© **Коллектив авторов**, 2012
УДК 616.379-008.64-036.3-092:[612.6.05:577.21]-07

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МИШЕНИ КАК ОСНОВА ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ САХАРНОГО ДИАБЕТА ТИПА 1: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Д.А. Гнатенко[1, 3], **Д.С. Костюшев**[1, 9], **А.В. Андреева**[2], кандидат медицинских наук, **Г.А. Филатова**[2], кандидат медицинских наук, **A. Notkins**[4], доктор медицинских наук, профессор, **M. von Herrath**[5, 6], доктор медицинских наук, профессор, **М.А. Пальцев**[7–9], академик РАН и РАМН, профессор, **С.В. Сучков**[1, 2, 9], доктор медицинских наук, профессор

[1]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия; [2]Московский государственный медико-стоматологический университет, Москва, Россия; [3]Институт хирургии им. А.В. Вишневского Росздрава, Москва, Россия; [4]National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA; [5]Type 1 Diabetes Center, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, University of California in San Diego (UCSD), San Diego, CA, USA; [6]R&D Division, Novo Nordisk Company (Denmark); [7]Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»; [8]Институт трансляционной медицины, РУДН, Москва, Россия; [9]Европейская ассоциация предиктивно-превентивной и персонифицированной медицины (EPMA), Брюссель, Евросоюз

E-mail: dkostushev@gmail.com

Клинической манифестации аутоиммунного сахарного диабета типа 1 (СД1) предшествует длительный период бессимптомного существования аутоиммунного процесса, запускаемого при наличии генетической предрасположенности в случае контакта с инфекционным агентом и(или) действия другого повреждающего β-клетки фактора. Современные достижения наук, изучающих генотип и белковый состав организма – геномики и протеомики, делают возможными выявление генетической предрасположенности к СД1 или обнаружение патологического процесса на наиболее ранних его этапах, задолго до клинических проявлений, а также прогнозирование течения заболевания и ответа на терапию. Кроме того, изучение генного и белкового профиля пациента помогает выявить группы риска по развитию СД1 с составлением для консультируемых и членов их семей индивидуальных научно обоснованных рекомендаций, направленных на предотвращение или замедление манифестации заболевания. В обзоре приведены общие принципы выбора биомаркеров для преклинической диагностики СД1 и рассматриваются наиболее перспективные, по мнению авторов, генные и белковые преклинические маркеры этого заболевания.

Ключевые слова: *сахарный диабет типа 1, биомаркеры, предиктивная медицина*

MOLECULAR AND CELLULAR TARGETS AS THE BASIS OF PRECLINICAL DIAGNOSIS OF TYPE 1 DIABETES: PROBLEMS AND PROSPECTS

D.A. Gnatenko[1, 3], D.S. Kostyushev[1, 9], A.V. Andreeva[2], G.A. Filatova[2], A. Notkins[4], M. von Herrath[5, 6], M.A. Paltsev[7–9], S.V. Suchkov[1, 2, 9]

[1]I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, [2]Moscow State Medical-Stomatological University, Moscow, Russia, [3]A.V. Vishnevskiy Institute of Surgery of Ministry of Health Care and Social Development of RF, Moscow, Russia, [4]National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA, [5]Type 1 Diabetes Center, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, University of California in San Diego (UCSD), San Diego, CA, USA, [6]R&D Division, Novo Nordisk Company (Denmark), [7]«Kurchatov Institute» National Research Center, [8]PFUR Translation Medicine Institute, Moscow, Russia, [9]European Predictive-Preventive and Personalized Medicine Association (EPMA), Brussels, EU

In autoimmune diabetes mellitus (IDDM), clinical manifestation is typically preceded by several years of latent autoimmune insulitis. The autoimmune process arises only in genetically predisposed people, and is usually provoked by an infectious pathogen. Dagnostics of IDDM in latent stage had been rare until recently, but now it has become possible to translate data collected by studies of human genome (genomics) and of protein profiles in healthy individuals and in conditions of pathology (proteomics) into clinical practice, creating biomarkers that allow diagnosing the disease at early preclinical stages, detecting genetic succeptability to IDDM, predicting prognosis and creating treatment programs for individual patients, accessing risk groups and giving scientifically based treatment and advice that would help to prevent the disease. In this review, we start by covering basic principles of selecting biomarkers of IDDM for clinical application. After that, we proceed to give information on individual genes and proteins that are currently used for prediction of IDDM development, and on those markers that have shown themselves promising for future clinical application.

Key words: *autoimmune diabetes mellitus, biomarkers, predictive medicine*

Современная эндокринология и, в частности, диабетология остро нуждаются в разработке диагностических инструментов и биоинженерных фармакоконструкций принципиально новых поколений, основанных на достижениях трансляционной медицины (ТМ), обеспечивающей перенос открытий, сделанных в результате фундаментальных исследований, в сферу практического применения. По сути, ТМ – это междисциплинарная область знаний, интегрирующая элементы клинической медицины и биотехнологические подходы к разработке новых лечебно-диагностических средств. Именно ТМ будет принадлежать ведущая роль в развитии медицины на протяжении ближайших десятилетий.

Наиболее перспективным в сфере ТМ направлением являются скрининг и идентификация *биомаркеров* и *биопредикторов* как специфических индикаторов развития патологических процессов, с одной стороны, и потенциальных *фармакотерапевтических мишеней* – с другой, представляющих огромный интерес для практической медицины и биофарминдустрии. На основе принципов ТМ сегодня выстраивается целая палитра инновационных технологий, а именно:

- протоколы идентификации *биомаркеров* и *биопредикторов* различных форм патологии (в том числе сахарного диабета типа 1 – СД1), которые закладываются в основу современных технологий лабораторной и клинической медицины (включая эндокринологию);
- создание принципиально новых (инженерных) биомолекул, предназначенных для целенаправленного воздействия на потенциальные фармакотерапевтические мишени, что позволит создавать современные лекарственные препараты (ЛП) для лечения хронических заболеваний (в том числе СД1);
- разработка биоинженерных фармакотерапевтических конструкций для направленного воздействия на сами мишени, включая компоненты генетического аппарата клетки;
- создание систем таргетной (целевой) доставки к мишеням, а также к кластерам взаимодействующих между собой мишеней (интерактомов) ЛП, способных внедряться в ключевые звенья патогенеза и корригировать возникающие в них сдвиги.

Одной из клинических моделей, наиболее перспективных для внедрения продуктов ТМ, является СД1.

