Апоптоз в развитии ремиссии сахарного диабета 1 типа

Т.В. Никонова, С.А. Прокофьев, В.А. Горелышева,
О.М. Смирнова, С.М. Степанова, Л.П. Алексеев

ГУ Эндокринологический научный центр
(дир.– акад. РАН и РАМН И.И. Дедов) РАМН, Москва

Центральным механизмом гибели β-клеток поджелудочной железы при сахарном диабете 1 типа (СД1) в настоящее время считается апоптоз [3,10,19].

Апоптоз – программированная клеточная гибель, энергетически зависимый, генетически контролируемый процесс, который запускается специфическими сигналами. В отличие от некроза апоптоз никогда не сопровождается воспалительной реакцией. При апоптозе сохраняется целостность мембран, органеллы выглядят морфологически интактными. Для него характерно сжатие клетки, формирование округлых, окруженных мембраной «апоптотических телец», которые быстро фагоцитируются окружающими клетками. В процессе апоптоза клетка исчезает бесследно в течение 15–120 минут [1].

Запуск программы, ведущей к смерти клетки, начинается с приема сигнала – предвестника гибели в виде информации, поступающей к клетке извне или возникающей в недрах самой клетки. Сигнал воспринимается рецептором и подвергается анализу.

TNF-α и Fas – лиганд(CD 178) связываются с рецепторами на поверхности клеток TNF R1 и TNF-R2, а для Fas/APO-1(CD95) и запускают каскад биохимических, энергетически зависимых процессов, приводящих к активации интрацеллюлярных «доменов смерти» (DED,DED1, DED2, SAPK/JNK, катепсин D, протеазы семейства ICE/CED-3, протеиновые тирозинкиназы), конечным этапом чего может являться гибель клетки [1,2,10].

Дальнейшая судьба клеток будет зависеть от соотношения активаторов (Bax-белки) и ингибиторов (белки семейства Bcl) апоптоза [1].

Fas-зависимый апоптоз регулирует гомеостаз лимфоцитов, вызывая гибель активированных Т лимфоцитов-продуцентов цитокинов и поддерживает баланс иммунной системы.

В наших предыдущих работах по исследованию роли цитокинов и форм гибели β-клеток при различных вариантах течения СД 1 была отмечена тенденция к снижению содержания Fas-рецептора апоптоза (CD95) на лимфоидных клетках периферической крови при СД1 с длительностью до года [4].

Низкие показатели Fas-рецептора апоптоза (CD95) были характерны для пациентов, находящихся в состоянии частичной (неполной) клинической ремиссии диабета.

Клиническая ремиссия, или медовый месяц (по определению J.Dupre и C.R. Stiller) – это период наиболее благоприятного течения СД 1 типа, развивающийся в первые месяцы после установления диагноза, когда потребность в экзогенном инсулине быстро снижается, а у некоторых пациентов возможна даже отмена инсулина.

Полная клиническая ремиссия заболевания, когда экзогенный инсулин может быть отменен, наблюдается в 2–12% случаев. При частичной ремиссии потребность в экзогенном инсулине составляет менее 0,4 ЕД/кг массы тела в сутки. Она встречается в 18–62% случаев впервые выявленного СД 1 типа [5,9].

Данные о значимости экспрессии молекулы Fas-рецептора в развитии сахарного диабета аутоиммунного генеза остаются в модельных опытах противоречивыми [12,17,18]. Как показано на животных моделях, Fas-рецептор непосредственно не играет роли в деструкции β-клеток, но вовлечен в процесс, провоцирующий инсулит. Однако при дефиците Fas-рецептора на клетках инсулит не развивается или происходит его торможение [7,15].

Цель работы состояла в изучении иммунологических параметров лимфоидных клеток крови у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом, в том числе Fas-рецептора програмированный гибели клеток (СД 95).

