

Итоги двадцатилетних исследований иммунитета в доклиническую фазу развития сахарного диабета 1-го типа у детей по Программе ИДСД: 1. Лейкоцитарный состав и иммунофенотип лимфоцитов крови

К.П. Зак,
В.В. Попова,
М.А. Грузов,
Б.М. Хоменко,
В.В. Афанасьева,
Т.Н. Малиновская,
Е.Н. Тронько,
Я.А. Саенко,
Л.А. Смолина,
Т.А. Семионова,
А.В. Куликовская

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

Резюме. Цель. Исследовать лейкоцитарный состав и иммунофенотип лимфоцитов крови у нормогликемических детей с отягощенной наследственностью, находящихся в асимптомной фазе развития сахарного диабета 1-го типа (СД1), которая устанавливалась на основании определения титра аутоантител к панкреатическим антигенам островков Лангерганса (ОАА). **Методы.** Обследованы 457 здоровых нормогликемических детей с отягощенной наследственностью по СД1, внесенных в Реестр отечественной программы ИДСД («Иммунитет в доклиническую стадию развития сахарного диабета»), родственники первой линии которых больны СД1. Детей разделили на четыре подгруппы: 1 — здоровые дети, без генетической склонности к СД1 — контроль; 2 — ОАА-позитивные дети, у которых при двукратном определении был выявлен одновременно повышенный титр не менее двух видов ОАА, преимущественно аутоантител к протеину тирозинфосфатазы, или (другое

* Адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна. E-mail: zdovado@ukr.net

© К.П. Зак, В.В. Попова, М.А. Грузов, Б.М. Хоменко, В.В. Афанасьева, Т.Н. Малиновская, Е.Н. Тронько, Я.А. Саенко, Л.А. Смолина, Т.А. Семионова, А.В. Куликовская

Оригінальні дослідження

название этого вида аутоантител — аутоантитела к протеину-2 инсулиномы — IA-2A) антител к декарбоксилазе глютаминовой кислоты (GADA); 3 — OAA-негативные пациенты с нормальной гликемией и с отсутствием при двукратном определении одновременно повышенного титра двух OAA; 4 — больные СД1. Определение лейкоцитарной формулы проводили традиционно и гематологическим анализатором, иммунофенотип лимфоцитов (CD3+T, CD4+T, CD8+T, CD20+, CD56+) — проточной цитометрией (FACS-анализ) и титра OAA (IAA — аутоантитела к антигенам инсулина, GADA и IA-2A) — радиоиммунным методом. **Результаты.** У нормогликемических OAA-позитивных детей отмечается выраженное изменение как естественного (нейтрофилопения, уменьшение числа и активности ЕК-клеток (CD56+ лимфоцитов и БГЛ)), так и адаптивного иммунитета (снижение относительного и абсолютного числа CD3+T, CD4+T, CD8+T и, особенно, иммунорегуляторной субпопуляции CD4+T-клеток) по сравнению как с OAA-негативной группой детей с отягощенной наследственностью ($p < 0,05$), так и с группой здоровых нормогликемических детей, без генетических осложнений ($p < 0,001$). **Заключение.** В асимптомную, доклиническую фазу развития СД1 у детей происходят выраженные изменения естественного и адаптивного иммунитета, что созвучно с новой концепцией о патогенезе и лечении СД1, заключающейся в том, что терапию СД1 следует начинать не в стадии резкого снижения массы бета-клеток и секреции инсулина, т.е. появления патологических клинических признаков, а в асимптомную фазу, когда аутоиммунный процесс в островках только начался.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа, лейкоцитарный состав, иммунофенотип лимфоцитов крови.

Открытие аутоантител к островкам Лангерганса (ОЛ) поджелудочной железы (OAA) [25, 26] имело огромное значение как для достоверного установления доклинической скрытой стадии возникновения сахарного диабета 1-го типа (СД1), т.е. наиболее раннего предсказания клинической стадии заболевания, так и для изучения иммунных механизмов, предшествующих клинической манифестации СД1 в асимптомную фазу развития заболевания в организме еще здорового человека [24, 45], что до недавнего времени было возможно осуществлять только на животных [9]. Однако, как показали многочисленные исследования, данные, полученные на лабораторных животных, в основном на грызунах, при всей их научной ценности, не могут быть полностью экстраполированы на пациентов с сахарным диабетом в связи с уникальной видовой специфичностью их иммунной системы, особенностями клинического течения, различной продолжительностью жизни, социальными факторами и др. [27].

Собственные исследования функции естественного и адаптивного иммунитета в различные периоды развития СД1 были начаты авторами статьи в конце 1996 года, более двадцати лет тому назад [12]. В октябре 1997 г. впервые в Украине в ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины» была создана программа «Иммуни-

тет в доклиническую стадию развития СД1» (ИДСД) по изучению доклинической стадии развития СД1 с использованием OAA, подобная программам США и стран ЕС [3, 6, 14-18].

Согласно плану исследований по программе ИДСД решались две основные задачи. Первая — освоение и внедрение впервые в клиническую практику в Украине методов определения OAA, а именно: аутоантител к инсулину (IAA), к декарбоксилазе глютаминовой кислоты (GADA) и к протеину тирозинфосфатазы, или (другое название этого вида аутоантител) аутоантител к протеину-2 инсулиномы (IA-2A) с целью их использования как теста для диагностики асимптомной фазы развития СД1 и прогнозирования риска его развития у нормогликемических детей. Публикации, касающиеся этого вопроса, недавно были обобщены в нашем обзоре [3]. Вторая — изучение ряда показателей естественного иммунитета (содержание, ультраструктура и функция нейтрофилов, моноцитов и ЕК-клеток), адаптивного иммунитета (общее содержание лимфоцитов в периферической крови, ультраструктура и функции клеток различного иммунофенотипа: CD3+T, CD4+T, CD8+T, CD20+ и CD56+), а также содержания различных видов цитокинов (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО α , и ИФН γ), хемокинов (ИЛ-8 и ИЛ-16), адипокинов (лептина и адипонектина) в периферической крови

(ПК) детей разных групп: нормогликемических «здоровых», ОАА-негативных, ОАА-позитивных и с уже диагностированным СД1.

Настоящее сообщение является только фрагментом этих исследований, в котором обобщены и обсуждены данные, как уже описанные в предыдущих наших работах [4, 5, 8, 10-13], так и неопубликованные новые результаты.

Материалы и методы

Предварительное клинико-иммунологическое обследование было проведено у 561 ребенка разного пола в возрасте 7-15 лет. Для дальнейшего обследования были отобраны 457 нормогликемических детей без каких-либо видимых воспалительных, аллергических или онкологических заболеваний, которые внесены в Реестр, защищенный авторским правом — патент № 27420. После тестирования на наличие ОАА (IAA, GADA, IA-2A) дети, для которых была установлена отягощенная наследственность (родственники первой линии: отцы, матери и сибсы, больные СД1), были разделены на две подгруппы: 1) ОАА-позитивные, у которых определялся повышенный титр не менее чем двух ОАА (особенно GADA+IA-2A), и ОАА-негативные, у которых даже при повторном исследовании повышенный титр ни одного из трех видов аутоантител не выявлялся. Группа контроля состояла из здоровых нормогликемических ОАА-негативных детей без наследственной отягощенности по СД1 и без нарушенной толерантности к глюкозе.

