

© Ахмедов Г. А., Несруллаева Г. М., Мамедова В. Р., Ибрагимова Ш. Г.

УДК 616.43

**Ахмедов Г. А., Несруллаева Г. М., Мамедова В. Р.,
Ибрагимова Ш. Г.**

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ ДЕТЕЙ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С ГЕНОМОМ HLA DRB1

Азербайджанский медицинский университет (г. Баку, Азербайджан)

nauchnayastatya@yandex.ru

Данная работа является фрагментом докторской диссертации: «Генетические, иммунологические и клинические аспекты сахарного диабета у детей и особенности терапевтического подхода».

Вступление. Инсулинозависимый сахарный диабет является хроническим аутоиммунным заболеванием.

В результате аутоиммунного процесса бета-клетки поджелудочной железы подвергаются деструкции. В патогенезе сахарного диабета Т-клетки играют значительную роль. Здесь все зависит от баланса регуляторных и аутореактивных Т-клеток [1].

В повреждении β-клеток поджелудочной железы Т-клетки CD8+ играют непосредственную, а Т-клетки CD4+ – косвенную роль. В данном процессе активно участвуют и клетки-киллеры (CD16/CD56⁺) [2].

Известно, что у людей, чувствительных к диабету из-за системы человеческих лейкоцитарных антигенов (ЧЛА), имеющей несколько антител к поджелудочной железе, вследствие снижения активности Т-супрессоров CD4+CD25+, наблюдается ускорение апоптоза. А ускорение апоптоза, в свою очередь, ускоряет повреждение бета-клеток. Также известно, что Т-супрессоры выделяют TGF-β (*трансформирующий ростовой фактор бета*), цитокины ИЛ-10, ИНФ-γ, ИЛ-35 и воздействуют через них. Между генотипом DQB1 ЧЛА и Т-супрессорами CD4+CD25+ существует положительная корреляционная взаимосвязь. У лиц с негативным антителом, но с наличием генотипа DQB1 ЧЛА апоптоз ускоряется, а у лиц без данного генотипа процесс апоптоза протекает нормально. Выявлена положительная взаимосвязь между аллелями HLA DQB1*0302, DQB1*0201, HLA DQB1*0602 и процессом апоптоза [5].

Цитотоксические Т-клетки или Т-клетки CD8+ уничтожают подвергшиеся изменениям клетки организма. Они воздействуют посредством выделения цитокинов ИЛ-10, аденозина и др. В одном из проведенных экспериментальных исследований было выявлено, что эти клетки обнаруживают бета-цепь молекулы инсулина, который обладает слабой аффилиативной способностью и подвергает их деструкции, в результате чего и возникает диабет [9].

В повреждении бета-клеток поджелудочной железы более значимую роль играют реактивные клетки CD8(+). Известно, что до антител в поджелудочной железе активизируются именно эти клетки, что способствует возникновению деструктивных изменений в бета-клетках. А после возникновения диа-

бета его уровень в крови по сравнению с уровнем антител снижается [7].

При сахарном диабете поджелудочная железа подвергается атаке со стороны Т- и В-лимфоцитов. В одном из экспериментальных исследований разработана специальная антисыворотка к антителам В-лимфоцитов, которая была введена экспериментальным животным. Позднее стало известно, что она задерживает возникновение диабета или характер его течения приобретает легкий характер [6].

Сахарный диабет возникает в ходе деструктивного повреждения аутореактивных Т-клеток бета-клеток. К аутореактивным клеткам относятся клетки CD4+ и CD8+. У больных с диабетогенными аллелями (ДГ) ЧЛА в результате стимуляции данных аллелей, в поджелудочной железе увеличивается количество CD4+-клеток, деструктивно влияющих на бета-клетки. У больных с ДГ ЛАЧ повышается и уровень ИНФ-γ [6].

Известно, что в патогенезе сахарного диабета участвуют и В-клетки. В-клетки синтезируют ИНФ-γ, а ИНФ-γ повышает синтез цитокинов. Ослабление данных клеток приводит к снижению активности также и Т-клеток [4]. В-лимфоциты участвуют в уничтожении β-клеток не напрямую, а косвенно. Так, они, подготавливая антитела и воздействуя на иммунные процессы и синтез цитокинов, активизируют и CD4+-клетки. А при ослаблении и дефиците В-клеток, замедляют возникновение аутоиммунного диабета [3,8].