Таблица 1

Клиническая характеристика больных

Признак	I группа СД 1 (ремиссия) n=16	II группа СД 1 (без ремиссии) n=9	III группа (контроль) n=15
Пол, м/ж	11/5	4/5	8/7
Возраст, лет	23,5 ± 4,7	24,3 ± 4,5	26,1 ± 5,2
Продолжительность заболевания, мес.	6,8 ± 5,2	7,4 ± 4,6	-
HbAlc, %	⩽ 6,0%	⩽ 6,8%	⩽ 6,0%
С пептид (базальный), нг/мл	1,6 ± 1,2	1,2 ± 0,8	1,98 ± 1,62
Доза инсулина, ед/кг в сутки	⩽ 0,4	> 0,4	-

Объект и методы исследования

Обследовано 25 больных с впервые выявленным СД 1 типа с длительностью заболевания до 1 года.

I группу составили пациенты, находящиеся в стадии неполной клинической ремиссии, II группа – пациенты с впервые выявленным сахарным диабетом без ремиссии, контрольную группу составили 15 здоровых лиц.

Основные клинические характеристики больных представлены в табл. 1.

Оценку иммунного статуса проводили на проточном цитометре FACSCalibur с использованием моноклональных антител («Becton Dikinson») к дифференцировочным антигенам периферической крови по стандартной методике. При этом оценивались процентные и количественные показатели Т-клеточной популяции (CD3+, CD4+, CD8+), естественных клеток киллеров (CD16+), В-клеточной популяции (CD19+) лимфоцитов, а также процентное содержание лимфоидных клеток, несущих маркеры активации (HLA-DR-антиген, CD38) и маркерный антиген апоптоза (CD95).

Типирование 3 локусов HLA 2 класса (DRB1, DQA1, DQB1) осуществляли с использованием набора НПФ ЗАО ДНК-технологии по прилагаемому протоколу. Количественное определение S Fas L проводили методом иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием коммерческого набора Bender Med Systems.

Аутоантитела к цитоплазматическим антигенам В-клеток (ICA) и к глутаматдекарбоксилазе (GAD) определяли методом непрямого иммуноферментного анализа с использованием наборов «Isletest ICA» фирмы «Biomerica». Аутоантитела к инсулину (IAA) определялись методом непрямого иммуноферментного анализа («Elisa test» фирмы «Mercodia»). Для оценки функции β-клеток использовали показатели С-петида натощак, которые определяли иммуноферментным методом с использованием наборов «DSL», США. Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программы Exel и Statistica v 6.0.

Результаты и их обсуждение

Данные по распределению аллелей генов DRB1, DQA1, DQB1 локуса HLA класса II представлены в табл. 2.

При анализе распределения аллелей не было отмечено статистически достоверных различий у пациентов в 2 исследуемых группах. Однако обращает на себя внимание преобладание протективного аллеля DQB1-502-4 в группе СД 1 типа с ремиссией по сравнению с протективным аллелем DQB1-602-8.

Таблица 2

Аллели генов DRB-DQ локуса HLA класса 2

HLA аллели	СД типа 1 ремиссия количество аллелей (n=32)	СД типа 1 без ремиссии количество аллелей (n=18)
DRB1*01	7	2
DRB1*03	9	2
DRB1*04	1	4
DRB1*07	1	3
DRB1*11	3	4
DRB1*13	7	1
DRB1*15	2	2
DRB1*16	2	0
DQA1*0101	7	2
DQA1*0501	9	2
DQA1*0301	2	4
DQA1*0201	3	4
DQA1*0103	2	1
DQA1*0102	9	5
DQB1*0501	7	2
DQB1*0201	9	5
DQB1*0302	4	4
DQB1*0301	4	3
DQB1*0602-8	1	1
DQB1*0502-4	7	3
Другие	15	10

Таблица 3

Гаплотипы генов DRB-DQ локуса HLA класса 2

HLA гаплотипы	СД типа 1 ремиссия гаплотипы (n=32)	СД типа 1 без ремиссии гаплотипы (n=18)
DRB1*17(03)-DQA1*0501-DQB1*0201	9	2
DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302	1	4
DRB1*01-DQA1*0101-DQB1*0501	7	2

Отмечено преобладание гаплотипов DRB1*17(03)-DQA1*0501-DQB1*0201 (сильная предрасположенность) и гаплотипа DRB1*01 DQA1*0101 DQB1*0501 (умеренная предрасположенность) у больных с выявленным СД 1 типа, находящихся в ремиссии, однако эти данные ввиду небольшого объема выборки статистически не достоверны (табл. 3).