Одновременное исследование лейкоцитарного состава крови и количества лимфоцитов различного иммунофенотипа было проведено проспективно у одних и тех же пациентов в динамике (275 детей), разделенных на 4 подгруппы: 1) здоровые, ОАА-отрицательные с нормогликемией, без генетической предрасположенности к СД1 (n=72); 2) нормогликемические, с генетической предрасположенностью к СД1, но ОАА-отрицательные (n=92); 3) ОАА-позитивные нормогликемические, с генетической предрасположенностью к СД1 (n=55); 4) ОАА-позитивные дети, у которых впоследствии развился СД1 (n=56). Клинический диагноз СД1 выставляли согласно критериям диагностики СД1 ВОЗ и IDF [31].

Общее количество лейкоцитов подсчитывали традиционным методом в счетной камере либо

с помощью гематологического анализатора. Идентификацию и количество различных видов лейкоцитов (лейкоцитарную формулу) проводили в мазках ПК, окрашенных по Паппенгейму, с использованием фосфатного или какодилатного буфера (рН 6,85) на 200 клетках. В ряде случаев в отдельную группу выделяли большие гранулодержащие лимфоциты (БГЛ), считающиеся морфологическим гомологом естественных клеток-киллеров (ЕК-клеток) [7].

Содержание лимфоцитов различного иммунофенотипа определяли методом проточной цитометрии с использованием лазерного цитофлуориметра FACStar plus Becton Dickinson (США). Мононуклеары из гепаринизированной ПК выделяли методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности фиколл-изопака или фиколл-уротраста по А. Воуим. В отдельных случаях проводили дальнейшее их инкубирование в CO₂-инкубаторе в течение 1 ч для устранения моноцитов. Поверхностные антигены лимфоцитов, экспрессирующих CD3 (все Т-лимфоциты), CD4 (Т-индукторы/хелперы), CD8 (Т-супрессоры/киллеры), CD20 (В-лимфоциты) и CD56 (ЕК-клетки), метили моноклональными антителами, которые для визуализации были конъюгированы с флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC) или фикоэритрином (PE) фирм Becton Dickinson (США), Dako Cytomation (Дания) или отечественного производства Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины. На цитофлуориметре FACS tar plus анализировали 25000 клеток в каждой пробе.

Статистическую обработку полученных данных проводили методом вариационной статистики с помощью стандартного пакета статистического расчета по программе Libre Office Calc. Достоверность различий средних величин определяли по парному критерию t Стьюдента. Различие считалось достоверным при p<0,05.

Результаты и их обсуждение

Лейкоцитарный состав ПК. В лейкоцитарной формуле, как видно из **табл. 1** и **рис. 1**, наиболее выраженные изменения наблюдались со стороны относительного и абсолютного количества нейтрофилов в ПК у ОАА-позитивных детей и больных СД1, как по отношению к группе здоровых детей (p<0,01), так и у ОАА-позитивных

Оригинальні дослідження

Таблиця 1. Общее количество лейкоцитов и лейкоцитарная формула в ПК здоровых, ОАА-негативных, ОАА-позитивных и больных СД1 детей ($M \pm m$)

Типы лейкоцитов	Здоровые дети	ОАА-дети	ОАА+ дети	Больные дети
Количество лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	6,63 \pm 0,16	5,88 \pm 0,17*	5,20 \pm 0,18*	5,21 \pm 0,15*
Нейтрофилы палочкоядерные, %	2,20 \pm 0,14	2,06 \pm 0,26	2,61 \pm 0,24	2,40 \pm 0,17
Нейтрофилы палочкоядерные, $\times 10^9/\text{л}$	0,14 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02	0,14 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01
Нейтрофилы сегментоядерные, %	54,02 \pm 0,12	52,8 \pm 1,40*	50,8 \pm 0,13**	50,1 \pm 0,09**
Нейтрофилы сегментоядерные, $\times 10^9/\text{л}$	3,89 \pm 0,12	3,09 \pm 0,13	2,7 \pm 0,13**+	2,3 \pm 0,10**
Базофилы, %	0,27 \pm 0,05	0,23 \pm 0,07	0,18 \pm 0,03*	0,45 \pm 0,08*
Базофилы, $\times 10^9/\text{л}$	0,02 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	0,02 \pm 0,05	0,27 \pm 0,01
Эозинофилы, %	2,66 \pm 0,15	3,78 \pm 0,45*	3,56 \pm 0,19*	3,7 \pm 0,28**
Эозинофилы, $\times 10^9/\text{л}$	0,16 \pm 0,01	0,21 \pm 0,02	0,18 \pm 0,02	0,21 \pm 0,01
Моноциты, %	5,81 \pm 0,21	7,1 \pm 0,45*	10,64 \pm 0,54**+	7,5 \pm 0,32**
Моноциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,36 \pm 0,02	0,40 \pm 0,03	0,55 \pm 0,03**+	0,43 \pm 0,02*
Лимфоциты, %	35,82 \pm 0,99	34,1 \pm 1,41	29,85 \pm 1,36**+	33,1 \pm 1,04
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	2,08 \pm 0,09	1,92 \pm 0,07*	1,52 \pm 0,07**	1,80 \pm 0,07

Примечание: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ в сравнении со здоровыми детьми; + — $p < 0,05$ в сравнении ОАА-позитивных и ОАА-негативных детей.

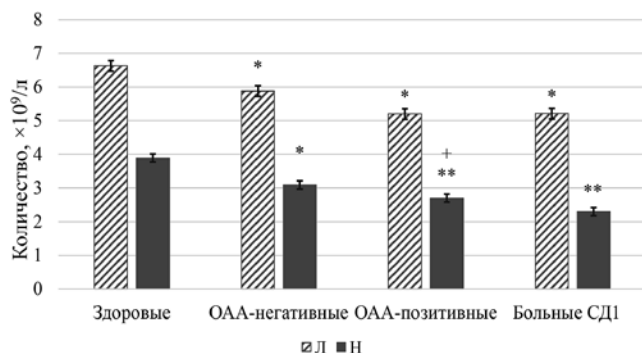


Рис. 1. Общее содержание всех видов лейкоцитов (Л) и абсолютное число сегментоядерных нейтрофилов (Н) в ПК детей: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ в сравнении со здоровыми детьми; + — $p < 0,05$ в сравнении ОАА-позитивных и ОАА-негативных детей.