СД1 – заболевание аутоиммунной природы, развивающееся в результате хронического воспаления в зоне панкреатических островков, исходом которого становится гибель основной массы инсулинсекретирующих β-клеток с формированием абсолютной инсулиновой недостаточности. Соответственно, итоги трансляции результатов фундаментальных исследований должны быть ориентированы на:

1) своевременную постановку диагноза *аутоиммунного инсулита* – специфического воспаления в зоне островков Лангерганса, сопровождающегося инфильтрацией островков иммуноцитами как *доклинической* стадии СД1 (на языке врача-иммунолога) или как *предиабета* (на языке врача-клинициста), т.е. на осуществление *предикции* заболевания;

2) обоснованное и высокоинформативное прогнозирование хода развития *доклинической* стадии СД1 с оценкой соответствующих рисков трансформации такой стадии в стадию развернутой клинической симптоматики (*предикция* рисков);

3) *фармакопревенцию* этапа трансформации доклинической в клиническую стадию на фоне разработанного для каждого конкретного пациента (или лиц из групп риска) индивидуального протокола *фармакопревентивных* мероприятий в рамках задач предиктивно-превентивной и персонифицированной медицины (ППМ).

СОВРЕМЕННАЯ МОДЕЛЬ ПАТОГЕНЕЗА СД1 И КЛЮЧЕВЫЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МИШЕНИ

На начальных (доклинических) стадиях ключевую роль в инициации СД1 и запуске связанных с воспалением патоморфологических сдвигов играет постинфекционный аутоиммунный синдром (ПИФАС), провоцируемый последствиями *молекулярной (антигенной) мимикрии* [21].

При этом уже на доклинических стадиях воспалительный процесс аутоиммунной (а следовательно, необратимой) природы быстро прогрессирует, приводя к формированию картины *хронического аутоиммунного инсулита*, а впоследствии – к утрате основной массы β-клеток вследствие действия ряда цитотоксических факторов, среди которых: антиостровковые аутоантитела (аутоАТ), аутореактивные цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ), провоспалительные цитокины и другие с последующим формированием картины СД1 [11].

ПОСТАДИЙНАЯ МОДЕЛЬ ПАТОГЕНЕЗА СД1

Современная модель СД1 включает ряд стадий.

Стадия I – стадия исходных рисков при интактном иммунном статусе определяется *генетической предрасположенностью*, значительная роль в структуре которой принадлежит аллелям классов I, II, а также HLA и не HLA генам [26].

Стадия II часто упоминается как стадия скомпрометированных ресурсов иммунной системы; на данной стадии экзо- или эндогенные факторы (например, микробные с мимикрирующими свойствами), названные *триггерами*, грубо вмешиваются в работу собственной иммунной системы, искажая генетически детерминированные сценарии здорового иммунного ответа и обусловливая тем самым скрытую фазу аутоагрессии (стадию ***латенции*** ПИФАС) [30].

Стадия III – это своего рода толчок в сторону развития в зоне островков хронического воспаления: на

этом этапе видимой железистой патологии не обнаруживается, а ее инсулинсекретирующая активность сохраняется в границах нормы; более того, титры антиостровковых *аутоАТ-биопредикторов* редко испытывают тенденцию к неудержимому росту, характеризуя стадию III как своего рода пограничную [41].

Стадия IV характеризуется пробуждением реальных механизмов аутоагрессии, главные участники которой – огромное количество *провоспалительных* цитокинов, секретируемых широкой палитрой иммуноцитов. Именно этот ансамбль провокаторов *молекулярной* (цитокины) и *клеточной* (лимфоциты, макрофаги, стромальные фибробласты и эндотелиоциты) природы поддерживают состояние аутоагрессии, на одном из этапов которого начинается инфильтрация лимфоцитов железистой ткани, иллюстрируя развитие типового аутоиммунного синдрома (доказательством чего служит обнаружение в биоптатах поджелудочной железы больных СД1 признаков *аутоиммунного инсулита*). При этом инсулит может иметь место и у лиц с неподтвержденным диагнозом СД1, а также у ближайших родственников больных и лиц из соответствующих групп риска [29].

Стадия V тесно связана с развитием дисбаланса между *Th-клетками* как индукторами аутоагрессии и *регуляторными* $CD24^{+}CD25^{+}T_{reg}$-клетками, активность которых носит протективный характер. Поэтому на фоне запуска аутоагрессии мы наблюдаем, с одной стороны, эффект супрессии протективных T_{reg}-клеток, а с другой – появление нежелательных инструментов аутоагрессии: аутореактивных цитотоксических Т-лимфоцитов (АР-ЦТЛ).

Отметим, что экспансия *наивных* АР-ЦТЛ в ходе индукции ПИФАС требует активации соответствующего Т-клеточного рецептора (ТКР) HLA-ассоциированными аутоАГ-пептидами. Первичную активацию обеспечивают АГ микробного происхождения (за счет *молекулярной мимикрии*). При этом запускаются процессы апоптоза β-клеток с блокадой механизмов саморегуляции, свидетельствуя о переходе от контролируемых нарушений к нарушениям спонтанного и агрессивного характера [32].

Одновременно с этим появляются антиостровковые аутоАТ, что вкупе с АР-ЦТЛ и широкой палитрой провоспалительных инструментов (включая цитокины) ведет к прогрессирующей деструкции β-клеток.

Стадия VI определяется как *предиабет* (термин, используемый с целью разграничения *клинической* и *доклинической* манифестации).

К сожалению, механизмы индукции *доклинической* патологии СД1 изучены недостаточно, хотя в последние годы появились сведения, проливающие свет на эти вопросы. К наиболее значимым факторам, способствующим индукции СД1, в частности, отнесены:

а) фактор *генетической предрасположенности*, обусловленной преимущественно HLA-локусами и провоцирующей развитие ПИФАС;

б) носительство патогенов с мимикрирующими свойствами (способствующих ПИФАС);

в) вторичные (внешние и внутренние) триггерные механизмы.

Соответственно, процессы, связанные с формированием доклинических стадий СД1 и в дальнейшем – *клинической* картины, протекают последовательно в течение определенного времени, испытывая на фоне наследственной предрасположенности последствия взаимодействия ряда пусковых факторов [19].

Стадия VII – финальная; это стадия истощения популяции β-клеток (при 80–90% утраченной клеточной массы) с манифестацией СД1, сопровождающейся клинической гипергликемией, и характерными для СД1 метаболическими сдвигами.