Известно более 2 десятков локусов и 100 генов-кандидатов, имеющих различную степень ассоциации с СД 1 типа [8,13].

При этом существенно изменилось распределение HLA-генотипов у больных сахарным диабетом, диагностированным в последние годы и

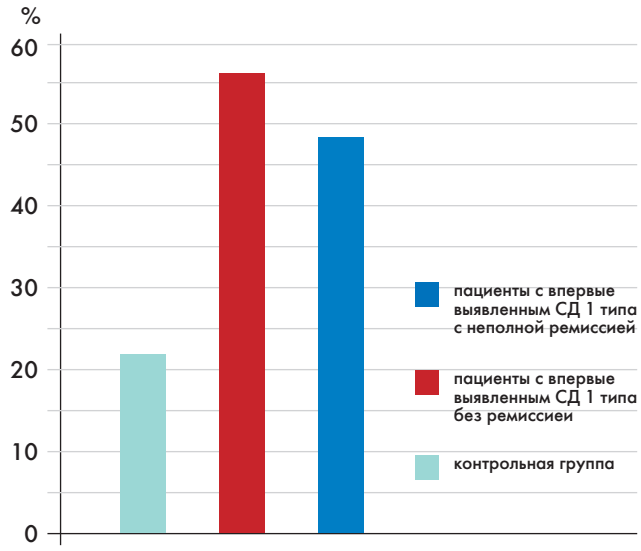


Рис. 1. Содержание лимфоцитов периферической крови с дифференцировочным маркером СД-38.

50 лет назад. Достоверно реже определяются генотипы высокого риска, достоверно чаще – генотипы, считающиеся протективными. Кроме того, наблюдается тенденция к снижению частоты встречаемости генотипов средней степени риска и тенденция к повышению частоты встречаемости генотипов низкой степени риска заболеваемости сахарным диабетом [11].

При иммуноогическом обследовании пациентов I и II групп омечено характерное повышение уровня активационной маркерной молекулы СД 38 ($p<0,05$) (рис. 1). Это одноцепочечный трансмембранный гликопротеин типа 2 семейства АДФ рибозил циклаз, представленный на широком спектре клеток организма, в том числе на Т- и В-лимфоидных клетках, особенно в процессе их активации и пролиферации [1]. Высокий уровень CD38 в обеих группах пациентов свидетельствует о состоянии напряженности иммунной системы.

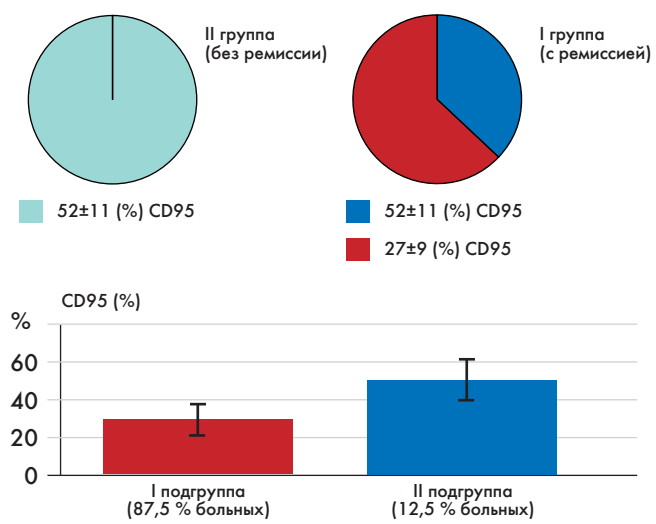


Рис. 2. Содержание рецептора апоптоза Fas (CD95) при впервые выявленном СД 1 типа.