тивных по отношению к ОАА-негативным детям ($p < 0,05$). Следует также отметить, что и у отдельных ОАА-негативных детей также отмечалось некоторое уменьшение абсолютного числа нейтрофилов (рис. 1), которое, по-видимому, объясняется тем, что исследование лейкоцитарной формулы проводилось преимущественно в ранний период после тестирования ОАА. А из последних работ [25] следует, что у некоторых ОАА-отрицательных детей возникновение повышенного титра некоторых ОАА, а затем, воз-

можно, развитие СД1 может происходить через довольно длительное время после отрицательного результата.

Нейтрофилопения у детей с СД1 была нами описана еще в 2002 г. [8]. В дальнейшем было установлено, что нейтрофилопения может предшествовать появлению клинических признаков диабета, т.е. нередко наблюдается у ОАА-позитивных нормогликемических детей в асимптомную фазу заболевания [11]. В 2013 году большая группа авторов [41] из различных клинических центров, используя метод подсчета нейтрофилов с помощью гематологических анализаторов, полностью подтвердила наши данные. В редакционной статье журнала «Diabetes», в которой было опубликовано это сообщение, подчеркивается [38], что выявленные данные A. Valle et al. (2010) о снижении содержания нейтрофилов в ПК больных СД1 являются значительным открытием, «сюрпризом», позволяющим думать, что в патогенезе ювенильного СД1 важное значение имеет не только адаптивный иммунитет, но и клеточные элементы естественного иммунитета, что подтверждается и другими публикациями [4, 22, 28, 34].

Необходимо также подчеркнуть, что у многих ОАА-позитивных детей, у которых в дальнейшем возник СД1, а также у других пациентов с впервые выявленным заболеванием, но не обследуемых на наличие ОАА, наряду со снижением числа нейтрофилов в ПК выявляли выраженное изменение их ультраструктуры в виде деструкции цитоплазматических пероксидазоположительных гранул и повышенной вакуолизации цитоплазмы (рис. 2). Это дает основание считать, что наряду со снижением числа нейтрофилов при СД1 происходит и изменение их функции [3]. Вместе с тем выявленные изменения числа и функции нейтрофилов могут служить одним из объяснений начального механизма нарушения сосудистых осложнений при СД1, так как имеются убедительные доказательства, что этот вид лейкоцитов играет значительную роль в функционировании сосудистой стенки, особенно капилляров [2], а также ослабления у больных СД1 фагоцитозной [20] и нефагоцитозной [43] активности к патогенам.

Несомненным подтверждением существенной роли нейтрофилов в патогенезе СД1 являются также последние сообщения о том, что введение больным гранулоцитарного колони-

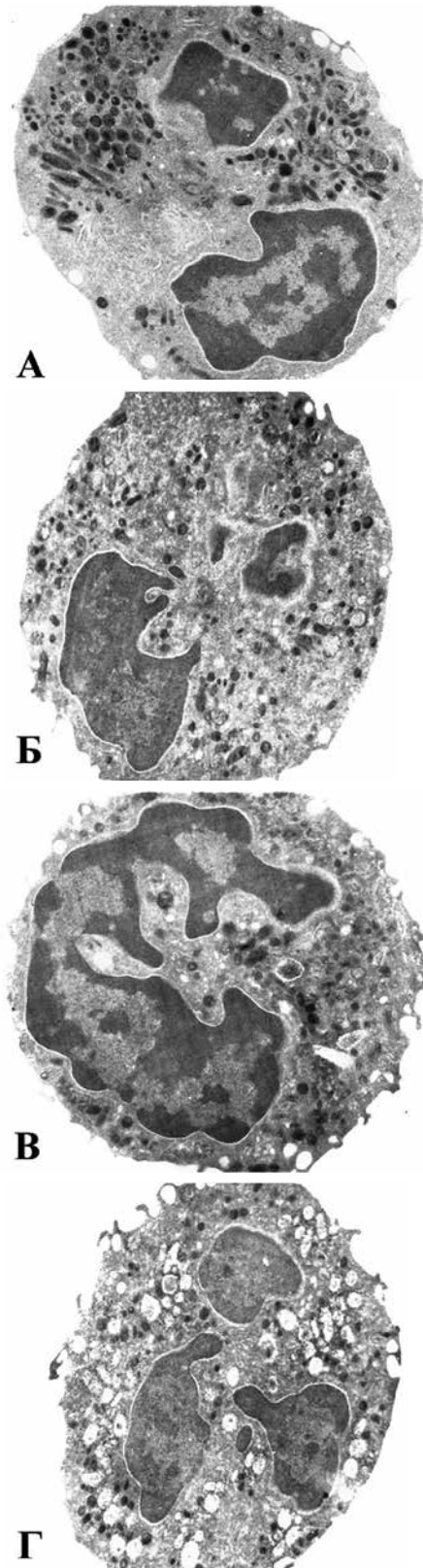


Рис. 2. Ультраструктура нейтрофилов крови детей: А — здоровых, Б — нормогликемических, ОАА-негативных с отягощенной наследственностью, В — нормогликемических с отягощенной наследственностью, но ОАА-позитивных, Г — больных СД1 через 3 года после начала заболевания, $\times 8000$.

стимулирующего фактора (G-CSF) совместно с низкими дозами антиtimoцитарного глобулина сохраняет у них в течение длительного времени бета-клеточную функцию (секрецию С-пептида) и нормализует созревание нейтрофилов в костном мозге, повышая уровень нейтрофилов в ПК [29].

Анализ вышеуказанных данных дает нам право считать, что установление нейтрофилопении у нормогликемических детей с генетической склонностью к СД1 может служить одним из дополнительных доступных биомаркеров определения риска развития СД1, а после манифестации последнего дает возможность судить о тяжести его течения.

Для ОАА-позитивных детей и больных с начальной стадией СД1 характерна также умеренная лимфоцитопения, что, по-видимому, является следствием снижения в циркуляции отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов и БГЛ/CD56+ клеток (табл. 2, 3).

Вместе с тем в мазках крови у отдельных ОАА-позитивных детей и больных начальным СД1 отмечалось некоторое увеличение числа плазматизированных лимфоцитов — 2-3 на 200 подсчитанных лейкоцитов.

Таблица 2. Относительное и абсолютное количество БГЛ в ПК здоровых, ОАА-отрицательных, ОАА-позитивных и больных СД1 детей ($M \pm m$)

Содержание БГЛ	Здоровые дети	ОАА-дети	ОАА+ дети	Больные дети
Относительное, %	2,90 \pm 0,30	1,41 \pm 0,20*	1,34 \pm 0,26*	1,39 \pm 0,29*
Абсолютное, $\times 10^9/\text{л}$	0,18 \pm 0,01	0,12 \pm 0,06	0,18 \pm 0,03	0,08 \pm 0,01*

Примечание.* — $p < 0,05$ в сравнении со здоровыми детьми.

