

# Роль регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Т-лимфоцитов и их функциональной активности в развитии и прогрессировании сахарного диабета 1 типа

<sup>1</sup>Никонова Т.В., <sup>2</sup>Апанович П.В., <sup>1</sup>Пекарева Е.В., <sup>1</sup>Горельшева В.А., <sup>1</sup>Прокофьев С.А., <sup>2</sup>Карпучин А.В., <sup>1</sup>Дедов И.И.

<sup>1</sup>ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва  
(директор – академик РАН и РАМН И.И. Дедов)  
<sup>2</sup>Медико-генетический научный центр, Москва  
(директор – академик РАМН Е.К. Гинтер)

Сахарный диабет 1 типа (СД1) – заболевание, связанное с нарушением (дефектом) иммунологической толерантности к собственным антигенам и селективным разрушением β-клеток панкреатических островков CD8<sup>+</sup> (цитотоксическими) и CD4<sup>+</sup> (эффektorными) лимфоцитами. Механизмы поддержания ауто толерантности включают CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Т-регуляторные клетки (T<sup>reg</sup>), супрессивная активность которых определяется экспрессией в них гена FoxP3.

**Цель.** Определение количественных и функциональных изменений, происходящих на уровне регуляторного звена иммунитета у лиц в группе риска развития СД1 и у пациентов с различной длительностью СД1.

**Материал и методы.** В исследование было включено 116 больных (67 мужчин, 49 женщин) СД1 с различной длительностью заболевания, 33 человека (10 мужчин, 23 женщины) составили группу риска и 16 человек – контрольную группу. У всех обследуемых было проведено HLA-генотипирование, определение аутоантител к глутаматдекарбоксилазе (ГДК), инсулину, тирозинфосфатазе, антигенам островковых клеток, определение субпопуляционного состава лимфоцитов CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, HLA DR<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup> и их функциональной активности (интенсивности экспрессии гена FoxP3), С-пептида, HbA<sub>1c</sub>.

**Результаты.** Отмечена тенденция к повышению относительного количества CD25<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и тенденция к снижению экспрессии гена FoxP3 в группе риска по сравнению с контролем ( $p < 0,1$ ). В этих группах определялась достоверная разница в процентном содержании активационных молекул CD38 и HLA-DR<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ). В группе больных с впервые выявленным СД количество Т-регуляторных лимфоцитов не отличалось от такового в группе контроля ( $p > 0,05$ ). Однако их функциональная активность (уровень экспрессии гена FoxP3) была достоверно ниже, чем в контроле ( $p < 0,001$ ). Низкая интенсивность экспрессии гена FoxP3 в сравнении с контролем в дальнейшем отмечалась при любой продолжительности заболевания.

**Заключение.** Впервые определена интенсивность экспрессии гена FoxP3 и количество CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Т-регуляторных клеток при различной длительности СД. Выявлено достоверное снижение функциональной активности Т-регуляторных клеток при любой длительности заболевания, несмотря на отсутствие существенной разницы в их количестве у больных СД1 по сравнению с контрольными значениями. У пациентов группы риска отмечено достоверное увеличение пула активированных лимфоидных клеток, повышение содержания T<sup>reg</sup> и снижение экспрессии гена FoxP3.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 1 типа, группа риска, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Т-регуляторные клетки, ген FoxP3

## The role of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-lymphocytes and their functional activity in the development of type 1 diabetes mellitus

<sup>1</sup>Nikonova T.V., <sup>2</sup>Apanovich P.V., <sup>1</sup>Pekareva E.V., <sup>1</sup>Gorelysheva V.A., <sup>1</sup>Prokofiev S.A., <sup>2</sup>Karpukhin A.V., <sup>1</sup>Dedov I.I.

<sup>1</sup>Endocrinological Research Centre, Moscow

<sup>2</sup>Medico-Genetic Research Centre, Moscow

Type 1 diabetes mellitus (DM1) is associated with compromised (defective) immunologic tolerance to autoantigens and selective destruction of pancreatic B-cells by CD4<sup>+</sup> (effector) and CD8 (cytotoxic) lymphocytes. The mechanisms of autotolerance involve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-regulatory cells (T<sup>reg</sup>) whose suppressor activity depends on the expression of the FoxP3 gene.