CD95 – это мембранный белок типа 1 суперсемейства рецепторов ФНО, содержащий домен смерти. Лигандом CD95 является молекула CD95L – мембранный белок типа 2, который относится к семейству ФНО цитокинов. CD95 L может экспрессироваться на поверхности клетки или «слущиваясь» находиться в виде свободной молекулы. Как в мембранносвязанной, так и в растворимой форме он может запускать процесс апоптоза в клетках, на поверхности которых экспрессируется рецептор CD95 [2,14,16].

В группе пациентов, находящихся в состоянии неполной клинической ремиссии, у 87,5% больных (I подгруппа) отмечались достоверно низкие показатели Fas-рецептора апоптоза (CD95) на лимфоидных клетках периферической крови (27±9%) ($p<0,05$). У 12,5% пациентов (II подгруппа) он был в пределах контрольных значений (52±11%).

Во II группе (без ремиссии) содержание рецептора апоптоза Fas у всех обследованных не отличалось от контроля ($p>0,05$) (рис. 2).

Можно предположить, что низкие значения CD95 рецептора у пациентов, находящихся в стадии неполной клинической ремиссии, могут косвенно свидетельствовать о частичной элиминации периферических лимфоидных клеток аутореактивной направленности либо о возможном уменьшении экспрессии данной маркерной молекулы.

Так как для запуска программированной гибели клеток необходимо взаимодействие рецептора Fas с лигандом данной маркерной молекулы, мы изучали его концентрацию в периферической крови. Не было отмечено выраженных отличий между показателями s Fas L в контрольной группе и в изучаемых группах пациентов (0,16±0,11 нг/мл) ($p>0,05$).

В подгруппе больных с ремиссией с низкими показателями CD95 отмечался дисбаланс Т-хелперных и Т-супрессорных лимфоидных клеток (рис. 3). У 9 больных (64,3%) определялись высокие показатели Тх (54±5,0), нормальные уровни Т-супрессоров (23±5,0) в сочетании с положительными титрами аутоантител. Повышение процентного содержания Т-хелперов может быть соотнесено с определенными показателями аутоантител в данной подгруппе (рис. 4.).

В I Б подгруппе 35,7% больных (5 чел) – показатели Тх были аналогичны здоровому контролю,



Рис. 3. Дисбаланс Т-хелперных и Т-супрессорных лимфоидных клеток у больных с низкими показателями CD95.

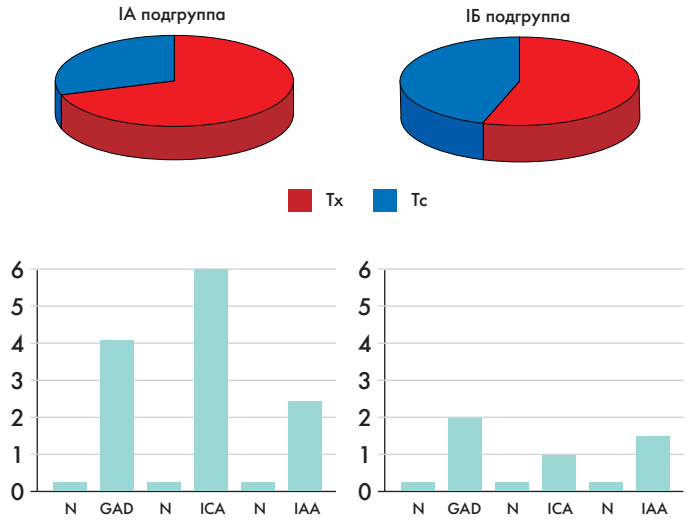


Рис. 4. Дисбаланс Т-хелперных и Т-супрессорных лимфоидных клеток в соотношении с антителами у больных с низкими показателями CD95.

(39±5,0) но были повышены уровни Т-супрессоров (36±5,0), отсутствовали антитела или определялись в низких титрах. Возможно высокое процентное содержание Т-супрессоров, осуществляющее негативную регуляцию лимфоидных клеток, тормозит формирование аутоиммунного ответа [6]. Представляет интерес изучение активаторов (Bax-белки) и ингибиторов (белки семейства Bcl) апоптоза как в эксперименте, так и в клинической практике, что позволит детально изучить патогенетические процессы, происходящие при СД 1 типа.