Таблица 3. Относительное и абсолютное содержание лимфоцитов различного иммунофенотипа в ПК здоровых, ОАА-негативных, ОАА-позитивных и больных СД1 детей ($M \pm m$)

Типы лейкоцитов	Здоровые дети	ОАА-дети	ОАА+ дети	Больные дети
CD3+, %	62,81 \pm 1,71	52,40 \pm 1,42*	50,69 \pm 1,70*	55,54 \pm 1,72*
CD3+, $\times 10^9/\text{л}$	0,91 \pm 0,06	0,98 \pm 0,05	0,82 \pm 0,05*	0,84 \pm 0,04*
CD4+, %	40,87 \pm 0,69	34,79 \pm 1,03*	32,69 \pm 0,65*	36,84 \pm 0,67*
CD4+, $\times 10^9/\text{л}$	0,66 \pm 0,06	0,65 \pm 0,04	0,53 \pm 0,01**	0,58 \pm 0,03
CD8+, %	22,78 \pm 0,93	20,67 \pm 0,65	19,69 \pm 0,97	20,77 \pm 0,60
CD8+, $\times 10^9/\text{л}$	0,39 \pm 0,04	0,39 \pm 0,02	0,32 \pm 0,02**	0,29 \pm 0,02*
CD20+, %	12,27 \pm 0,61	12,16 \pm 0,48	10,19 \pm 0,36**	9,35 \pm 0,41*
CD20+, $\times 10^9/\text{л}$	0,15 \pm 0,02	0,18 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01
CD56+, %	14,14 \pm 0,77	10,86 \pm 0,92*	10,49 \pm 0,81*	9,71 \pm 0,77*
CD56+, $\times 10^9/\text{л}$	0,22 \pm 0,02	0,18 \pm 0,03	0,17 \pm 0,02*	0,18 \pm 0,01*

Примечание.* — $p_1 < 0,05$ в сравнении со здоровыми детьми; + — $p_2 < 0,05$ в сравнении ОАА-позитивных и ОАА-негативных детей.

Оригінальні дослідження

В то же время, как видно из табл. 1, относительное и абсолютное содержание моноцитов в ПК ОАА-положительных детей и больных СД1 повышено ($p < 0,05-0,01$), т.е. изменения количества нейтрофилов и лимфоцитов имеют противоположный характер. Обнаруженные нами данные ассоциируют с результатами работы [11], в которой показано, что моноциты/макрофаги являются, с одной стороны, главными продуцентами провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО α), а с другой — значительное повышение их количества наблюдается как при предиабете, так и при СД1.

Содержание лимфоцитов различного иммунофенотипа. При обобщении результатов многочисленных прежних наших исследований, а также новых данных, выполненных по Программе ИДСД [8, 10, 11, 14-16], приведенных в **таблице 3**, было установлено, что у ОАА-положительных детей и больных СД1 наблюдается умеренное, но достоверное ($p < 0,05$) уменьшение общего количества Т-лимфоцитов (CD3+Т-клеток) и их субпопуляций: CD8+Т и, особенно, иммунорегуляторных CD4+Т-клеток ПК по сравнению со здоровыми нормогликемическими и ОАА-отрицательными детьми ($p < 0,05$), а также разница в показателях между ОАА-негативными и ОАА-положительными детьми ($p < 0,05$).

Проведенные нами [1, 11, 19] электронномикроскопические и ультрацитохимические исследования обобщенной популяции CD4+Т-клеток, выделенной методом проточной цитометрии (FACS-анализатором), показали, что изолированная популяция CD4+Т-клеток ультраструктурно и функционально неоднородна как у нормогликемических, так и у больных детей. У детей, больных СД1, по сравнению со здоровыми, были выявлены более значительные субмикроскопические изменения, особенно, как видно из **рис. 3**, телец Голла (стрелки), в которых содержалось увеличенное количество сателлитных гранул и наблюдалось повышение активной кислой фосфатазы, что созвучно с последними прецизионными иммунологическими исследованиями CD4+Т-клеток.

Так, иммунологическими исследованиями [35] обнаружено, что популяция CD4+Т-клеток функционально неоднородна, так как экспрессирует различные мембранные антигены. Особое значение придается субпопуляции CD4+CD25+Foxp3+ клеток (Foxp3 — фактор

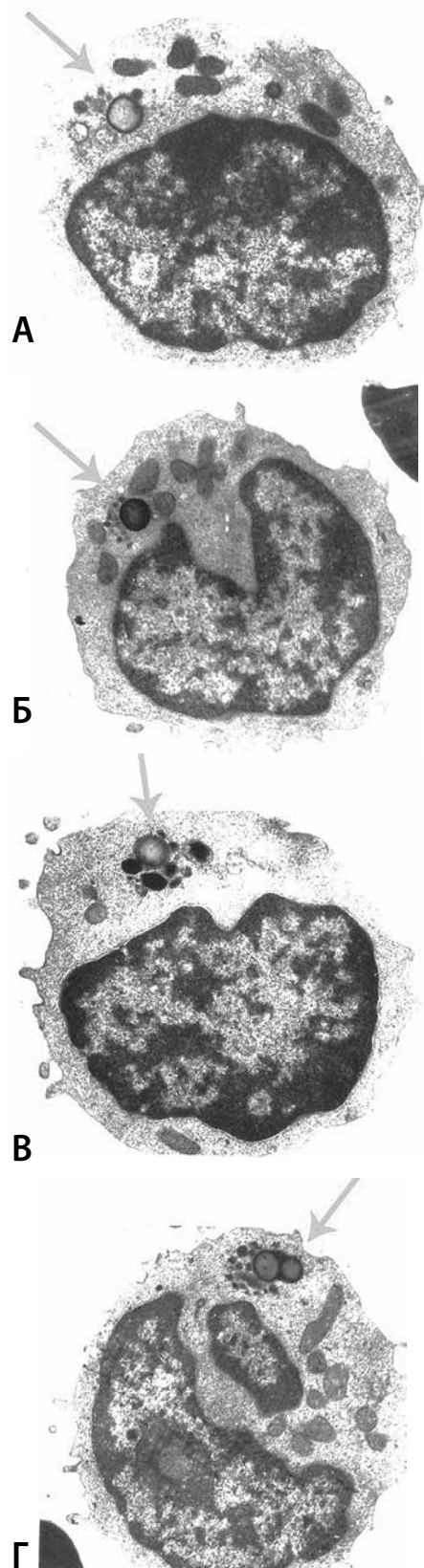


Рис. 3. Ультраструктура субпопуляции CD4+Т-лимфоцитов у детей — кластер, содержащий тельца Голла и гранулы-спутники (стрелки): А — здоровых, Б — ОАА-негативных, В — ОАА-положительных, Г — больных СД1, $\times 8000$.

транскрипции клеток, регулируемых специальным геном). В иммунорегуляторной субпопуляции Т-лимфоцитов CD4+ различают субпопуляции: CD45RO — клетки памяти (мемориальные), CD45RA — наивные клетки и CD4RARO — активированные клетки. Причем в работе [35] у больных СД1 наблюдали резкое снижение количества активированных CD4+ CD25+ CD45+ Т-клеток, что дает основание этим авторам, учитывая взаимозависимость этой субпопуляции с продукцией С-пептида, считать, что она играет ключевую роль в патогенезе СД1.