**Aim.** Detection of quantitative and functional alterations at the level of regulation of immunity in subjects at risk of DM1 and patients with different duration of DM1.

**Materials and methods.** 116 patients (67 men and 49 women) with different duration of DM1. The risk group was comprised of 33 subjects (10 men and 23 women), control group included 16 subjects. In all cases, HLA genotyping was performed, autoantibodies to GDC, insulin and tyrosine phosphatase, islet cell antigens were determined, subpopulation composition of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, HLA DR<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup> lymphocytes and their functional activities (FoxP3 gene expression) studied, C-peptide and HbA<sub>1c</sub> levels measured.

**Results.** A tendency toward a rise in CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup> T-lymphocytes and a decrease in FoxP3 expression was documented in the risk group compared with control ( $p < 0,1$ ). These groups were also significantly different in terms of percentage of CD3 and HLA DR<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ). Patients with newly diagnosed DM1 had the same number of regulatory T-lymphocytes as controls ( $p > 0,05$ ) but their functional activity was lower ( $p < 0,001$ ). FoxP3 expression was impaired throughout the follow-up period.

**Conclusion.** FoxP3 expression and the number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-lymphocytes were determined for the first time in patients with different duration of DM1. Functional activity of regulatory T-cells was shown to decrease at any duration of the disease despite the absence of significant difference in their counts in the patients and controls. Subjects at risk of DM1 exhibited a significant rise in the number of activated lymphoid cells and T<sup>reg</sup> along with a reduction of FoxP3 expression.

**Key words:** type 1 diabetes mellitus, subjects at risk if DM1, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T-lymphocytes, FoxP3 gene

Сахарный диабет 1 типа (СД1) – заболевание, связанное с дефектом иммунологической толерантности к собственным антигенам и селективным разрушением β-клеток панкреатических островков CD8<sup>+</sup>

(цитотоксическими) и CD4<sup>+</sup> (эффektorными) лимфоцитами.

В настоящее время основной группой лимфоидных клеток, отвечающих за поддержание ауто толерантности, считают пул

CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, экспрессирующих CD25 маркерную молекулу —  $\alpha$ -цепь рецептора IL-2 (IL-2R) [1]. Субпопуляцию CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> называют Т-регуляторными клетками (T<sup>reg</sup>). У человека функцию T<sup>reg</sup> выполняют не все CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> лимфоциты, а только их фракция с высоким уровнем экспрессии CD25 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>). Их основная роль — контроль иммунного ответа через регуляцию функции Т-эффекторных клеток (Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток) [2].

Функциональные свойства T<sup>reg</sup> опосредованы активностью *FoxP3* (forkhead box) [3] — фактора транскрипции, непосредственно и косвенно регулирующего экспрессию более 300 генов. *FoxP3* влияет на экспрессию, в том числе генов, регулирующих клеточный цикл и межклеточные взаимодействия.

Участие T<sup>reg</sup> в регуляции аутоиммунных процессов при СД1 подтверждается фактом ассоциации СД1 с IPEX-синдромом (*Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, and X-linked inheritance*) — моногенным аутоиммунным синдромом, сцепленным с X-хромосомой, проявляющимся иммунной дисрегуляцией, полиэндокринопатией и энтеропатией [3, 4, 5]. IPEX-синдром развивается в результате мутации гена *FoxP3* [3, 6]. Супрессивная активность T<sup>reg</sup> непосредственно зависит от интенсивности экспрессии гена *FoxP3* [7, 8, 9, 10]. Снижение количества или супрессивной активности этих клеток могут способствовать потере аутоотолерантности к антигенам  $\beta$ -клеток и развитию аутоиммунного процесса [9, 12].

В литературе приводятся достаточно противоречивые данные по характеру изменений количественных и функциональных показателей этих клеток при различных заболеваниях, в том числе на фоне СД1.

Целью настоящей работы стало определение количественных и функциональных изменений, происходящих на уровне регуляторного звена иммунитета у лиц в группе риска развития СД1 и у пациентов с различной длительностью СД1.

## Материалы и методы

В исследование было включено 116 больных (67 мужчин, 49 женщин) СД1 с различной длительностью заболевания, 33 человека (10 мужчин, 23 женщины) составили группу риска и 16 человек — контрольную группу.