ПРИНЦИПЫ СЕЛЕКЦИИ КЛЮЧЕВЫХ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ МИШЕНЕЙ

Применительно к тактике ведения больных СД1 и предиабетом интерес представляют лекарственные препараты (ЛП), способные влиять на активацию (или супрессию) сигнальных путей, передачу сигнала по соответствующим каналам и реализацию действия сигнала на клеточном и молекулярном уровнях, а также в составе *интерактомов*, тормозя процессы индукции аутоагрессии [24].

При селекции патогенетически и диагностически значимых мишеней с учетом особенностей современной модели патогенеза СД1 в качестве ключевых нами выделены:

- гены, кодирующие ТКР, семейства корецепторов и костимуляторных молекул, а также цитокинов и других активных биомолекул, участвующих в запуске аутоиммунного инсулита и(или) поддерживающих его (в том числе молекул, активирующих В-лимфоциты), а также сами продукты экспрессии таких генов или их кластеров [1];
- гены, отвечающие за поведение иммуноцитов в ходе аутоагрессии, а также биомолекулы, опосредующие процессы *сигналирования* [34];
- гены, отвечающие за клональную экспансию АР-ЦТЛ с прямым в отношении β-клеток цитотоксическим эффектом [33];
- гены, экспрессия которых приводит к гиперсекреции цитокинов, активирующих апоптоз β-клеток и стимулирующих появление АР-ЦТЛ, а также сами цитокины с проапоптотическими свойствами [31];
- гены, кодирующие особые белки-регуляторы, аномалии которых приводят к искажению процессов распознавания ключевых для индукции предиабета-1 АГ-детерминант (*эпитопов*) и, соответственно, к аутоагрессии [37];
- сами β-клетки, выступающие в роли мишеней.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СД1

Предложены первые рабочие версии протоколов доклинической диагностики предиабета-1, основанные на скрининге ключевых биомаркеров у пациентов и их ближайших родственников, а также лиц из групп повышенного риска. Цель – попытка сформулировать для обследуемого (точнее, для представителей соответствующего генеалогического древа) версию доклинического диагноза по итогам скрининга с использованием технологий *геномики, протеомики* и *метаболомики*. А далее – обеспечить индивидуума необходимым пакетом информации и соответствующими рекомендациями.

В протоколы *доклинической диагностики* предиабета-1 должны быть включены:

- *геномный анализ* оценки потенциальных рисков для конкретного пациента (или ближайших родственников), а также конкретного лица из групп повышенного риска развития СД1;
- *протеомный анализ* (анализ протеомных банков индивидуума), включая скрининг на биомаркеры и биопредикторы, а также мониторинг динамики последних;
- *метаболомный анализ* (анализ метаболического профиля пациента, включающий скрининг на клинически скрытые нарушения эндокринной функции поджелудочной железы);
- *анамнестический анализ и контроль динамики факторов риска* (включая вирусные инфекции, в том числе латентные).

ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕДУРЫ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ У БОЛЬНЫХ СД1 И В ГРУППАХ РИСКА

К генам, участвующим, согласно современным представлениям, в патогенезе СД1, относятся:

- аллели Human Leukocyte Antigen (HLA) I и II классов, определяющие категории риска СД1, например, HLA-DR3 (преимущественно у взрослых), HLA-DR3-DQ2, HLA-DR4-DQ8 (преимущественно у детей раннего возраста), а также аллели HLA, обеспечивающие функцию защиты и снижающие риск развития СД1 (HLA-DR1, DR2, DR5,DR6, DR7, DR8, DR9) [14, 17, 18, 20];
- гены, участвующие в защите β-клеток от апоптоза (например, TNFAIP3) [4];
- гены, контролирующие секрецию и метаболизм инсулина (например, INS);
- гены, относящиеся к системам общего контроля иммунологической реактивности (ERBB3, IL2RA, PTPN22, PTPN2, SH2B3, CTLA4).

HLA-ГЕНЫ

Гены HLA, расположенные на 6-й хромосоме, делятся на 3 класса – HLA I, HLA II и HLA III. Продукты этих генов, которые отличаются высоким полиморфизмом, обеспечивают презентацию АГ и определяют особенности иммунной реактивности конкретного индивидуума (т.е. по сути, персонификацию иммунного ответа). Одни наборы генов HLA ассоциируются с более высоким риском развития СД1, другие, наоборот, проявляют протективные свойства.

HLA-I гены

Полиморфизмы генов HLA-I могут оказывать влияние на распознавание аутоАГ β-клеток ЦТЛ, обусловливая риски аутоагрессии. Модифицирующее влияние генов HLA-I на развитие СД1 может проявляться в разные периоды жизни. Так, наличие аллеля HLA-E*0101 повышает риск развития СД1 в первые 10 лет жизни, в то время как при наличии аллеля HLA-E*010 риск заболевания повышается после 10 лет жизни [17]. Такие закономерности частично обусловлены зависимостью экспрессии продуктов генов HLA-I от колебаний уровня половых гормонов, ассоциативного фрагмента предиктивной диагностики, имеющего отношение к вопросам полового созревания, беременности, приема оральных контрацептивов или наличия гормонпродуцирующей опухоли.

HLA-II гены

Гены HLA II класса более актуальны для развития и, соответственно, предиктивной диагностики СД1. Эти гены, расположенные на коротком плече 6-й хромосомы, кодируют экспрессию молекул, осуществляющих презентацию АГ пептидов CD4+ Т-клеткам-хелперам. Функция последних реализуется уже на первых этапах патогенеза СД1, так как активация аутореактивных клонов Th1-клеток является необходимым звеном для индукции аутоиммунного инсулита. Одни аллели HLA II генов ассоциированы с повышением частоты заболевания, другие – с его снижением. Выделяют ряд основных аллелей, применяемых в целях генодиагностики (табл. 1) [6, 18, 20].

Таким образом, между определенными гаплотипами HLA II и риском развития СД1 может быть установлена четкая взаимосвязь, что позволяет использовать аллельный скрининг в качестве способа ранней предикторной диагностики.

ГЕНЫ, НЕ СВЯЗАННЫЕ С HLA (*non-HLA-genes*) (см. рисунок)

Разумеется, каждый отдельный ген не способен оказывать определяющее влияние на развитие СД1, в связи с чем речь может идти только о сочетанном эффекте аллельных кластеров, вносящих дисбаланс в систему взаимодействия между аутоиммунными и толерогенными механизмами, что и должно использоваться при конструировании алгоритмов предиктивной генодиагностики.