Цель исследования – выявление взаимосвязи между иммунной системой и геномом DRB1 ЧЛА у детей с сахарным диабетом.

Объект и методы исследования. Были обследованы больные сахарным диабетом, обратившиеся в эндокринологическое отделение Детской клинической больницы № 6 и во 2-ое педиатрическое отделение Азербайджанского медицинского университета. Было обследовано 128 детей с впервые выявленным сахарным диабетом и 15 практически здоровых детей. Из детей с впервые выявленным сахарным диабетом 46,8% (n=60) были мальчики, 53,2% (n=68) – девочки. Средний возраст детей из данной группы составлял 8,7 лет. Уровень глюкозы в периферической крови больных проверялся с помощью глюкометра Diachек (фирма DMS, Объединенные Арабские Эмираты), гликогемоглобин измерялся посредством прибора Clover A1 (Inforgia Co, Южная Корея).

Иммунные исследования проведены в иммунологической лаборатории курса «Иммунология» Азербайджанского медицинского университета.

Моноклональные антитела идентифицированных мембранных маркеров иммунокомпетентных клеток (показатели клеточного иммунитета – Т-лимфоциты (CD3⁺), Т-хелперы (CD4⁺), Т-супрессоры (CD8⁺), натуральные киллеры (CD16/CD56⁺) и показатели гуморального иммунитета В-лимфоциты (CD19⁺)) изучены методом проточной цитометрии на аппарате «Erics XL» («BEKMON COULTER», Франция). При подготовке результатов были использованы методы прямого (FSC), бокового (SSC) рассеивания и программа CellQuest («Becton Dickinson», США).

Определение С-пептида и антител GAD 65, IA-2 проводилось на иммуноферментном планшетном анализаторе StatFax 2100 (Awareness Technology Inc., США) и анализаторе ChemWell 2910 (Awareness Technology Inc., США).

Статистические вычисления были осуществлены с использованием статистической программы Statistika 13.0 (Dell Software, 2016). При нормальном распределении исходных данных был применен критерий t-Стьюдента, при ненормальном распределении – непараметрический метод Колмогорова-Смирнова.

Результаты исследования и их обсуждение. Средний показатель гликогемоглобина у детей с впервые выявленным сахарным диабетом составлял 12,1% (n=128), у детей с длительностью заболевания в несколько лет этот показатель был 10,2% (n=63) (p<0,0001). 44,5% (n=57) впервые выявленных больных поступили с различными степенями кетоацидозного состояния.

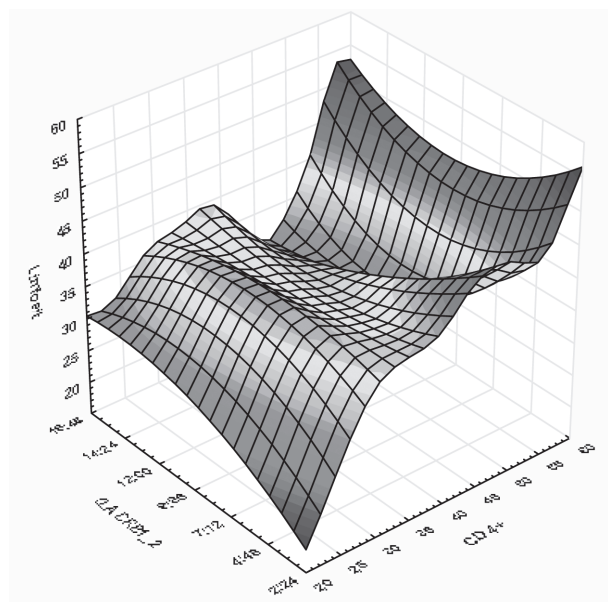


Рис. Корреляционная взаимосвязь между ЧЛА DR B1_2 и CD Т-хелперами, % CD4⁺, лимфоцитами.