Больные СД1 были разделены в зависимости от длительности заболевания на следующие группы: впервые выявленный СД1 (1-й год заболевания/после постановки диагноза) — 59 человек, с продолжительностью СД от 1 года до 5 лет — 16, от 5 до 10 лет — 15, свыше 10 лет — 26. Медиана возраста дебюта заболевания СД1 составила 27,0 лет [21,0; 33,0], индекс массы тела (ИМТ)=21,88 кг/м<sup>2</sup> [20,59; 23,93]. HbA<sub>1c</sub> в первой группе составил 9,1 % [6,4; 14,1], С-пептид — 0,7 нг/мл [0,5; 0,8], во второй: HbA<sub>1c</sub> — 7,2 % [6,4; 9,8], С-пептид — 1,2 нг/мл [0,6; 1,8]; в третьей: HbA<sub>1c</sub> — 8,6 % [7,4; 9,8], С-пептид — 0,5 нг/мл [0,3; 0,8], в четвертой: HbA<sub>1c</sub> — 9,2 % [6,8; 11,9], С-пептид — 0,3 нг/мл [0,1; 0,8].

В группу риска вошли обследованные пациенты с положительными результатами повторного определения аутоантител, ассоциированных с развитием СД1 (GADA, IA-2A, ICA, IAA). Пациенты были в возрасте 28,5 лет [21,5; 35,5], с 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; 14,0]. У 3 человек из группы риска родственники первой степени родства болели СД1.

Контрольную группу составили 16 практически здоровых лиц (9 мужчин и 7 женщин), сопоставимых по возрасту с пациентами исследуемых групп. Критериями включения в контрольную группу были: отсутствие нарушений углеводного обмена и отрицательные аутоантитела к антигенам  $\beta$ -клетки (GADA, IA-2A, ICA, IAA). Для определения диапазона нормальных показателей интенсивности экспрессии гена *Fox P3* было обследовано 85 здоровых доноров.

Критериями исключения из исследования была вакцинация и прием иммуномодулирующих препаратов в течение предшествующего года.

Диагноз впервые выявленного СД1 ставился на основании клинической картины и данных лабораторного обследования в соответствии с критериями ВОЗ [13].

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили с помощью наборов пробоподготовки «DNA prep». ДНК-типирование выполнялось по аллельным вариантам трех генов HLA II класса: DRB1 (14 специфичностей), DQA1 (8 аллелей) и DQB1 (13 аллелей) методом мультипраймерной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для определения полиморфных аллелей данных генов применялись коммерческие наборы производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология». ПЦР проводилась согласно регламенту, указанному производителем. Амплификацию проводили на амплификаторе «Терцик». Идентификацию продуктов амплификации проводили после электрофореза в 3% агарозном геле и окрашивания продуктов амплификации бромистым этидием. Гаплотипы составлялись на основе известных таблиц сцепления.

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

Содержание гликированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC) на аппарате D-10 («Bio-Rad») по стандартной методике производителя.

Определение базальной концентрации С-пептида в крови для оценки функционального состояния  $\beta$ -клеток проводили иммунохеомлюминисцентным методом на аппарате «Elesys 2010» («Roche»).

Определение субпопуляционного состава лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>, CD95L<sup>+</sup>, DR<sup>+</sup>) периферической крови проводили на проточном цитометре «FACSCalibur» с использованием моноклональных антител одинарной и двойной меткой («Becton Dickinson») к дифференцировочным антигенам лимфоцитов по стандартной методике. При этом оценивали процентное содержание, экспрессию дифференцировочных антигенов и абсолютное количество указанных субпопуляций лимфоидных клеток.

Для определения интенсивности экспрессии гена *FoxP3* проводилось выделение тотальной РНК из образцов крови данных групп пациентов и получение кДНК по матрице РНК. Определение интенсивности экспрессии гена *FoxP3* было проведено методом ПЦР в режиме реального времени (Real-time PCR). Для проведения Real-time PCR были синтезированы праймеры и отработаны оптимальные условия амплификации. При оптимизации метода Real-time PCR был определен диапазон значений, в котором соблюдается линейная зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации кДНК.

Статистическая обработка результатов исследования выполнена с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Сравнение показателей выделенных групп пациентов проводилось по U-критерию Манна-Уитни. Корреляционный анализ осуществлялся непараметрическим методом ранговой корреляции по Спирмену. Количественные показатели представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [Q25; Q75]. Критический уровень значимости принимался равным 5%.

