	0,35 - 0,69
Генотип <i>AA</i>	118 / 0,667	102 / 0,495	15,82	0,0004	2,04	1,35 - 3,09
Генотип <i>AT</i>	53 / 0,299	79 / 0,383			0,69	0,45 - 1,05
Генотип <i>TT</i>	6 / 0,034	25 / 0,121			0,25	0,10 - 0,63

**Таблица 4. Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *-23HphI* гена *INS* в контрольной группе и у пациентов с LADA**

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение $\chi^2$	Уровень значимости $p$	OR	
	LADA	контроль			значение	CI 95%
	n = 92	n = 206				
Аллель <i>A</i>	153 / 0,832	283 / 0,687	13,55	0,00024	2,25	1,45 - 3,49
Аллель <i>T</i>	31 / 0,168	129 / 0,313			0,44	0,29 - 0,69
Генотип <i>AA</i>	64 / 0,696	102 / 0,495	12,20	0,0023	2,33	1,38 - 3,93
Генотип <i>AT</i>	25 / 0,272	79 / 0,383			0,60	0,35 - 1,03
Генотип <i>TT</i>	3 / 0,033	25 / 0,121			0,24	0,07 - 0,83

**Таблица 5. Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера –23HphI гена *INS* в группах LADA и СД 1**

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение $\chi^2$	Уровень значимости $p$	OR	
	LADA	СД 1			значение	CI 95%
	n = 92	n = 177				
Аллель <i>A</i>	153 / 0,832	289 / 0,816	0,19	0,66	1,11	0,69 - 1,78
Аллель <i>T</i>	31 / 0,168	65 / 0,184			0,90	0,56 - 1,44
Генотип <i>AA</i>	64 / 0,696	118 / 0,667	0,24	0,89	1,14	0,66 - 1,97
Генотип <i>AT</i>	25 / 0,272	53 / 0,299			0,87	0,50 - 1,53
Генотип <i>TT</i>	3 / 0,033	6 / 0,034			0,96	0,23 - 3,93

Ген *PTPN22*, расположенный в хромосомной области 1p13.3-p13.1, входит в число наиболее значимых генов, предрасполагающих не только к развитию СД 1, но и к ревматоидному артриту, системной красной волчанке и ряду других аутоиммунных заболеваний [Lee, .2007, Gregersen, 2006, Criswell, 2005]. Тирозиновая фосфатаза лимфоидных клеток (LYP), которая кодируется геном *PTPN22*, – внутриклеточный белок, специфичный для клеток иммунной системы [Cohen, 1999]. Тирозиновые фосфатазы Т-лимфоцитов осуществляют дефосфорилирование соответствующих белков, передающих сигнал от антигенных рецепторов Т-клеток и рецепторов цитокинов. В 2004 г. обнаружена ассоциация полиморфного маркера *C1858T* гена *PTPN22* с СД 1 [Bottini N., 2004]. Однонуклеотидному полиморфизму *C1858T* соответствует аминокислотный полиморфизм *R/W* в положении 620 аминокислотной последовательности тирозиновой фосфатазы Т-лимфоцитов (*R620W*). Так как вклад полиморфного маркера *C1858T* гена *PTPN22* в формирование предрасположенности к СД 1 подтвердился в нескольких геномных анализах с использованием микрочипов высокой плотности [Todd, 2007, Cooper, 2008], мы изучили ассоциацию этого полиморфного маркера с заболеванием LADA в сравнении с СД 1 (табл. 6-8).

При сравнительном анализе распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *R620W* гена *PTPN22* в группах с СД1 и контрольной группой, а также в группе LADA и СД1 получены достоверные отличия, в то время как между группой LADA и контрольной группой достоверной разницы обнаружено не было. Достоверное увеличение частоты аллеля *T* (OR=1,7  $p=0,01$ ) и генотипа *CT* (OR=1,7

$p=0,04$ ) в группе больных СД1 говорит об их ассоциации с повышенным риском развития данной патологии. В то же время была установлена ассоциация аллеля *C* ( $OR=0,59$   $p=0,01$ ) и генотипа *CC* ( $OR=0,55$   $p=0,04$ ) с пониженным риском развития СД1. Таким образом, обнаружена ассоциация полиморфного маркера *R620W* гена *PTPN22* с развитием СД1, однако, ассоциации с развитием LADA в нашей выборке не установлено. Поскольку исследование было проведено на малой выборке больных, полученные данные требуют дальнейшего анализа.

**Таблица 6. Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *R620W* гена *PTPN22* в контрольной группе и у пациентов с СД 1**

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение $\chi^2$	Уровень значимости $p$	OR	
	СД1	контроль			значение	CI 95%
	n = 162	n = 203				
Аллель <i>C</i>	265 / 0,818	359 / 0,884	6,39	0,01	0,59	0,39 – 0,89
Аллель <i>T</i>	59 / 0,182	47 / 0,116			1,7	1,12 – 2,57
Генотип <i>CC</i>	108 / 0,667	159 / 0,783	6,43	0,04	0,55	0,35 – 0,88
Генотип <i>CT</i>	49 / 0,302	41 / 0,202			1,71	1,06 – 2,77
Генотип <i>TT</i>	5 / 0,031	3 / 0,015			2,12	0,50 – 9,02

**Таблица 7. Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *R620W* гена *PTPN22* в контрольной группе и у пациентов с LADA**

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение $\chi^2$	Уровень значимости $p$	OR	
	LADA	контроль			значение	CI 95%
	n = 92	n = 203				
Аллель <i>C</i>	165 / 0,897	359 / 0,884	0,20	0,66	1,14	0,65 - 2,00
Аллель <i>T</i>	19 / 0,103	47 / 0,116			0,88	0,50 - 1,55
Генотип <i>CC</i>	73 / 0,793	159 / 0,783	1,37	0,50	1,06	0,58 - 1,95
Генотип <i>CT</i>	19 / 0,207	41 / 0,202			1,03	0,56 - 1,89
Генотип <i>TT</i>	0 / 0,000	3 / 0,015			0,31	0,02 - 6,06

**Таблица 8. Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера R620W гена PTPN22 в группах LADA и СД 1**

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение $\chi^2$	Уровень значимости $p$	OR	
	LADA	СД1			значение	CI 95%
	n = 92	n = 162				
Аллель C	165 / 0,897	265 / 0,818	5,61	0,018	1,93	1,11 - 3,36
Аллель T	19 / 0,103	59 / 0,182			0,52	0,30 - 0,90
Генотип CC	73 / 0,793	108 / 0,667	6,18	0,045	1,92	1,05 - 3,50
Генотип CT	19 / 0,207	49 / 0,302			0,60	0,33 - 1,10
Генотип TT	0 / 0,000	5 / 0,031			0,15	0,01 - 2,83

Аутоантитела к антигенам  $\beta$ -клетки являются маркерами аутоиммунного процесса. Вид аутоантител, их комбинации и титры а в группах LADA и СД1 были различны. У пациентов с LADA наиболее часто определялись антитела к GAD: 53,1% по сравнению с 22,1% при СД 1 ( $p < 0,05$ ). Также отмечена большая частота встречаемости комбинации GADA+IA-2A у пациентов с СД 1 (19% - при длительности заболевания до 6 мес., 26,3% - до 12 мес.) по сравнению с LADA (отсутствие - до 6 мес., 10% - до 12 мес.) ( $p < 0,01$ ), и большая частота встречаемости комбинации GADA+ICA у пациентов с LADA (21,4% - при длительности заболевания до 6 мес., 25,% - до 12 мес.) по сравнению с СД 1 (9,5% - до 6 мес., 5,3% - до 12 мес.) ( $p < 0,01$ ). Взаимосвязи предрасполагающих и протективных HLA гаплотипов с аутоантителами не обнаружено ни в группе пациентов с СД1, ни в группе с LADA.