Таблица 1.
CD показатели иммунной системы у больных с впервые выявленным сахарным диабетом

Иммунные показатели	Средние показатели первичных больных (n=48)	Контрольная группа (n=15)	Достоверность
Т-лимфоциты, % CD3 ⁺	67,9±1,40 (44-89)	71,8±1,04 (67-82)	p>0,05
Т-хелперы, % CD4 ⁺	39,1±1,01 (25-56)	39,0±1,08 (30-49)	p>0,05
Т-супрессоры, % CD8 ⁺	28,6±0,82 (18-40)	28,1±1,39 (19-38)	p>0,05
В-лимфоциты, % CD19 ⁺	17,0±0,99 (5-31)	14,2±1,1 (7-22)	p<0,05
Т-лимфоциты/киллеры, % CD16 ⁺ /56 ⁺	11,0±0,74 (3-25)	12,2±1,01 (5-18)	p>0,05
Иммунорегуляторный индекс CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,48±0,08 (0,7-4,6)	1,44±0,09 (1,0-2,50)	p>0,05
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,2±0,28 (3,8-12,4)	7,54±0,82 (4-16)	p>0,05
Лимфоциты, %	41±1,22 (22-60)	39,4±2,60 (26,0-63,0)	p>0,05

Таблица 2.

Взаимосвязь между геном DRB1 ЧЛА и CD у детей, больных сахарным диабетом

Показатели	DRB1_2 ЧЛА	Лимфоциты, %	Т-хелперы, % CD4 ⁺
DRB1_1 ЧЛА	r=+0,42 p<0,05		
DRB1_2 ЧЛА		r=-0,29 p<0,05	
GAD 65			r=-0,38 p<0,007

В проведенном исследовании изучена взаимосвязь между показателями CD впервые заболевших детей. Достоверная разница была выявлена только в показателях В-лимфоцитов, % CD19⁺ (p<0,05). Между другими показателями достоверной разницы не отмечено. В обеих группах изучено нормальное распределение показателей CD. В связи с тем, что распределение в группах было нормальным, был использован критерий t-Стьюдента. Ненормальное распределение было только между показателями иммунорегуляторного индекса (ИРИ) CD4⁺/CD8⁺, поэтому для их статистической обработки был применен метод Колмогорова-Смирнова.

Корреляционной взаимосвязи между показателями CD и возрастом у детей с впервые выявленным сахарным диабетом не отмечено, выявлена отрицательная взаимосвязь только между В-лимфоцитом, % CD19⁺ (r=-0,40, p<0,05), лимфоцитами (r=-0,43, p<0,05) и возрастом. У детей с впервые выявленным сахарным диабетом наблюдалась также взаимосвязь между показателями гликогемоглобина HbA_{1c} и Т-лимфоцитом, % CD3⁺ (r=-0,28, p<0,05), Т-супрессором, % CD8⁺ (r=-0,40, p<0,05) (табл. 1).

Таблиця 3.

Корреляційна взаємозв'язок між CD у дітей з вперше виявленим сахарним діабетом

Показатели	Т-лимфоциты, % CD3+	Т-хелперы, % CD4+	Т-супрессоры, % CD8+	В-лимфоциты, % CD19+	ИРИ CD4+/ CD8+	Лейкоциты, 10 ⁹ /л
Т-хелперы, % CD4+	r=+0,53 p<0,0001					
Т-супрессоры, % CD8+	r=+0,37 p<0,05				r=+0,39 p<0,005	
В-лимфоциты, % CD19+			r=-0,33 p<0,02			
Т-лимфоциты/ киллеры, % CD16+/56+		r=-0,34 p<0,019		r=+0,39 p<0,005		r=-0,30 p<0,04
ИРИ CD4+/CD8+			-0,40 p<0,005			
Лимфоциты, %						r=-0,33 p<0,02

В результате проведенного исследования выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь между генотипом DRB1_2 ЧЛА и лимфоцитами (r=-0,29, p<0,05) (табл. 2). Одним из интересных результатов является то, что между Т-хелпером, % CD4+ и антителом GAD 65 отмечена отрицательная взаимосвязь (r=-0,38, p<0,007). Известно, клетки Т-хелпера, % CD4+ активно участвуют в деструкции бета-клеток поджелудочной железы. Повышение уровня антитела GAD 65 приводит к снижению уровня Т-супрессора, % CD4+.

Взаимосвязь между этими показателями приведена в рисунке.

Корреляционная взаимосвязь между CD у детей с впервые выявленным сахарным диабетом представлена в таблице 3.

