

УДК 616.43;616-008.9;616.39

МАРКЕРЫ АПОПТОЗА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА У ДЕТЕЙ

Барычева Л. Ю., Эрдни-Горяева Н. Э.

ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации, г. Ставрополь, Россия (355017, Ставрополь, ул. Мира, д. 310), e-mail: stgmu.ru

Обследовано 45 детей в возрасте 3–15 лет. Целью исследования явилось определение готовности к апоптозу лимфоцитов и нейтрофилов периферической крови с помощью определения маркеров апоптоза – CD95, CD95L, BSL2. При оценке апоптоза иммунокомпетентных клеток установлено снижение готовности к запрограммированной клеточной гибели лимфоцитов и увеличение – нейтрофильных гранулоцитов. Наиболее выраженные изменения регистрируются в возрастной группе 7–15 лет со стажем заболевания более 3-х лет. Полученные данные могут быть признаком подавления запрограммированной гибели аутореактивных лимфоцитов в ткани поджелудочной железы, что способствует пролонгации иммунного ответа. Увеличение доли лейкоцитарных клеток, экспрессирующих CD95L, может способствовать усилению процессов запрограммированной клеточной гибели в островковых β -клетках поджелудочной железы, инфильтрированных иммунокомпетентными клетками.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа, дети, апоптоз лимфоцитов, апоптоз нейтрофилов.

MARKERS OF APOPTOSIS OF IMMUNOCOMPETENT CELLS AT DIABETES OF THE 1 ST TYPE BY CHILDREN

Barycheva L. Y., Erdni-Goryaeva N. E.

GBOU VPO "Stavropol state medical university" Health Ministry of Russian Federation, 355017, Stavropol, Russia (355017, Stavropol, Mira street, 310), e-mail: stgmu.ru

25 children aged 3–15 years are examined. The aim of the research was to determine the readiness to apoptosis of lymphocytes and neutrophils of peripheral blood with help of the definition of apoptosis markers – CD95, CD95L, BSL2. When assessing the apoptosis of immunocompetent cells is fixed a decrease of readiness to programmed cell death of lymphocytes and increase of neutrophils. The most expressed changes are registered in the group aged 7–15 years with the disease experience more than 3 years. The data may be the indication of the programmed death suppressing of autoreactive lymphocytes in pancreatic tissue, that promotes the prolongation of the immune response. Increasing of the share of leukocyte cells expressing CD95L can promote to strengthening of processes of programmed cell death in islet β -cells of the pancreas, indurated immunocompetent cells.

Key words: diabetes of the 1st type, children, apoptosis of lymphocytes, apoptosis of neutrophils.

Введение

Сахарный диабет 1 типа (СД1) является полигенным, мультифакторным заболеванием, связанным с образованием аутоантител и аутореактивных Т-лимфоцитов к β -клеткам поджелудочной железы [3, 6].

Ведущими звеньями в патогенезе аутоиммунных поражений являются дисрегуляция иммунитета и запрограммированной гибели клеток [1, 2, 7].

Контролируемый апоптоз рассматривается сегодня как главный механизм поддержания оптимального баланса клеток в очаге воспаления [5, 10], ограничивающий экспансию активированных клонов и препятствующий развитию аутоиммунных реакций [1,

2]. При возникновении дефекта в его реализации активированные иммунные клетки могут накапливаться, что ведет к возникновению аутоиммунных заболеваний.

Цель исследования: изучение активационных маркеров апоптоза CD95, CD95L, Bsl2 на лимфоцитах и нейтрофилах периферической крови при сахарном диабете 1 типа у детей.

Материал и методы исследования

Выполнено обследование 45 детей с сахарным диабетом 1 типа в возрасте 3–15 лет. В группу I вошли 20 детей в возрасте 3–6 лет (дошкольники), в группу II – 12 детей в возрасте 7–15 лет (школьники) с длительностью заболевания менее 3-х лет, в группу III – 13 детей 7–15 лет (школьники) со стажем заболевания более 3-х лет. Контрольную группу составили 30 здоровых детей 3–6 (15) и 7–15 (15) лет. Исследование проведено на базе эндокринологического отделения ДГКБ им. Г. К. Филиппского г. Ставрополя.

Для оценки программируемой клеточной гибели выявляли количество лимфоцитов и нейтрофильных гранулоцитов, экспрессирующих маркеры апоптоза. Лимфоциты выделяли на градиенте плотности Ficoll-Raque, нейтрофилы – на двойном градиенте плотности Ficoll-Raque и фиколл-урографин (GE Healthcare, Швеция). Суспензию клеток трижды отмывали в среде RPMI-1640 (Вектор-Бест, Россия). В культурах лимфоцитов и нейтрофилов оценивали количество клеток, экспрессирующих CD95, CD95L, Bsl2 методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Invitrogen, США).