### **Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов, естественных регуляторных Т-клеток и их молекулярного маркера - гена FOXP3**

Деструкция  $\beta$ -клеток при СД1 опосредована клеточным иммунным ответом, что доказывается фактами обнаружения эффекторных Т-клеток в островках при инсулите, замедлением прогрессирования заболевания иммуносупрессивными препаратами, направленными непосредственно против Т-клеток, определением аутореактивных Т-клеток в крови у пациентов в дебюте СД1. В нормальных условиях защитные механизмы предотвращают избыточную активацию клеток иммунной системы [McClymont S.A.,

2011]. К фундаментальным защитным механизмам относится иммунологическая толерантность. У здоровых людей периферическая ауто толерантность поддерживается с помощью ряда регуляторных механизмов, включая популяцию естественных регуляторных Т-клеток. Способность Treg подавлять аутоиммунный ответ непосредственно зависит от уровня экспрессии гена *FOXP3*.

Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов, естественных регуляторных Т-клеток и их молекулярного маркера – гена *FOXP3* проводилось в выборке из 116 больных (67 мужчин, 49 женщин) СД 1, выборке из 74 больных LADA (51 мужчина, 23 женщины), а также у лиц группы риска развития СД1 в сравнении с контрольными группами. Больные СД 1 и LADA были разделены на подгруппы в зависимости от длительности заболевания: (табл. 9, 10).

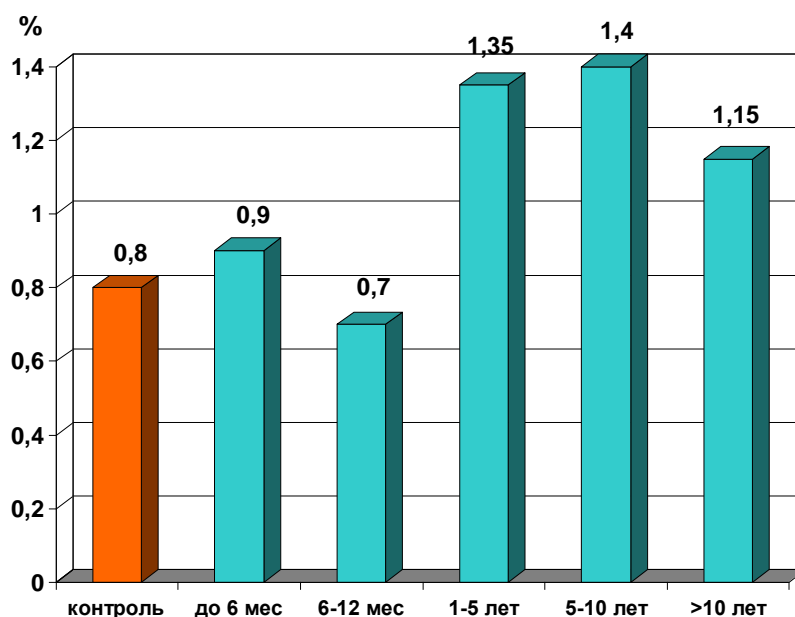
**Таблица 9. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с СД 1 (n=116)**

	до 6 мес. (n=21)	6-12 мес. (n=38)	1-5 лет (n=16)	5-10 лет (n=15)	более 10 лет (n=26)
<b>НbA<sub>1c</sub>, %</b>	10,1 [8,2; 14,1]	9,1 [6,4; 11,1]	7,2 [6,4; 9,8]	8,6 [7,4; 9,8]	9,2 [6,8; 11,9]
<b>С-пептид, нг/мл</b>	0,6 [0,3; 1,0]	0,7 [0,5; 0,8]	1,2 [0,6; 1,8]	0,5 [0,3; 0,8]	0,3 [0,1; 0,8]
<b>ретинопатия</b>	нет	нет	11,5%	38,2%	53,5%
<b>нефропатия</b>	нет	нет	3,8%	25,0%	46,6%
<b>нейропатия</b>	нет	нет	4,8%	18,4%	48,3%

**Таблица 10. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с LADA (n=74)**

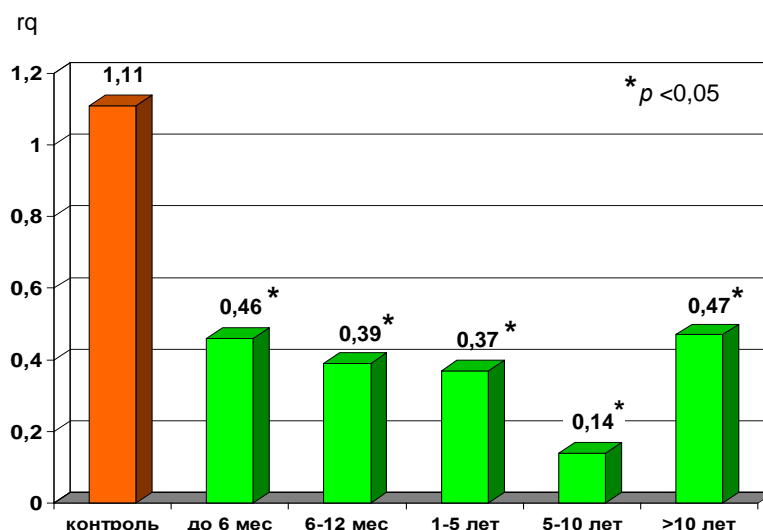
	до 6 мес. (n=14)	6-12 мес. (n=20)	1-5 лет (n=26)	5-10 лет (n=14)
<b>НbA<sub>1c</sub>, %</b>	8,9 [6,4; 11,1]	6,0 [5,3; 6,6]	6,6 [6,0; 7,2]	7,5 [6,3; 8,8]
<b>С-пептид, нг/мл</b>	1,8 [1,6; 2,6]	2,6 [2,4; 2,9]	2,1 [1,5; 2,3]	1,4 [0,8; 2,1]
<b>ретинопатия</b>	нет	нет	8,2%	25,7%
<b>нефропатия</b>	нет	нет	14,3%	31,4%
<b>нейропатия</b>	нет	нет	6,1%	20,0%

В группе больных с СД 1, как с впервые выявленным, так и при продолжительном течении заболевания, количество регуляторных Т-лимфоцитов не отличалось от такового в группе контроля ( $p > 0,05$ ) (рис. 1.)



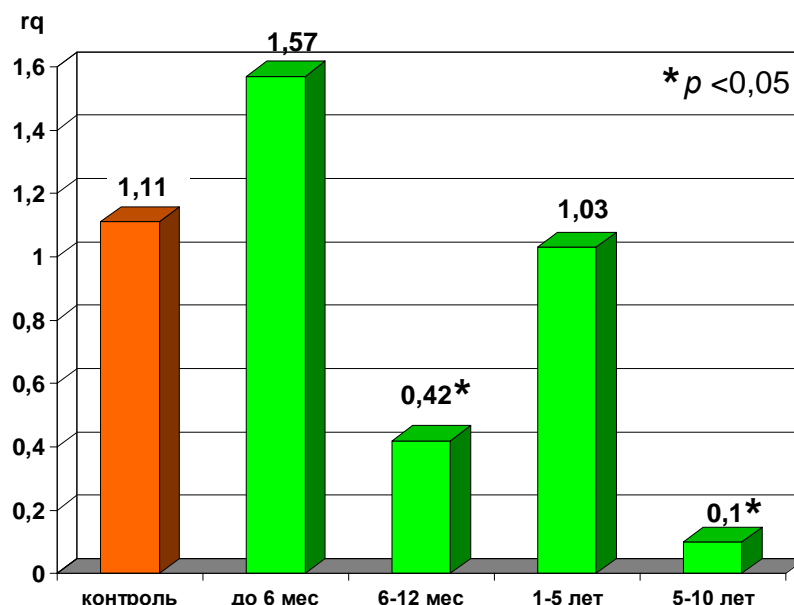
**Рис. 1. Количество клеток CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> у пациентов с СД 1 с различной длительностью заболевания.**

Однако их функциональная активность (интенсивность экспрессии гена *FOXP3*) была достоверно ниже, чем в контроле. Низкая интенсивность экспрессии гена *FOXP3* в сравнении с контролем отмечалась при любой продолжительности заболевания (рис. 2):