Выводы. Иммунная система активно участвует в повреждении бета-клеток поджелудочной железы. С другой стороны, у больных сахарным диабетом существует тесная взаимосвязь между генотипом ЧЛА DR B1_2 и лимфоцитами.

Перспективы дальнейших исследований. Планируется дальнейшее изучение особенностей иммунной системы у детей, больных сахарным диабетом.

Литература

1. Aghili B. Altered Suppressor Function of Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes / B. Aghili, A.A. Amirzargar, A. Rajab [et al.] // Iran J Immunol. — 2015. — V. 12, № 4. — P. 240-251.
2. Angstetra E. An indirect role for NK cells in a CD4(+) T-cell-dependent mouse model of type I diabetes / E. Angstetra, K.L. Graham, Y. Zhao [et al.] // Immunol Cell Biol. — 2012. — V. 90, № 2. — P. 243-247.
3. Cox S.L. Emerging roles for B lymphocytes in Type 1 diabetes / S.L. Cox, P.A. Silveira // Expert Rev Clin Immunol. — 2009. — № 5. — P. 311-324.
4. Fillatreau S. Pathogenic functions of B cells in autoimmune diseases: ИНФ-γ production joins the criminal gang / S. Fillatreau // Eur J Immunol. — 2015. — V. 45, № 4. — P. 966-970.
5. Glisic S. Genetic association of HLA DQB1 with CD4+CD25+(high) T-cell apoptosis in type 1 diabetes / S. Glisic, M. Klinker, J. Waukau [et al.] // Genes Immun. — 2009. — V. 10, № 4. — P. 334-340.
6. Luan L. Anti-serum with anti-autoantibody activity decreases autoantibody-positive B lymphocytes and type 1 diabetes of female NOD mice / L. Luan, R. Xue, C. Lu [et al.] // Autoimmunity. — 2015. — № 3. — P. 1-10.
7. Martinuzzi E. The frequency and immunodominance of islet-specific CD8+ T-cell responses change after type 1 diabetes diagnosis and treatment / E. Martinuzzi, G. Novelli, M. Scotto [et al.] // Diabetes. — 2008. — V. 57, № 5. — P. 1312-1320.
8. O'Neill S.K. Change you can B (cell) eive in recent progress confirms a critical role for B cells in type 1 diabetes / S.K. O'Neill, E. Liu, J.C. Cambier // Curr Opin Endocrinol. — 2009. — № 16. — P. 293-298.
9. Wong F.S. Activation of insulin-reactive CD8 T-cells for development of autoimmune diabetes / F.S. Wong, L.K. Siew, G. Scott [et al.] // Diabetes. — 2009. — V. 58, № 5. — P. 1156-1164.

УДК 616.43

ОСОБЛИВОСТІ ІМУННОЇ СИСТЕМИ У ХВОРИХ ДІТЕЙ З ВПЕРШЕ ВІЯВЛЕНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ ТА ЙОГО ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК З ГЕНОМОМ HLA DRB1

Ахмедов Г. А., Несруллаєва Г. М., Мамедова В. Р., Ібрагімова Ш. Г.

Резюме. Описано взаємозв'язок клітинної імунної системи дітей з вперше виявленим цукровим діабетом і дітей контрольної групи, а саме взаємозв'язок між показниками Т і В-лімфоцитів і геномом HLA DRB1. Була виявлена достовірна різниця між показником CD19+, В-лімфоцитом і у контрольної групи (p<0,05). А також була виявлена негативна кореляція між глікованим гемоглобіном і показниками CD3+ Т-лімфоцитів (r=-0,28, p<0,05) і CD8+ Т-супрессором (r=-0,40, p<0,05). Була відзначена негативна кореляція між геномом

HLA DRB1_2 і кількістю лімфоцитів ($r=-0,29$, $p<0,05$). Існує негативний взаємозв'язок між CD4+ Т-хелпером і антитілом GAD65 ($r=-0,38$, $p<0,007$). Аналіз між субпопуляціями Т-клітинної системи показав тісний зв'язок між цими показниками.

Ключові слова: цукровий діабет, Т-лімфоцити, лейкоцитарна антигенна система людини.

УДК 616.43

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ ДЕТЕЙ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С ГЕНОМОМ HLA DRB1

Ахмедов Г. А., Несруллаева Г. М., Мамедова В. Р., Ибрагимова Ш. Г.