TNFAIP3 (A20) (TNF alpha-induced protein 3) – индуцируемый фактором некроза опухоли-α (ФНОα) белок-3. Кодируемый геном белок A20 обеспечивает защиту β-клеток от TNF-индуцированного апоптоза, участвуя в подавлении аутоагрессии. При этом гиперэкспрессия белка A20 способствует стабилиза-

ции морфологической архитектоники островковой зоны, поддерживая надлежащий уровень секреции β-клетками инсулина [4].

ERBB3 – ген, кодирующий рецептор типа 3 фактора роста эпидермиса, который способен формировать гетеродимеры с другими факторами роста и таким образом опосредовать внутриклеточную передачу сигнала. Экспрессия ERBB3 на $CD11^+$ ДК и макрофагах в качестве стимулятора пролиферации CD4+-клеток коррелирует с активностью последних: наиболее высокий уровень экспрессии мРНК ERBB3 характерен для индивидуумов с пониженным риском развития СД1 [39].

PTPN22. Функция *PTPN22* обеспечена взаимодействием генного продукта с киназами семейства Src (sarcoma), в связи с чем дефекты *PTPN22* влекут за собой возрастание рисков трансформации предиабета-1 в СД1 [27].

Ген *IFIH1 (interferoninducedwithhelicasedomain-1)* участвует в противовирусной защите за счет контроля динамики конформации вирусной РНК и последующего запуска транскрипции ряда «шоковых» генов, а именно интерферона (ИФН)-γ и факторов NF-к-B (Nuclear Factor-KappaB) и IRF3 (interferonregulatory factor-3), способствуя обвальной продукции провоспалительных цитокинов. Мутации IFIH1, приводящие к снижению функции этого гена, играют при СД1 защитную роль [7].

IL2RA (α-субъединица рецептора интерлейкина – ИЛ2). ИЛ2 является важным фактором регуляции иммунного ответа, способствуя дифференцировке праймированных Т-лимфоцитов, ограничивая их пролиферацию и контролируя активность механизмов апоптоза. ИЛ2 также способствует приобретению частью активированных CD4+-лимфоцитов фенотипа CD4+ CD25+ (фенотипа естественных T_{reg}). Ингибирующие мутации IL2RA, изменяя чувствительность к ИЛ2, вызывают дисбаланс иммунорегуляторных популяций, что предрасполагает к аутоиммуным проявлениям [27].

INS-ген кодирует *проинсулин*. При этом образование мутантных форм инсулина может увеличивать риски продукции антиинсулиновых аутоАТ с патогенными свойствами.

Полиморфизм INS VNTR I/III[3] (тандемные повторы в гене инсулина) связан с появлением аутоАТ против глутаматдекарбоксилазы (GAD) [12] у пациентов с поздним (после 35 лет) дебютом СД1. С другой стороны, данный генотип ассоциируется с пролонгацией остаточной секреции инсулина, определяемой по наличию постпрандиальной секреции С-пептида.

CD226 – адгезин на поверхности Т- и NK-клеток. Полиморфизм rs763361[4] (однонуклеотидный полиморфизм в гене, кодирующем CD226) увеличивает предрасположенность к СД1 [13].

SUMO-4 (Small ubiquitin-related modifier-4) – семейство генов, способствующих изменению активности ингибитора транскрипционного фактора NF-κB и приводящих к подавлению экспрессии гена, отвечающего за экспрессию NF-κB. Полиморфизм этого гена ассоциируется с повышением риска СД1 [38].

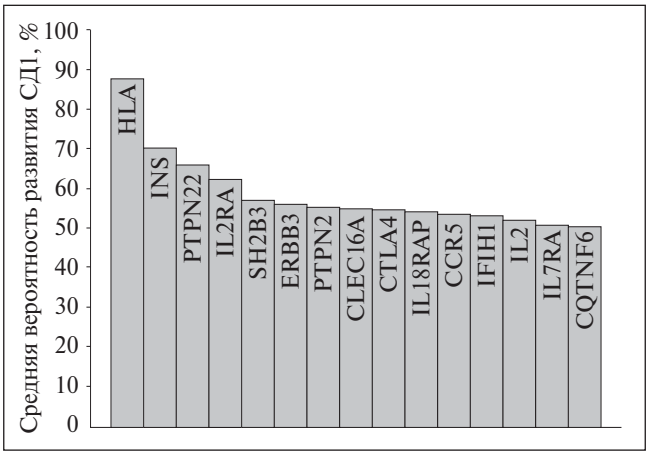
Таблица 1

АЛЛЕЛИ ГЕНОВ HLA II КЛАССА, СВЯЗАННЫЕ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ СД1

Аллели, ассоциированные с высоким риском		
DRB1*0301	DQA1*0501	DQB1*0201
DRB1*0401	DQA1*0301	DQB1*0302
Аллели, ассоциированные со средним риском		
DRB1*01	DQA1*0101	DQB1*0501
DRB1*0801	DQA1*0401	DQB1*0402
DRB1*0901	DQA1*0301	DQB1*0303
DRB1*1001	DQA1*0301	DQB1*0501
Аллели с высоким уровнем протекции		
DRB1*1501	DQA1*0102	DQB1*0602
DRB1*1101	DQA1*0501	DQB1*0301
Аллели со средним уровнем протекции		
DRB1*0401	DQA1*0301	DQB1*0301
DRB1*0403	DQA1*0301	DQB1*0302
DRB1*0701	DQA1*0201	DQB1*0201

CTLA-4 (cytotoxic lymphocyte antigen-4). Продукты экспрессии гена CTLA-4 являются одними из ключевых костимуляторных молекул, необходимых для активации T_{reg}-клеток, способных, в свою очередь, подавлять активность АР-ЦТЛ. Двойной скрининг на полиморфизмы генов *CTLA4* (rs231775) и HLA II может быть рекомендован для обследования детей из групп высокого риска по СД1 [8].

Как видно, активация нежелательных генов, способных провоцировать аутоагрессию, начинается задолго до стадии клинической манифестации СД1. Таким образом, технологии и соответствующие протоколы генотипирования позволяют выделять лиц с повышенным риском СД1, подготавливая последних к этапам фенотипирования на основе индивидуальных банков данных по протеому и метаболому.