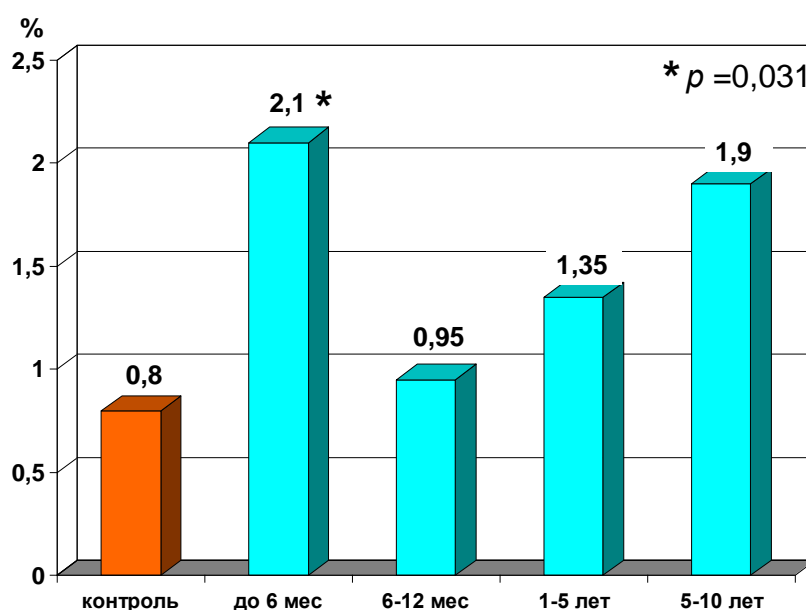


**Рис. 2. Экспрессия гена *FOXP3* у пациентов с СД1 с различной длительностью заболевания.**

Изменение экспрессии гена *FOXP3* у пациентов с LADA носило волнообразный характер, что не наблюдалось у пациентов с СД 1 (рис.3). Начало заболевания характеризовалось показателями экспрессии, не отличающимися от контрольных значений, при этом наблюдалось достоверное повышение относительного количества Т-лимфоцитов подтипа CD4<sup>+</sup>25<sup>high</sup> ( $p=0,031$ ) (рис. 4).



**Рис. 3. Экспрессия гена *FOXP3* у больных LADA с различной длительностью заболевания.**



**Рис. 4. Количество клеток CD4+CD25<sup>high</sup> у больных LADA с различной длительностью заболевания.**

Снижение экспрессии гена *FOXP3* у пациентов с LADA, в отличие от СД 1, наблюдалось через 6-12 месяцев от начала заболевания, при этом количество Т-лимфоцитов подтипа CD4+25<sup>high</sup> нормализовалось и при дальнейшем течении заболевания не отличалось от контрольных значений. В период от года до пяти лет вновь наблюдалась нормализация уровня экспрессии гена *FOXP3*, при длительности болезни более пяти лет – достоверное снижение.

Наращение процентного содержания Treg в период до 6 мес. может отражать их



регулирующую роль при подавлении аутоиммунного ответа. Возможно, увеличение численности Treg компенсирует их функциональный дефицит. Таким образом, при заболевании LADA функциональный дефицит Treg возникает отсрочено, что, очевидно, обуславливает медленное прогрессирование аутоиммунной деструкции  $\beta$ -клеток. Прогрессирование индуцированной аутоиммунной реакции при длительности заболевания от года до пяти лет по неизвестным пока причинам замедляется, несмотря на наличие антител. Возможно, индукция аутоиммунного процесса происходит на фоне имеющейся периферической инсулинорезистентности, характерной для больных LADA.

Низкая интенсивность экспрессии гена *FOXP3* (несмотря на отсутствие существенной разницы в содержании Treg в крови) в сравнении с контролем при любой продолжительности СД 1 говорит о потере иммунологической толерантности и дефекте подавления аутоиммунного ответа при любом сроке заболевания.

В группе риска развития СД 1 отмечена тенденция повышения относительного количества клеток с подтипами  $CD25^+$  и  $CD4^+CD25^{high}$  по сравнению с контролем ( $p > 0,05$ ) и достоверное снижение экспрессии гена *FOXP3* – 0,49 гк [0,24;0,81] ( $p < 0,05$ ). Результаты, полученные в группе риска развития СД 1, могут свидетельствовать о постепенно снижающейся способности Treg подавлять Т-клеточную пролиферацию.

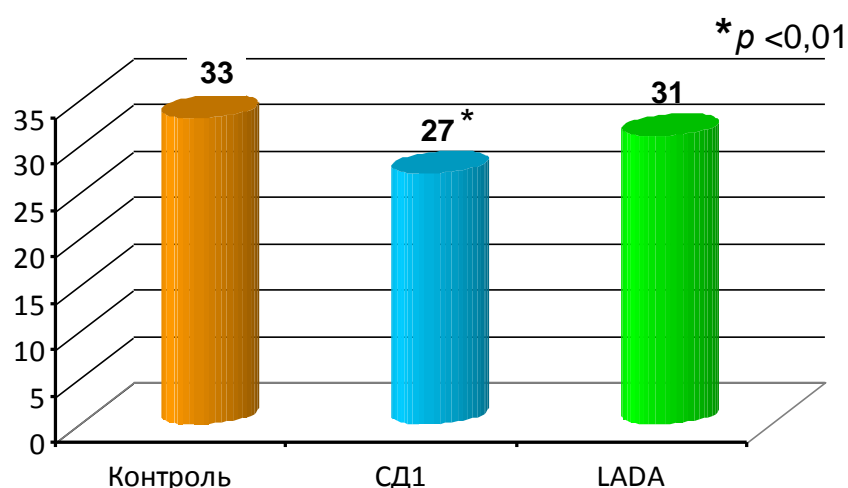
При оценке количества регуляторных Т-клеток в группе с ремиссией СД 1 было отмечено их повышенное число (2,4% [1,9; 2,8]), по сравнению с контрольными значениями у здоровых лиц (0,8% [0,6; 0,9]) ( $p < 0,01$ ) и при дебюте (0,9% [0,4; 2,1]) ( $p = 0,021$ ). В группе без ремиссии, с “обычной” потребностью в экзогенном инсулине количество регуляторных Т-клеток не отличалось от контрольных значений ( $p = 0,67$ ). Экспрессия гена *FOXP3* была снижена в том числе и в группе с ремиссией ( $p = 0,044$ ). Можно предположить, что у пациентов этой группы для компенсации функционального дефицита Treg возникает увеличение их численности, которое, однако, нельзя рассматривать как показатель роста активности этих клеток.

### **Исследование маркеров апоптоза**

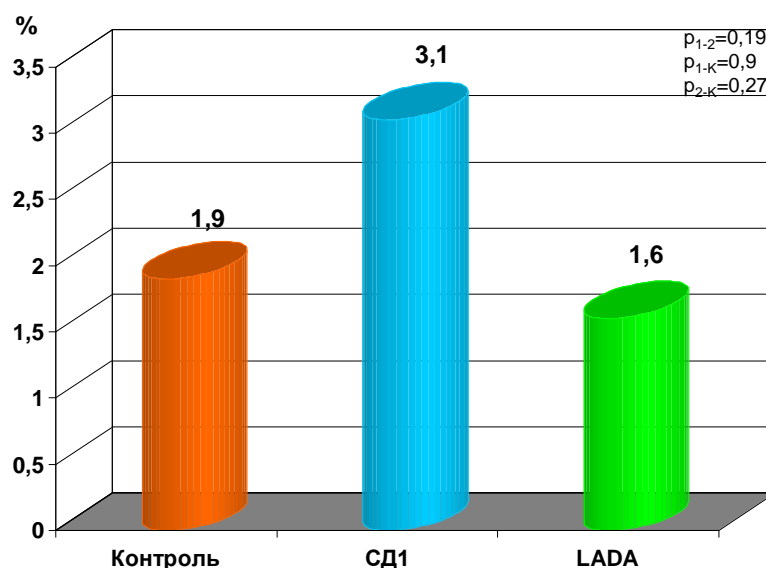
Апоптоз играет одну из ключевых ролей в патогенезе СД1. С одной стороны гибель  $\beta$ -клеток может идти по пути апоптоза, с другой — этот процесс участвует в элиминации аутореактивных клеток и контролирует иммунный ответ.