Резюме. Описана взаимосвязь клеточной иммунной системы детей с впервые выявленным сахарным диабетом и детей контрольной группы, а именно взаимосвязь между показателями Т- и В-лимфоцитов и геномом HLA DRB1. Была выявлена достоверная разница между показателем CD19+, В-лимфоцитом и у контрольной группы ($p<0,05$). А также была выявлена отрицательная корреляция между гликированным гемоглобином и показателями CD3+ Т-лимфоцитов ($r=-0,28$, $p<0,05$) и CD8+ Т-супрессором ($r=-0,40$, $p<0,05$). Была отмечена отрицательная корреляция между геномом HLA DRB1_2 и количеством лимфоцитов ($r=-0,29$, $p<0,05$). Существует отрицательная взаимосвязь между CD4+ Т-хелпером и антителом GAD65 ($r=-0,38$, $p<0,007$). Анализ между субпопуляциями Т-клеточной системы показал тесную связь между этими показателями.

Ключевые слова: сахарный диабет, Т-лимфоциты, лейкоцитарная антигенная система человека.

UDC 616.43

FEATURES OF THE IMMUNE SYSTEM IN CHILDREN WITH NEWLY DIAGNOSED DIABETES MELLITUS AND ITS RELATIONSHIP WITH THE GENOME HLA DRB1

Akhmedov G. A., Nesrullaeva G. M., Mamedova V. R., Ibrahimova Sh. G.

Abstract. *The purpose of the study* is to identify the relationship between the immune system and the genome of HLA DRB1 in children with diabetes.

Methods. Were examined patients with diabetes who applied to the endocrinology Department of the Children clinical hospital No. 6 and in the 2nd pediatric Department of Azerbaijan medical University. Were examined in 128 children with newly diagnosed diabetes mellitus and 15 healthy children. From children with newly diagnosed diabetes 46,8% ($n=60$) were boys, 53.2 per cent ($n=68$) were females. The average age of this group was 8.7 years. The level of glucose in the peripheral blood of patients was tested using the blood glucose meter Diacheck (firm DMS, United Arab Emirates), glycohemoglobin was measured by means of an apparatus A1 Clover (Infopia Co., South Korea).

Immune studies were conducted in the immunology laboratory of the course «Immunology» of the Azerbaijan medical University.

Monoclonal antibodies are identified by membrane markers of the immune cells (indicators of cell-mediated immunity – T-lymphocytes (CD3+), T helper (CD4+), T suppressors (CD8+), natural killers (CD16/CD56+) and humoral immunity b-lymphocytes (CD19+)) were studied by flow cytometry using the «Epics XL» («COULTER BECKMON», France). In the preparation of the results were used methods of direct (FSC), side (SSC) scattering, and the program CellQuest («Becton Dickin Son», USA).

Determination of C-peptide and antibodies to GAD 65, IA-2 was performed on immunofermental plansantherm analyzer StatFax 2100 (Awareness Technology Inc., USA) and the analyzer ChemWell 2910 (Awareness Technology Inc., USA).

Results. The average glycohemoglobin in children with newly diagnosed diabetes mellitus was 12.1% ($n=128$) in children with disease duration of several years, the figure was 10.2 percent ($n=63$) ($p<0.0001$). 44,5% ($n=57$) new patients enrolled with various degrees ketoacidosis state.

Were revealed a significant difference between the index of CD19+-lymphocytes and in the control group ($p<0.05$). And there was revealed a negative correlation between glycerolysis hemoglobin and indicators of CD3+ T lymphocytes ($r=-0,28$, $p<0.05$) and CD8+ T-suppressor ($r=-0,40$, $p<0,05$). Was marked negative correlation between genome HLA DRB1_2 and the number of lymphocytes ($r=-0,29$, $p<0,05$). There is a negative correlation between CD4+ T-helper and antibody GAD65 ($r=-0,38$, $p<0,007$). Analysis between subpopulations of the T-cell system showed a close relationship between these indicators.

Conclusions. The immune system is actively involved in the damage of beta cells of the pancreas. On the other hand, in patients with diabetes there is a close relationship between the genotype of HLA DR B1_2 and lymphocytes.

Keywords: diabetes mellitus, T-lymphocytes, leukocyte antigen system.

Рецензент – проф. Похилько В. І.

Стаття надійшла 14.12.2016 року