

Оценка эффективности Fas-опосредованного апоптоза лимфоцитов периферической крови у больных сахарным диабетом первого типа

А. В. Луговая, к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики отделения лабораторной диагностики клиники¹

Н. М. Калинина, д.м.н., проф. кафедры иммунологии¹, гл. научный сотрудник, врач – аллерголог-иммунолог²

В. Ф. Митрейкин, д.м.н., проф. кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии¹

Ю. В. Эмануэль, к.м.н. доцент кафедры неврологии и мануальной медицины факультета последипломного обучения¹

Ю. П. Ковальчук, к.м.н. зам. гл. врача клиники по лабораторной диагностике¹

А. В. Артемова, врач-невролог, ассистент кафедры неврологии и мануальной медицины факультета последипломного обучения¹

В. С. Эмануэль, член студенческого научного общества¹

Ю. В. Мусихина, медицинская сестра³

В. Л. Эмануэль, д.м.н., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины¹

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

²ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А. М. Никифорова» МЧС России, г. Санкт-Петербург

³СПбГБУЗ «Городская станция скорой медицинской помощи», г. Санкт-Петербург

Evaluation of efficiency of Fas-mediated apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with type 1 diabetes mellitus

A. V. Lugovaya, N. M. Kalinina, V. F. Mitreikin, Yu. V. Emanuel, Yu. P. Kovaltchuk, A. V. Artyomova, V. L. Emanuel, Yu. V. Musikhina, V. L. Emanuel

First Saint Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov, All-Russian Centre for Emergency and Radiation Medicine n.a.

A. M. Nikiforov, City Emergency Station; Saint Petersburg, Russia

Резюме

Известно, что система Fas/FasL играет центральную роль в поддержании периферической ауто толерантности и тканевого гомеостаза организма [12, 18]. Fas-опосредованный апоптоз индуцируется при связывании Fas(CD 95/APO-1/TNFRSF6)-рецептора с Fas(CD 95L/CD 178/TNFSF6)-лигандом на соответствующих клетках [24]. Триггерование экспрессии поверхностных клеточных Fas-рецепторов (Fas) регулирует элиминацию аутореактивных Т- и В-лимфоцитов путем апоптоза. Известно, что нарушение активации Fas-опосредованного апоптоза в отдельных субпопуляциях Т-клеток играет важную роль в патогенезе сахарного диабета первого типа (СД-1). Ключевым моментом в инициации СД-1 является устойчивость к апоптозу активированных аутореактивных Т-лимфоцитов, которые мигрируют из кровяного русла в поджелудочную железу и принимают активное участие в деструкции β-клеток. К настоящему моменту большинство результатов по изучению Fas-опосредованного апоптоза при СД-1 получено в экспериментах *in vitro* [11, 18, 31]. Не вызывает сомнений тот факт, что аутоиммунные изменения *in vivo* носят более глубокий характер, и экстраполяция эффектов, выявленных в системе *in vitro*, на организм не всегда правомерна. В связи с этим представляется актуальной оценка эффективности Fas-опосредованного апоптоза Т-лимфоцитов в крови больных СД-1 в зависимости от фазы компенсации и длительности течения заболевания. В статье изучены маркеры Fas-опосредованного апоптоза лимфоцитов периферической крови больных СД-1 и лиц с высоким риском развития СД-1. Проведена оценка поверхностной экспрессии Fas в отдельных субпопуляциях Т-лимфоцитов. Установлено, что у больных в фазе декомпенсации СД-1 происходит ингибирование Fas-опосредованного апоптоза аутореактивных CD95⁺-клеток при участии растворимой формы Fas (sFas — soluble Fas). При компенсации углеводного обмена наблюдается реализация апоптоза лимфоцитов по Fas-пути с помощью растворимого Fas-лиганда (sFasL — soluble FasL). В фазе компенсации СД-1 и у лиц группы риска выявлено увеличение содержания sFasL. Вероятно, это имеет протективное значение, поскольку sFasL принимает участие в удалении аутореактивных CD95⁺-клеток в периферической крови.

Ключевые слова: апоптоз, рецепторы смерти, Fas-рецептор, Fas-лиганд, Т-лимфоциты, сахарный диабет I типа, β-клетки.