Выводы

1. Снижение уровня Fas-рецептора программированной гибели клеток на лимфоцитах периферической крови может косвенно свидетельствовать о развитии ремиссии сахарного диабета 1 типа.

2. Дебют сахарного диабета 1 типа сопровождается дисбалансом Т-хелперов и Т-супрессоров лимфоцитов периферической крови, что определяется индивидуальными особенностями иммунореактивности организма.

Литература

1. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. Эдиториал УРСС, 2002, с. 320.
2. Цыган В.Н. Актуальные проблемы иммунологии. С-П., 2004 с. 48.
3. Один В.И. Аутоиммунный сахарный диабет. С-П., 2003, с. 344.
4. Дедов И.И., Никонова Т.В., Смирнова О.М. и соав. Роль цитокинов в регуляции иммунного ответа и механизмы гибели β-клеток при различных вариантах течения сахарного диабета типа 1. «Пробл. эндокринол.», №3, 2005, с. 3-6.
5. Впервые выявленный сахарный диабет, механизм развития, клиника, лечение. Под ред. И.И. Дедова. М. 2005, с. 28.
6. A. Kukreja, G. Cost, J. Marker. Multiple immuno-regulatory defects ih type 1 diabetes/ The J. of Clinical Investigation, 1, 2002, v. 109: 131-140.
7. A Savinov, A Tcherepanov, E. A. Green Contribution of Fas to diabetes development. PNAS 2003, 100:628-632.
8. Atkinson M. A. Thirty years of Investigating in Autoimmune basis for the type 1 diabetes Diabetes 54^1253-1263, 2005.
9. Buyukgebiz A, Cemeroglu A.P., Bober E. Factors influencing remission phase in children with type 1 diabetes mellitus. J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 2001. 14(9): 1585-1596.
10. Kawasaki E., Abiru N., Eguchi K. Prevention of type 1 diabetes: from the view point of β-cell damage. Diabetes Research and Clinical Practice, 66, 2004 : 27-32.
11. Hermann R, Knip M. The FINDIANE Study Group- Temporal changes in the frequencies of HLA genotypes in patients with type 1 diabetes - indication of an increased environmental pressure Diabetologia 2003; 46,3: 420-425.
12. Apostolou I., Hao Z., Rajewsky K. Effective Destruction of Fas-deficient insulin-producing β-cells in type 1 diabetes. The J. of Exp. Med., v. 198, 7, 2003: 1103-1106.
13. Ide A, Eisebarth GS: Genetic suspectibility in type 1 diabetes and its associated autoummune disorders. Rev. Endocr Metab Disord 4: 243-253, 2003.
14. Krneger A. Fas SC., Baumann S The role of CD 95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. Immunol. Rev. 193: 58-69, 2003.
15. Vence L., Benoist Ch., Mathis D. Fas Deficiency Prevents Type 1 Diabetes by Inducing Hyporesponsiveness in Islet β-cell-Reactive T-Cells. Diabetes 53:2797-2803, 2004.
16. Nakayama M., Nagata M., Yasuda H. Fas/Fas Ligand Interactions Play an Essential Role in the Initiation of Murine Autoimmune Diabetes. Diabetes 51: 1391-1397, 2002.
17. DeFranco S., Bonissoni S., Cerrutti F. Defective function of Fas in Paticuts with type 1 Diabetes Associated with otherm Autoimmune Disease, Diabetes 2001, Mar; 50 (3) ; 483-488.
18. Kim S., Kim K., Hwang D-Y. Inhibition of Autoimmune Diabetes by Fas Ligand: The Paradox is solved. The journal of Immunology, 2000, 164: 2931-2936.
19. Su X, Hu Q, Kristan J. M. Significant role for Fas in the pathogenesis of autoimmune diabetes. J. immunol. 164: 2523-2532, 2000.