Вклад генов, не связанных с локусами HLA, в генетическую предрасположенность к СД1

ФЕНОТИПИРОВАНИЕ У БОЛЬНЫХ СД1 И В ГРУППАХ РИСКА. ПРОТЕОМНЫЕ БАНКИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ДАННЫХ В ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ И ФАРМАКОПРЕВЕНЦИИ

В условиях хронического воспаления и(или) повреждения β-клеток реализуются 2 базовых процесса: а) активация β-клеток с продукцией аутоАТ; б) активация АР-ЦТЛ. Важную роль в обоих случаях играет феномен *молекулярной мимикрии*.

Ключевыми *биопредикторами* СД1 являются аутоАТ: в настоящее время выявлен достаточно широкий спектр ассоциируемых с СД1 аутоАТ, специфичных к антигенам (АГ) островковых клеток. Важно отметить, что многие виды аутоАТ могут быть выявлены и до клинического дебюта – на стадии аутоиммунного инсулита. Наибольшее значение придается следующим видам аутоАТ:

- аутоАТ к глутаматдекарбоксилазе (GAD) 65 и 67;
- аутоАТ к тирозинфосфатазе (islet antigen 2 – IA2), антитела к фогрину (islet antigen 2β – IA-2β);
- аутоАТ к инсулину (insulin autoantibodies – IAA);
- цитоплазматические островково-клеточные АТ (islet cell antibodies – ICA), а также аутоАТ к другим видам антигенов: ICA69 (islet cell antigen-69), ICsA (islet cellsoluble antigen), 38кDa jun-B, HSP (heatshock proteins, AADC (antibody dependent cell cytotoxycity), DNA topoisomeraseII, Glima-38 (glicosylated membrane antigen-38).

Каждый вид АТ имеет собственное прогностическое значение и связан с определенным этапом развития СД1 (инсулит, скрытый СД1 или предиабет-1, манифестный СД1), а также подвластен определенным факторам, способствующим их появлению. Современная медицина обладает полным диагностическим инструментарием для определения таких АТ.

КЛАССИЧЕСКИЕ АГ И АТ

Частота обнаружения аутоАТ у больных с «классическим» СД1 составляет: ICA – 60–90%, IAA – 16–69%, GADA – 22–81%.

Таблица 2

ЗАВИСИМОСТЬ РИСКА РАЗВИТИЯ СД1 ОТ ТИТРОВ AT-GAD65

Титр аутоАТ	10-летний риск (% ± SE)	HR (95% CI)	p
1-й квартиль	35±9	1	
2-й квартиль	22±9	0,8 (0,3–1,9)	0,55
3-й квартиль	52±9	1,7 (0,8–3,6)	0,18
4-й квартиль	43±10	1,6 (0,7–3,6)	0,26

Примечание: SE – стандартная ошибка, HR – отношение шансов, CI – доверительный интервал; в скобках – размах колебаний; p – вероятность ошибки (здесь и в последующих таблицах).

Анти-GAD аутоАТ. GAD определяется в виде 2 изоформ, гены которых располагаются на различных хромосомах: ген GAD65 – на 3-й и ген GAD67 – на 10-й хромосоме.

Наличие анти-GAD аутоАТ у детей с СД1 ассоциируется с носительством HLA-DQ2 [10]. При этом GAD65-пептиды специфически связываются с HLA-DQ молекулами, и презентация GAD-HLAII-DQ тандема приводит к активации провирусных Th-клеток через бинарный (TKP-CD4) комплекс, что, в свою очередь, стимулирует В-лейкоциты с образованием впоследствии анти-GAD аутоАТIgG-изотипа.

Диагностическая ценность АТ-GAD65 крайне высока, достигая в дебюте СД1 80% [26]. Прогностическая ценность составляет 60% (табл. 2). У детей с семейными формами СД1 анти-GAD аутоАТ находят в дебюте в 100% случаев, а при спорадической форме СД1 существенно реже (78%).

Прогностическое значение указанных выше АТ высоко: такие аутоАТ появляются ранее других видов АТ (за 10–15 лет до первых клинических проявлений СД1). Присутствие анти-GAD65 аутоАТ на момент верификации диагноза ассоциируется с более быстрой потерей β-клеточной функции, но по мере гашения аутоиммунного воспаления уровень анти-GAD65 аутоАТ снижается, сохраняясь, однако, годами и даже десятилетиями у пациентов с явлениями автономной и периферической нейропатии.

АТ-IAA

АутоАТ к инсулину – компонент крови здоровых людей. У пациентов с СД1 концентрации таких АТ очень высокая (табл. 3), а эпитопы IAA ориентировочно находятся в аминокислотных последовательностях B1–B3 и A8–A13.

IAA чаще определяются у детей, чем у подростков и взрослых (в дебюте СД1 и до начала инсулинотерапии) [9]. Так, у детей до 5 лет IAA в дебюте СД1 находили в 50–70% случаев (в возрастной группе старше 15 лет – у 35–40% обследованных).

Частота обнаружения антиинсулиновых аутоАТ возрастает после начала инсулинотерапии. Связываясь с молекулами инсулина, они могут вызывать резистентность к заместительному лечению СД. Функциональным свойством IAA является способность удлинять период полужизни молекулы инсулина.

АутоАТ к инсулину также обнаруживают у 70–90% обследованных за 10–12 лет до манифестации СД1 [40], т.е. на доклинической стадии заболевания. Сероконверсия таких АТ обычно регистрируется уже через 8 лет после начала аутоагрессии, а титры аутоАТ начинают постепенно уменьшаться и в клинической стадии СД1 обнаруживаются только у 30–60% пациентов.

АТ-IA-2

IA-2 (islet antigen-2) – аутоАГ, принадлежащий к семейству трансмембранных белков (тирозинфос-

Таблица 3

ЗАВИСИМОСТЬ РИСКА РАЗВИТИЯ СД1 ОТ ТИТРОВ АТ-IAA

Титр аутоАТ	10-летний риск (% ± SE)	HR (95% CI)	p
1-й квартиль	45±16	1	
2-й квартиль	30±13	0,7 (0,2–2,4)	0,55
3-й квартиль	38±17	0,8 (0,2–2,7)	0,68
4-й квартиль	77±12	3,0 (1,1–8,1)	0,03

Таблица 4

ЗАВИСИМОСТЬ РИСКА РАЗВИТИЯ СД1 ОТ ТИТРОВ АТ-IA-2

Титр аутоАТ	10-летний риск (% ± SE)	HR (95% CI)	p
1-й квартиль	20±14	1	
2-й квартиль	74±15	6,0 (1,6–22,4)	0,008
3-й квартиль	84±10	5,9 (1,7–21,1)	0,006
4-й квартиль	71±15	4,8 (1,3–17,9)	0,02

фатаз). Местом распознавания для аутоАТ служит домен, локализующийся в цитоплазме β-клеток. Обнаружены 2 гомологичные молекулы такого АГ: IA-2 и IA-2β (фогрин), которые локализованы в секреторных гранулах β-клеток. Анти-IA-2 аутоАТ позитивно ассоциируются с гаплотипом DQ8, DR4, DQB1*0302 и негативно – с гаплотипом DQ6 у больных со свежим диагнозом СД1. АутоАТ к IA-2 обнаруживали у 70% детей с вновь диагностированным СД1 (среди взрослых – у 30–50%, в контроле – менее чем в 1% (табл. 4) [15].