Согласно другим данным [23], полученным с помощью метода негативной селекции различных видов Т-лимфоцитов ПК, у больных СД1 снижено количество активированных мемориальных ТМ-клеток (CD4+CD25+CD45RO).

При исследовании панели генов, участвующих в функционировании CD4+Т-reg лимфоцитов (CD4+CD25+CD127+ клеток), было обнаружено [36], что у детей с впервые выявленным СД1, по сравнению со здоровыми детьми, более выражено снижение экспрессии генов Foxp3 и рецептора ФНО α , и это позволило авторам предположить, что при СД1 более значительно нарушается функция регуляторной субпопуляции CD4+ клеток, чем их содержание в ПК.

Вместе с тем показано [40], что субпопуляция CD4+CD25+Foxp3+Т-клеток секретирует значительное количество иммунорегуляторного цитокина ИЛ-10, который обладает выраженными антидиабетическими свойствами.

Данные, полученные в работах [5, 8, 11, 19, 21], во многом созвучны с результатами наших электронно-микроскопических и ультрацитохимических исследований, в которых показано, что выявленное снижение общего содержания популяции CD4+Т-лимфоцитов и изменение их ультраструктуры (рис. 2) в ПК у детей в доклинический и ранний клинический период СД1 обусловлено изменением не только их количества, но и функции.

Совсем недавно благодаря прогрессу в иммунологии и использованию современных методов молекулярной биологии в ПК здорового человека и больного СД1 была обнаружена новая субпопуляция CD4+ клеток [32, 39], представляющая собой циркулирующие мемориальные фолликулярные клетки, экспрессирующие рецептор к хемокину CXCR5, который способствует миграции Т-клеток к В-клеткам, находящимся

в герминальных центрах фолликулов лимфатических узлов, а также ICOS (индуцирующий ко-стимулятор) и PD-1 (иммуноингибиторный рецептор) CD4+CXCR5+PD-1+ICOS+ клеток. Эта субпопуляция CD4+CXCR5+PD-1+ICOS+ клеток получила название «фолликулярных хелперных клеток» (Тfh). Показано [30], что эти Тfh-клетки участвуют как хелперы в механизмах образования аутоантител В-клетками, в том числе и аутоантител к ОЛ, а также секретируют большое количество ИЛ-21.

Было обнаружено значительное повышение содержания Тfh-клеток в ПК ОАА-позитивных детей и больных с начальной стадией СД1 по сравнению со здоровыми и ОАА-негативными детьми. Причем повышенный уровень Тfh отмечался только при позитивности не менее чем к двум (IA-2A и GADA) или трем ОАА (IAA, IA-2A и GADA) [42]. На основании полученных данных высказывается мнение о значительной роли Тfh-клеток в патогенезе СД1 у человека и о возможном использовании Тfh-клеток как биомаркера предсказания риска развития СД1, а также разработки новых способов иммунной терапевтической интервенции при СД1 у человека [30, 42].

Учитывая вышеизложенные сенсационные сообщения, можно допустить, что наблюдаемое нами снижение абсолютного числа CD4+Т-клеток в ПК больных предиабетом и СД1 обусловлено миграцией одной из их субпопуляций (Тfh-клеток) из циркуляции в лимфатические узлы.

Естественно, для окончательного выяснения такого методически очень сложного вопроса — какая же из субпопуляций CD4+Т-клеток является ведущей в деструкции бета-клеток и развитии СД1 — необходимы дальнейшие исследования.

У ОАА-позитивных детей и у тех из них, у кого в дальнейшем развился СД1, наблюдается, как видно из табл. 3, достоверное снижение относительного ($p < 0,05$) и абсолютного ($p < 0,01$) количества CD56+ клеток в ПК по сравнению с нормогликемическими детьми, что подтверждается и цитологически при подсчете больших гранулодержащих лимфоцитов, являющихся гомологом ЕК-клеток.

Полученные результаты согласуются с нашими предыдущими [7, 11], а также других авторов [37], в которых показано, что для больных СД1 характерно снижение как содержания, так и цитотоксической функции ЕК-клеток.

Оригінальні дослідження

Как известно, ЕК-клетки, являясь одними из основных клеток-эффекторов естественного иммунитета, создающих первую линию защиты организма от патогенов, препятствуют развитию бактериальных, вирусных, грибковых и онкологических заболеваний до того времени, пока не вступает в действие специфическая адаптивная Т-система и появляются мемориальные Т-лимфоциты, обладающие целенаправленными антимикробными свойствами.

Интересно отметить, что в более ранних наших публикациях было описано значительное снижение количества ЕК-клеток в ПК и у ряда родственников первой линии больных СД1 детей, особенно отцов [7]. Эти данные наводят на мысль, что снижение количества ЕК-клеток в ПК у части детей, больных СД1, может быть обусловлено генетическим дефектом ЕК-системы, что может способствовать более агрессивному течению вирусных инфекций, характерных для детей (вирус Коксаки, герпес, краснуха, ветряная оспа и др.), которые, как сейчас предполагают, могут быть одной из причин развития и прогрессирования СД1 [44].

Следовательно, снижение числа и функции ЕК-клеток, как и нейтрофилопения, указывает на ослабление естественной иммунной защиты организма у человека, которая может провоцировать развитие СД1 еще в асимптомную, доклиническую фазу.

Таким образом, аутоиммунный процесс в ОЛ сопровождается выраженными изменениями как естественного, так и адаптивного иммунитета в организме человека задолго до появления клинических признаков СД1, что дает основание поддерживать недавно выдвинутую концепцию известного диабетолога E. Bonnifacio et al. [33], заключающуюся в том, что лечение больных СД1 и, особенно, предупреждение развития этого заболевания следует начинать не в фазе уже развившегося заболевания, т. е. когда большинство бета-клеток уже разрушено, а в асимптомной, доклинической фазе.

Выводы

Установлено, что у нормогликемических детей с отягощенной наследственностью по СД1, позитивных не менее чем к двум видам ОАА (GADA и IA-2A), в асимптомную, доклиническую стадию развития СД1 отмечается выраженное изменение показателей как естественного (нейтрофило-

пения, снижение числа и активности ЕК-клеток), так и адаптивного иммунитета (снижение относительного и абсолютного числа CD3+T, CD8+T и, особенно, иммунорегуляторной субпопуляции CD4+T-клеток). Полученные данные созвучны с новой концепцией патогенеза СД1 — ABCD, заключающейся в том, что лечение СД1 у детей следует начинать не тогда, когда уже появились клинические симптомы заболевания, т. е. большинство бета-клеток разрушено, а в асимптомную, доклиническую фазу, когда аутоиммунный процесс в ОЛ только начался и большинство бета-клеток еще возможно сохранить.