Таблица 1

Количество пациентов с различными аутоантителами к антигенам β-клетки и инсулину первично и в динамике (n=33)		
Аутоантитела	Первично	Через 6–12 мес.
GADA	7	9
ICA	2	4
IA-2A	4	5
IAA	1	1
GADA+ICA	4	6
GADA+IAA	4	5
GADA+IA-2A	1	2
ICA+IAA	1	1
3 вида	3	3
4 вида	0	1

Таблица 2

Распределение HLA-гаплотипов в группе риска	
Генотип	n
Предрасполагающий / предрасполагающий	4
Предрасполагающий / протективный	6
Протективный / протективный	23

## Результаты и их обсуждение

### Группа риска

В группе риска преобладали пациенты с положительными титрами GADA и с комбинациями GADA с ICA и IAA (табл. 1).

При HLA-типировании в группе риска были получены результаты преобладания частоты встречаемости протективных гаплотипов и генотипов по сравнению с классическими предрасполагающими. В качестве «предрасполагающих» и «протективных» мы рассматривали следующие гаплотипы:

- «Предрасполагающие» гаплотипы:
  - DRB1\*03-DQA1\*0501-DQB1\*0201*;
  - DRB1\*04-DQA1\*0301-DQB1\*0302*;
  - DRB1\*01-DQA1\*0101-DQB1\*0501*.
- «Протективные» гаплотипы:
  - DRB1\*13-DQA1\*0102-DQB1\*0602-8*;
  - DRB1\*15-DQA1\*0102-DQB1\*0602-8*;
  - DRB1\*11-DQA1\*0501-DQB1\*0301*;
  - DRB1\*13-DQA1\*0501-DQB1\*0301*.

Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов в группе риска и в контрольной группе представлены в таблице 3.

У пациентов группы риска мы выявили достоверное повышение относительного и абсолютного количества CD38<sup>+</sup>- и DR<sup>+</sup>-лимфоцитов ( $p < 0,05$ ). Наблюдаемая тенденция повышения относительного количества CD25<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>-клеток, а также снижение абсолютного количества CD95L<sup>+</sup>-лимфоцитов по сравнению с контролем оказались статистически недостоверны ( $p > 0,05$ ).

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 β-клеток.

Результаты определения интенсивности экспрессии гена *FoxP3*, полученные в группе риска, могут свидетельствовать о постепенно снижающейся способности T<sup>reg</sup> подавлять Т-клеточную пролиферацию, а увеличение содержания этих клеток можно считать компенсаторным явлением.

Все это отражает наличие общей напряженности иммунной системы на этой стадии процесса.

Таблица 3

Сравнение показателей субпопуляционного состава лимфоцитов в группе риска и в контрольной группе		
Субпопуляция	Группа риска	Контрольная группа
CD3, %	70 [65; 73]	72 [65; 78]
Абс.	1397,4 [1088,43; 1727,18]	1267,7 [990,51; 1675,67]
CD4, %	40 [37; 44]	37 [34; 45]
Абс.	828,1 [598,92; 946,4]	784,2 [615,43; 1020]
CD8, %	28 [25; 34]	23 [19; 27]
Абс.	532,4 [395; 704,88]	471,7 [385,8; 781,23]
CD38, %	44,0 [39,0; 51,0]	23 [18; 26]
Абс.	706,63 [604,75; 842,16]	412,1 [355,4; 581,25]
CD25, %	2,2 [1,6; 3,5]	1,3 [1,0; 1,8]
Абс.	30,512 [15,120; 44,312]	34,492 [4,985; 64,000]
CD4/25 <sup>high</sup> , %	1,25 [0,80; 2,45]	0,8 [0,6; 0,8]
Абс.	16,131 [12,960; 22,884]	30,492 [4,985; 56,000]
CD95L, %	1,9 [0,8; 4,5]	2,60 [0,65; 8,75]
Абс.	23,826 [12,992; 45,452]	94,103 [57,60; 130,607]
<i>FoxP3</i> , r <sub>q</sub>	0,49 [0,24; 0,81]	1,11 [0,66; 2,26]

Таблица 4

Распределение HLA-гаплотипов в группе больных с СД1	
Генотип	n
Предрасполагающий / предрасполагающий	54
Предрасполагающий / протективный	39
Протективный / протективный	23