Summary

The Fas/FasL system is known to play a central role in maintaining peripheral self-tolerance and tissue homeostasis of the organism [12, 18]. Fas-mediated apoptosis is induced by binding of the Fas(CD 95/APO-1/TNFRSF6)-receptor to the Fas(CD 95L/CD 178/TNFSF6)-ligand on the respective cells [24]. Triggering of the expression of cell surface Fas receptors (Fas) regulates the elimination of autoreactive T- and B-lymphocytes by apoptosis. It is known that impaired activation of Fas-mediated apoptosis in individual subpopulations of T-cells plays an important role in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus (T1DM). The main key point in the development of T1DM is resistance to apoptosis of activated autoreactive T-lymphocytes, which migrate from the bloodstream to the pancreas and take an active part in β-cells destruction. At the present time, most of the results on the study of Fas-mediated apoptosis in T1DM were obtained in experiments *in vitro* [11, 18, 31]. There is no doubt that *in vivo* autoimmune pathological changes are more profound, and extrapolation of the results obtained in the experiment to the organism is not always valid. Thereby, it seems relevant to evaluate the efficiency of Fas-mediated apoptosis of T-lymphocytes in the blood of patients with T1DM, depending on the compensation phase and the duration of the disease. In the article, the markers of Fas-mediated apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with type 1 diabetes mellitus and individuals with high risk of T1DM development have been studied. The surface expression of Fas in individual subpopulations of T-lymphocytes was evaluated. The inhibition of Fas-mediated apoptosis of autoreactive CD95⁺-cells by soluble Fas-receptor was detected in patients with decompensation of T1DM. In compensation phase of T1DM Fas-mediated apoptosis of lymphocyte was successfully realized via the soluble Fas ligand (sFasL). The increased level of soluble FasL was revealed in compensation phase of T1DM and in individuals with high risk of T1DM development. This probably has a protective value, since the soluble FasL is involved in the removal of the peripheral blood autoreactive CD95⁺-cells.

Key words: apoptosis, death receptors, Fas-receptor, Fas-ligand, T lymphocytes, type 1 diabetes mellitus, β-cells.

Введение

Fas-опосредованный апоптоз представляет собой инициаторную фазу трансдукции апоптотического сигнала и относится к внешнему (рецепторному) пути запуска гибели клетки.

В зависимости от механизма запуска апоптотического каскада выделяют два основных сигнальных пути, ведущих к индукции апоптоза клеток млекопитающих: внешний (рецепторный) и внутренний (митохондриальный или Bcl-2-регулируемый) [6, 14, 18, 25]. Внешний путь опосредуется рецепторами клеточной смерти DR (Death Receptor), к числу которых относится Fas-рецептор (Fas). Fas содержит в цитоплазматической части домен смерти DD (Death Domain) — центральный физиологический регулятор апоптоза [6, 18, 26]. Связывание Fas с Fas-лигандом (FasL) активирует Fas-ассоциированный адаптерный белок домена смерти FADD (Fas-Associated Death Domain protein), что приводит к образованию эффекторного комплекса DISC (Death Initiating Signaling Complex) — сигнального комплекса, инициирующего смерть [13, 14, 25]. DISC активирует прокаспазу-8, которая подвергается аутокаталитическому расщеплению и переходит в активную форму. Таким образом, взаимодействие Fas с FasL приводит к образованию активной каспазы-8, относящейся к группе иницирующих каспаз [26, 29].

Fas(CD 95/APO-1/TNFRSF6)-антиген представляет собой мембранный белок, который является членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF-Tumor Necrosis Factor Receptor Super Family) и относится к группе рецепторов смерти DR (Death Receptor) [24]. Новейшие литературные источники сообщают, что в норме Fas повсеместно экспрессируется в тканях человека на базальном уровне, и порог его активации должен строго регулироваться, чтобы избежать чрезмерной гибели клеток [12, 24]. Недавно были выявлены негативные регуляторы FasR, основным из которых является белок FLIP (Flice-Like Inhibitory Protein) — Flice-подобный ингибирующий белок, представля-

ющий собой ингибитор каспазы-8/FLICE. Изменение в клетке баланса между каспазой-8 и ее регулятором FLIP может переключать Fas-опосредованную передачу сигналов с апоптоза на пролиферацию и наоборот [24, 26, 29]. Существует функционально активная растворимая форма Fas, которая является результатом протеолитического расщепления мембраносвязанных рецепторов или образуется при альтернативном сплайсинге [9].

Fas/APO-1-лиганд (FasL/CD 178/TNFSF6) представляет собой мембранный белок и является членом суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (TNF-Tumor Necrosis Factor), которые относятся к цитокинам [6, 24]. Подобно TNF-лиганду, FasL может освобождаться с клеточной поверхности и быть физиологически активным в растворимой форме [9, 21, 22].

Fas-опосредованный апоптоз обеспечивает элиминацию нежелательных для организма клеток иммунной системы, а также участвует в регуляторном подавлении иммунных реакций и цитотоксичности Т-лимфоцитов [18]. Если в системе Fas/FasL имеется дефект, активированные лимфоциты могут накапливаться, что приводит к развитию аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома (АЛПС) — группы заболеваний, характеризующихся генетическими дефектами генов Fas и FasL, аутоиммунными нарушениями и повышенной склонностью к развитию злокачественных лимфоидных образований [23]. В основе патогенеза АЛПС лежит генетически детерминированное нарушение Fas-опосредованного апоптоза активированных Т-клеток, приводящее к появлению в периферической крови двойных негативных Т-лимфоцитов (CD 3⁺ CD 4⁻ CD 8⁻) [6].