Исследование маркеров апоптоза проведено в той же выборке пациентов, что и исследование регуляторных Т-лимфоцитов и экспрессии гена *FOXP3*.

Были определены уровни экспрессии CD95 и CD95L на поверхности периферических лимфоцитов и концентрация их растворимых форм в сыворотке крови. В дебюте СД 1 отмечено достоверное снижение уровня синтеза CD95 лимфоцитами по сравнению с контрольной группой — 27% и 33%, соответственно ( $p < 0,01$ ). У пациентов с LADA этот показатель составил 31% и при попарном сравнении достоверно не отличался от 1-ой группы и контрольной группы ( $p > 0,05$ ) (рис. 5). Снижение экспрессии CD95 на поверхности клеток может свидетельствовать об устойчивости лимфоцитов к апоптозу и способствовать пролонгации иммунного ответа.



**Рис. 5. Процентное содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD95, в исследуемых группах с впервые выявленным диабетом.**



**Рис. 6. Процентное содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD95L, в исследуемых группах с впервые выявленным диабетом.**

Более высокий уровень экспрессии CD95L на лимфоцитах периферической крови был выявлен у пациентов с СД 1 — 3,1%, чем у пациентов с LADA — 1,6% и практически здоровых лиц — 1,9% (рис. 6). Однако различия между группами оказались статистически недостоверны ( $p_{1-2} = 0,19$ ,  $p_{1-к} = 0,9$ ,  $p_{2-к} = 0,27$ ).

Нами отмечено изменение уровня экспрессии маркерных молекул апоптоза (CD95, CD95L) на поверхности лимфоцитов периферической крови в разные сроки СД 1. Количество лимфоидных клеток, экспрессирующих антиген CD95 на поверхности, увеличилось при длительности заболевания до 6 мес. составило 27%, через 6 - 12 мес. — 32%, а через 1 - 5 лет — 33% ( $p = 0,04$ ). При парном сравнении показателей были также получены статистически достоверные различия: до 6 мес. vs 6 - 12 мес. ( $p < 0,05$ ); до 6 мес. vs 1 - 5 лет ( $p < 0,01$ ). При большей длительности заболевания достоверных изменений в уровне экспрессии маркерной молекулы апоптоза CD95 отмечено не было.

Количество лимфоцитов подтипа CD95L<sup>+</sup> в течение первого года наблюдения, наоборот, снизилось с 3,1% до 2,2%, однако, различия оказались статистически не достоверны ( $p = 0,81$ ). Дальнейшее изменение количества лимфоцитов подтипа CD95L<sup>+</sup> при большей длительности заболевания оказалось также статистически не достоверно ( $p = 0,7$ ).

В отличие от пациентов с СД 1 при сравнительном анализе уровня экспрессии маркерных молекул апоптоза на лимфоцитах в подгруппах пациентов с LADA мы не отметили статистически значимых различий ни одного из показателей. Уровень экспрессии CD95 и CD95L на лимфоцитах у этих пациентов был сопоставим с контролем. Корреляционных связей между маркерами апоптоза у пациентов с LADA выявлено не было.

В группе риска развития СД1 содержание относительного количества лимфоцитов подтипов CD95<sup>+</sup> и CD95L<sup>+</sup> статистически не отличалось от контрольных значений ( $p > 0,05$ ). При проведении корреляционного анализа мы обнаружили сильную отрицательную связь между относительным количеством лимфоцитов, экспрессирующих CD95L на поверхности, и базальной концентрацией С-пептида ( $r = -0,94$ ;  $p = 0,05$ ), что может быть связано с начальными явлениями апоптоза  $\beta$ -клеток.

В группе пациентов с ремиссией уровень экспрессии CD95 и CD95L на поверхности лимфоцитов был выше, чем в дебюте заболевания. Статистически достоверные различия отмечались только в изменении уровня экспрессии CD95 на

поверхности лимфоцитов ( $p=0,02$ ). Нормализация экспрессии CD95 может свидетельствовать о частичном восстановлении иммунорегуляторных механизмов.

### **Исследование показателей секреторной функции $\beta$ -клеток натошак, общей функциональной активности $\beta$ -клеток и периферической инсулинорезистентности**

В рамках данной работы были проанализированы показатели секреторной функции  $\beta$ -клеток натошак, общая функциональная активность  $\beta$ -клеток и периферическая инсулинорезистентность у больных LADA, СД1, группы риска в сравнении с контрольной группой практически здоровых лиц и СД2 по данным базального уровня ИРИ и С-пептида, а также по данным НОМА. У пациентов с впервые выявленным СД1 ( $n=28$ ), LADA ( $n=23$ ) и СД2 ( $n=31$ ) до назначения терапии была взята кровь для определения ИРИ и С-пептида. Был произведен расчет функции  $\beta$ -клеток и инсулинорезистентности периферических тканей с использованием НОМА-модели.

В группе больных LADA средние показатели концентрации инсулина и С-пептида были достоверно ниже, чем у больных СД2  $9,8 [3,2; 11,5]$  и  $17,9 [7,2; 22,0]$  мкЕд/мл;  $1,8 [1,6; 2,6]$  и  $3,1 [1,8; 4,0]$  нг/мл, ( $p<0,001$ ), но выше, чем у больных СД1 ( $0,7 [0,5; 1,2]$  нг/мл), ( $p<0,001$ ). При оценке функции  $\beta$ -клеток и инсулинорезистентности периферических тканей с использованием НОМА-модели также были получены достоверные различия между группами. Показатели функции  $\beta$ -клеток и инсулинорезистентности при LADA были достоверно ниже, чем при СД 2 (табл. 11).

Таким образом, для дебюта LADA характерно как сниженная функциональная активность  $\beta$ -клеток (НОМА-F – 39,2%, в контрольной группе – 96%) ( $p=0,008$ ), так и наличие инсулинорезистентности (НОМА-IR – 3,7, в контрольной группе – 1,6) ( $p=0,021$ ). При этом начало СД 2, по сравнению с LADA характеризуется как большим показателем функциональной активности  $\beta$ -клеток (НОМА-F – 63,9%) ( $p=0,018$ ), так и большим показателем периферической инсулинорезистентности (НОМА-IR – 7,2) ( $p=0,038$ ). Вероятно, высокие потребности в инсулине у инсулинрезистентных пациентов приводят их к диабету при меньшем повреждении  $\beta$ -клеток (у худых, с хорошей чувствительностью к инсулину требуются более серьезные повреждения  $\beta$ -клеток для развития клинической манифестации диабета).

**Таблица 11. Секреторная функция  $\beta$ -клеток натощак, общая функциональная активность  $\beta$ -клеток и периферическая инсулинорезистентность у больных LADA и СД 1 и 2 типа, группе риска**

Группы больных	Инсулин мкЕд/мл	С-пептид нг/мл	НОМА-F %	НОМА-IR
СД 1 (n=28)	2,7 [2,0; 4,5]	0,7 [0,5; 1,2]	8,9 [8,0; 21,2]	1,2 [1,0; 2,4]
LADA (n=23)	9,8 [3,2; 11,5]	1,8 [1,6; 2,6]	39,2 [18,5; 58,2]	3,7 [2,4; 6,4]
Группа риска (n=30)	7,2 [5,4; 8,6]	1,7 [1,2; 4,1]	112 [80; 118]	1,6 [1,0; 3,6]
СД 2 (n=31)	17,9 [7,2; 22,0]	3,1 [1,8; 4,0]	63,9 [52,7; 112,5]	7,2 [5,3; 13,1]
Контрольная группа (n=54)	7,3 [4,2; 9,2]	2,3 [1,5; 4,5]	96 [92; 112]	1,6 [1,0; 2,7]

### Оценка секреторной функции $\beta$ -клеток в ходе ММТТ в исследуемых группах

В рамках данного исследования был проведен анализ секреторной функции  $\beta$ -клеток в ходе ММТТ в исследуемых группах (табл. 12, 13).