Таблица 5

Количество пациентов с СД1 с различными аутоантителами к антигенам β-клеток и инсулину при разной длительности заболевания (лет)				
Аутоантитела	до 1 года	1–5	5–10	>10
GADA	36	28	11	8
ICA	9	11	3	0
IA-2A	5	7	2	0
IAA	4	14	10	6
GADA+ICA	14	18	8	0
GADA+IAA	12	21	7	0
GADA+IA-2A	13	2	1	0
ICA+IAA	1	0	0	0
ICA+IA-2A	1	0	0	0
3 вида	0	2	0	0
4 вида	0	0	0	0
Отрицательные	21	18	74	102

### Сахарный диабет 1 типа

В группе больных СД1 при HLA-типировании выявлено преобладание классических предрасполагающих гаплотипов и генотипов по сравнению с протективными (табл. 4).

Наличие и распределение аутоантител представлено в таблице 5. Обращает на себя внимание отсутствие аутоантител у значительного числа пациентов с длительностью СД1 до 1 года, что может быть связано с развитием ремиссии у данного контингента больных.

Субпопуляционный состав лимфоидных клеток в группе больных СД1 с различной продолжительностью заболевания представлен в таблице 6.

Характеристика субпопуляционного состава лимфоидных клеток в группе больных СД1 с различной продолжительностью заболевания				
	До 1 года	1–5 лет	5–10 лет	>10 лет
CD3, %	69 [65; 73]	70,5 [65,5; 74,5]	66,0 [63,2; 71,7]	68,1 [67,4; 70,2]
Абс.	1354,32 [1081,5; 1727,18]	1249,5 [981,8; 1617,28]	1114,7 [1001,9; 15173,2]	1271,4 [1041,9; 1604,08]
CD4, %	40,3 [37; 44]	39,5 [35,5; 42,5]	43,0 [30,1; 44,3]	35,2 [31,1; 39,5]
Абс.	828,3 [642,6; 941,64]	814,0 [722,4; 970,44]	785,9 [582,9; 1021,54]	723,7 [612,0; 891,74]
CD8, %	28,3 [25; 33]	27,8 [25; 34]	21,0 [17; 31]	25,1 [20; 38]
Абс.	532,4 [407,22; 704,88]	492,1 [397,77; 694,18]	512,9 [425,72; 801,11]	500,4 [399,12; 694,12]
CD38, %	39,0 [28,0; 49,0]	45,0 [42,0; 49,0]	41,4 [32,4; 48,1]	40,2 [35,9; 54,1]
Абс.	718,65 [649,04; 749,70]	1517,36 [1333,56; 1814,44]	1494,4 [1234,78; 1861,31]	1304,2 [1111,9; 1414,7]
CD25, %	1,6 [0,6; 3,4]	2,45 [1,1; 3,85]	2,1 [1,2; 2,8]	2,0 [1,5; 2,2]
Абс.	44,805 [10,29; 69,713]	54,51 [19,99; 79,13]	41,0 [23,91; 59,31]	39,22 [25,9; 49,3]
CD4/25 <sup>high</sup> , %	0,7 [0,3; 2]	1,35 [0,5; 2,4]	1,4 [0,7; 2,1]	1,15 [0,81; 1,71]
Абс.	16,239 [6,552; 38,472]	14,92 [9,55; 28,71]	12,9 [8,25; 31,42]	11,2 [10,2; 15,2]
CD95L, %	2,3 [0,5; 5,4]	1,1 [0,5; 6,5]	1,7 [1,1; 4,4]	2,3 [1,5; 3,4]
Абс.	36,72 [9,368; 50,996]	39,61 [31,4; 65,3]	28,6 [14,89; 44,45]	30,1 [23,9; 56,4]
FoxP3, rq	0,39 [0,18; 0,71]	0,37 [0,18; 0,89]	0,14 [0,11; 0,31]	0,47 [0,17; 0,86]

У пациентов с СД1, как и в группе риска, мы отмечали достоверное повышение относительного и абсолютного количества CD38<sup>+</sup> и DR<sup>+</sup>-лимфоцитов ( $p < 0,05$ ). В группе больных с впервые выявленным СД1 количество T<sup>reg</sup> не отличалось от такового в группе контроля ( $p > 0,05$ ).