Список использованной литературы

1. Афанасьева ВВ, Зак КП, Кондрацька ІМ, Семіонова ТА. Вміст, ультраструктура та функція моноцитів крові у хворих на цукровий діабет 2 типу і метаболічний синдром. *Ендокринологія*. 2009;14(2):201-8. (Afanas'yeva VV, Zak KP, Kondrats'ka IM, Semionova TA. Content, ultrastructure and function of blood monocytes in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Endokrynolohiya*. 2009;14(2):201-8).
2. Дейл ММ, Формен Дж К. Нейтрофильные лейкоциты. В кн.: *Руководство по иммунофармакологии*. Москва: Медицина, 1998:331 с. (Deil MM, Formen JK. Neutrophilic leukocytes. In: *Guide to Immunopharmacology*. Moscow: Meditsina, 1998:331 p.).
3. Зак КП, Попова ВВ. Предказание развития сахарного диабета 1-го типа и диагностика его асимптомной фазы с помощью аутоантител к островкам Лангерганса поджелудочной железы у человека задолго до возникновения у него заболевания. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2016;7(79):11-21. (Zak KP, Popova VV. Prediction of type 1 diabetes mellitus development and diagnosis of its asymptomatic phase using autoantibodies to the islets of Langerhans in human long before the onset of the disease. *Mizhnarodniy endokrinolohichniy zhurnal*. 2016;7(79):11-21).
4. Зак КП. Роль нейтрофильных лейкоцитов в патогенезе сахарного диабета 1-го типа у человека (аналитический обзор с включением собственных данных). *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2016;2(74):130-9. (Zak KP. The role of neutrophilic leukocytes in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus in man (analytical review with the inclusion of own data). *Mizhnarodniy endokrinolohichniy zhurnal*. 2016;2(74):130-9).
5. Зак КП, Грузов МА, Афанасьева ВВ, Малиновская ТН, Попова ВВ, Куликовская АВ, и др. Ультраструктура и функция лимфоцитов крови у детей с впервые выявленным нелеченым сахарным диабетом 1-го типа. *Пробл. эндокринологии*. 2005; 51(5):8-13. (Zak KP, Gruzov MA, Afanas'yeva VV, Malinovskaya TN, Popova VV, Kulikovskaya AV, et al. Ultrastructure and function of blood lymphocytes in children with newly diagnosed untreated type 1 diabetes mellitus. *Probl. endokrinologii*. 2005;51(5):8-13).
6. Зак КП, Грузов МА, Афанасьева ВВ, Попова ВВ, Куликовская АВ, Семионова ТА, и др. Иммунитет в доклиническом периоде развития сахарного диабета 1-го типа и положительных к диабетассоциированным аутоантителам. *Клиническая медицина*. 2006; 84(8):35-40. (Zak KP, Gruzov MA, Afanas'yeva VV, Popova VV, Kulikovskaya AV, Semionova TA, et al. Immunity in the preclinical period of type 1 diabetes mellitus development and positive for diabetes-associated autoantibodies. *Klinicheskaya meditsina*. 2006;84(8):35-40).
7. Зак КП, Киндзельский ЛП, Бутенко АК. Большие гранулоциты лимфоциты в патологии. Київ: Наукова думка, 1992:164 с. (Zak KP, Kindzel'skiy LP, Butenko AK. Large granule-containing lymphocytes in pathology. Kyiv: Naukova dumka, 1992:164 p.).
8. Зак КП, Малиновская ТН, Тронько НД. Иммунитет у детей, больных сахарным диабетом. Київ: Книга плюс, 2002:111 с. (Zak KP, Malinovskaya TN, Tron'ko ND. Immunity in children with diabetes. Kyiv: Kniha plyus, 2002:111 p.).