**Таблица 12. Клиническая характеристика обследуемых при ММТТ**

	СД 1 (n=18)	LADA (n=14)	Группа риска (n=29)	СД 2 (n=16)
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	21,6 [20,7; 23,7]	28,6 [23,8; 31,2]	26,0 [22,8; 30,2]	30,1 [25,5; 35,2]
HbA <sub>1c</sub> , %	6,8 [6,4; 7,0]	6,0 [5,3; 6,6]	5,6 [5,4; 5,7]	7,0 [6,8; 7,2]
С-пептид базал., нг/мл	1,2 [0,8; 1,8]	2,6 [2,4; 2,9]	1,7 [1,2; 4,1]	3,7 [3,1; 5,7]
ИРИ базал, мкЕд/мл	6,4 [2,7; 11,0]	11,5 [7,8; 19,4]	7,2 [5,4; 8,6]	13,1 [10,1; 26,8]

Тест проводился в выборке больных на фоне компенсации углеводного обмена. Оценивался суммарный секреторный ответ в виде площади под кривой значений концентраций С-пептида. Суммарный секреторный ответ у пациентов СД1 и LADA достоверно между собой не отличался ( $p=0,082$ ). При этом было отмечено достоверное отличие этих показателей от суммарного секреторного ответа пациентов в группе с СД2 ( $p<0,001$ ).

**Таблица 13. Показатели секреции инсулина в ходе ММТТ**

	<b>СД 1</b>	<b>LADA</b>	<b>Группа риска</b>	<b>СД 2</b>	<b>Контроль</b>
<b>Гликемия натощак, ммоль/л</b>	5,8 [5,0;6,3]	6,5 [5,5;6,7]	4,6 [4,2;5,5]	6,2 [5,4;6,5]	5,0 [4,1;5,2]
<b>Время тах пика секреции С-пептида в ходе ММТТ, мин</b>	90-120	60-120	30-60	60-90	30-60
<b>Мах пик секреции С-пептида в ходе ММТТ, нг/мл</b>	3,9* [3,3;5,5]	4,9 [3,9;6,0]	6,6 [5,0;8,5]	10,2 [8,3;13,6]	6,5 [5,2;7,9]
<b>Площадь под кривой в ходе ММТТ, нг/мин х 3 час</b>	539,0* [518,0;672,0]	702,0** [590,5;753,0]	727,5 [699,0;925,5]	1354,0 [982,0;1749]	796,5 [764,5;916]

\* $p < 0,05$  по сравнению с СД 2 и контрольной группой, \*\* $p < 0,05$  по сравнению с СД 2.

Максимальные пики секреции у пациентов в группах с СД1 и LADA также достоверно между собой не отличались, при этом отмечено их достоверное отличие от максимального пика секреции С-пептида у пациентов в группе с СД2 ( $p < 0,05$ ). Секреция инсулина в ответ на смешанную пищу у пациентов с СД 1 в начале болезни на фоне компенсации (без ремиссии) в среднем составила 67,7% от ответа обследованных в контрольной группе, а у пациентов с LADA – 88,1%. В группе пациентов с ремиссией ( $n=11$ ) суммарный секреторный ответ составил 94,7%, максимальный пик секреции в 3,6 раз превышал базальную концентрацию С-пептида и в 1,6 раз превышал максимальный пик секреции в группе пациентов с СД1 без ремиссии. Полученные данные могут свидетельствовать как о значении глюкозотоксичности в подавлении секреторной активности  $\beta$ -клеток в дебюте заболевания, так и об эндогенно-регенеративном потенциале  $\beta$ -клеток.

В результате выполненной работы были сформулированы дифференциально-диагностические критерии аутоиммунного сахарного диабета и СД 2 (табл. 14).

Таким образом, несмотря на сходство клинической картины LADA в дебюте заболевания с СД2, отмечено достоверное снижение общей функциональной активности  $\beta$ -клеток у пациентов с LADA (до 39%) по сравнению с пациентами с СД2 (до 64%)

( $p < 0,05$ ), а также достоверно больший индекс инсулинорезистентности у пациентов с СД2 по сравнению с пациентами с LADA (7,2 и 3,7 баллов соответственно) ( $p < 0,05$ ). Отмечено генетическое сходство СД1 и LADA в контексте ассоциаций с локусами *IDDM1* и *IDDM2*. Подтверждена ассоциация генов HLA класса II с развитием как LADA, так и СД1. При этом, наличие в генотипе больных LADA только одного высоко предрасполагающего гаплотипа в комбинации с протективным или нейтральным гаплотипом, вероятно, обуславливает более позднее начало и менее агрессивное течение заболевания. В дебюте СД1 (при «классическом» варианте) отмечено снижение экспрессии ключевого маркера апоптоза (CD95) лимфоцитов сравнительно с контрольной группой ( $p < 0,01$ ) и с группой больных LADA ( $p > 0,05$ ), что является косвенным признаком подавления запрограммированной гибели аутореактивных лимфоидных клеток, и, в свою очередь, объясняет большую выраженность аутоиммунного ответа при СД1, по сравнению с LADA. В начале заболевания у пациентов с LADA показатели экспрессии гена *FOXP3* не отличались от контрольных значений, что говорит об отсроченном функциональном дефиците регуляторных Т-лимфоцитов, в отличие от пациентов с СД1, у которых отмечается низкая интенсивность экспрессии гена *FOXP3* при любой продолжительности заболевания, что говорит о потере иммунологической толерантности и дефекте подавления аутоиммунного ответа при любом сроке заболевания. Суммарный секреторный ответ у пациентов с СД1 и LADA достоверно между собой не отличался. При этом было отмечено достоверное отличие этих показателей от суммарного секреторного ответа пациентов в группе с СД2.

В настоящее время не существует специальных алгоритмов по лечению LADA. Большинство исследователей склоняется к целесообразности раннего назначения инсулинотерапии этим пациентам. Полученные нами данные о сниженной функциональной активности  $\beta$ -клеток в дебюте LADA свидетельствуют в пользу данной точки зрения.

**Таблица 14. Клинико-лабораторные критерии дифференциальной диагностики аутоиммунного сахарного диабета (СД 1 и LADA) и СД 2**

<b>Признак</b>	<b>СД 1</b>	<b>LADA</b>	<b>СД 2</b>
<b>Манифестация заболевания</b>	острая	постепенная	постепенная
<b>Возраст в дебюте</b>	чаще до 30 лет	чаще 30-40 лет	чаще после 40 лет
<b>ИМТ, кг/м<sup>2</sup></b>	менее 23	24-30	более 25
<b>Кетоз, кетоацидоз в дебюте</b>	часто	редко	крайне редко
<b>Наличие инсулинорезистентности (НОМА-IR) (норма усл. 1 балл)</b>	отсутствует (1,2 балла)	выражена (3,7 балла)	значительно выражена (7,2 балла)
<b>Общая функциональная активность β-клеток в дебюте (НОМА-F) (норма усл. 100%)</b>	Низкая (9%)	снижена значительно (39%)	снижена незначительно (64%)
<b>Гаплотипы генов HLA класса II</b>	преобладание двух высоко предрасполагающих гаплотипов	сочетание одного высоко предрасполагающего гаплотипа с одним протективным или нейтральным	низкая частота двух предрасполагающих гаплотипов
<b>Ассоциация полиморфного маркера -23HphI гена INS</b>	ассоциирован	ассоциирован	-
<b>Ассоциация полиморфного маркера R620W гена PTPN 22</b>	ассоциирован	не ассоциирован	-
<b>Аутоантитела</b>	чаще GADA, IA-2A	чаще GADA, ICA	нет
<b>С-пептид базальный в дебюте</b>	низкий	в пределах нормы	в пределах нормы или повышенный
<b>Количество регуляторных Т- лимфоцитов в дебюте</b>	в пределах нормы	повышено	в пределах нормы
<b>Экспрессия гена FOXP3 в дебюте</b>	низкая	в пределах нормы	в пределах нормы
<b>Экспрессия маркера апоптоза CD95 на лимфоцитах в дебюте</b>	снижена	в пределах нормы или незначительно снижена	в пределах нормы
<b>Экспрессия маркера апоптоза CD95L на лимфоцитах в дебюте</b>	повышена	в пределах нормы	в пределах нормы
<b>Время максимального пика секреции С-пептида в ходе ММТТ, мин</b>	90-120	60-120	60-90
<b>Максимальный пик секреции С-пептида в ходе ММТТ, нг/мл</b>	снижен (3,9)	незначительно снижен (4,9)	повышен (10,2)



## Выводы

1. Гетерогенность клинической картины аутоиммунного СД 1 обусловлена значительными различиями гормонально-метаболических и иммуно-генетических характеристик пациентов.