В современной литературе широко обсуждается роль рецепторов смерти в деструкции β-клеток при сахарном диабете первого типа (СД-1) [18, 26, 30]. В исследованиях с использованием изолированных островков поджелудочной железы человека показано, что воздействие стрессовых факторов (гипергликемия,

избыточное количество свободных радикалов, активные формы кислорода, продукция IL-1β клетками микроокружения) усиливает экспрессию Fas на β-клетках, что приводит к их гибели по механизму Fas-опосредованного апоптоза [18]. Имунокомпетентные клетки, инфильтрирующие островковую ткань поджелудочной железы, продуцируют провоспалительные цитокины: интерлейкин 1b (IL-1b), фактор некроза опухоли α (TNF-α) и интерферон γ (IFN-γ), известные своими проапоптогенными свойствами [16, 19, 20]. IL-1β индуцирует усиление экспрессии Fas на β-клетках, что повышает их готовность к Fas-опосредованному апоптозу, который реализуется аутореактивными Т-клетками, экспрессирующими FasL. Активированные цитотоксические Т-лимфоциты (CD 8⁺ ЦТЛ), входящие в состав воспалительных инфильтратов поджелудочной железы (инсулитов), также могут разрушать β-клетки рецепторным Fas-зависимым способом [10, 18, 30].

Ранее мы сообщали о повышенной экспрессии Fas, выявленной нами в отдельных субпопуляциях Т-лимфоцитов периферической крови больных СД-1 [3]. Однако нельзя не учитывать патогенетическое значение растворимых форм Fas и FasL в развитии аутоиммунитета при СД-1, поскольку диагностическое и прогностическое значение этих показателей Fas-опосредованного апоптоза активно изучается при системных и органоспецифических аутоиммунных заболеваниях, при сепсисе, острой почечной недостаточности, онкологических заболеваниях [9, 21, 22, 28]. Комплексная оценка эффективности Fas-опосредованного апоптоза с определением всех маркеров, принимающих участие в данном варианте рецепторного пути запуска апоптотической программы, может дать более точное представление о механизмах и значении дисрегуляции системы Fas/FasL в патогенезе СД-1.

По оценкам экспертов ВОЗ, в течение следующих нескольких десятилетий СД-1 достигнет масштабов пандемии [32]. Поэтому особое зна-

чение приобретает ранняя диагностика и профилактика заболевания у лиц с высоким риском развития СД-1. В связи с этим представляется актуальной оценка маркеров Fas-опосредованного апоптоза лимфоцитов не только у больных СД-1, но и у лиц с высоким риском развития аутоиммунного диабета.

Цель исследования: изучить особенности Fas-опосредованного апоптоза мононуклеаров периферической крови больных СД-1 в зависимости от фазы компенсации и длительности течения заболевания, а также у лиц с высоким риском развития СД-1.

Материалы и методы

Характеристика обследуемых групп больных. Было обследовано 63 больных с достоверно установленным диагнозом СД-1 и 15 человек с высоким риском развития СД-1. Контрольную группу (I группа) составили 30 здоровых лиц, по полу и возрасту сопоставимых с больными СД-1. Распределение пациентов по группам проводилось в зависимости от фазы компенсации и длительности течения заболевания. II группу (декомпенсированный СД-1) составили 17 больных с впервые выявленным СД-1 (группа IIa) и 19 пациентов (группа IIб) с длительностью течения СД-1 в среднем $15,3 \pm 5,1$ года. В III группу (состояние компенсации СД-1) были включены

13 больных с длительностью заболевания до 1 года (группа IIIa) и 14 человек с продолжительностью СД-1 в среднем $15,1 \pm 5,4$ года (группа IIIб). IV группу составили 15 человек с высоким риском развития СД-1, которые являлись близкими родственниками обследованных больных СД-1. В группу риска были отобраны лица с повышенным титром (более 1/20) аутоантител к цитоплазматическим антигенам островковых клеток — ICA (Islet Cell Autoantibodies) в сыворотке и нарушением толерантности к глюкозе. ICA могут служить предиктором заболевания у родственников больных СД-1, так как они появляются в крови за 1–8 лет до клинической манифестации сахарного диабета [7, 30].

Иммунофенотипирование мононуклеаров периферической крови осуществляли методом проточной цитометрии с использованием следующих моноклональных антител Immunotech (Coulter Corporation, США): anti-CD 3, конъюгированные с FITC (Fluorescein Isothiocyanate); anti-CD 4-FITC; anti-CD 8-FITC; anti-CD 16-FITC; anti-CD 20-FITC; anti-CD 25-FITC; anti-HLA-DR-FITC; anti-CD 95-FITC и их изотипических контролей.

Для оценки апоптотических процессов в отдельных субпопуляциях Т-лимфоцитов определяли уровень

поверхностной экспрессии Fas-рецептора с использованием двойной флуоресцентной метки FITC (Fluorescein Isothiocyanate) и PE (Phycoerythrin). Исследование проводили с применением следующих сочетаний антител: anti-CD 3-FITC/anti-CD 95-PE, anti-CD 4-FITC/anti-CD 95-PE и anti-CD 8-FITC/anti-CD 95-PE. Цитометрический анализ лимфоцитов проводили на проточном цитометре EPICS XL (Coulter Corporation, США).

Определение растворимых форм Fas-рецептора (sFas) и Fas-лиганда (sFasL) в сыворотке крови проводили методом непрямой твердофазной иммуноферментной реакции (ИФА) с использованием тест-систем Human sFas Ligand ELISA фирмы Bender MedSystems (Австрия) и Human Fas ELISA фирмы BD Biosciences (США).

Для статистической обработки полученных данных использовали непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни для сравнения средних. Обработка материала проведена с использованием пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft, США). Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии значимых различий) принимали равным 0,05.

Результаты исследования

Иммунофенотипирование мононуклеаров периферической крови показало достоверное повышение относительного и абсолютного количества CD 95⁺-лимфоцитов во всех группах больных СД-1 по сравнению с группой контроля (I группа), что свидетельствует о повышенной готовности иммунокомпетентных клеток к апоптозу при СД-1 (табл. 1). Максимальное увеличение относительного и абсолютного содержания CD 95⁺-клеток и количества Т-лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор (Fas), было выявлено при декомпенсации СД-1 независимо от продолжительности заболевания (группы IIa и IIб). Полученные данные указывают на то, что при СД-1 повышение готовности иммуноком-

Таблица 1
Содержание CD 95⁺-клеток и Т-лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор, в периферической крови больных СД-1 и лиц группы риска

Группы	CD 95 ⁺		CD 3 ⁺ CD 95 ⁺	CD 3 ⁺ CD 95 ⁺	CD 8 ⁺ CD 95 ⁺
	Относительное содержание, %	Абсолютное содержание, мм ³	Относительное содержание, %		
I	4,2	80	3,0	2,3	0,9
IIa	12,4**	260**	10,8**	7,3**	6,0***
IIб	13,2**	222**	11,1**	8,1**	6,7***
IIIa	8,6*	212*	7,3*	5,1*	3,9**
IIIб	8,2*	152*	6,9*	4,8*	3,7**
IV	4,9	90	3,5	3,0	2,1*

Примечание: * — различия по изучаемому показателю с контрольной группой (I) достоверны ($p < 0,05$); ** — различия по изучаемому показателю с контрольной группой (I) достоверны ($p < 0,01$); *** — различия по изучаемому показателю с контрольной группой (I) достоверны ($p < 0,001$).

петентных клеток к апоптозу не зависит от длительности заболевания, а четко ассоциировано с декомпенсацией углеводного обмена и уровнем гликемии.

Среди субпопуляций Т-лимфоцитов следует отметить значительное увеличение процента $CD8^+CD95^+$ -клеток от общего количества цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+CTL$) во всех группах обследуемых пациентов по сравнению с группой контроля (см. рис). Повышение относительного содержания $CD8^+CTL$, экспрессирующих Fas, максимально выражено при декомпенсации заболевания (группы IIa и IIб). Увеличение количества клеток с фенотипом $CD8^+CD95^+$ при СД-1, вероятно, является компенсаторным механизмом, направленным на элиминацию аутореактивных цитотоксических Т-лимфоцитов путем Fas-опосредованного апоптоза. Согласно данным литературы, именно эффекторные цитотоксические Т-лимфоциты играют доминирующую роль в деструкции β -клеток поджелудочной железы [18, 30].

В то же время достоверное повышение количества клеток с фенотипом $CD8^+CD95^+$ в крови у лиц с высоким риском развития СД-1 (IV группа) по сравнению с группой контроля (I группа) является неблагоприятным прогностическим фактором. Эти данные указывают на то, что уже в латентной стадии СД-1 происходит экспансия аутореактивных клонов цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови с последующей их миграцией в орган-мишень (поджелудочную железу), что приводит к прогрессированию аутоиммунного процесса [28, 30].

Исследованием установлено, что содержание растворимых форм Fas (sFas — soluble Fas) и FasL (sFasL — soluble FasL) в сыворотке крови больных СД-1 не зависело от продолжительности заболевания, а изменялось в зависимости от состояния компенсации углеводного обмена (табл. 2). У больных СД-1 в фазе декомпенсации заболевания (II группа) наблюдалось достоверное увеличение содержания sFas по сравнению с группой контроля

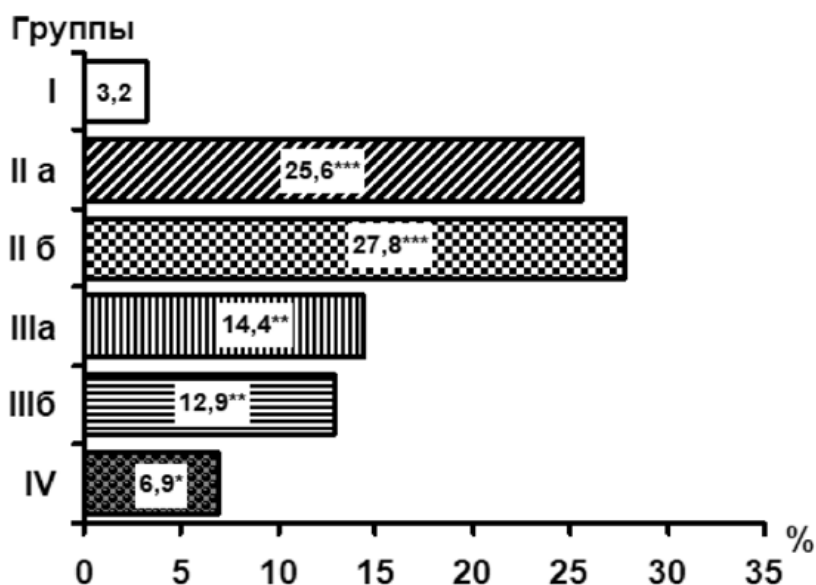


Рисунок. Процент $CD8^+CD95^+$ -клеток от общего числа цитотоксических Т-лимфоцитов.

Примечание: * — различия по изучаемому показателю с контрольной группой (I) достоверны ($p < 0,05$); ** — различия по изучаемому показателю с контрольной группой (I) достоверны ($p < 0,01$); *** — различия по изучаемому показателю с контрольной группой (I) достоверны ($p < 0,001$).

Таблица 2
Содержание растворимой формы Fas-рецептора и Fas-лиганда в сыворотке крови больных СД-1 и лиц группы риска

Показатель	Контрольная группа, n = 8	Больные СД-1		Группа риска СД-1, n = 14
		Фаза декомпенсации заболевания, n = 26	Фаза компенсации заболевания, n = 24	
	I	II	III	IV
sFas (нг/мл)	778	1501*	789	864
sFasL (нг/мл)	0,102	0,118	0,243*	0,403**

Примечания: * — различия по изучаемому показателю с контрольной группой (I) достоверны ($p < 0,05$); ** — различия по изучаемому показателю с контрольной группой (I) достоверны ($p < 0,01$).

(I группа) и остальными обследуемыми группами пациентов. Полученные результаты согласуются с данными литературы о взаимосвязи между повышением концентрации sFas в сыворотке больных и ухудшением течения заболевания [9, 21, 22]. Сообщалось, что высокий уровень сывороточного sFas коррелирует с тяжестью септического процесса [9]. Показано, что содержание sFas в крови увеличивалось по мере нарастания почечной дисфункции у больных с острым повреждением почек [9, 21]. Согласно данным литературы, растворимая форма Fas конкурирует с мембранным Fas-рецептором за связывание лиганда, чем препятствует «физиологическому» апоптозу клеток, подлежащих элиминации. При увеличении в цирку-

ляции содержания sFas не все дефектные клетки могут реализовать свою апоптотическую программу. В результате происходит их аккумуляция в периферической крови, что приводит к усугублению патологического процесса [6, 23].

Содержание sFasL при компенсации СД-1 было достоверно выше, чем в группе декомпенсации, и достоверно ниже, чем в группе риска (табл. 2). Следует отметить значительное увеличение содержания sFasL в группе риска, что согласуется с данными литературы [28]. По мнению авторов, повышение sFasL в латентной стадии СД-1 имеет протективное значение и направлено на элиминацию аутоагрессивных клонов лимфоцитов путем Fas-опосредованного апоптоза.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о выраженной дисрегуляции в системе Fas/FasL, которая наблюдается на всех этапах развития СД-1.

Обсуждение результатов

Нарушения функционирования Fas-рецептора (Fas) и Fas-лиганда (FasL), как ключевых индукторов рецепторно-зависимого апоптоза, активно изучаются в патогенезе заболеваний, связанных как с ингибированием, так и усилением апоптоза клеток шоковых органов [2, 6]. Недавно было установлено, что Fas-опосредованная активация каспазы-8 играет важную роль в регуляции патогенетических механизмов при бактериальных инфекциях [29]. Выраженное усиление экспрессии мембранных форм Fas и FasL на лимфоцитах периферической крови выявлено у больных с ишемической болезнью сердца, с острым нарушением мозгового кровообращения, у пациентов с вирусными и бактериальными инфекциями, при сепсисе, при вирусе иммунодефицита человека [5, 9, 26, 29]. Показано, что к ранним маркерам прогрессирования сердечной недостаточности относится увеличение в крови растворимой формы FasL [5]. В наших предыдущих исследованиях мы показали значительное увеличение содержания CD95⁺-моноклеаров в крови больных острым коронарным синдромом (ОКС) [4]. Нами было установлено, что окисленные липопротеины низкой плотности индуцируют Fas-опосредованный апоптоз как моноклеаров периферической крови, так и эндотелиоцитов коронарных сосудов, что свидетельствует о системном характере апоптоза при ОКС [1, 4].

В патогенезе сахарного диабета I типа (СД-1) нарушения Fas-опосредованного апоптоза имеют бивалентную природу. Так, если в отношении β -клеток развитие апоптоза сопряжено с прогрессированием заболевания, то, с точки зрения элиминации активированных аутореактивных лимфоцитов, апоптоз желателен и может замедлить деструкцию β -клеток поджелудочной железы.

Двойственная роль рецепторного (внешнего) пути запуска апоптоза в патогенезе СД-1 обусловлена экспрессией опосредующих его молекул (Fas и FasL) как клетками-эффекторами (аутореактивные Т-клетки), так и клетками-мишенями (β -клетки поджелудочной железы) [18]. Выявление взаимосвязей между особенностями Fas-опосредованного апоптоза лимфоцитов периферической крови и состоянием компенсации углеводного обмена, длительностью аутоиммунной деструкции инсулярного аппарата поджелудочной железы у больных СД-1 может способствовать более глубокому пониманию патогенеза заболевания, что и определило цель настоящего исследования. Для оценки роли нарушений апоптоза моноклеаров периферической крови в прогрессировании аутоиммунного процесса на доклинической стадии диабета была обследована группа лиц с высоким риском развития СД-1.

Исследованием установлено, что при СД-1 отмечается повышенная готовность иммунокомпетентных клеток к апоптозу, о чем свидетельствует достоверное повышение количества CD95⁺-клеток во всех обследуемых группах больных СД-1 по сравнению с группой контроля. Максимальное увеличение относительного и абсолютного содержания CD95⁺-клеток и Т-лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор, было выявлено при декомпенсации СД-1 независимо от продолжительности заболевания. Это объясняется влиянием гипергликемии, которая повышает чувствительность лимфоцитов периферической крови к Fas-опосредованному апоптозу за счет усиления экспрессии Fas-рецептора на их поверхности, а также индуцирует р53-опосредованный апоптоз клеток-мишеней при участии эффекторной каспазы-3 [8, 11, 17, 27].

Во всех группах обследуемых пациентов наблюдалось увеличение процента CD8⁺CD95⁺-клеток от общего количества цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с группой контроля, более выраженное при декомпенсации заболевания. Это

указывает на стремление иммунной системы ограничить активность аутореактивных цитотоксических Т-лимфоцитов, играющих ведущую роль в деструкции инсулярного аппарата поджелудочной железы.

Для эффективной элиминации CD95⁺-клеток в периферической крови необходимо поддержание баланса между клетками, экспрессирующими Fas и FasL. Важно учитывать возможную роль растворимой Fas-рецептора (sFas) в ингибировании апоптоза, реализуемого по Fas-пути [9].

Полученные нами результаты о повышении sFas при декомпенсации СД-1 находятся в соответствии с результатами ряда авторов, сообщавших об увеличении содержания растворимой формы Fas при некоторых системных и органоспецифических аутоиммунных заболеваниях [9, 21, 22]. Наблюдаемое в нашем исследовании выраженное повышение sFas на фоне резкого увеличения количества CD95⁺-клеток в крови больных СД-1 в состоянии декомпенсации углеводного обмена свидетельствует о неэффективности Fas-опосредованного апоптоза вследствие ингибирования элиминации CD95⁺-клеток по Fas-пути.

Показано, что в удалении аутореактивных клеток человека участвуют как мембранная, так и растворимая формы Fas-лиганда (sFasL) [9, 24]. В эксперименте предварительное культивирование диабетогенных клонов Т-лимфоцитов с sFasL полностью ингибировало развитие аутоиммунного диабета у мышей, которым затем трансплантировали диабетогенные Т-клетки [18]. Это означает, что повышение sFasL при СД-1 имеет протективное значение и направлено на установление периферической толерантности, необходимой для защиты от аутоиммунной агрессии против β -клеток. Сообщалось о повышении sFasL у лиц с высоким риском развития СД-1 на фоне снижения в крови количества аутореактивных CD4⁺CD95⁺- и CD8⁺CD95⁺-лимфоцитов, в связи с чем авторы предполагают участие sFasL в удалении патогенных Т-клеток на доклинической стадии заболевания [28].

Следовательно, выявленное нами повышение sFasL у больных СД-1 в состоянии компенсации углеводного обмена и в группе риска является компенсаторным механизмом и играет защитную роль.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что регуляция системы FasL/Fas влияет на тропность аутореактивных Т-клеток к островковым антигенам больных СД-1, и что Fas-индуцированная гибель β -клеток, опосредованная Т-лимфоцитами, играет существенную роль в развитии и прогрессировании СД-1 как в латентной стадии, так и на этапе развернутых клинических проявлений заболевания.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов и выражают благодарность за сотрудничество коллективу эндокринологического отделения Елизаветинской городской больницы и специалистам лаборатории клеточного и гуморального иммунитета Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины МЧС МЗ РФ г. Санкт-Петербурга за предоставление базы для обследования пациентов.

Список литературы

- Васина А.В., Луговая А.В., Петрищев Н.Н., Серебряная Н.Б. Патогенетическое значение изменения относительного содержания аннексин V⁺-мононуклеаров и CD 59⁺-лимфоцитов периферической крови при остром коронарном синдроме. Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2008. (1): 14–24.
- Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. РИО Уро РАН. — Екатеринбург. — 2018. — 720 с.
- Луговая А.В., Калинина Н.М., Митрейкин В.Ф., Ковальчук Ю.П., Артемова А.В., Белолипетская Ю.Р., Гаврилова Е.А., Рузанова О.С., Эмануэль В.С., Эмануэль Ю.В., Эмануэль В.А. Апоптоз и пролиферация Т-лимфоцитов периферической крови как альтернативные процессы в патогенезе сахарного диабета первого типа. Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория». 2019. 1 (4): 16–20.
- Петрищев Н.Н., Васина А.В., Луговая А.В. Содержание растворимых маркеров апоптоза и циркулирующих аннексин V-связанных апоптотических клеток в крови больных острым коронарным синдромом. Вестник Санкт-Петербургского государственного университета. 2008. (1): 14–24.
- Фефелова Е.В., Терешков П.П., Максимова М.В., Цыбилов Н.Н. Индукция апоптоза лимфоцитов под влиянием гомоцистеина в культуре клеток периферической крови больных ИБС. Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке». 2016. 18 (11): 36–39.
- Хайтов Р.М. Иммунология. М. ГЭОТАР-Медиа. 2018. — 496 с.
- Abstracts of 52nd EASD Annual Meeting. Diabetologia. 2016. 59 (1): 581 p.
- Baidwan S., Chekuri A., Hynds D.L., Kowluru A. Glucotoxicity promotes aberrant activation and mislocalization of Fas-related C3 botulinum toxin substrate 1 [Rac1] and metabolic dysfunction in pancreatic islet β -cells: reversal of such metabolic defects by metformin. Apoptosis. 2017. 22 (11): 1380–1393.
- Bhatraju P.K., Robinson-Cohen C., Mikacenic C. et al. Circulating levels of soluble Fas (sCD95) are associated with risk for development of a nonresolving acute kidney injury subphenotype. Crit. Care. 2017. 21 (217): 1–9. DOI: 10.1186/s13054-017-1807-x.
- Blander J.M. The many ways tissue phagocytes respond to dying cells. Immunol. Rev. 2017. 277 (1): 158–173.
- Cantley J., Davenport A., Vetterli L. et al. Disruption of beta cell acetyl-CoA carboxylase-1 in mice impairs insulin secretion and beta cell mass. Diabetologia. 2019. 62 (1): 99–111.
- Esposito M.D., Matarrese P., Tinari A. et al. Changes in membrane lipids drive increased endocytosis following Fas ligation. Apoptosis. 2017. 22 (5): 681–695.
- Garg A.D., Romano E., Rufo N., Agostinis P. Immunogenic versus tolerogenic phagocytosis during anticancer therapy mechanisms and clinical translation. Cell Death Differ. 2016. 23: 938–951.
- Green D.R. Cell death and the immune system: getting to how and why. Immunol. Rev. 2017. 277 (1): 4–8.
- Green D.R., Oguin T.H., Martinez J. The clearance of dying cells: table for two. Cell Death Differ. 2016. 23: 915–926.
- Hakonen E., Chandral V., Fogarty C.L. et al. MANF protects human pancreatic beta cells against stress-induced cell death. Diabetologia. 2018. 61 (10): 2202–2214.
- Hammes H.P. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. Diabetologia. 2018. 61 (1): 29–38.
- Joglekar M.V., Trivedi P.M., Kay T.W. et al. Human islet cells are killed by BID-independent mechanisms in response to Fas ligand. Apoptosis. 2016. 21 (4): 379–389.
- Li X., Shang B., Li Y. et al. IFN γ and TNF α synergistically induce apoptosis of mesenchymal stem/stromal cells via the induction of nitric oxide. Stem Cell Res. Ther. 2019. 10 (18): 1–11. DOI: 10.1186/s13287-018-1102-z.
- Liang L., Ge K., Zhang F. et al. The suppressive effect of co-inhibiting PD-1 and CTLA-4 expression on H22 hepatomas in mice. Cell. Mol. Biol. Lett. 23 (58): 1–11. 2018. DOI: 10.1186/s11658-018-0122-0.
- Liphaus B.L., Kiss M.H.B., Carrasco S. et al. Increased serum sFas, sTRAIL, and reduced sFasL in juvenile-onset systemic lupus erythematosus. Clin. Rheumatol. 2017. 36 (12): 2847–2852.
- Nabipour I., Kalantarhormozi M., Assadi M. et al. Influence of levothyroxine treatment on serum levels of soluble Fas (CD95) and Fas Ligand (CD95L) in chronic autoimmune hypothyroidism. Endocr. 2010. 38 (3): 406–411.
- Rieux-Laucat F., Magéris-Chatinet A., Neven B. The Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome with Defective Fas or Fas-Ligand Functions. J. Clin. Immunol. 2018. 38 (5): 558–568.
- Rossin A., Lounnas N., Jérôme Durivault J. et al. The Btk-dependent PIP3K1 γ lipid kinase activation by Fas counteracts FasL-induced cell death. Apoptosis. 2017. 22 (11): 1344–1352.
- Sachet M., Liang Y.Y., Oehler R. The immune response to secondary necrotic cells. Apoptosis. 2017. (22) 10: 1189–1204.
- Shukla V., Shukla A.K., Perez-Pinzon M.A. et al. Cerebral ischemic damage in diabetes: an inflammatory perspective. Journal of Neuroinflammation. 2017. 14 (21): 1–22. DOI: 10.1186/s12974-016-0774-5.
- Sidarala V., Kowluru A. Exposure to chronic hyperglycemic conditions results in Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1)-mediated activation of p53 and ATM kinase in pancreatic β -cells. Apoptosis. 2017. 22 (5): 597–607.
- Tchorzewski H., Glowacka M., Banasik P. et al. Activated T lymphocytes from patients with high risk of type 1 diabetes mellitus have different ability to produce interferon- γ , interleukin-6 and interleukin-10 and undergo anti-CD95 induced apoptosis after insulin stimulation. Immunology Letters. 2001. 75: 225–234.
- Uchiyama R., Tsutsui H. Caspases as the Key Effectors of Inflammatory Responses Against Bacterial Infection. Immunol. Ther. Exp. 2015. 63 (1): 1–13.
- Vives-Pi M., Rodríguez-Fernández S., Pujol-Autonell I. How apoptotic β -cells direct immune response to tolerance or to autoimmune diabetes: a review. Apoptosis. 2015. (20) 3: 263–272.
- Xv J., Ming Q., Wang X. et al. Mesenchymal stem cells moderate immune response of type 1 diabetes. Cell Tissue Res. 2017. 368 (2): 239–248.
- Zhang M., Zhang L., Hu J. et al. MST1 coordinately regulates autophagy and apoptosis in diabetic cardiomyopathy in mice. Diabetologia. 2016. 59 (11): 2435–2447.

Для цитирования. Луговая А.В., Калинина Н.М., Митрейкин В.Ф., Эмануэль Ю.В., Ковальчук Ю.П., Артемова А.В., Эмануэль В.С., Мусихина Ю.В., Эмануэль В.А. Оценка эффективности Fas-опосредованного апоптоза лимфоцитов периферической крови у больных сахарным диабетом I типа // Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория». — 2019 — Т. 3. — 22(397). — С. 26–32.



Точная диагностика -
эффективное лечение!

Наборы реагентов

» для количественного определения цитокинов методом ИФА

№ по каталогу	определяемый цитокин	чувствительность анализа	диапазон измерений
A-8752	Гамма-Интерферон – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/6008 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации гамма-интерферона в сыворотке крови	2 пг/мл	0-1000 пг/мл
A-8754	Интерлейкин – 4 – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/6009 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-4 в сыворотке крови	0,4 пг/мл	0-100 пг/мл
A-8756	Альфа – ФНО – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/5961 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации фактора некроза опухоли – альфа в сыворотке крови	1 пг/мл	0-250 пг/мл
A-8758	Альфа – Интерферон – ИФА – БЕСТ РУ № ФСР 2008/02195 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации альфа-интерферона в сыворотке крови	5 пг/мл	0-500 пг/мл
A-8760	Альфа – Интерферон – аутоиммунные антитела – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2014/2056 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации аутоиммунных антител к альфа-интерферону в сыворотке крови человека	0,4 нг/мл	0-100 пг/мл
A-8762	Интерлейкин – 8 – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/6005 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-8 в сыворотке крови и моче человека	2 пг/мл	0-250 пг/мл
A-8766	Интерлейкин – 1 бета – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/6010 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-1 бета в сыворотке крови и моче человека	1 пг/мл	0-250 пг/мл
A-8768	Интерлейкин – 6 – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/6006 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-6 в сыворотке крови и моче человека	0,5 пг/мл	0-300 пг/мл
A-8770	Интерлейкин – 8 – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2014/2083 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-8 в сыворотке крови человека	2 пг/мл	0-1000 пг/мл
A-8772	Интерлейкин – 2 – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/6012 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-2 в сыворотке крови человека	2 пг/мл	0-500 пг/мл
A-8774	Интерлейкин – 10 – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/6011 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-10 в сыворотке крови человека	1 пг/мл	0-500 пг/мл
A-8776	Эритропоэтин – ИФА – БЕСТ РУ № ФСР 2010/09378 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации эритропоэтина в сыворотке (плазме) крови	0,5 мМЕ/мл	0-200 мМЕ/мл
A-8782	МСР – 1 – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/5969 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации моноцитарного хемотоксического белка-1 в сыворотке крови.	15 пг/мл	0-2000 пг/мл
A-8784	VEGF – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/5974 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации фактора роста эндотелия сосудов в сыворотке крови.	10 мЕд/мл	0-2000 мЕд/мл

Срок хранения наборов – 18 месяцев

АО «Вектор-Бест»

630117, Новосибирск, а/я 492
т.: (383) 227-73-60, 332-81-34,
т./факс: 332-67-49, 332-67-52,
e-mail: vbmarket@vector-best.ru
www.vector-best.ru

Представительства:

Москва: (495) 710-76-96
Санкт-Петербург: (812) 495-55-99
Ростов-на-Дону: (863) 295-15-61
Екатеринбург: (343) 372-90-50

Уфа: (347) 246-23-34
Нижний Новгород: (831) 270-48-53
Хабаровск: (4212) 335-946
Киев: (10 380 44) 338-04-04