9. Зак КП, Попова ВВ. Иммунная интервенция в терапии сахарного диабета (аналитический обзор). *Диабет. Ожирения. Диабетический синдром*. 2015;6(IV):31-44. (Zak KP, Popova VV. Immune intervention in the therapy of diabetes mellitus (analytical review). *Diabet. Ozhirynnya. Diabetychnyi syndrom*. 2015;6 (IV):31-44).
10. Зак КП, Попова ВВ. Цитокины и сахарный диабет 1-го типа у человека (Обзор с включением собственных данных). *Укр. мед. часопис*. 2006;1(51):78-89. (Zak KP, Popova VV. Cytokines and type 1 diabetes mellitus in man (Overview with inclusion of own data). *Ukr. med. chasopis*. 2006;1(51):78-89).
11. Зак КП, Тронько НД, Попова ВВ, Бутенко АК. Сахарный диабет. Иммунитет. Цитокины. Київ: Книга плюс, 2015:485 с. (Zak KP, Tron'ko ND, Popova VV, Butenko AK. Diabetes mellitus. Immunity. Cytokines. Kyiv: Knyha plus, 2015:485 p.).
12. Зак КП, Хоменко БМ, Афанасьева ВВ, Сакало ЕА. Содержание и ультраструктура больших гранулосодержащих лимфоцитов (естественных клеток-киллеров) в крови больных сахарным диабетом 1 типа. *Пробл. эндокринологии*. 1987; 4:3-5. (Zak KP, Khomenko BM, Afanas'yeva VV, Sakalo YeA. The content and ultrastructure of large granule-containing lymphocytes (natural killer cells) in the blood of patients with type 1 diabetes mellitus. *Probl. endokrinologii*. 1987;4:3-5).
13. Попова ВВ. Лейкоцитарный склад та імунофенотип лімфоцитів периферичної крові у ДААТ-позитивних і ДААТ-негативних щодо вмісту діабетасоціюваних аутоантител дітей та підлітків на доклінічний та ранній клінічний стадіях розвитку цукрового діабету 1-го типу. *Здоров'я ребенка*. 2015;2:45-51. (Popova VV. The leukocyte content and immunophenotype of peripheral blood lymphocytes in DAAT-positive and DAAT-negative to content of diabetes-associated autoantibodies in children and adolescents at preclinical and early clinical stages of diabetes type 1 development. *Zdorovyie rebionka*. 2015;2:45-51).
14. Попова ВВ. Продукція діабетасоціюваних аутоантител до острівцевих аутоантигенів (IA-2A, GADA, IAA) у дітей і підлітків на етапах еволюції цукрового діабету 1 типу як основа клініко-імунологічного алгоритму доклінічної діагностики захворювання. *Сучасна педіатрія*. 2015;2:113-8. (Popova VV. Production of diabetes-associated autoantibodies to islet autoantigens (IA-2A, GADA, IAA) in children and adults at the stages of evolution of type 1 diabetes as basis of clinic-immunologic algorithm of preclinical disease diagnosis. *Suchasna pediatriya*. 2015;2:113-8).
15. Попова ВВ. Уміст діабетасоціюваних аутоантител до острівцевих аутоантигенів (IA-2A, GADA, IAA) і рівень різних видів цитокінів у дітей та підлітків на доклінічній і ранній клінічній стадіях розвитку цукрового діабету 1-го типу. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2015;2:138-46. (Popova VV. Content of diabetes-associated autoantibodies to islet autoantigens (IA-2A, GADA, IAA) and the level of different types of cytokines in children and adolescents at the preclinical and early clinical stages of diabetes type 1 development. *Mizhnarodnyi endokrinologichnyi zhurnal*. 2015;2:138-46).
16. Попова ВВ, Зак КП. Открытие аутоантител к островкам Лангерганса поджелудочной железы – выдающееся достижение в области предсказания возникновения и диагностики типа сахарного диабета в клинике (Обзор с включением собственных данных). *Лікарська справа*. 2006;7:3-12. (Popova VV, Zak KP. The discovery of autoantibodies to the islets of Langerhans is an outstanding achievement in the field of prediction of the onset and diagnosis of the type of diabetes mellitus in the clinics (Overview with the inclusion of own data). *Likars'ka sprava*. 2006;7:3-12).
17. Попова ВВ, Мельниченко СВ, Семіонова ТА, Куліковська ГВ, Зак КП, Маньковський БМ. Проспективне клініко-імунологічне дослідження дітей з обтяженою спадковістю, позитивних щодо вмісту аутоантител до антигенів острівців Лангерганса, в динаміці розвитку у них цукрового діабету 1 типу. *Ендокринологія*. 2010;15(додаток):55. (Popova VV, Mel'nichenko SV, Semionova TA, Kulikovsk'ka HV, Zak KP, Man'kovsk'kiy BM. A prospective clinical and immunological studies of children with burdened heredity, positive to autoantibodies content to antigens of islets of Langerhans, in the dynamics of their development of type 1 diabetes. *Endokrynolohiya*. 2010;15(dodatok):55).
18. Тронько НД, Попова ВВ, Зак КП, Маньковський БН. О научно-исследовательской проспективной программе «Иммунитет в доклинический период развития сахарного диабета 1 типа», созданной в ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины». *Ендокринологія*. 2010;15(2):180-191. (Tron'ko ND, Popova VV, Zak KP, Man'kovskiy BN. About the research prospective program «Immunity in the preclinical period of type 1 diabetes development», created in the SI «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine». *Endokrynolohiya*. 2010;15(2):180-191).
19. Хоменко БМ, Грузов МА, Шляховенко ВС, Зак КП. Содержание и ультраструктура CD4+ лимфоцитов крови здоровых людей и больных сахарным диабетом 1 типа. *Физиол. журнал*. 1989;35(5):31-8. (Khomenko BM, Gruzov MA, Shlyakhovenko VS, Zak KP. The content and ultrastructure of CD4 + blood lymphocytes in healthy people and patients with type 1 diabetes mellitus. *Fiziol. zhurnal*. 1989;35(5):31-8).
20. Шиффман Ф.Дж. Патопфизиология крови. Москва : Бином, 2009:446 с. (Shiffman FJ. Pathophysiology of blood. Moscow : Binom, 2009:446 p.).
21. Afanasieva VV, Zak KP, Butenko AK. Electron microscopy and ultracytochemistry studies of healthy individuals' lymphocytes containing Gall bodies. *Cytology and Genetics*. 2003;37(1):52-6.
22. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014;383(9911):69-82.
23. Bian ML, Haigh O, Munster D, Harris M, Cotterill A, Miles JJ, et al. Reactivated CD4+Tm cells of T1D patients and siblings display an exaggerated effector phenotype with heightened sensitivity to activation-induced cell death. *Diabetes*. 2015;64(6):2161-71.
24. Bonifacio E, Mathieu Ch, Nepom GT, Ziegler A-G, Anhalt H, Haller MJ, et al. Rebranding asymptomatic type 1 diabetes: the case for autoimmune beta cell disorder as a pathological and diagnostic entity. *Diabetologia*. 2016;60(1):35-8.
25. Bonifacio E, Ziegler AG, Klingensmith G, Schober E, Bingley PJ, Rottenkolber M, et al. Effects of high-dose oral insulin on immune responses in children at high risk for type 1 diabetes: the Pre-POINT randomized clinical trial. *JAMA*. 2015;313(15):1541-9.
26. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*. 1974;2(7892):1279-83.
27. Drexhage HA, Dik WA, Leenen PJ, Versnel MA. The immune pathogenesis of type 1 diabetes: not only thinking outside the cell but also outside the islet and out of the box. *Diabetes*. 2016;65(8):2130-3.
28. Grossmann V, Schmitt VH, Zeller T, Panova-Noeva M, Schulz A, Laubert-Reh D, et al. Profile of the immune and inflammatory response in individuals with prediabetes and type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38(7):1356-64.
29. Haller MJ, Gitelman SG, Gottlieb PA, Michels AW, Perry DJ, Schultz AR, et al. Antithymocyte globulin plus G-CSF combination therapy leads to sustained immunomodulatory and metabolic effects in a subset of responders with established type 1 diabetes. *Diabetes*. 2016;65(12):3765-75.
30. Heuts F, Edner NM, Walker LSK. Follicular T helper cells: a new marker of type 1 diabetes risk? *Diabetes*. 2017;66(2):258-60.
31. International Diabetes Federation . *Diabetes Atlas*. 3rd eds. Brussels: International Diabetes Federation; 2006. Available at <http://www.eatlas.idf.org/media> Last accessed 8 September 2008.
32. Keneff R, Wang CJ, Kapadi T, Wardzinski L, Attridge K, Clough LE, et al. Follicular helper T cell signature in type 1 diabetes. *J Clin Invest*. 2015;125(1):292-303.
33. Knip M, Selvenius J, Siljander H, Veijola R. Reclassification of asymptomatic beta cell autoimmunity: a critical perspective. *Diabetologia*. 2017;60(1):39-42.
34. Leslie RD, Bradford C. Autoimmune diabetes: caught in a NET. *Diabetes*. 2014;63(12):4018-20.
35. Okubo Y, Washer SLL, Faustman DL. Low frequency of activated tregs in T1D may result in earlier onset of diabetes and lower residual C-peptide. *Diabetes*. 2015;64(Suppl 1): 230-OR (A-61).
36. Pesenacker AM, Wang AY, Singh A, Gillies J, Kim Y, Piccirillo CA, et al. A regulatory T-cell gene signature is a specific and sensitive biomarker to identify children with new-onset type 1 diabetes. *Diabetes*. 2016;65(4):1031-9.
37. Qin H, Lee I-F, Panagiotopoulos C, Wang X, Chu AD, Utz PJ, et al. Natural killer cells from children with type 1 diabetes have defects in NKG2D-dependent function and signalling. *Diabetes*. 2011;60(3):857-66.
38. Röper BO. β -cells, autoimmunity, and the innate immune system: «un menage a trois». *Diabetes*. 2013;62:1821-2.
39. Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol*. 2014;35(9):436-42.