IA-2β (фогрин) структурно подобен IA-2. АутоАТ, полученные от больных СД1, реагируют только с цитоплазматическим доменом фогрина и выявляются реже, чем аутоАТ к IA-2. Последние, кстати, характерны почти для всех (95%) больных СД1 с аутоАТ к IA-2β. Поэтому данную панель АТ не используют в диагностических целях. Вместе с тем аутоАТ к фогрину могут быть зарегистрированы за несколько лет до возникновения первых клинических проявлений болезни, что позволяет отнести их к категории значимых для субклинической и предиктивной диагностики инструментов.

АТ-ICA (islet cell antibodies) – гетерогенная группа АТ к цитоплазматическим АГ β-клеток, специфичность которых пока до конца не выяснена. В качестве международного стандарта используются единицы JDF (Juvenile diabetes Foundation).

Преимущество теста на АТ-ICA состоит в том, что такой тест может одновременно обнаружить аутоАТ к ряду аутоАГ, и хотя СД1 проявляется поражением β-клеток, ICA в ходе скрининга больных с СД1 визуализируется на всех без исключения островковых клетках [2].

97% всех сывороточных аутоАТ среди ICA-положительных больных объясняется присутствием анти-GAD65, анти-IA2 и анти-IAA аутоАТ. Наличие и титр ICA, по-видимому, может определять течение и клинические особенности СД1, поскольку анти-ICA аутоАТ находят как на стадии предиабета-1, так и в дебюте СД1 в 20–30% случаев, причем их уровень не зависит от других АТ, в том числе ICA и IAA [35]. Одним из возможных АГ-кандидатов для данных АТ является карбоксипептидаза-Н, молекула которой является основным ферментом в секреторных гранулах нейроэндокринных клеток островков.

Повышенный титр ICA обычно появляется за 10–12 лет до развития СД1: аутоАТ к островкам идентифицированы у 85–90% пациентов с манифестирующим СД1 в течение 1-й недели после постановки клинического диагноза. Уже через 4 нед после манифестации их уровень снижается до 50%, а в случае годового стажа СД1 аутоАТ к β-клеткам присутствуют только у 10–20% пациентов. У здоровых обследованных ICA также выявляются, но с частотой 0,1–0,5% случаев.

Идентификация у больных СД1 и их родственников ICA свидетельствует об активной работе механизмов толерантности, часто указывая на скрытый аутоиммунный диабет (LADA) и медленную деструкцию β-клеток [23]. Также аутоАТ обнаруживаются и у здоровых родственников пациентов с СД1.

РЕДКИЕ АГ И ДРУГИЕ КОМПОНЕНТЫ ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА

ICA69 (islet cell antigen 69 – антиген островковых клеток-69) – АГ островковых клеток 69. Ген данного белка картирован на хромосоме 7p22, а сам АГ гомологичен бычьему сывороточному альбумину (БСА) и может принимать участие в индукции аутоиммунного инсулита.

ICA69-АТ находят как в стадии предиабета-1, так и в дебюте СД1 у 20–30% обследованных, причем их уровень не зависит от других АТ, в том числе ICA и IAA [25]. Т-клеточная аутореактивность к ICA69 ярко выражена в дебюте СД1 и значительно меньше у больных со стажем заболевания или их близких родственников.

Определение аутоАТ к островкам – ICsA (islet cell surface antigens) – отражает наличие у больных СД1 аутоАТ к β-клеткам. Диагностическая чувствительность метода ниже, чем ICA, и в дебюте заболевания составляет не более 30–60% [36].

38кDa jun-B – аутореактивность Т-лейкоцитов к ядерному транскрипционному протеину jun-B (38K) обнаружена у 71% больных с впервые выявленным СД1, у 50% ICA-позитивных родственников I линии родства, а также у 25% пациентов с другими аутоиммунными заболеваниями при негативной

реакции у здоровых [5]. АГ имеет общие последовательности с АГ-герпесвирусов, отражая последствия АГ-мимикрии.

HSP (heatshock proteins – белки теплового шока) – семейство стресс-протеинов, секретируемых в ответ на колебания температуры, выброс цитокинов или свободных радикалов. Не исключены признаки АГ-мимикрии между эпитопом GAD65 и HSP65 [40]. Последний может являться фактором, определяющим на β-клетках формирование ряда особых мишеней, утилизируемых при продукции антиостровковых аутоАТ. Так, аутоАТ к рекомбинантному мышиному HSP60 выявляются у 16% больных СД1.

DNA topoisomerase II (ДНК-топоизомераза-II) – аутоАТ к данному АГ находят у 48% больных СД1, что отражает тенденцию к росту титров антинуклеарных аутоАТ у больных СД1 и их родственников I линии родства. В отличие от ICA и IAA титр такого рода АТ не зависит от возраста, пола и длительности диабета. При анализе аминокислотных последовательностей отмечается гомология (до 64%) между данным белком и другими АГ, в том числе инсулином, GAD и HSP65 [3].

Glima-38 (glycosylated islet-cell membrane antigen-38 – гликированный мембранный антиген островковых клеток-38) – мембранный гликопротеин с молекулярной массой 38kDa, экспрессируемый в островковых и нейроэндокринных клетках. Обнаруживается у 19% детей с вновь выявленным СД1 и у 14% родственников I линии родства [16].