2. Особенностью LADA является сочетание аутоиммунного процесса с инсулинорезистентностью, что приводит к манифестации сахарного диабета при меньшем уровне разрушения  $\beta$ -клеток. LADA развивается как на фоне сниженной функциональной активности  $\beta$ -клеток, так и на фоне инсулинорезистентности.

3. У пациентов с LADA в генотипе значимо чаще встречается только один из высоко предрасполагающих гаплотипов HLA (*DR3-DQ2;DR4-DQ8*) в комбинации с протективным или нейтральным гаплотипом, что может определять более позднюю манифестацию заболевания и менее агрессивное течение.

4. Обнаружена ассоциация полиморфного маркера *-23HphI (rs689)* гена *INS* с развитием как СД1, так и LADA. Установлено, что носители аллеля *A* данного полиморфного маркера имеют повышенный риск развития как СД1, так и LADA, тогда как носители аллеля *T* имеют пониженный риск развития как СД1, так и LADA.

5. Ассоциация полиморфного маркера *R620W* гена *PTPN22* с развитием LADA в нашей выборке не выявлена, в то время как при СД 1 обнаружена данная ассоциация. Установлено, что носители аллеля *T* данного полиморфного маркера имеют повышенный риск развития СД1, тогда как носители аллеля *C* имеют пониженный риск развития СД 1.

6. Развитие СД 1 связано с нарушением иммунорегуляторных механизмов, включая изменения количества регуляторных Т-лимфоцитов и их активности. При СД1 экспрессия гена *FOX P3* остаётся сниженной на всём протяжении заболевания (несмотря на отсутствие существенной разницы в содержании Treg в крови), что обуславливает низкую супрессорную активность Treg в отношении аутореактивных цитотоксических Т-лимфоцитов. При LADA функциональный дефицит Treg возникает отсрочено, что, очевидно, обуславливает медленное прогрессирование аутоиммунной деструкции  $\beta$ -клеток, несмотря на наличие аутоантител.

7. Сниженная экспрессия ключевого маркера апоптоза лимфоцитов (CD95), наблюдаемая при СД 1, является косвенным признаком подавления программированной

гибели аутореактивных лимфоидных клеток. При LADA данные изменения наблюдаются в меньшей степени, чем при классическом варианте клинической картины СД1. Повышение количества лимфоцитов подтипа CD95<sup>+</sup> на фоне компенсации углеводного обмена в течение первого года заболевания свидетельствует о частичном восстановлении иммунорегуляторных механизмов.

8. У лиц из группы риска развития аутоиммунного СД1 увеличивается популяция Treg подтипа CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, что может отражать подавление аутоиммунной реакции в отношении β-клеток.

9. Фаза клинической ремиссии характеризуется нормализацией базальной концентрации С-пептида в крови, снижением титров аутоантител, ассоциированных с развитием СД1, повышением уровня экспрессии CD95 и снижением уровня экспрессии CD95L на поверхности лимфоцитов. В период ремиссии сохраняется низкая функциональная активность Treg (низкий уровень экспрессии гена *FOXP3*), однако повышается численность этой популяции лимфоцитов. Суммарный секреторный ответ на смешанную пищу в ходе теста ММТТ составляет 94,7% от такового у обследованных из контрольной группы здоровых лиц.

10. У пациентов с впервые выявленным СД1 в состоянии метаболической компенсации секреторный ответ на смешанную пищу в ходе теста ММТТ составляет, в среднем, 67,7% от такового у обследованных из контрольной группы, а у пациентов с LADA – 88,1%. Данные показатели отражают роль глюкозотоксичности в подавлении секреторной активности β-клеток в дебюте заболевания, а также могут свидетельствовать об их высоком эндогенно-регенеративном потенциале.

### **Практические рекомендации**

1. Сниженная функциональная активность β-клеток в дебюте LADA и сниженный суммарный секреторный ответ у пациентов с LADA, даже на фоне компенсации заболевания, позволяет рекомендовать раннее назначение инсулинотерапии этим пациентам.

2. Исследование секреторной функции β-клеток с использованием ММТТ теста у взрослых пациентов с впервые выявленным СД в состоянии метаболической компенсации может быть рекомендовано для уточнения типа СД и дальнейшей лечебной тактики.

3. Одной из характеристик LADA при генотипировании HLA класса II в комплексе с другими диагностическими маркерами является наличие в генотипе только одного предрасполагающего гаплотипа в сочетании с протективным или нейтральным.

4. При проведении дифференциальной диагностики СД, помимо определения HLA генотипа, рекомендовано дополнительно определять генотипы полиморфных маркеров –23HphI (rs689) гена *INS* и R620W гена *PTPN22*.

5. Лица, имеющие положительные титры аутоантител, ассоциированных с развитием СД 1, с базальным уровнем С-пептида на нижней границе референсного интервала должны быть включены в группу динамического наблюдения (HbA<sub>1c</sub> каждые 3 мес).

6. Для верификации аутоиммунного процесса пациентам с впервые выявленным СД и лицам группы риска развития СД1 рекомендуется, помимо определения аутоантител, ассоциированных с развитием СД1, исследовать количество регуляторных Т-лимфоцитов подтипа CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> и их функциональную активность (экспрессию гена *FOXP3*).

7. Проведение расширенной клинико-лабораторной диагностики позволяет с высокой достоверностью дифференцировать различные подтипы и варианты течения аутоиммунного СД, что крайне важно для выбора адекватной лечебной тактики.

### **Список научных работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Никонова Т.В. Гормонально-иммунологические критерии тяжести течения инсулинзависимого сахарного диабета / **Т.В. Никонова**, В.В. Потёмкин // III Всесоюзный съезд эндокринологов. Тезисы докладов. – Ташкент «Медицина», 1989. – С. 289-290.
2. Алиханов Х.А. Количественные и функциональные показатели иммунной системы у больных с диабетическими ангиопатиями и обоснование иммунокорректирующей терапии в комплексном лечении / Х.А. Алиханов, А.П. Чадаев, **Т.В. Никонова** // Хирургические заболевания и сахарный диабет. Сборник научных трудов. – М., 1989. – С. 57-59.
3. Злобина Е.Н. Иммунологические аспекты сахарного диабета 1 типа с длительным и осложненным течением / Е.Н. Злобина, В.В. Потёмкин, **Т.В. Никонова**, С.В. Брыкова // Сахарный диабет. Сборник научных трудов. – Саратов, 1990. –

С. 20-22.

4. Потёмкин В.В. Клинико-диагностическое значение определения аутоантител к поверхности островковых клеток поджелудочной железы у больных сахарным диабетом // В.В. Потёмкин, **Т.В. Никонова**, Е.Н. Злобина, С.В. Брыкова, Г.Н. Гудукина, Н.И. Коптева // Вопросы эндокринологии. – М., 1990. – С. 169-170.
5. Алиханов Х.А. Диагностическая значимость гормонально-иммунологических показателей при 2 типе сахарного диабета / Х.А. Алиханов, **Т.В. Никонова** // Материалы III Всероссийского съезда эндокринологов. – Челябинск, 1991. – С. 52-53.
6. Брыкова С.В. Динамика нарушений показателей клеточного и гуморального иммунитета у больных инсулинзависимым сахарным диабетом / С.В. Брыкова, В.Н. Андреев, Е.Н. Злобина, О.М. Смирнова, **Т.В. Никонова**, В.И. Есенин // Первая научно-практическая конференция «Многопрофильная больница сегодня и завтра». Сборник трудов. – М., 1991. – С. 38-41.
7. Никонова Т.В. Изменения соотношения регуляторных субпопуляций у больных сахарным диабетом 1 типа / **Т.В. Никонова** // Сборник научных трудов МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского «Вопросы эндокринологии». – Москва, 1992. – С. 29.
8. Хаитов Р.М. Динамика нарушений показателей клеточного и гуморального иммунитета у больных инсулинзависимым сахарным диабетом / Р.М. Хаитов, И.И. Дедов, С.В. Брыкова, О.М. Смирнова, **Т.В. Никонова** // Проблемы эндокринологии. – 1992. – №2. – С. 8-12.
9. Потемкин В.В. Динамика ряда показателей клеточного и гуморального иммунитета у больных сахарным диабетом 1 типа / В.В. Потёмкин, С.В. Брыкова, **Т.В. Никонова** // Проблемы эндокринологии. – 1994. – №6. – С. 5-7.
10. Зилов А.В. HLA генотипы в русской популяции при инсулинзависимом сахарном диабете / А.В. Зилов, Л.П. Алексеев, М.Н. Болдырева, И.Ю. Демидова, **Т.В. Никонова**, Д.Ю. Трофимов, И.И. Дедов // Тезисы докладов I Российского диабетологического конгресса. – 1998. – С. 131.
11. Зилов А.В. Внедрение современных методов доклинической диагностики инсулинзависимого сахарного диабета в клиническую практику / А.В. Зилов, Л.П. Алексеев, М.Н. Болдырева, **Т.В. Никонова**, О.М. Смирнова, И.И. Дедов // Тезисы докладов I Российского диабетологического конгресса. – 1998. – С. 132.

12. Никонова Т.В. Доклиническая диагностика инсулинзависимого сахарного диабета в группах высокого риска / **Т.В. Никонова**, М.Н. Болдырева, Т.Р. Бахтадзе, Л.П. Алексеев, О.М. Смирнова, И.И. Дедов Тезисы докладов I Российского диабетологического конгресса. – 1998. – С. 233.
13. Соловьёва О.Е. Характеристика сахарного диабета с поздним аутоиммунным началом (LADA) у больных в возрасте от 30 до 55 лет / О.Е. Соловьёва, В.А. Горельшева, **Т.В. Никонова**, О.М. Смирнова // Тезисы докладов I Российского диабетологического конгресса. – 1998. – С. 296.
14. Алиханов Х.А. Состояние иммунной системы у больных с диабетическими ангиопатиями и обоснование иммунокоррекции в комплексном лечении / Х.А. Алиханов, В.В. Потемкин, **Т.В. Никонова** // Хирургия. – 1998. – №10. – С. 152-153.
15. Никонова Т.В. Прогнозирование СД 1 типа в группах высокого риска / **Т.В. Никонова**, И.И. Дедов, Л.П. Алексеев, М.Н. Болдырева, О.М. Смирнова И.В. Дубинкин // Сахарный диабет. – 2000. – №2. – С. 2-6.
16. Случай семейной формы сахарного диабета 2 типа у молодых. (Статья) Журнал «Сахарный диабет» - 2000 №3 с 37-42 Гарибашвили А. Ю. Смирнова О. М. . Никонова Т.В.
17. Nikonova T.V. Se and oxidative stress in new-onset type 1 diabetes patients and in offsprings of type 1 diabetes parents / **T.V. Nikonova**, O.M. Smirnova, I.I. Dedov // Diabetes Metab. – 2003. – Vol. 29. – P. 4S47.
18. Табеева К.И. Аутоиммунный полигландулярный синдром III типа (ДТЗ, сахарный диабет 1 типа, аутоиммунный гломерулонефрит) / К.И. Табеева, **Т.В. Никонова**, О.М. Смирнова // Сахарный диабет. – 2004. – №4. – С. 30-32.
19. Смирнова О.М. Современные принципы лечения сахарного диабета 1 типа. (Пособие для врачей) / О.М. Смирнова, **Т.В. Никонова** // М.: ГУП «Медицина для Вас», 2004. – 64 с.
20. Дедов И.И. Роль цитокинов в регуляции иммунного ответа и механизмы гибели  $\beta$ -клеток при различных вариантах течения сахарного диабета типа 1 / И.И. Дедов, **Т.В. Никонова**, О.М. Смирнова, С.А. Прокофьев // Проблемы эндокринологии. – 2005. – №3. – С. 3-7.

21. Дедов И.И. Идиопатический сахарный диабет / И.И. Дедов, **Т.В. Никонова**, О.М. Смирнова // Проблемы эндокринологии. – 2005. – №4. – С. 41-43.
22. Nikonova T.V. Association of the metabolic syndrome and profile of inflammatory cytokines in LADA diabetes / **T.V. Nikonova**, O.M. Smirnova, I.I. Dedov // 2<sup>nd</sup> Intern. Symposium on Triglycerides and HDL: role in Cardiovascular disease and the Metabolic syndrome. Abstract book. – 2005. – P. 38.
23. Nikonova T. Metabolic syndrome and inflammatory cytokines in LADA diabetes / **T. Nikonova**, O. Smirnova, I. Dedov // ECE 2005. Abstract book. – 2005. – P. 309.
24. Смирнова О.М. Впервые выявленный сахарный диабет 1 типа: механизмы развития, клиника, лечение. (Пособие для врачей) / О.М. Смирнова, **Т.В. Никонова** // М.: ГУП «Медицина для Вас», 2005. – 48 с.
25. Прокофьев С.А. Апоптоз в развитии ремиссии сахарного диабета 1 типа / С.А. Прокофьев, **Т.В. Никонова**, В.А. Горельшева, О.М. Смирнова, С.М. Степанова, Л.П. Алексеев // Сахарный диабет. – 2006. – №4. – С. 47-50.
26. Nikonova T. Apoptosis in the remission of type 1 diabetes / **T.Nikonova**, V. Gorelysheva, O. Smirnova, S. Prokofiev, I. Dedov // Diabetic Medicine. – 2006. – Vol. 23 (Suppl. 4). – P. 658.
27. Никонова Т.В. Современные аспекты патогенеза сахарного диабета 1 типа / **Т.В. Никонова** // Сахарный диабет. – 2006. – №3. – С. 59-64.
28. Никонова Т.В. Экспрессия гена *FoxP3* при различной длительности течения сахарного диабета 1 типа / **Т.В Никонова**, А.В. Карпухин, П.В. Апанович, С.А. Прокофьев, И.И. Дедов // IV Всероссийский диабетологический конгресс. Тезисы докладов. – М., 2008. – С. 12.
29. Никонова Т.В. Апоптоз при сахарном диабете 2 типа / **Т.В. Никонова**, С.А. Прокофьев, В.А. Горельшева, Е.В. Пекарева, О.М. Смирнова // IV Всероссийский диабетологический конгресс. Тезисы докладов. – М., 2008. – С. 13.
30. Apanovich P.V. The expression of FoxP3, IFN $\gamma$  and IL4 on different stages of type 1 diabetes mellitus / P.V. Apanovich, **T.V. Nikonova**, N.V. Apanovich, M.V. Shestakova, A.V. Karpukhin // European Journal of Human Genetics. – 2008. – Vol. 16 (Suppl 2).
31. Никонова Т.В. Возможности клеточных технологий в лечении сахарного диабета / **Т.В. Никонова**, Е.В. Пекарева, Ю.И. Филиппов // Сахарный диабет. – 2008. –

№ 4. – С. 93-95.