Оригінальні дослідження

40. Takiishi T, Cook DP, Korff H, Sebastiani G, Mancarella F, Cunha JP, et al. Reversal of diabetes in NOD mice by clinical-grade proinsulin and IL-10-secreting lactococcus lactis in combination with low-dose anti-CD3 depends on the induction of Foxp3-positive T cells // *Diabetes*. 2017 Feb;66(2):448-459.
41. Valle A, Giamporcaro GM, Scavini M, Stabilini A, Grogan P, Bianconi E, et al. Reduction of circulating neutrophils precedes and accompanies type 1 diabetes. *Diabetes*. 2013;62(6): 2072-7.
42. Viisanen T, Ihantola E-L, Näntö-Salonen K, Hyöty H, Nurminen N, Selvenius J, et al. Circulating CXCR5+PD-1+ICOS+ follicular T helper cells are increased close to the diagnosis of type 1 diabetes in children with multiple autoantibodies. *Diabetes*. 2017;66(2): 437-47.
43. Wang Y, Xiao Y, Zhong L, Ye D, Zhang J, Tu Y, et al. Increased neutrophil elastase and proteinase 3 and augmented NETosis are closely associated with β -cell autoimmunity in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2014;63(12): 4239-48.
44. Williams AJ, Bingley PJ. Worth the wait: type 1 diabetes prospective birth cohort studies enter adolescence. *Diabetologia*. 2012;55(7):1873-6.
45. Ziegler AG, Rewers M, Simell O, Simell T, Lempainen J, Steck A, et al. Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *JAMA*. 2013;309(23):2473-9.

(Надійшло до редакції 01.08.2017 р.)

Підсумки двадцятирічних досліджень імунітету в доклінічну фазу розвитку цукрового діабету 1-го типу в дітей за Програмою ІДЦД: 1. Лейкоцитарний склад та імунофенотип лімфоцитів крові

К.П. Зак, В.В. Попова, М.А. Грузов, Б.М. Хоменко, В.В. Афанасьєва, Т.М. Малиновська, К.М. Тронько, Я.А. Саєнко, Л.А. Смоліна, Т.А. Семіонова, А.В. Куліковська

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

Резюме. Мета. Дослідити лейкоцитарний склад та імунофенотип лімфоцитів крові в нормоглікемічних дітей з обтяженою спадковістю, що знаходяться в асимптомній фазі розвитку цукрового діабету 1-го типу (ЦД1), яку встановлено на підставі визначення титру автоантитіл до панкреатичних острівців Лангерганса (ОАА). **Методи.** Обстежено 457 нормоглікемічних дітей з обтяженою спадковістю щодо ЦД1, зареєстрованих у Реєстрі вітчизняної програми ІДЦД (імунітет у доклінічну стадію розвитку цукрового діабету), родичі першої лінії яких хворіють на ЦД1, розділених на чотири підгрупи (1 — здорові, без генетичної схильності до ЦД1; 2 — ОАА-негативні; 3 — ОАА-позитивні; 4 — хворі на ЦД1). Лейкоцитарну формулу визначали традиційно та за допомогою гематологічного аналізатора, імунофенотип лімфоцитів (CD3+T, CD4+T, CD8+T, CD20+, CD56+ клітин) — за допомогою проточної цитометрії (FACS-аналіз), а титр ОАА (IAA, GADA й IA-2A) — за допомогою радіоімунних методів. **Результати.** У нормоглікемічних ОАА-позитивних дітей відзначаються виражені зміни як природного (нейтрофілопенія, зменшення кількості та активності ПК-клітин (CD56+ лімфоцитів і БГЛ)), так і адаптивного імунітету (зниження відносної та абсолютної кількості CD3+T, CD4+T, CD8+T та, надто, імунорегуляторної субпопуляції CD4+ T-клітин) порівняно з ОАА-негативною групою дітей з обтяженою спадковістю ($p < 0,05$) і групою здорових нормоглікемічних дітей, без генетичних ускладнень ($p < 0,001$). **Висновок.** В асимптомну, передклінічну фазу розвитку ЦД1 у дітей відбуваються виражені зміни природного та адаптивного імунітету, що співзвучно з новою концепцією

про патогенез і лікування ЦД1, яка полягає в тому, що терапію ЦД1 слід починати не в стадії різкого зниження маси бета-клітин і секреції інсуліну, тобто після появи патологічно клінічних ознак, а в асимптомну фазу, коли автоімунний процес в острівцях лише почався.

Ключові слова: цукровий діабет 1-го типу, лейкоцитарний склад, імунофенотип лімфоцитів крові.

Results of twenty-year studies on immunity at preclinical asymptomatic phase of developing type 1 diabetes in children on the program IPDM: 1. Leukocyte composition and immune phenotype of blood lymphocytes

K.P. Zak, V.V. Popov, M.A. Gruzov, B.M. Khomenko, V.V. Afanasyeva, T.N. Malynovskaya, E.N. Tronko, Ya.A. Saenko, T.A. Semionova, A.B. Kulskovskaya

SI «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Natl. Acad. Sci. of Ukraine»

Abstract. Aim. To study the leukocyte composition and immunophenotype of blood lymphocytes in normoglycemic children with burdened heredity, who are in asymptomatic phase of developing type 1 diabetes mellitus (type 1 DM), which was established on the basis of determining the autoantibody titre to pancreatic islets of Langerhans (OAA). **Methods.** There were examined 457 normoglycemic children with burdened heredity to type 2 DM registered in the register of national program «Immunity in Pre-clinical Stage of Diabetes Mellitus Development» (IPDM), which first line relatives had type 1 DM, divided into four sub-groups (1 — healthy without genetic predisposition to type 1 DM; 2 — OAA-negative; 3 — OAA-positive; 4 — patients with type 1 DM). Determination of leukocyte formula was traditionally performed and by hematological analyzer, immunophenotype of lymphocytes (CD3+T, CD4+T, CD8+T, CD20+, CD56+ cells) — by flow cytometry (FACS analysis) and the titer of OAA (IAA, GADA and IA-2A) — by radioimmunological method. **Results.** It was found that a pronounced change in a natural (neutrophilepenia, decrease in a number and activity of NK-cells (CD56+ lymphocytes and BGL)) as well as adaptive immunity (reduction in relative and absolute number of CD3+T, CD4+T, CD8+T and, especially, immunoregulatory subpopulation of CD4+T cells), compared with OAA-negative group of children with burdened heredity ($p < 0,05$), and a group of healthy normoglycemic genetically uncomplicated children ($p < 0,001$). **Conclusion.** The marked changes in natural and adaptive immunity, corresponding to the new concept of the pathogenesis and management of type 1 DM in asymptomatic pre-clinical phase of type 1 DM development in children are occurred. This concept is that the therapy of type 1 DM should not begin at the stage of a sharp decrease in the beta cells mass and the insulin secretion, i.e. after an appearance of pathological clinical signs, but in the asymptomatic phase, when the autoimmune process in the islets has just begun.

Keywords: type 1 diabetes mellitus, leukocyte composition, immunophenotype of blood lymphocytes.