Комплементзависимая АТ-опосредованная цитотоксичность (CAMC – complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity) является эффекторным механизмом процесса гибели клеток (в том числе β-клеток), инициируемого в результате связывания иммуноглобулинов с поверхностными АГ. Результаты проводимых среди родственников больных СД1 исследований демонстрируют, что комбинация из 2 или более аутоАТ такого порядка отражает высокую прогностическую ценность так называемого целевого (таргетного) серологического пакета: например, выявление аутоАТ против моноАГ свидетельствует о риске развития СД1 в последующие 7 лет у 30% обследуемых, 2 типов АГ – у 70% и 3 типов – у 90%. Прогностическая значимость для родственников с 1, 2 или 3 видами аутоАТ соответствует 2, 25 и 70%.

Таким образом, на основании совокупной оценки индивидуального протеома и генома пациента возможна *персонификация* рисков развития СД1. При высоких рисках целесообразен пролонгированный мониторинг динамики сывороточных АТ. Успехи в развитии инструментов *доклинической* и *предиктивной* диагностики позволяют обратиться к методам вторичной профилактики, точнее, к протоколам раннего и своевременного индивидуального лечения, т.е. протоколам *персонифицированной* терапии с элементами первичной *фармакопревенции*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ (ПЕРСПЕКТИВЫ)

В современной диагностике СД1, несомненно, используются генетические и иммунологические маркеры: чаще всего для дифференциального диагноза у пациентов с LADA-диабетом (при развитии СД после 40 лет), для подтверждения выявления MODY-диабета или подтверждения аутоиммунного СД1, а также для определения риска развития СД1, но чаще такие обследования проводятся в частном порядке при наличии других факторов риска. Все перечисленные виды диагностики используются в амбулаторной или стационарной сети, но уже на клиническом этапе, когда пациенту назначено или назначается лечение, когда эффект глюкозотоксичности достиг апогея.

Реально используемыми генетическими биомаркерами и биопредикторами в сфере диабетологии сегодня являются HLA-II АГ. Практический аспект применения таких биоинструментов сводится к скринингу аллельных панелей генов DRB1, DQA1 и DQB1, позволяя выявить гаплотипы с высоким риском развития СД1 и, наоборот, гаплотипы с протективными свойствами.

Генетический анализ в рамках *персонифицированной* и *предиктивной* диагностики (в том числе в *субклинических* целях) используют также с целью выявления мутаций, характерных для MODY-диабета: MODY-1 (хромосома 20, ген HNF4a); MODY-2 (хромосома 7, ген глюкокиназы); MODY-3 (хромосома 7, ген HNFla); и MODY-4 (хромосома 13, ген IPF-1) – диабета, обусловленного мутациями митохондриального гена.

Использование аналогичных биоинструментов из категории протеомики пока ограничено, что объясняется некорректностью в применении и(или) неадекватностью поставленных задач. Практически нет анализа рисков с использованием инструментов геномики, протеомики и метаболомики в рамках принципиально новых алгоритмов и возможностей биоинформатики.

Нами предприняты первые попытки конструирования единых диагностических панелей для мониторинга лиц из групп риска по СД1, утилизирующие весь инструментарий геномики и протеомики (исключая на этом этапе раздел метаболомики). В состав такого рода панелей нами отобраны: 1) выделение семейств потенциальных мишеней (биомаркеров и биопредикторов), отражающих высокие риски развития СД1; 2) группы аналогичных инструментов, обладающих в отношении СД1 протективными свойствами.

В зависимости от принадлежности пациента или семьи пациента к той или иной группе будет предложен индивидуальный алгоритм наблюдения (*персонифицированного мониторинга*) за базовыми показателями, отражающими состояние указанных выше таргетных мишеней и динамику их структурно-функциональных параметров, т.е. ключевых *биомаркеров* и *биопредикторов* из состава индивидуальных банков данных по геному и протеому. Такой подход к диагностике и верификации диагноза позволит более

обоснованно и адекватно диагностировать стадию типового патологического процесса (на *клинических* и *субклинических* стадиях СД1), подтверждая соответствующими алгоритмами отдельные *предиктивные* параметры, а именно: возможные сроки манифестации, тип течения, степень резистентности к инсулину и др. Последовательная работа в этом направлении позволит на следующем этапе разрабатывать современные меры фармакопревенции в целях гашения аутоиммунного инсулита, отсрочивая тем самым метаболический дисбаланс и предлагая конкретному пациенту (а также лицам из групп риска) индивидуальный протокол таргетной фармакопревенции (т.е. *персонифицированного* лечения).