Однако функциональная активность T<sup>reg</sup> (интенсивность экспрессии гена *FoxP3*) была достоверно ниже, чем в контроле (0,39 [0,18–0,71] vs. 1,11 [0,66–2,26],  $Z = 5,26$ ,  $p < 0,001$ ). Низкая интенсивность экспрессии гена *FoxP3* в сравнении с контролем в дальнейшем отмечалась при любой продолжительности заболевания: при длительности диабета от 1 до 5 лет (0,37 [0,18–0,89],  $Z = 2,62$ ,  $p = 0,009$ ); от 6 до 10 лет (0,14 [0,11–0,31],  $Z = 3,33$ ,  $p = 0,0009$ ); свыше 10 лет (0,47 [0,17–0,86],  $Z = 3,15$ ,  $p = 0,0016$ ).

У пациентов с СД1 мы выявили сильную отрицательную корреляционную связь между интенсивностью экспрессии гена *FoxP3* и титром GADA ( $r = -0,95$ ,  $p = 0,05$ ), что может свидетельствовать об ослаблении лимфопролиферативной способности клеток. Также в данной выборке пациентов была выявлена взаимосвязь интенсивности экспрессии гена *FoxP3* и маркерной молекулы CD95L ( $r = 0,52$ ,  $p = 0,05$ ). Последнее может свидетельствовать о том, что проапоптотическая активность у людей с СД1 выражена в большей степени, чем у пациентов в группе риска.

Таким образом, можно предположить, что у пациентов из группы риска для компенсации функционального дефицита T<sup>reg</sup> возникает увеличение численности T<sup>reg</sup>, которое, однако, нельзя рассматривать как показатель роста активности этих клеток. Сохраняющийся функциональный дефицит T<sup>reg</sup> сопровождается дальнейшим снижением экспрессии гена *FoxP3* и обуславливает развитие СД1.

Полученные результаты согласуются с результатами ряда авторов [14], показавших, что иммунный дисбаланс в дебюте СД затрагивает в том числе субпопуляцию T<sup>reg</sup>. Так, Glisic-Miosavljevic S. и соавт. [15] выявили, что у пациентов в дебюте СД1 и у лиц из группы риска развития этого заболевания CD4<sup>+</sup>25<sup>high</sup>-Т-лимфоциты более интенсивно гибнут в результате апоптоза, нежели у пациентов из группы контроля. Авторы отметили, что в группе пациентов с впервые выявленным СД1

интенсивность апоптоза T<sup>reg</sup> была наивысшей. Таким образом, манифестация СД, по мнению авторов, проходит в условиях сниженной активности T<sup>reg</sup> из-за высокой скорости их деструкции путем апоптоза. Это может обуславливать неконтролируемое развитие аутоиммунного процесса. В то же время авторы отметили, что интенсивность апоптоза T<sup>reg</sup> у лиц из группы риска достоверно ниже, чем у пациентов с впервые выявленным СД1, хотя и выше, чем в контрольных группах здоровых лиц.

Во многих исследованиях авторы обращают внимание не только на сниженное абсолютное или относительное количество T<sup>reg</sup> при СД1, но и на нарушение их супрессорной (регуляторной) функции. Так, в исследовании Jin Y. и соавт. [14] было подтверждено, что у значительной части (40%) пациентов с СД1 T<sup>reg</sup> отличается «крайне низкой супрессорной активностью» (менее 25% от нормальных показателей) по сравнению с группой здоровых пациентов.

В исследовании на животных моделях СД1 также подтверждена важная роль T<sup>reg</sup> в патогенезе СД1. Более того, у животных разработано множество достоверно эффективных методов предотвращения развития СД1 и его излечения, включающих специфические воздействия на субпопуляцию T<sup>reg</sup> и приводящих, в первую очередь, к увеличению их абсолютного количества и изменению соотношения популяций Th1- и Th2-лимфоцитов. Так, в исследовании Jan-Luuk Hillebrands и соавт. [16] введение CD4<sup>+</sup>25<sup>high</sup>-Т-лимфоцитов ВВ-крысам предотвращало развитие СД в 80% случаев.

## Выводы

У пациентов группы риска отмечено достоверное увеличение пула активированных лимфоидных клеток, повышение содержания T<sup>reg</sup> и снижение экспрессии гена *FoxP3*.