32. Смирнова О.М. Лечение сахарного диабета 1 типа. (Пособие для врачей) / О.М. Смирнова, **Т.В. Никонова** // М.: ГУП «Медицина для Вас», 2008. – 76 с.
33. Dedov I. The components of metabolic syndrome in ketosis prone type 2 diabetes mellitus / I. Dedov, **Т. Nikonova**, E. Pekareva, V. Gorelysheva // Journal of Diabetes. – 2009. – Vol. 1 (Suppl 1). – A 204.
34. Никонова Т. Строгий метаболический контроль – ключевой фактор развития ремиссии при сахарном диабете типа 1 / **Т. Никонова**, Е. Пекарева // Врач. – 2009. – № 11. – С. 30-32.
35. Пекарева Е.В. Маркёры апоптоза у больных сахарным диабетом 1 типа в дебюте заболевания / Е.В. Пекарева, **Т.В. Никонова**, В.А. Горельшева, С.А. Прокофьев, Я.С. Зверева, С.М. Степанова, О.М. Смирнова // Сахарный диабет. – 2009. – № 4. – С. 86-89.
36. Pekareva E.V. CD 95 and CD 95L expression in patients with onset autoimmune diabetes mellitus / E.V. Pekareva, **Т.В. Nikonova**, V.A. Gorelysheva, S.A. Prokofyev, O.M. Smirnova // 9<sup>th</sup> Regional medical conference on the treatment of type 2 diabetes mellitus. Conference materials. – Berlin, 2009. – P. 33.
37. Молитвослова Н. Сахарный диабет 2 типа, склонный к кетозу / Н. Молитвослова, **Т. Никонова** // Сахарный диабет. – 2009. – №3. – С. 70-76.
38. Никонова Т. Сложноклассифицируемые случаи сахарного диабета / **Т. Никонова**, Н. Молитвослова // Врач. – 2009. – №8. – С. 46-48.
39. Репина Е.А. Роль иммунологической памяти в патогенезе сахарного диабета 1 типа / Е.А. Репина, **Т.В. Никонова**, С.М. Степанова, С.А. Прокофьев // Международный журнал по иммунореабилитации. – 2009. - №1 (том 11). – С. 107.
40. Никонова Т.В. Нетипичные случаи сахарного диабета / **Т.В. Никонова**, Н.А. Молитвослова // Диабетография. – 2010. – №10 (30). – С. 9-13.
41. Пекарева Е.В. Роль апоптоза в патогенезе сахарного диабета 1 типа / Е.В. Пекарева, **Т.В. Никонова**, О.М. Смирнова // Сахарный диабет. – 2010. – № 1. – С. 45-49.
42. Харлашина Е.А. Дебют сахарного диабета 1 типа на фоне инфекционного мононуклеоза / Е.А. Харлашина, О.С. Шаповальянц, Е.В. Пекарева,

- Т.В. Никонова** // Сахарный диабет. – 2010. - № 1. – С. 126-128.
43. Никонова Т. Роль вирусной инфекции в патогенезе сахарного диабета / **Т. Никонова**, О. Шаповальянц, Е. Пекарева // Врач. – 2010. – № 2. – С. 35-37.
44. Nikonova T. Role of regulatory T-cells in the development of the partial remission period in patients with type 1 diabetes / **T. Nikonova**, V. Gorelysheva, S. Prokofiev, E. Pekareva, I. Dedov // 12<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology. Endocrine Abstract. – 2010. – Vol. 22. – P. 341.
45. Пекарева Е.В. Динамика показателей иммунного статуса у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 1 типа / Е.В. Пекарева, **Т.В. Никонова**, В.А. Горелышева, С.А. Прокофьев, С.М. Степанова, О.М. Смирнова // V Всероссийский диабетологический конгресс. Сборник тезисов. – М., 2010. – С. 83.
46. Никонова Т.В. Роль регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и их функциональной активности (уровень экспрессии гена FoxP3) в развитии и прогрессировании сахарного диабета 1 типа / **Т.В. Никонова**, П.В. Апанович, В.А. Горелышева, Н.В. Апанович, С.А. Прокофьев, А.В. Карпухин, И.И. Дедов // V Всероссийский диабетологический конгресс. Сборник тезисов. – М., 2010. – С. 79-80.
47. Репина Е.А. Роль иммунологической памяти в патогенезе аутоиммунного сахарного диабета / Е.А. Репина, **Т.В. Никонова**, С.М. Степанова, М.В. Шестакова, И.И. Дедов // V Всероссийский диабетологический конгресс. Сборник тезисов. – М., 2010. – С.86.
48. Пекарева Е. Медленнопрогрессирующий аутоиммунный сахарный диабет взрослых / Е. Пекарева, **Т. Никонова** // Врач. – 2010. – № 5. – С. 5-7.
49. Nikonova T.V. The role of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes and FoxP3 expression in evolution and progression of type 1 diabetes / **T.V. Nikonova**, E.V. Pekareva, V.A. Gorelysheva, P.V. Apanovich, S.A. Prokofyev, I.I. Dedov // Diabetologia. – 2010. – Vol. 53 (Suppl 1). – P. S181-S182.
50. Pekareva E.V. Dynamic changes of CD 95 and CD 95L expression on lymphocytes in patients with new-onset type 1 diabetes mellitus / E.V. Pekareva, **T.V. Nikonova**, V.A. Gorelysheva, S.M. Stepanova, S.A. Prokofyev, O.M. Smirnova, I.I. Dedov // Diabetologia. – 2010. – Vol. 53 (Suppl 1). – P. S183.



51. Никонова Т.В. Роль регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Т-лимфоцитов и их функциональной активности в развитии и прогрессировании сахарного диабета 1 типа / **Т.В. Никонова**, П.В. Апанович, Е.В. Пекарева, В.А. Горелышева, С.А. Прокофьев, А.В. Карпухин, И.И. Дедов // Сахарный диабет. – 2010. – № 3. – С. 25-29.
52. Никонова Т. Перспективы клеточных технологий в лечении сахарного диабета / **Т. Никонова**, Е. Пекарева, Ю. Филиппов // Врач. – 2010. – № 12. – С. 10-13.
53. Никонова Т.В. Иммуногенетические особенности (LADA) / **Т.В. Никонова**, П.В. Апанович, Е.В. Пекарева, В.А. Горелышева, С.А. Прокофьев, С.М. Степанова, Ю. Тишина, А.В. Карпухин // Сахарный диабет. – 2011. – № 1. – С. 28-35.
54. Nikonova T.V. Metabolic syndrome in adult patients with type 1 diabetes mellitus / **T.V. Nikonova**, E.V. Pekareva, O.M. Smirnova, I.I. Dedov // Journal of Diabetes. – 2011. – Vol. 3 (Suppl. 1). – P. 151-152.
55. Nikonova T.V. Immune and metabolic parameters in high-risk type 1 diabetes subjects / **T.V. Nikonova**, E.V. Pekareva, V.A. Gorelysheva, P.V. Apanovich, O.S. Shapovalyants, S.A. Prokofyev, I.I. Dedov // Journal of Diabetes. – 2011. – Vol. 3 (Suppl. 1). – P. 274.
56. Шаповальянц О.С. Диагностическая и прогностическая значимость аутоантител при сахарном диабете. Новый маркер аутоиммунного процесса – антитела к ZnT8 / О.С. Шаповальянц, **Т.В. Никонова** // Сахарный диабет. – 2011. – №2. – С. 18-22.

## Список сокращений, использованных в работе

GADA – аутоантитела к ферменту глютаматдекарбоксилаза (*autoantibodies to glutamic acid decarboxylase*)

GST – тест стимуляции с глюкагоном (*glucagon stimulation test*)

НОМА – модель оценки гомеостаза (*homeostasis model assessment*)

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

IAA – аутоантитела к инсулину (*insulin auto-antibodies*)

ICA – аутоантитела к островковым клеткам (*islet cell antibodies*)

LADA – латентный аутоиммунный диабет взрослых (*latent autoimmune diabetes in adult*)

ОГТТ – оральный глюкозотолерантный тест (*oral glucose tolerance test*)

PTPN22 – нерецепторная протеин-тирозин фосфатаза 22 типа (*protein tyrosine phosphatase nonreceptor 22*)

VNTR – различное число tandemных повторов (*variable numbers of tandem repeat*)

ИМТ – индекс массы тела

ММТТ – тест со смешанной пищей (*mixed meal tolerance test*)

ПССП – пероральные сахароснижающие препараты

СД – сахарный диабет

Treg – регуляторные Т-лимфоциты