ЛИТЕРАТУРА

1. Battaglia M. Induction of tolerance in type 1 diabetes via both CD4+CD25+ T regulatory cells and T regulatory type 1 cells // Diabetes. – 2006; 55 (6): 1571–80.
2. Bottazzo G., Doniach D. Islet-cell antibodies (ICA) in diabetes mellitus (evidence of an autoantigen common to all cells in the islet of Langerhans) // Ric. Clin. Lab. – 1978; 8 (1–2): 29–38.
3. Chang Y., Hwang J., Shang H. et al. Characterization of human DNA topoisomerase II as an autoantigen recognized by patients with IDDM // Diabetes. – 1996; 45: 408–14.
4. Dahlen E., Dawe K., Ohlsson L. et al. Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF-alpha in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse // J. of immunol.: official journal of the American Association of Immunologists. – 1998; 160 (7): ISSN 3585–93.
5. DeAizpurua H., Honeyman M., Harrison L. A 64 kDa antigen/glutamic acid decarboxylase (GAD) in fetal pig pro-islets: co-precipitation with a 38 kDa protein and recognition by T cells in humans at risk for insulin-dependent diabetes // J. Autoimmun. – 1992; 5 (6): 759–70.
6. Fernando M., Stevens C., Walsh E. et al. Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis / Public Library of Science genetics. – 2008; 4 (4): ISSN e1000024.
7. Ferreira R., Pan-Hammarström Q., Graham R. et al. Association of IFIH1 and other autoimmunity risk alleles with selective IgA deficiency // Nature genetics. – 2010; 42 (9): ISSN 777–80.
8. Kavvoura F., Ioannidis J. CTLA-4 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Type 1 Diabetes Mellitus: A HuGE Review and Meta-Analysis // Am. J. Epidemiol. – 2005; 162 (1): 3–16.
9. Franke B., Galloway T., Wilkin T. Developments in the prediction of type 1 diabetes mellitus, with special reference to insulin autoantibodies // Diabetes Metab Res Rev. – 2005; 21 (5): 395–415.
10. Giuliani L., Mele R., Di Giovine M. et al. Detection of GAD65 autoreactive T-cells by HLA class I tetramers in type 1 diabetic patients // J. of biomedicine & biotechnology. – 2009; Article ID 576219.
11. González-Chávez A. Pathophysiological implications between chronic inflammation and the development of diabetes and obesity // Cir Cir. – 2011; 79: 190–7.
12. Grasso Y., Reddy S., Rosenfeld C. et al. AutoantibodiestoIA-2andGAD65inpatients with type 2 diabetes mellitus of varied duration: prevalence and correlation with clinical features // EndocrPract. – 2001; 7 (5): 339–45.
13. Hafler J., Maier L., Cooper J. et al. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases // Genes Immun. – 2009; 10 (1): 5–10.
14. Howson J., Walker N., Clayton D. (2009) Confirmation of HLA class II independent type 1 diabetes associations in the major histocompatibility complex including HLA-B and HLA-A // Diabetes, obesity & metabolism. – 2009; (1): ISSN 31–45.
15. Hu Y., Zhang H., Cai T. et al. The IA-2 interactome. Experimental Medicine Section, Oral Infection and Immunity Branch, National Institutes of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA.
16. Husebye E., Gebre-Medhin G., Tuomi T. et al. Autoantibodies against aromatic L-amino acid decarboxylase in autoimmune polyendocrine syndrome type I // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1997; 82 (1): 147–50.
17. Kordonouri O. Genetic risk markers related to diabetes-associated auto-Abs in young patients with type 1 diabetes in berlin // Experimental and clinical endocrinology and diabetes. Germany. – 2010; 116 (4): 245–9.
18. Murdock L. DNA damage and cytotoxicity in pancreatic beta-cells expressing human CYP2E1 // Biochemical pharmacology. – 2004; 68 (3): ISSN 523–30.
19. Lind K. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the innate immune response to enteroviruses and its possible role in regulating type 1 diabetes // Clinical & Experimental Immunology. – 2012; 168 (1): 12–23.
20. Lipponen K. Effect of HLA class I and class II alleles on progression from autoantibody positivity to overt type 1 diabetes in children with risk-associated class II genotypes // Diabetes. – 2010; 59 (12): ISSN 3253–6.
21. Lis J., Jarząb A., Witkowska D. Molecular mimicry in the etiology of autoimmune diseases. InstytutImmunologiiiTerapiiDo świadczalnej PAN im. L. // Hirszfelda we Wrocławiu. – 2012; 66: 475–91.
22. Liuwantara D., Elliot M., Smith M. et al. Nuclear factor-kappaB regulates beta-cell death: a critical role for A20 in beta-cell protection // Diabetes. – 2006; 55 (9): ISSN 2491–501.
23. Lohmann T., Kellner K., Verlohren H. et al. Titre and combination of ICA and autoantibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate two clinically distinct types of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) // Diabetologia. – 2001; 44 (8): 1005–10.
24. Richer M., Lavallée D., Shanina I. et al. Immunomodulation of Antigen Presenting Cells Promotes Natural Regulatory T Cells That Prevent Autoimmune Diabetes in NOD Mice. PLoS ONE 7 (2): e31153.
25. Martin S., Kardorf J., Schulte B. et al. Autoantibodies to the islet antigen ICA69 occur in IDDM and in rheumatoid arthritis // Diabetologia. – 1995; 38 (3): 351–5.
26. Noble J., Valdes A. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes // Curr. Diab. Rep. – 2011; 11 (6): 533–42.
27. Petrone A., Spoletini M., Zampetti S. et al. The PTPN22 1858T gene variant in type 1 diabetes is associated with reduced residual beta-cell function and worse metabolic control // Diabetes Care. – 2008; 31 (6): ISSN 214–8.
28. Pociot F., McDermott M. Genetics of type 1 diabetes mellitus // Genes and Immunity. – 2002; 3: 235–249.
29. Roep B., Peakman M. Diabetogenic T lymphocytes in human Type 1 diabetes // Curr. Opin. Immunol. – 2011; 23 (6): 746–53.
30. Sané F., Moumna I., Hober D. Group B coxsackieviruses and autoimmunity: focus on Type 1 diabetes // Expert. Rev. ClinImmunol. – 2011; 7 (3): 357–66.
31. Singh B., Nikoopour E., Huszarik K. et al. Immunomodulation and regeneration of islet Beta cells by cytokines in autoimmune type 1 diabetes // J. Interferon. Cytokine. Res. – 2011; 31 (10): 711–9.
32. Skyler J. Immune intervention for type 1 diabetes mellitus // Int. J. Clin. Pract. Suppl. – 2011; 170: 61–70.
33. Steck A., Rewers M. Genetics of type 1 diabetes. Baltimore: Clinical chemistry, 2011 // Clin. Chem. – 2011; 57 (2): 176–85.
34. Takiishi T., Korf H., Tom L. et al. Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified Lactococcuslactis in mice // J. Clin. Invest. – 2012; 122 (5): 1717–25.
35. Orban T., Sosenko J., Cuthbertson D. et al. Pancreatic Islet Autoantibodies as Predictors of Type 1 Diabetes in the Diabetes Prevention Trial–Type 1 // Diabetes Care. – 2009; 32 (12): 2269–74.
36. Toguchi Y., Ginsberg-Fellner F., Rubinstein P. Cytotoxic islet cell surface antibodies (ICSA) in patients with type I diabetes and their first-degree relatives // Diabetes. – 1985; 34 (9): 855–60.
37. Walker L. Natural Treg in autoimmune diabetes: all present and correct? // Expert. Opin. Biol. Ther. – 2008; 8 (11): 1691–703.
38. Wang C., Podolsky R., She J. Genetic and functional evidence supporting SUMO4 as a type 1 diabetes susceptibility gene // Ann. N Y Acad. Sci. – 2006; 1079: 257–67.
39. Wang H., Jin Y., Reddy M. et al. Genetically Dependent ERBB3 Expression Modulates Antigen Presenting Cell Function and Type 1 Diabetes Risk // PLoS One. – 2010; 5 (7): e11789.
40. Winter W., Harris N., Schatz D. Type 1 diabetes islet autoantibody markers // Diabetes. Technol. Ther. – 2002; 4 (6): 817–39.
41. Winter W., Schatz D. Autoimmune markers in diabetes // Clin. Chem. – 2011; 57 (2): 168–75. Epub 2010 Dec 2.
42. Yoon J., Jun H. Viruses in type 1 diabetes: brief review. National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources. – 2004; 45 (3).