При любой длительности СД1 наблюдается снижение интенсивности экспрессии гена *FoxP3* (несмотря на отсутствие существенной разницы в содержании T<sup>reg</sup> в крови), что может приводить к пролиферации аутореактивных цитотоксических Т-лимфоцитов.

## Литература

1. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Shimizu J. et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance // *Immunol. Rev.* – 2001. – 182. – P. 18–32.
2. Lan R.Y., Ansari A.A., Zhe-Xiong Lian, Eric M. Gershwin Regulatory T cells Development, function and role in autoimmunity // *Autoimmunity Reviews.* – 2005. – 4. – P. 351–363.
3. Powell B.R., Buist N.R., Stenzel P. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy // *J. Pediatr.* – 1982. – V. 100. – P. 731–737.
4. Bennett C.L., Ochs H.D. IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena // *Curr. Opin. Pediatr.* – 2001. – V. 13. – P. 533–538.
5. Gambineri E., Torgerson R.T., Ochs H.D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis // *Curr. Opin. Rheumatol.* – 2003. – V. 15. – P. 430–435.
6. Fontenot J.D., Rasmussen J.P., Williams L.M. et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3 // *Immunity.* – 2005. – V. 22. – P. 329–341.
7. Pop S.M., Wong C.P., Culton D.A. et al. Single cell analysis shows decreasing FoxP3 and TGFbeta1 coexpressing CD4+CD25+ regulatory T cells during autoimmune diabetes // *J. Exp. Med.* – 2005. – V. 201. – P. 1333–1346.
8. Zheng Y., Rudensky A.Y. FoxP3 in control of the regulatory T cell lineage // *Nat. Immunol.* – 2007. – V. 8. – P. 457–462.
9. Putnam A.L., Vendrame F., Dotta F., Gottlieb P.A. CD4+CD25+high regulatory T cells in human autoimmune diabetes // *J. Autoimmun.* – 2005. – V. 24. – P. 55–62.
10. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M. et al. Immunologic cell-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25) // *J. Immunol.* – 1995. – V. 155. – P. 1151–1164.
11. Fehervari Z., Sakaguchi S. CD4(+) Tregs and immune control // *J. Clin. Invest.* – 2004. – 114(9). – P. 1209–1217.
12. Lindley S., Dayan C.M., Bishop A., Roep B.O., Peakman M., Tree T.I. Defective suppressor function in CD4+CD25+ T-cells from patients with type 1 diabetes // *Diabetes.* – 2005. – Vol. 54. – P. 92–99.
13. World Health Organization: Definition, Diagnosis, and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications: Report of a WHO consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva, World Health Organization, 1999 (WHO/NCD/NCS/99.2).
14. Jin Y., Chen X., Podolsky R. et al. APC dysfunction is correlated with defective suppression of T cell proliferation in human type 1 diabetes // *Clin. Immunol.* – 2008. – doi:10.1016/j.clim.2008.10.005.
15. Glisic-Milosavljevic S., Waukau J., Jailwala P., Jana S., Khoo H.-J., et al (2007). At-Risk and Recent-Onset Type 1 Diabetic Subjects Have Increased Apoptosis in the CD4+CD25+high T-Cell Fraction // *PLoS ONE* 2(1): e146. doi:10.1371/journal.pone.0000146.
16. Hillebrands J.-L., Whalen B., Visser J.T.J. et al. A Regulatory CD4<sub>+</sub> T Cell Subset in the BB Rat Model of Autoimmune Diabetes Expresses Neither CD25 Nor Foxp31 // *The Journal of Immunology.* – 2006. – 177. – P. 7820–7832.

## Никонова Татьяна Васильевна

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

**E-mail: [tatiana\\_nikonova@mail.ru](mailto:tatiana_nikonova@mail.ru)**

Апанович Павел Васильевич

аспирант, н. сотрудник лаб. молек. генетики, Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

Пекарева Елена Владимировна

аспирант Института диабета, ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва

Горелышева Вера Анатольевна

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

Прокофьев Сергей Александрович

к.б.н., зав. лабораторией генетики и клинической иммунологии, ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва

Карпучин Александр Васильевич

д.б.н., зав. лаб. молек. генетики, сложнаследуемых заболеваний, Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

Дедев Иван Иванович

академик РАН и РАМН, директор ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва