

Итоги двадцатилетних исследований иммунитета в доклиническую стадию развития сахарного диабета 1-го типа у детей и подростков по Программе ИДСД: 2. Содержание различных видов цитокинов и хемокинов в крови

В.В. Попова,
К.П. Зак,
С.В. Мельниченко,
Т.Н. Малиновская,
Е.Н. Тронько,
Я.А. Саенко,
А.В. Куликовская,
И.В. Гончар

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

Резюме. Цель — исследовать содержание различных видов цитокинов и хемокинов в крови нормогликемических детей с отягощенной наследственностью по сахарному диабету 1-го типа (СД1), находящихся в доклинической латентной стадии развития СД1, которая устанавливалась на основании определения вида и титра аутоантител к панкреатическим островкам Лангерганса (ОАА), а именно: к протеину тирозинфосфатазы (IA-2A), к декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GADA) и инсулину (IAA). **Методы.** Обследован 561 ребенок из внесенных в Реестр отечественной программы ИДСД («Иммунитет в доклиническую стадию развития сахарного диабета»). Все обследованные были разделены на четыре подгруппы: 1) 104 здоровых ребенка, без генетической склонности к СД1 — контроль; 2) 161 ОАА-позитивный ребенок, у которых при двукратном определении был выявлен одновременно повышенный титр не менее двух видов ОАА, преимущественно аутоантител к IA-2A и антител к GADA; 3) 296 ОАА-негативных пациентов с нормальной гликемией и отсут-

* 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

© В.В. Попова, К.П. Зак, С.В. Мельниченко, Т.Н. Малиновская, Е.Н. Тронько, Я.А. Саенко, А.В. Куликовская, И.В. Гончар

Оригинальні дослідження

ствием при двукратном определении одновременно повышенного титра двух видов ОАА; 4) 86 детей с клиническим дебютом СД1 из группы ОАА-позитивных пациентов. С целью выявления наличия аутоиммунного процесса в поджелудочной железе использовали радиоиммунологический метод (RIA) определения ОАА. Количественное определение концентраций исследованных ОАА в сыворотке крови выполняли с использованием наборов «ImmunoTech» (Чехия) и «CIS Bio International» (Франция) на γ -счетчике Beckman Gamma 5500B (США). Нормальным считали уровень аутоантител — GADA и IA-2A <1 Ед/мл, IAA — <5,5 Ед/мл в сыворотке крови. Определение лейкоцитарной формулы проводили традиционно и гематологическим анализатором, иммунофенотип лимфоцитов (CD3+T, CD4+T, CD8+T, CD20+, CD56+) определяли методом проточной цитометрии (FACS-анализ). Определение содержания цитокинов (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИФН γ , ФНО α) и хемокинов (ИЛ-8 и ИЛ-16) в сыворотке крови проводили иммуноферментным методом ELISA с использованием наборов реактивов фирм DIACLONE (Франция) и DRG (США). **Результаты.** У нормогликемических детей, позитивных по наличию аутоантител к не менее чем двум островковым аутоантигенам (GADA и IA-2A) в раннюю латентную доклиническую стадию эволюции СД1, предшествующую первым проявлениям дисгликемии, отмечается значительное повышение уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α) и хемокинов (ИЛ-8/СХСL8 и ИЛ-16) и снижение уровня иммунорегуляторных цитокинов, особенно ИЛ-4 и ИЛ-10. При развитии дисгликемии изменение уровня цитокинов прогрессирует. При манифестации клинического дебюта СД1 у ряда пациентов повышенный титр ОАА и уровень провоспалительных цитокинов могут сохраняться длительное время на достаточно высоком уровне, указывая, что у части пациентов инсулин-продуцирующие клетки остаются неповрежденными, несмотря на клинический дебют заболевания, что может являться ориентиром для потенциального выбора в ближайшем будущем дополнительного вида используемой терапии. **Выводы.** Одним из ключевых механизмов патогенеза СД1 является контррегуляторный дисбаланс между провоспалительными и регуляторными цитокинами.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа, доклиническая стадия, цитокины, хемокины.

Настоящее сообщение представляет результаты дальнейших многоплановых проспективных исследований состояния различных звеньев иммунной системы в доклиническую (скрытую) стадию развития СД1 у детей с отягощенной наследственностью, идентифицированных при определении вида и титра островковых аутоантител (ОАА), в частности содержания цитокинов и хемокинов, проводимых по Программе ИДСД [1, 2].

Как известно [3, 4], к цитокинам относят большую группу низкомолекулярных протеинов и полипептидов, которые участвуют в межклеточной передаче сигналов в иммунной системе в ходе иммунного ответа, защите организма от патогенов и стресса и регуляции многих жизненно важных процессов. Цитокины являются центральными медиаторами воспаления, участвуют в развитии и поддержании различных воспалительных заболеваний, в частности ожирения и, особенно, аутоиммунных заболеваний. Способ их действия — апокринный (локальный — путем конъюгирования клеток-мишеней), паракринный (на близлежащие клетки) и дистантный (эндокринный).

Цитокины по своему действию делятся на три подгруппы: собственно цитокины, адипокины (секретируемые клетками жировой ткани) и хемокины — цитокины, обладающие свойством хемоаттрактантов.

Собственно цитокины условно разделяют на провоспалительные (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-16, ИЛ-17, ИЛ-18, ИЛ-21, ФНО α) и противовоспалительные (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-37, ТФР β). В зависимости от вида клетки-продуцента цитокины делят на макрофагальные, хелперные Th1-цитокины: ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-18, ИФН γ , ФНО α , Th2-цитокины: ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-13 и Th17-цитокины: ИЛ-17, ИЛ-21, а также островковые цитокины (isletokine).

В настоящее время особенно большое внимание уделяется изучению иммунорегуляторных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-35), получивших свое название от субпопуляций Т-хелперов — CD4+, CD25+, FOXP3+клеток (Т-regs). Имеются убедительные доказательства того, что Т-regs, особенно их субтип Tr1, играют ключевую роль в противодиабетической защите организма путем секреции в «огромных количествах» ИЛ-10 [5].

Недавно была описана еще одна субпопуляция CD4+клеток — Tfh+клетки, которые находятся в фолликулах лимфатических образований и в больших количествах выявляются в периферической крови (ПК) детей с риском развития СД1 (позитивных по наличию не менее 2 видов ОАА и находящихся в доклинической стадии развития СД1). Предполагают, что их определение может стать новым биомаркером развития СД1 [6, 7].

Характерной особенностью цитокинов является также то, что один и тот же их тип может быть секретирован различными видами клеток и в то же время одновременно по своим функциональным особенностям принадлежать к различным функциональным классам цитокинов. К примеру, ИЛ-4 и ИЛ-10, являющиеся типичными противовоспалительными цитокинами, относятся также к иммунорегуляторным цитокинам. ФНО α — мощный провоспалительный цитокин, одновременно является также и адипокином.

Вместе с тем информация о роли различных видов цитокинов в патогенезе СД1 у человека 15-20 лет тому назад, т.е. в период, когда нами впервые были инициированы исследования по данному вопросу, была чрезвычайно ограничена и неоднозначна. Особенно это касалось доклинической стадии развития СД1, так как на тот момент достоверные иммунологические методы установления доклинической, скрытой стадии СД1 с помощью использования наборов для определения вида и титра аутоантител к островкам Лангерганса (ОЛ) отсутствовали. Такие методы только начинали внедряться в клиническую практику, а в нашей стране они вовсе были недоступны. Благодаря освоению нами методов определения ОАА открылась также возможность проспективного изучения показателей естественного и адаптивного иммунитета в скрытую латентную стадию развития СД1. Фрагмент первых результатов этих иммунологических исследований, касающийся лейкоцитарного состава крови и иммунофенотипа лимфоцитов у ОАА-позитивных детей, уже был опубликован в виде 1-го сообщения [8].

Целью настоящего, 2-го сообщения стало обобщение и анализ уже опубликованных данных [1-3, 9] и новых результатов, посвященных дальнейшему изучению иммунитета, а именно роли цитокинов на различных этапах докли-

нического развития СД1 у ОАА+ детей. Этот фрагмент исследования тесно связан с предыдущим, 1-м сообщением [8], так как выполнен в тех же группах пациентов. Особое внимание в представленном фрагменте направлено на выяснение уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α), регуляторных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 и ИФН γ) и хемокинов (ИЛ-8 и ИЛ-16) у обследуемых на разных доклинических стадиях и в начальный период клинического дебюта диабета. Были учтены последние рекомендации ADA относительно фаз стадии, предшествующей развитию СД1: 1) бессимптомная нормогликемическая с повышенным титром не менее чем 2-3 видов ОАА; 2) бессимптомная дисгликемическая с повышенным титром ОАА; 3) симптоматическая, т.е. с проявлением первых клинических признаков СД1, но с отсутствием уже прежде выявленных некоторых видов ОАА, наиболее часто аутоантител к инсулину [10, 11].

Материал и методы

Исследования проведены у 561 ребенка обоих полов в возрасте 7-15 лет без каких-либо воспалительных, аллергических или онкологических заболеваний, а также с нормальным уровнем глюкозы в ПК. Из данной общей когорты были отобраны для дальнейшего обследования 457 детей, у которых родственники первой линии (отцы, матери, сибсы) больны СД1. На основании определения вида и титра островковых аутоантител (GADA, IAA и IA-2A) эту группу пациентов разделили на две подгруппы: 161 ОАА-позитивный ребенок, у которых определялся повышенный титр не менее чем к двум ОАА (преимущественно GADA и IA-2A) и 296 ОАА-негативных пациентов, у которых ни один из трех исследуемых видов ОАА не выявлялся в многократных тестовых определениях. 104 нормогликемических ребенка без генетической предрасположенности, которые были негативны ко всем трем видам ОАА, составили контроль. Одновременное исследование лейкоцитарного состава крови и количества лимфоцитов различного иммунофенотипа проведено проспективно у одних и тех же пациентов в динамике (275 детей), разделенных на 4 подгруппы: 1) здоровые, ОАА-отрицательные с нормогликемией, без генетической предрасположен-

Оригінальні дослідження

ности 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.

Количество различных видов цитокинов (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО α , ИФН γ) и хемокинов (ИЛ-8, ИЛ-16) определяли иммуноферментным методом ELISA с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом Starfax3200 фирмы Star (США) и набора реактивов главным образом фирм Diaclone (Франция) и DRG (США).

Результаты и их обсуждение

У ОАА-позитивных детей в доклиническую и раннюю клиническую стадии развития СД1 наблюдается выраженное повышение уровней всех провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α), но степень этих изменений и их характер для каждого вида цитокина были неодинаковы и имели свои особенности. В связи с этим полученные данные представляются в виде рисунков, из которых видно индивидуальные колебания уровней цитокинов и медиана их изменения.

Провоспалительные цитокины

Интерлейкин-1 (ИЛ-1) — провоспалительный макрофагальный многофункциональный цитокин, полипептид, обладает гипертермическим свойством, индуцирует лихорадку и способствует адаптивному иммунитету. Среди большого семейства ИЛ-1 и его рецепторов наиболее биологически активны ИЛ-1 α , ИЛ-1 β и ИЛ-1Ra (рецептор-антагонист), который способен блокировать провоспалительное действие ИЛ-1 [12, 13].

Изучение роли ИЛ-1, главным образом ИЛ-1 β , при СД1 широко проводилось преимущественно на лабораторных животных со спонтанным диабетом и показало его деструктивное действие на бета-клетки *in vitro*, особенно при совместном введении с ИЛ-6 и ФНО α [13, 14]. Количество работ, посвященных исследованию ИЛ-1 и ИЛ-1 β у больных СД1, невелико.

Ко времени начала наших исследований по программе ИДСД в доступной литературе удалось найти только одну работу Hussein M.J. et al., опубликованную в 1996 г., в которой сообщалось о повышении содержания ИЛ-1 α в ПК детей с недавно выявленным СД1 [15]. Вместе с тем, по данным этих авторов, содержание ИЛ-1 β в ПК обследуемых изменялось недостоверно. Существовало твердое убеждение, что у больных СД1 наблюдается выраженное повышение в ПК уровня только ИЛ-1 β [14, 16, 17].

Проведенные нами исследования [3] убедительно показали значительное повышение уровня ИЛ-1 α в ПК у многих детей, позитивных по наличию островковых аутоантител и больных СД1, по сравнению со здоровыми детьми. Как видно из **рис. 1А**, медиана содержания ИЛ-1 α у ОАА-позитивных детей составляла 9,2 (0-145) пг/мл, у больных СД1 — 5,0 (0-157) пг/мл, в то время как у ОАА-негативных детей — 3,8 (0-62) пг/мл, а в контроле — 3,5 (0-15) пг/мл.

Полученные результаты о выраженном повышении уровня ИЛ-1 α в ПК детей с предиабетом и начальной стадией СД1 были недавно подтверждены Y.G. Chen et al. (2014), которые обнаружили, что у детей с генетической склонностью к СД1, позитивных по наличию островковых аутоантител (IAA, IA-2A, GADA и ZnT8), имеется достоверное увеличение содержания ИЛ-1 α в плазме ПК по сравнению с ОАА-негативными сверстниками [18].

При исследовании ИЛ-1 β нами также было обнаружено повышение его содержания в ПК у большинства обследуемых ОАА-позитивных детей.

Из **рис. 1Б** видно, что медиана содержания ИЛ-1 β у ОАА-позитивных пациентов составляла 2,47 (0-5,5) пг/мл, а у больных СД1 — 2,3 (0-5,7) пг/мл, в то время как у ОАА-негативных детей медиана содержания ИЛ-1 β составляла 0,3 (0-1,8) пг/мл, а у детей контрольной группы — 0,005 (0-0,4) пг/мл [3, 9], что согласуется с данными других авторов [13].

Как известно, мнение о том, что ИЛ-1 β является главным киллером бета-клеток при СД1, основывалось на исследованиях, проведенных преимущественно на изолированных ОЛ человека или *in vivo* на лабораторных животных [13, 19, 20]. Следует учитывать, что изолированные ОЛ в этих исследованиях были лишены естественной взаимосвязи с другими видами

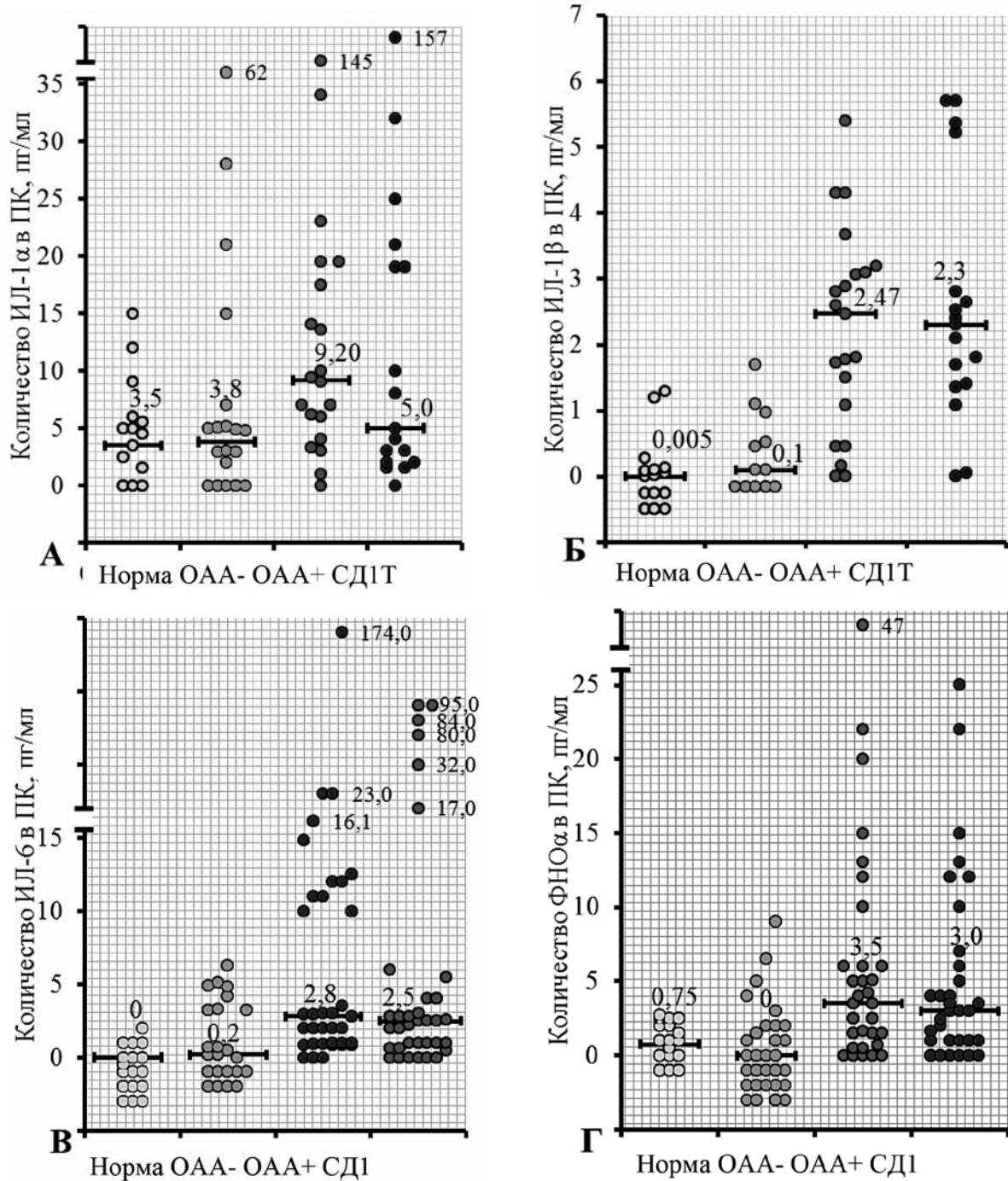


Рис. 1. Содержание провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 α (А), ИЛ-1 β (Б), ИЛ-6 (В) и ФНО α (Г) в ПК здоровых детей (норма), ОАА-негативных, ОАА-позитивных и больных СД1.

клеточных элементов, находящимися с ними в функциональной взаимосвязи, и постоянной рециркуляции крови, содержащей многие биологически активные соединения.

К сожалению, исследования с ИЛ-1 α *in vitro*, аналогичные таковым с ИЛ-1 β , с целью их сравнения пока еще не проводились.

Следовательно, наши результаты уточняют и дополняют существующее представле-

ние о механизме провоспалительного действия ИЛ-1 при СД1, а именно показывают, что в этом механизме ключевую роль играет не только ИЛ-1 β , но и ИЛ-1 α .

Интерлейкин-6 (ИЛ-6). Провоспалительный цитокин гликопротеин, обладающий широким спектром биологического действия, принадлежит к центральным регуляторам иммунитета и кроветворения, характеризуется диabetоген-

ным воздействием. Уровень ИЛ-6 резко повышается в циркуляции при инфекциях, травмах, стрессах, является надежным маркером воспаления, в том числе и системного субклинического. Его патогенное действие осуществляется как локально (паракринно/аутокринно), так и дистантно (эндокринно), подобно обычным гормонам. Согласно заключению экспертов Гарвардского университета (2017), определение ИЛ-6 является чувствительным методом выявления воспаления, превышающим эффективность определения скорости оседания эритроцитов (СОЭ), С-реактивного протеина и др.

Имеется значительное число публикаций о том, что в культуре тканей *in vitro* ИЛ-6 оказывает выраженное цитотоксическое действие на бета-клетки [21]. Однако информация о содержании ИЛ-6 в ПК больных СД1 на различных этапах развития СД1, особенно в доклинической стадии, немногочисленна. Все же в имеющихся работах описано значительное повышение уровня ИЛ-6 в ПК больных с недавно диагностированным СД1 [22, 23].

По результатам наших исследований [3], как видно из **рис. 1В**, обнаружено значительное повышение уровня ИЛ-6 в ПК у большинства (16 из 26) ОАА-позитивных детей — медиана 2,8 (0-174) пг/мл, по сравнению со здоровыми детьми — медиана 0 (0-2,5) пг/мл. Повышенное содержание ИЛ-6 в ПК отмечалось также и у детей, заболевших СД1, медиана — 2,5 (0-5) пг/мл. Важно отметить, что у части (n=12) ОАА-позитивных детей с особенно высоким уровнем ИЛ-6 в ПК заболевание СД1 возникало гораздо быстрее и носило наиболее агрессивный характер. У большинства таких пациентов в дальнейшем наблюдалась также более отчетливая дисгликемия, что, по данным ADA [10, 11], указывает на наличие второй бессимптомной, заключительной фазы перехода доклинической стадии развития заболевания в манифестный, клинический дебют СД1. У 8 из 26 ОАА-позитивных детей, у которых возник СД1, также отмечался высокий уровень ИЛ-1 α , ИЛ-1 β и ФНО α . Причем у этих пациентов в последующем, через 3-5 лет появлялись непролиферирующая или умеренная диабетическая ретинопатия (согласно последней классификации ADA) [24].

Небольшое повышение содержания ИЛ-6 в ПК у отдельных ОАА-отрицательных детей по сравнению с контролем можно объяснить тем,

что, хотя в этой группе пациентов были дети с нормогликемией, они все же имели генетическую предрасположенность к СД1. А согласно последним данным, у детей, негативных по наличию ОАА, но генетически склонных к развитию СД1, в дальнейшем в юношеском и даже взрослом возрасте могут появляться один, два или даже три вида островковых аутоантител (IA-2A, GADA и ZnT8), и затем развивается так называемый «взрослый» СД1, или LADA [25].

Фактор некроза опухолей (ФНО) — провоспалительный цитокин. Так как он в больших количествах продуцируется жировой тканью, его также относят и к адипокинам. Существует два вида ФНО: ФНО α (кахентин) и ФНО β (лимфотоксин). Наиболее изучен ФНО α . ФНО α — функционально полипотентен и играет центральную роль во многих физиологических и патофизиологических процессах, контролирует жировой метаболизм, способствует развитию аутоиммунных и сердечно-сосудистых заболеваний, неврологических расстройств, легочных болезней, а также метаболического синдрома [26, 27].

Изучению содержания циркулирующего ФНО α в ПК и его продукции мононуклеарами у больных СД1 посвящено относительно небольшое количество работ, в большинстве из которых отмечается повышенное содержание ФНО α в ПК при СД1, более выраженное на начальной стадии его возникновения, нежели при длительном течении заболевания [28]. В то же время какую-либо информацию о содержании ФНО α в доклиническую стадию развития СД1 в доступной литературе обнаружить не удалось.

Согласно результатам наших уже опубликованных работ [3], а также новых исследований, наиболее содержание ФНО α в ПК увеличивается задолго до развития клинически диагностируемого заболевания.

Из **рис. 1Г** видно, что у 7 из 28 ОАА-позитивных детей содержание ФНО α в ПК значительно превышало таковое у ОАА-негативных детей. Медиана показателя соответственно составляла 3,5(0-47)пг/мл;0(0-85)пг/мл;0,75(0-2,5)пг/мл в контрольной группе. У большинства детей, у которых развился СД1, также отмечалось повышение содержания ФНО α в ПК, его медиана составляла 3,0 (0-25) пг/мл. У четырех больных СД1 с высоким содержанием ФНО α отмечался также повышенный уровень ИЛ-1 и ИЛ-6,

и в дальнейшем, через несколько лет у троих из этих пациентов возникала диабетическая ретинопатия, а у одного — нарушение функции почек. Полученные результаты дают основание считать, что ФНО α , так же как ИЛ-1 и ИЛ-6, играет чрезвычайно важную провоспалительную роль в патогенезе СД1 у детей.

Иммунорегуляторные цитокины

Интерлейкин-2 (ИЛ-2) — иммунорегуляторный цитокин, обладающий плюрипотентными свойствами, выполняет в организме центральную роль в контроле гуморального и клеточного иммунитета, имеет ключевое значение в генерации числа и функции регуляторных CD4+CD25+FOXP3+клеток на периферии. Установлено, что дефект иммунного гомеостаза при СД1 является следствием снижения ИЛ-2 сигнализации, влияющей на экспрессию CD4+CD25+FOXP3-клеток, обладающих антидиабетическим действием. Имеются также данные о благоприятном действии малых доз ИЛ-2 в лечении больных диабетом [3, 29, 30].

В то же время существующие немногочисленные публикации о содержании ИЛ-2 в ПК больных СД1 противоречивы. Одна группа авторов [31-33] сообщает о высоком уровне ИЛ-2 в ПК пациентов с СД1, другая [34-36], наоборот, отмечает снижение уровня циркулирующего ИЛ-2 у больных диабетом.

В наших исследованиях, как видно из **рис. 2А**, не обнаружено достоверного изменения уровня ИЛ-2 в ПК ОАА-позитивных детей, медиана — 0 (0-0) пг/мл, по сравнению с ОАА-негативными детьми, медиана — 0 (0-1,25) пг/мл, и детьми контрольной группы, медиана — 0 (0-0,4) пг/мл. В то же время у большинства детей, у которых возник СД1, медиана составляла 5,8 (0-1,96) пг/мл, что согласуется с данными других авторов, сообщающих о повышении содержания этого цитокина именно в начальной стадии СД1 [15, 33, 37]. Полученные нами результаты позволяют считать, что ИЛ-2 не играет ведущей роли на начальной стадии аутоиммунного процесса, приводящей к деструкции бета-клеток, в отличие от провоспалительных цитокинов. В дальнейшем с прогрессированием СД1 содержание ИЛ-2 в ПК повышается, что подтверждается и другими исследователями [36]. Такой кратковременный подъем уровня ИЛ-2 в ПК является, по-видимому, защитной реакцией для нейтрализации действия провоспалительных цитокинов.

Это подтверждается благоприятным действием введения малых доз ИЛ-2 больным с начальной стадией заболевания [29, 38]. Однако такая реакция организма уже не в состоянии победить мощный деструктивный аутоиммунный процесс, предшествующий развитию заболевания.

Интерлейкин-4 — противовоспалительный регуляторный плейотропный цитокин, продуцируемый активированными CD4+клетками (Th0-, Th1-, Th2-лимфоцитами). ИЛ-4 обладает выраженным стимулирующим действием на В-, ЕК-, ЕК-Т клетки, участвуя во многих реакциях естественного и адаптивного иммунитета, осуществляя в организме защитную функцию от патогенов, злокачественных клеток и нарушения иммунной толерантности [43].

В эксперименте на животных ИЛ-4 оказывает противодействие аутоиммунной деструкции бета-клеток [39, 40]. Большинство исследователей также находили более низкий уровень ИЛ-4 у детей, больных СД1, особенно в начальной стадии его развития, и у ОАА-позитивных детей по сравнению с ОАА-негативными [37, 39, 41]. Еще одним подтверждением того, что ИЛ-4 обладает выраженным противодиабетическим действием, является то, что при инкубации его с ОЛ человека и коктейлем провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β и ФНО α) полностью предотвращается вызываемый ими апоптоз бета-клеток [42].

В собственных исследованиях [3], как видно из **рис. 2Б**, было обнаружено значительное снижение уровня ИЛ-4 в ПК у ОАА-позитивных детей — медиана 0 (0-0,3) пг/мл по сравнению с ОАА-негативными детьми — медиана 0 (0-11) пг/мл и, особенно, здоровыми нормогликемическими детьми, у которых отсутствовала генетическая предрасположенность к развитию СД1 — медиана 0,7 (0-7,9) пг/мл. Причем у 29 из 30 ОАА-позитивных детей ИЛ-4 в сыворотке совсем не определялся. У детей с уже развившимся СД1 имелась тенденция к небольшому повышению концентрации ИЛ-4 в ПК. Так, у 6 из 30 больных детей содержание ИЛ-4 в ПК колебалось от 0,3 пг/мл до 0,5 пг/мл, хотя медиана составляла 0 (0-0,5) пг/мл. Вышеизложенное дает нам право присоединиться к существующему мнению большинства ученых [43], что ИЛ-4 является характерным противодиабетическим цитокином.

Интерлейкин-10 — иммунорегуляторный, противовоспалительный цитокин, мощный им-

Оригінальні дослідження

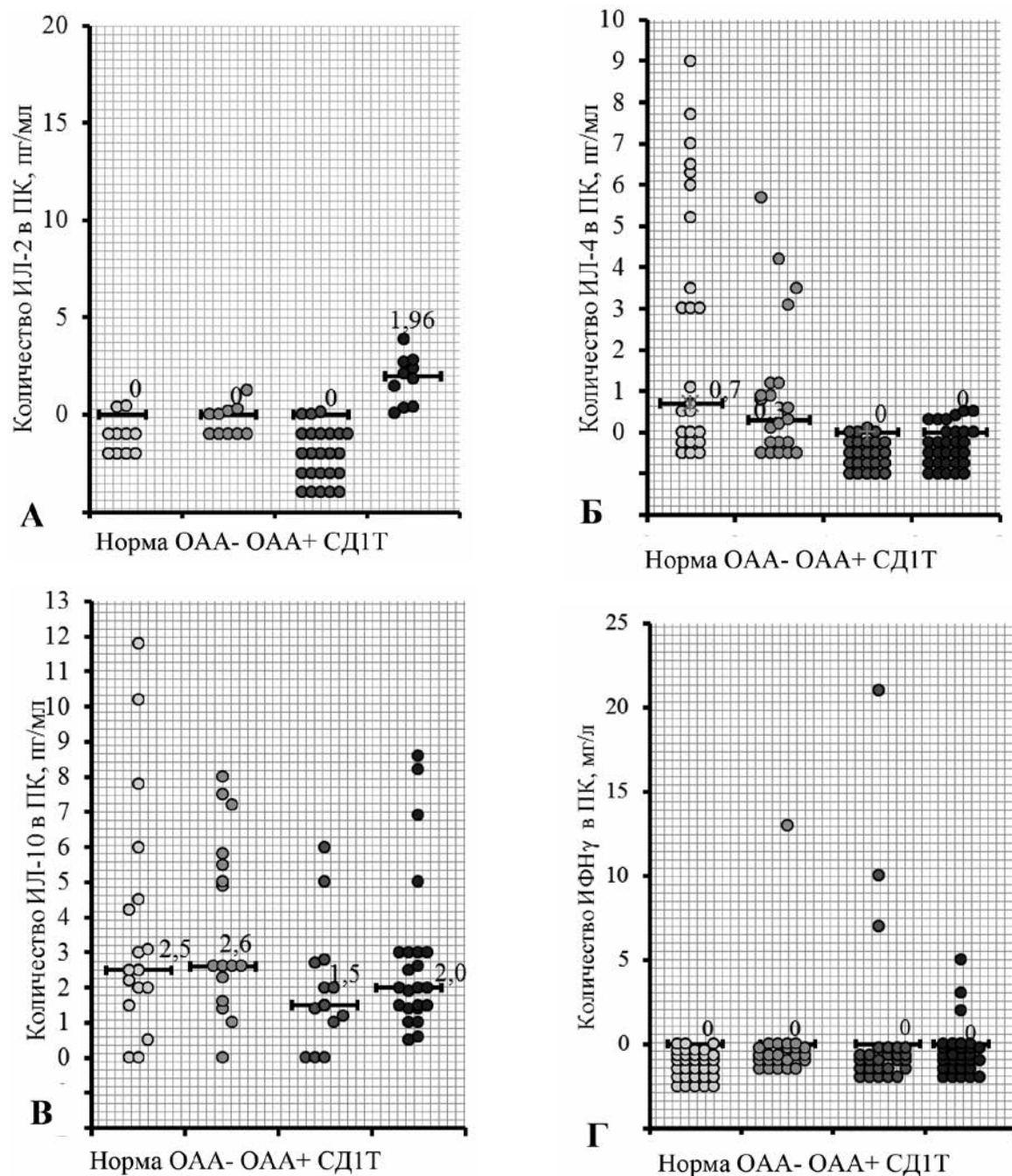


Рис. 2. Содержание иммунорегуляторных цитокинов: ИЛ-2 (А), ИЛ-4 (Б), ИЛ-10 (В) и ИФН γ (Г) в ПК здоровых детей (норма), ОАА-негативных, ОАА-позитивных и больных СД1.

муносупрессор, обладает широким спектром биологического действия. ИЛ-10 стимулирует рост стволовых клеток и тимоцитов, регулирует функцию лимфоидных и миелоидных клеток. В больших количествах он секретируется субпопуляцией Tr1 иммунорегуляторных CD4+CD25+FOXP3+клеток [5].

При инкубировании в культуре тканей ИЛ-10 с ОЛ животных и человека обнаружено защитное его действие от провоспалительных

цитокинов, вызывающих деструкцию бета-клеток. На основании этого большинство авторов склонны относить ИЛ-10 к антидиабетическим цитокинам [5, 38, 42, 43].

В наших исследованиях не обнаружено достоверной разницы в содержании ИЛ-10 в ПК между четырьмя обследуемыми группами детей (здоровых, ОАА-негативных, ОАА-позитивных и больных СД1) из-за значительных индивидуальных колебаний. Все же, как видно

из **рис. 2В**, медиана содержания ИЛ-10 у ОАА-позитивных детей составляла 1,5 (0-6,0) пг/мл, а у больных СД1 — 2,0 (0,5-8,6) пг/мл, против ОАА-негативных — 2,6 (0-8,0) пг/мл и здоровых детей — 2,5 (0-11,8) пг/мл.

Полученные нами результаты в определенной мере близки к таковым последних иммунологических исследований, проведенных на молекулярном уровне, показавшим, что при СД1 происходит резкое снижение продукции ИЛ-10 субтипом Тg1-клеток иммунорегуляторных CD4+CD25+FOXP3+субпопуляций лимфоцитов. У здорового человека эта субпопуляция благодаря «огромной секреции ИЛ-10» противодействует деструктивному влиянию провоспалительных цитотоксических Т-клеток на ОЛ [5, 6]. Естественно, полного совпадения наших данных с результатами, полученными этими авторами, быть не может, так как ими определялось количество ИЛ-10 локально на уровне островков (клетка к клетке), а нами — суммарная концентрация этого цитокина в ПК, в которую ИЛ-10 поступает из различных органов и тканей организма. Он также мог нейтрализоваться многочисленными другими факторами.

Интерфероны — провоспалительные цитокины, обладающие плейотропным действием, характеризующиеся прежде всего антивирусным, антипролиферативным и антинеопластическими свойствами, считаются важными модуляторами иммунной системы и реактивности.

Существует три класса ИФН: I — ИФН α (антивирусный), II — ИФН β (лимфотоксин), III — (эндотоксин). ИФН α — цитостатик, он наименее токсичен по сравнению с другими типами этого цитокина, широко применяется в лечении злокачественных новообразований [46, 47]. Повышение уровня ИФН α в ПК описано также у детей с генетической склонностью к СД1 в доклиническую стадию развития последнего [48]. Имеются также данные о том, что ИФН α играет центральную роль в ранней фазе развития СД1 у человека и участвует в поражении бета-клеток [48, 49]. Описаны также случаи развития СД у лиц, длительно лечившихся ИФН α [47].

При исследовании уровня циркулирующего ИФН γ и его продукции мононуклеарами ПК при СД1 у человека были получены неоднозначные результаты. По данным одних авторов [37, 50, 51], у детей и подростков с впервые выявленным СД1 отмечается значительное повышение

содержания ИФН γ в ПК и его продукции мононуклеарами после стимулирования митогенами. Высокий уровень ИФН γ в ПК был также описан у нормогликемических детей, генетически склонных к диабету, по сравнению с детьми, уже заболевшими СД1 [52]. Другие исследователи не находили существенного повышения содержания уровня ИФН γ в ПК у больных СД1 [53] или даже определяли его снижение [39, 54].

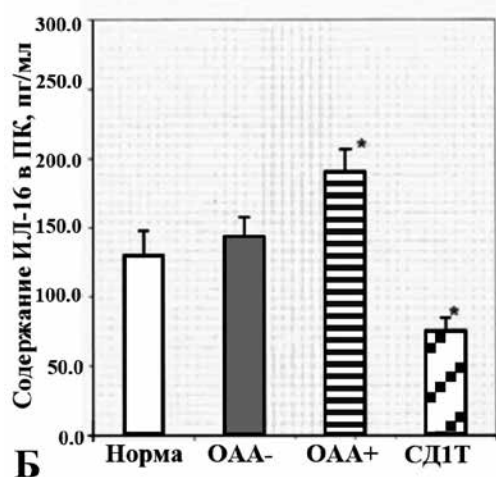
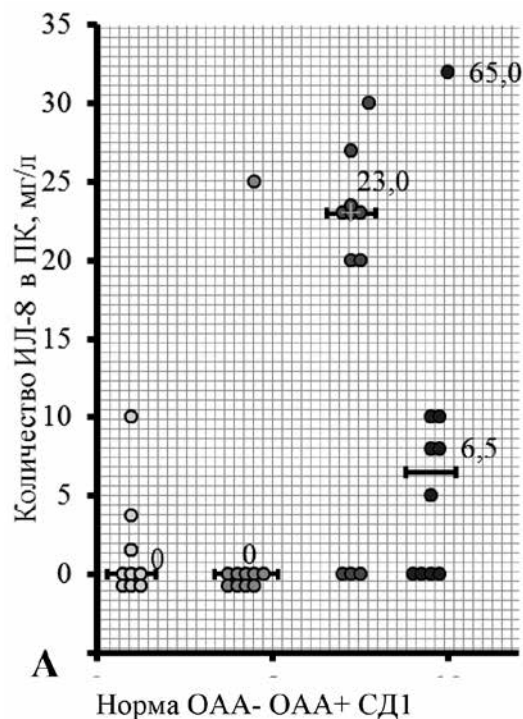
Нами [1, 3] не обнаружено достоверного изменения содержания ИФН γ в ПК у детей всех обследованных групп. Как видно из **рис. 2Г**, медиана содержания ИФН γ в ПК как ОАА-позитивных детей, больных СД1, так и ОАА-негативных и нормогликемических детей равнялась нулю. Возможно, это связано как с очень небольшим поступлением ИФН γ в циркуляцию, так и с недостаточной чувствительностью используемого нами метода определения этого цитокина. Все же, как видно из **рис. 2Г**, у четырех из 35 ОАА-позитивных детей содержание ИФН γ в ПК значительно превышало нормальные показатели и колебалось от 6 пг/мл до 22 пг/мл.

Хемокины

Интерлейкин-8 (CXCL8) — активный провоспалительный α -хемокин из семейства СХС, мощный хемоаттрактант, контролирующий миграцию циркулирующих Т-лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов из ПК в очаги воспаления. Одновременно он способствует повышению активности мигрирующих лейкоцитов, их адгезии к сосудистой стенке и диапедезу через нее [3, 55].

Информация о роли ИЛ-8 в патогенезе СД1 у человека весьма ограничена. По имеющимся данным [56, 57], содержание ИЛ-8 в сыворотке ПК больных СД1 значительно повышено. Публикации об уровне ИЛ-8 в ПК при предиабете в период выполнения программы ИДСД отсутствовали.

Собственные исследования, как видно из **рис. 3А**, показали, что у большинства ОАА-позитивных детей имело место выраженное повышение содержания ИЛ-8 в ПК, медиана составляла 23,0 (0-32) пг/мл, по сравнению с ОАА-негативными детьми — медиана 0 (0-0) пг/мл. У детей с уже возникшим СД1 повышение уровня ИЛ-8 в ПК выявлено у 6 из 10 обследованных, медиана равнялась 6,5 (0-65) пг/мл. Следовательно, проведенные исследования показывают, что наиболее высокое содержание ИЛ-8 характерно



* $p < 0,05$ по сравнению с группой здоровых детей

Рис. 3. Содержание хемокинов: ИЛ-8 (А) и ИЛ-16 (Б) в ПК здоровых детей (норма), ОАА-негативных, ОАА-позитивных и больных СД1.

для доклинических стадий развития СД1. Это наводит на мысль, что ИЛ-8 принимает участие в миграции аутореактивных клеток еще на самых ранних этапах развития аутоиммунного процесса в ОЛ, задолго до клинической манифестации заболевания, т.е. у еще «практически здорового» ребенка. По мере уменьшения числа функционирующих бета-клеток и ослабления иммунной реакции происходит снижение уровня ИЛ-8 в ПК, а следовательно, и уменьшение миграции лейкоцитов в очаг воспаления.

Так как процесс деструкции бета-клетки носит сугубо индивидуальный характер, т.е. часть функционирующих бета-клеток у некоторых детей остается даже после развития заболевания, процесс миграции лейкоцитов в ОЛ хотя и ослабляется, но происходит. Таким образом, выявление наличия ИЛ-8 на начальной стадии СД1 может служить маркером, указывающим на сохранность резидуальных бета-клеток при уже развившемся заболевании, что имеет большое значение для выбора вида иммунотерапии.

Интерлейкин-16 — провоспалительный иммунорегуляторный цитокин, мощный хемотактант, обладающий широким спектром биологического действия. Наряду со свойством контролировать миграцию различных видов лейкоцитов (антигензависимых Т-лимфоцитов, нейтрофилов и эозинофилов), он способен также модулировать созревание и активность CD25+лимфоцитов и участвовать в регуляции CD4+ Th1-клеток [1, 3].

Известны отдельные работы о повышении уровня ИЛ-16 при аутоиммунных заболеваниях (бронхиальной астмой, экземе, множественной миеломе, болезни Крона и др.). Какая-либо информация о роли ИЛ-16 при СД1 до недавнего времени отсутствовала.

Впервые в литературе в 2004 г. были опубликованы наши данные [1, 3] о снижении уровня циркулирующего ИЛ-16 у детей с начальной стадией заболевания СД1. В дальнейших наших исследованиях, как видно из **рис. 3Б**, выявлено достоверное ($p < 0,05$) повышение содержания ИЛ-16 в ПК у ОАА-позитивных детей, а также у уже заболевших СД1, по сравнению с ОАА-негативными и детьми контрольной группы. Полученные результаты недавно были подтверждены другими авторами [58] и цитируются зарубежными исследователями. Они указывают на значительную роль ИЛ-16 в механизме аутоиммунного процесса, приводящего к деструкции бета-клеток, и могут служить предсказанием его развития, т.е. быть биомаркером.

Таким образом, согласно современным представлениям, СД1 у человека является аутоиммунным заболеванием, характеризующимся деструкцией инсулин-продуцирующих клеток [11, 59, 60]. Многолетние исследования, проведенные нами у ОАА-позитивных и ОАА-негативных детей с отягощенной наследственностью по СД1 [3], показали, что в сложных иммунных

механизмах, приводящих к развитию СД1, ключевую роль играют различные виды цитокинов и хемокинов. Этот процесс сопровождается значительным повышением уровней провоспалительных цитокинов ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α и хемокинов ИЛ-8 и ИЛ-16, которые также продуцируются клетками ОЛ, направляющих миграцию лимфоцитов в аутоиммунный процесс в ОЛ [61], а также снижением содержания иммунорегулирующих цитокинов (ИЛ-4 и ИЛ-10), секретируемых в основном субпопуляцией CD4+CD25+FOXP3+клеток [5, 45].

Полученные данные согласуются с недавно выдвинутой гипотезой, согласно которой ключевую роль в патогенезе СД1 играет нарушение баланса между провоспалительными эффекторными Т-лимфоцитами и иммунорегуляторными CD4+CD25+FOXP3+клетками [5], контролируемые ИЛ-2 [30]. Следовательно, при развитии СД1 происходит контррегуляция продиабетических и антидиабетических цитокинов. Кроме того, нами впервые показано, что этот контррегуляционный дисбаланс происходит на самой начальной, латентной стадии патогенеза СД1, которая, согласно последним публикациям [10, 62, 63], предшествует дисгликемии, т.е. следующей доклинической стадии развития заболевания. Естественно, большее значение при этом имеет и генетическая предрасположенность индивидуума, а также ряд других, пока еще неизвестных факторов. Полученные данные могут быть полезны при выборе вида иммуноинтервенции с целью профилактики и лечения СД1.

Заключение

Доклиническая латентная стадия развития СД1 у детей с генетической отягощенностью по данному заболеванию у ОАА-позитивных лиц, позитивных по наличию не менее двух видов аутоантител к антигенам островков Лангерганса (преимущественно GADA и IA-2A), характеризуется повышенным уровнем провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α) и хемокинов (ИЛ-8 и ИЛ-16) в крови при одновременном снижении содержания иммунорегуляторных цитокинов (ИЛ-4 и ИЛ-10). Полученные данные подтверждают гипотезу, что одним из ключевых механизмов патогенеза СД1 является дисбаланс между эффекторными цитоток-

сическими Т-клеточными и иммунорегуляторными цитокинами. Полученные данные могут быть полезны при выборе вида иммуноинтервенции с целью предупреждения и терапии СД1.

Список использованной литературы

1. Тронько НД, Попова ВВ, Зак КП, Маньковский 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». *Эндокринология*. 2010;15(2):180-91. (Tron'ko ND, Popova VV, Zak KP, Man'kovsky BN. About the research prospective program «Immunity in the preclinical period of type 1 diabetes development», created in the State Institution «V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, National Academy of Medical Sciences of Ukraine». *Endokrinolohiya*. 2010;15(2):180-91).
2. Зак КП, Попова ВВ. Предсказание 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 development and diagnosis of its asymptomatic phase using autoantibodies to the islets of Langerhans in human long before the onset of the disease. *Mizhnarodnyi endokrynolohichnyi zhurnal*. 2016;7(79):11-21).
3. 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 plyus, 2015; 485 p.).
4. Sabat R, Ouyang W, Wolk K. Therapeutic opportunities of the IL-22 – IL-22R1 system. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2014;13:21-38.
5. Hull CM, Peakman M, Tree TIM. Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it? *Diabetologia*. 2017 Oct;60(10):1839-50.
6. Heuts F, Edner NM, Walker LSK. Follicular T helper cells: a new marker of type 1 diabetes risk? *Diabetes*. – 2017;66(2):258-60.
7. Viisanen T, Ihantola E-L, Nääntö-Salonen K. 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.
8. Зак КП, Попова ВВ, Грузов МА, Хоменко БМ, Афанасьева ВВ, Малиновская ТН, и др. 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. *Эндокринология*. 2017; 22(3):201-10. (Zak KP, Popova VV, Gruzov MA, Khomenko BM, Afanasyeva VV, Malinovskaya TN, et al. Results of 20 year studies on immunity at the preclinical phase of type 1 diabetes development in children according to the IPDM program: 1. Leukocyte composition and immune phenotype of blood lymphocytes. *Endokrinolohiya*. 2017;22(3):201-10).
9. 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 in human type 1 diabetes mellitus (Review and own data). *Ukr Med chasopys*. 2006;1(51):78-89).
10. Insel RA, Dunne JL, Atkinson MA, Chiang JL, Dabelea D, Gottlieb PA, et al. Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2015 Oct;38(10):1964-74.
11. Regnell SE, Lernmark Å. Early prediction of autoimmune (type 1) diabetes. *Diabetologia*. 2017 Aug;60(8):1370-81.
12. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011;117(14):3720-32.
13. Mandrup-Poulsen T. Interleukin-1 antagonism: a study companion for immune tolerance induction in type 1 diabetes? *Diabetes*. 2014;63(6):1833-5.
14. Mandrup-Poulsen T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia*. 1996;39(4):1005-29.

Оригінальні дослідження

15. Hussain MJ, Peakman M, Gallati H, Lo SSS, Hawa M, Viberti GC, et al. Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia*. 1996;39(1):60-9.
16. Ronn SG, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T. Diabetes and suppressors of cytokine signaling proteins. *Diabetes*. 2007;56(2):541-8.
17. Uno S, Imagawa A, Okita K, Sayama K, Moriwaki M, Iwahashi H, et al. Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor- α in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2007;50(5):596-601.
18. Chen YG, Cabrera SM, Jia S, Kaldunski ML, Kramer J, Cheong S, et al. Molecular signatures differentiate immune states in type 1 diabetic families. *Diabetes*. 2014;63(11):3960-73.
19. Rabinovitch A. Immunoregulation by cytokines in autoimmune diabetes. *Adv Exp Med Biol*. 2003;520(5):159-93.
20. Störling J, Binzer J, Andersson AK, Züllig RA, Tonnesen M, Lehmann R, et al. Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt. *Diabetologia*. 2005;48(10):2039-50.
21. Russel MA, Morgan NG. Interleukin-6 potentiates the cytotoxic actions of both interleukin-1 β and palmitate in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2012;55(Suppl 1):A-492.
22. Galassetti PR, Iwanaga K, Crisostomo M, Zaldivar FP, Larson J, Pescatello A. Inflammatory cytokine, growth factor and counterregulatory responses to exercise in children with type 1 diabetes and healthy controls. *Pediatr Diabetes*. 2006;7(1):16-24.
23. Pham MN, Kolb H, Mandrup-Poulsen T. Adiponectin levels negatively associate with beta cell function in type 1 diabetes, in contrast to leptin and resistin. *Diabetologia*. 2011 (B);54(Suppl 1).
24. Solomon SD, Chew E, Duh EJ, Sobrin L, Sun JK, VanderBeek BL, et al. Diabetic retinopathy: a position statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2017 Mar;40(3):412-8.
25. Bonifacio E. Predicting type 1 diabetes using biomarkers. *Diabetes Care*. 2015;38(6):989-96.
26. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012 Jan 19;119(3):651-65.
27. Tse MCL, Herlea-Pana O, Brobst D, Yang X, Wood J, Hu X, et al. Tumor necrosis factor- α promotes phosphoinositide 3-kinase enhancer A and AMP-activated protein kinase interaction to suppress lipid oxidation in skeletal muscle. *Diabetes*. 2017 Jul;66(7):1858-70.
28. Herold KC, Gitelman SE, Ehlers MR, Gottlieb PA, Greenbaum CJ, Hagopian W, et al. Teplizumab (anti-CD3 mAb) treatment preserves C-peptide responses in patients with new-onset type 1 diabetes in a randomized controlled trial: Metabolic and immunologic features at baseline identify a subgroup of responders. *Diabetes*. 2013;62(11):3766-74.
29. Yu A, Snowwhite I, Vendrame F, Rosenzweig M, Klatzman D, Pugliese A, et al. Selective IL-2 responsiveness of regulatory T cells through multiple intrinsic mechanisms supports the use of low-dose IL-2 therapy in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2015;64(6):2172-83.
30. Yang JH, Cutler AJ, Ferreira RC, Reading JL, Cooper NJ, Wallace C, et al. Natural variation in Interleukin-2 sensitivity influences regulatory T-cell frequency and function in individuals with long-standing type 1 diabetes. *Diabetes*. 2015; 64(11):3891-02.
31. Hussain MJ, Maher J, Warnock T, Vats A, Peakman M, Vergani D. Cytokine overproduction in healthy first degree relatives of patients with IDDM. *Diabetologia*. 1998;41(3):343-9.
32. Aharoni D, Mor A, Bistrizer T. Aberrant Th1/Th2 cytokine secretory pattern in pre-IDDM high risk individuals. *Abstr Book 4th Immunol Diabet Soc Congr. (Rome, November, 12-15, 1999)*. 1999:119.
33. Rapoport MJ, Bistrizer T, Aharoni D, Weiss M, Ramot Y, Buchs A, et al. Th/Th2 cytokine secretion of first degree relatives of T1DM patients. *Cytokine*. 2005;30(5):219-27.
34. Tomoda T, Kurashige T, Taniguchi T. Imbalance of the interleukin 2 system in children with IDDM. *Diabetologia*. 1994;37(5):476-82.
35. Marchase RB, Chen PY, Su Z. Lymphocytes from subjects with type 1 diabetes are deficient in capacitative calcium entry: implications to immune function, cytokine production, and T cell subset representation. *Abstr Book 4th Immunol Diabet Soc Congr (Rome, 12-15 November 1999)*. 1999:82.
36. Herold KC, Burton JB, Francois F, Poumian-Ruiz E, Glandt M, Bluestone JA. Activation of human T cells by FcR nonbinding anti-CD3 mAb, hOKT3 γ 1 (Ala-Ala). *J Clin Invest*. 2003;111(3):409-18.
37. Rapoport MJ, Mor A, Vardi P, Ramot Y, Winker R, Hindi A, et al. Decreased secretion of Th2 cytokines precedes Up-regulated and delayed secretion of Th1 cytokines in activated peripheral blood mononuclear cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun*. 1998;11(6):635-42.
38. Tong J, Fujimoto WY, Kahn SE, Weigle DS, McNeely MJ, Leonetti DL, et al. Insulin, C-peptide, and leptin concentrations predict increased visceral adiposity at 5- and 10-year follow-up in nondiabetic Japanese Americans. *Diabetes*. 2005; 54(4):985-90.
39. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, et al. Multiple immuno-regulatory defects in type 1 diabetes. *J Clin Invest*. 2002;109(1):131-40.
40. Chang Y, Piao SL, Gao S, Zheng DM. Regulatory effects of micronutrient complex on the expression of Th1 and Th2 cytokines in diabetic C57BL mice. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2005;31(1):64-6.
41. Kallmann BA, Lampeter EF, Hanifi-Moghaddam P, Hawa M, Leslie RD, Kolb H. Cytokine secretion patterns in twins discordant for type 1 diabetes. *Diabetologia*. 1999;42(9):1080-5.
42. Santangelo C, Marchetti P, Marselli L. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in cytokine-induced human islet cell damage. *Diabetologia*. 2001;44(Suppl 1):A-41.
43. Hedman M, Faresjo M, Axelsson S. Suppressed Th1 and induced naïve T-cell phenotype in type 1 diabetes children. *Diabetologia*. 2007;50(Suppl 1):191.
44. Bonato V, Dionisi S, Vendrame F. Oral probiotic administration in the NOD mouse induces systemic and islet IL-10 production and down regulates pancreatic expression of proinflammatory cytokine and chemokines. *Diabetologia*. 2005;48(Suppl 1):A-193.
45. Tree TI, Lawson J, Edwards H, Skowera A, Arif S, Roep BO, et al. Naturally arising human CD4 T-cells that recognize islet autoantigens and secrete interleukin-10 regulate proinflammatory T-cells responses via linked suppression. *Diabetes*. 2010;59(6):1451-60.
46. Возианов АФ, Бутенко АК, Зак КП. Вопросы иммунохимиотерапии метастазирующей почечно-клеточной карциномы (по материалам последних международных конгрессов урологов и собственные исследования). *Журн. АМН України*. 2008;14(1):94-104. (Vozianov AF, Butenko AK, Zak KP. Problems of immunochemotherapy metastasizing renal cell carcinomas (based on the latest international congresses materials of urologists and own researches). *Zhurn. AMN Ukrainy*. 2008;14(1):94-104).
47. Возианов АФ, Бутенко АК, Зак КП. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. Киев: Наукова думка, 1998;315 с. (Vozianov AF, Butenko AK, Zak KP. Cytokines. Biological and antitumor properties. Kiev: Naukova Dumka, 1998; 315 p.).
48. Ferreira RC, Guo H, Coulson RM, Smyth DJ, Pekalski ML, Burren OS, et al. A type I interferon transcriptional signature precedes autoimmunity in children genetically at risk for type 1 diabetes. *Diabetes*. 2014;63(7):2538-50.
49. Marroqui L, Dos Santos RS, Op de Beeck A, Coomans de Brachène A, Marselli L, Marchetti P, et al. Interferon- α mediates human beta cell HLA class I overexpression, endoplasmic reticulum stress and apoptosis, three hallmarks of early human type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2017 Apr;60(4):656-67.
50. Nicoletti F, Conget I, Di Marco M, Di Marco R, Mazzarino MC, Bendtzen K, et al. Serum concentrations of the interferon- γ -inducible chemokine IP-10/CXCL10 are augmented in both newly diagnosed type 1 diabetes mellitus patients and subjects at risk of developing the disease. *Diabetologia*. 2002;45(8):1107-10.
51. Durinovic-Belló I, Riedl M, Rosinger S, Maisel N, Kalbacher H, Deeg M, et al. Th2 dominance of T helper cell response to preproinsulin in individuals with preclinical type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;958(4):209-13.
52. Faresjo M, Hedman M, Cilio C. Markers associated with T-regulatory cells are induced at diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2006;49(Suppl 1):279.
53. Beyan H, Humphreys RE, Leslie RDG. Study of T cell response to II Key/MHC class II epitope hybrid peptides in human type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2005;48(Suppl 1): A-99.
54. Qin H, Lee IF, 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 signaling. *Diabetes*. 2011;60(3):857-66.
55. Delves PJ, Roitt IM. Advance in immunology: The immune system. *New Engl J Med*. 2000;343(1):37-49.
56. Erbaççi AB, Tarakçioğlu M, Coskun Y, Sivasli E, Sibel Namiduru E. Mediators of inflammation in children with type 1 diabetes mellitus: cytokines in type 1 diabetic children. *Clin Biochem*. 2001;34(8):645-50.

57. Lo Hui-Chen, Lin Su-Chen, Wang Yu-Mei. The relationship among serum cytokines, chemokine, nitric oxide, and leptin in children with type 1 diabetes mellitus. *Clin Biochem.* 2004;37(8):666-72.
58. Yeung WCG, Al-Shabeeb A, Pang CNI, Wilkins MR, Cateau J, Howard NJ, et al. Children with islet autoimmunity and enterovirus infection demonstrate a distinct cytokine profile. *Diabetes.* 2012;61(15):1500-8.
59. Eisenbarth GS, Jeffrey J. The natural history of type 1A diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(2):146-55.
60. Atkinson MA, von Herrath M, Powers AC, Clare-Salzler M. Current concepts on the pathogenesis of type 1 diabetes — considerations for attempts to prevent and reverse the disease. *Diabetes Care.* 2015;38(6):979-88.
61. Yoshimatsu G, Kunnathodi F, Saravanan PB, Shahbazov R, Chang C, Darden CM, et al. Pancreatic β -cell-derived IP-10/CXCL10 isletokine mediates early loss of graft function in islet cell transplantation. *Diabetes.* 2017 Nov;66(11):2857-67.
62. Sosenko JM, Skyler JS, DiMeglio LA, Beam CA, Krischer JP, Greenbaum CJ, et al. A new approach for diagnosing type 1 diabetes in autoantibody-positive individuals based on prediction and natural history. *Diabetes Care.* 2015 Feb;38(2):271-6.
63. Nathan BM, Boulware D, Geyer S, Atkinson MA, Colman P, Goland R, et al. Dysglycemia and index60 as prediagnostic end points for type 1 diabetes prevention trials. *Diabetes Care.* 2017 Dec; 40(12): 1494-500.

(Надійшла до редакції 19.04.2018 р.)

Підсумки двадцятирічних досліджень імунітету в доклінічну фазу розвитку цукрового діабету 1-го типу в дітей за Програмою ІДЦД: 2. Вміст різних видів цитокінів і хемокінів у крові

**В.В. Попова, К.П. Зак, С.В. Мельниченко,
Т.М. Малиновська, К.М. Тронько, Я.А. Саєнко,
А.В. Куликовська, І.В. Гончар**

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

Резюме. Мета — дослідити вміст різних видів цитокінів і хемокінів у крові нормоглікемічних дітей з обтяженою спадковістю на передклінічній, прихованій стадії розвитку цукрового діабету 1-го типу (ЦД1), що встановлювалася на підставі визначення титру аутоантитіл до панкреатичних острівців (ОАА) Лангерганса. **Методи.** Обстежено 561 нормоглікемічну дитину за Програмою ІДЦД, яких розподілили на чотири підгрупи: 1) 104 дитини — ОАА-негативні без генетичної схильності до ЦД1 (контроль); 2) 296 пацієнтів — ОАА-негативні з генетичною схильністю до ЦД1; 3) 161 дитина — ОАА-позитивні щонайменше до двох видів ОАА (GADA і IA-2A); 4) 86 хворих дітей із клінічним дебютом ЦД1 із групи ОАА-позитивних пацієнтів. Визначення вмісту цитокінів у сироватці крові (ІЛ-1 α , ІЛ-1 β , ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10, ІФН γ , ЧНП) і хемокінів (ІЛ-8 та ІЛ-16) виконували імуноферментним методом ELISA з використанням набору реактивів фірм DIACLONE (Франція) і DRG (США). **Результати.** У нормоглікемічних дітей, позитивних щонайменше до двох острівцевих аутоантитіл (GADA і IA-2A), у найбільш ранню, приховану, передклінічну стадію ще перед розвитком дисглікемії значно підвищуються рівні прозапальних цитокінів (ІЛ-1 α , ІЛ-1 β , ІЛ-6 і ЧНП) і хемокінів (ІЛ-8/СХСЛ8 і ІЛ-16) і знижується вміст у крові імунорегуляторних цитокінів, надто ІЛ-4 і ІЛ-10. Із

розвитком дисглікемії зміни рівнів цитокінів прогресують. На час клінічної маніфестації ЦД1 у низки пацієнтів підвищені титри ОАА та рівні прозапальних цитокінів можуть зберігатися, вказуючи, що у частини з них деякі інсулін-продуруючі клітини залишаються незруйнованими попри виникнення захворювання, що може слугувати маркером у виборі виду замісної терапії. **Висновок.** Одним із ключових механізмів патогенезу ЦД1 є дисбаланс між прозапальними та регуляторними цитокінами.

Ключові слова: цукровий діабет 1-го типу, передклінічна стадія, цитокіни, хемокіни.

Results of twenty years studies on immunity at the preclinical phase of type 1 diabetes mellitus development in children according to the IPDM program: 2. Content of various types of cytokines and chemokines in the blood

**V.V. Popova, K.P. Zak, S.V. Melnichenko,
T.N. Malinovskaya, Ye.N. Tronko, Ya.A. Sayenko,
A.V. Kulikovskaya, I.V. Gonchar**

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

Abstract. The aim is to study the content of various types of cytokines and chemokines in the blood of normoglycemic children with burdened heredity which are at the preclinical latent stage of type 1 diabetes mellitus (T1DM) development, that was established on the basis of determining autoantibody titer to the pancreatic islets (OAA) of Langerhans. **Methods.** To survey 561 normoglycemic children according to the IPDM program, they were divided into four subgroups: 1) 104 — OAA-negative ones without genetic predisposition to T1DM (control); 2) 296 — OAA-negative with a genetic predisposition to T1DM; 3) 161 — OAA-positive to at least two OAA (GADA and IA-2A) and 4) 86 — those affected with T1DM. Determination of cytokine (IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN γ , TNF α) and chemokine (IL-8 and IL-16) content in blood serum was performed by ELISA using a reagents set of DIACLONE (France) and DRG (USA) firms. **Results.** It has been established that a significant increase in the level of proinflammatory cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF α), chemokines (IL-8 / CXCL8 and IL-16) and decrease in the level of immunoregulatory cytokines, especially IL-4 and IL-10 were observed in the earliest preclinical stage in normoglycemic children positive for at least two islet autoantibodies (GADA and IA-2A). With the development of dysglycemia, the change in the level of cytokines was progressed. When clinically diagnosed T1DM occurs, the elevated titer of OAA and the level of proinflammatory cytokines can be preserved in some patients, indicating that some of them have insulin-producing cells remaining not destroyed despite the onset of the disease and that can serve as a marker for choosing the type of substitution therapy. **Conclusion.** One of the key mechanisms of the T1DM pathogenesis is the imbalance between proinflammatory and regulatory cytokines.

Keywords: type 1 diabetes, preclinical stage, cytokines, chemokines.