Для статистического анализа данных использовали пакет программ «Primer of Biostat 4,0», Attestat 10.5.1.». Для оценки межгрупповых различий применяли дисперсионный анализ повторных измерений с вычислением критериев Ньюмена – Кейлса, Данна.

Количественные значения характеризовались ненормальным распределением и были представлены в виде медианы и интерквартильного (25 и 75 процентиля) размаха (Me (Q1-Q)). Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В работе было установлено уменьшение количества лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецепторы (CD95) у пациентов всех групп по сравнению со здоровыми детьми (табл. 1).

Минимальные показатели отмечены у детей 7–15 лет со стажем заболевания более 3-х лет (табл. 1).

Таблица 1

Показатели апоптоза лимфоцитов у детей с сахарным диабетом 1 типа

| Возраст | Клинические группы | CD95, % | CD95L, % | Bsl2, % |
|---------|--------------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| 3-6 лет | СД1 (I) (n=20) | 17,7(15,9-19,43)*** | 7,4(5,81- 8,94)*** | 70,2(68,56-71,76)*** |
| | Контрольная группа | 28,0(26,08-30,0) | 9,2(8,04- 10,25) | 65,9(62,82-69,05) |

| | | | | |
|----------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | (n=15) | | | |
| 7-15 лет | СД1, стаж заболевания менее 3-х лет (II) (n=12) | 20,5(17,94-23,02) *** | 11,6(10,12-13,14) *** | 70,3(65,72-74,9) *** |
| | СД1, стаж заболевания более 3-х лет (III) (n=13) | 13,9(10,04-17,73) *** | 15,6(14,26-16,87) *** | 79,5(75,47-83,59) *** |
| | Контрольная группа (n=15) | 26,5 (24,20-28,84) | 8,14 (6,49-9,78) | 60,3(56,97-63,66) |

*- $p < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой, **- $p < 0,05$ – по сравнению с группой III (критерий Ньюмена – Кейлса, критерий Данна).

При оценке уровня экспрессии антиапоптотических маркеров (Bsl2) выявлено его увеличение на лимфоцитах детей всех групп, более выраженное у школьников с длительностью заболевания более 3-х лет, что также свидетельствует о нарушении Fas-зависимого апоптоза у детей с сахарным диабетом 1 типа, приводящего к замедлению процессов клеточной смерти аутореактивных форм лимфоцитов [1, 2].

Полученные нами результаты могут быть косвенным признаком подавления программированной гибели активированных лимфоцитов в ткани поджелудочной железы, что способствует пролонгации иммунного ответа.

Уровень апоптотической готовности лимфоидных клеток зависит от длительности заболевания и уменьшается у детей со стажем СД1 более 3-х лет.

Ранее было показано, что при сахарном диабете выявляется резистентность лимфоцитов к апоптозу, что, возможно, объясняет характер и продолжительность аутоиммунного ответа [1].

В культуре лимфоцитов детей, больных сахарным диабетом, установлено увеличение процентной доли лимфоцитов, экспрессирующих CD95L, (табл. 1), по сравнению с группой здоровых детей. Наиболее высокие показатели определялись у детей 7–15 лет со стажем заболевания более 3-х лет (табл. 1).

Известно, что при СД1 островки поджелудочной железы инфильтрованы иммунными клетками, продуцирующими широкий спектр цитокинов, что сопровождается aberrантной экспрессией мембранных рецепторов. Под влиянием повышенной концентрации глюкозы и цитокинов β -клетки начинают экспрессировать CD95 на своей поверхности, практически отсутствующий в норме [2].

Повышение экспрессии CD95L на лимфоидных клетках возможно обуславливает более выраженный апоптотический процесс в β -клетках поджелудочной железы [2] и их последующее удаление.

В последние годы показано, что нейтрофильные гранулоциты принимают активное участие в формировании аутоиммунного воспаления. Реакция нейтрофилов, направленная на

локализацию и элиминацию аутоантигенов во многом зависит от силы и длительности антигенного воздействия на иммунную систему, а также исходного уровня функциональной активности клеток.

Нами установлено, что течение сахарного диабета у детей сопровождается увеличением процента нейтрофилов, экспрессирующих маркеры апоптоза (CD95), и уменьшением доли клеток, имеющих на своей поверхности антиапоптотические белки Bsl2 (табл. 2).

Таблица 2

Показатели апоптоза нейтрофилов у детей с сахарным диабетом 1 типа

| Возраст | клинические группы | CD95, % | CD95L, % | Bsl2, % |
|----------|--|----------------------|----------------------|---------------------|
| 3-6 лет | СД1 (I) (n=20) | 75,1(71,49-78,72)*** | 9,5 (8,63- 10,32)*** | 3,68 (3,46-3,90)*** |
| | контрольная группа (n=15) | 59,2 (56,31- 62,01) | 7,35 (6,58- 8,12) | 7,7 (6,68-8,77) |
| 7-15 лет | СД1, стаж заболевания менее 3-х лет (II) (n=12) | 77,6(71,15-83,99)*** | 9,5(8,14-10,92)*** | 3,99(2,9- 5,08)*** |
| | СД1, стаж заболевания более 3-х лет (III) (n=13) | 87,9(84,24-91,63)*** | 12,1(10,22-13,96)*** | 2,78(2,36-3,19)*** |
| | контрольная группа (n=15) | 58,43(54,95- 1,90) | 7,3 (6,46-8,09) | 5,38(4,21-6,55) |

*- $p < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой, **- $p < 0,05$ – по сравнению с группой III (критерий Ньюмена – Кейлса, критерий Данна).

При сравнительной межгрупповой характеристике максимальные показатели CD95 ($p < 0,05$) и минимальные Bsl2 ($p < 0,05$) отмечены у детей 7–15 лет с длительностью заболевания более 3-х лет.

Выявлено увеличение процента полиморфноядерных лейкоцитов, имеющих на своей поверхности CD95L. Наиболее высокие показатели отмечены у детей школьников со сроком заболевания более 3-х лет.

Результаты исследования апоптоза ПМЯЛ при сахарном диабете, представленные в литературных источниках, носят противоречивый характер. Существуют данные об увеличении скорости апоптоза нейтрофилов периферической крови при СД1 и СД2 [4].

Однако в ряде исследований установлено снижение апоптоза нейтрофильных гранулоцитов у больных с СД1 [6], особенно в условиях гипергликемии, что вероятно инициирует процессы хронического воспаления с повреждением тканей, а также предрасполагает к затяжным бактериальным инфекциям у больных сахарным диабетом 1 типа [9].

Полученные нами результаты позволяют считать, что у больных СД1 отмечается повышенная предрасположенность ПМЯЛ к апоптозу, что может быть проявлением защитной реакции, направленной на устранение «излишка» активных нейтрофилов, формирование которого усиливает повреждение тканей.

Увеличение апоптотического потенциала нейтрофильных гранулоцитов является отражением активного вовлечения ПМЯЛ в иммунопатогенез заболевания.

Повышение экспрессии CD95L на нейтрофильных гранулоцитах у больных сахарным диабетом, вероятно, может способствовать элиминации не только клеток поджелудочной железы, но и собственных лейкоцитарных клеток.

Таким образом, при оценке апоптоза иммунокомпетентных клеток у детей, больных сахарным диабетом 1 типа, установлено снижение готовности к запрограммированной клеточной гибели лимфоцитов и увеличение – полиморфноядерных лейкоцитов.

Наиболее выраженные изменения регистрируются в возрастной группе 7–15 лет со стажем заболевания более 3-х лет. У детей всех групп выявлено увеличение доли лейкоцитарных клеток, экспрессирующих на своей поверхности CD95L.

Полученные нами результаты позволяют считать, что у больных СД1 отмечается повышенная предрасположенность ПМЯЛ к апоптозу, что может быть проявлением защитной реакции, направленной на ликвидацию клеток, участвующих в повреждении тканей.

Известно, что ПМЯЛ являются связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом и выполняют главенствующую роль в антибактериальной защите.

Повышение их апоптотической активности может становиться причиной низкой возрастной устойчивости ребенка, его подверженности инфекционным заболеваниям.

Снижение количества лимфоидных клеток, чувствительных к индукции апоптоза, является косвенным признаком подавления запрограммированной клеточной гибели и нарушения элиминации активированных форм лимфоцитов.

Выводы

1. У детей, страдающих сахарным диабетом 1 типа, отмечается снижение готовности к апоптозу лимфоцитов периферической крови, повышение – нейтрофильных гранулоцитов, что сопровождается изменением экспрессии CD95 и Bsl2 и зависит от стажа заболевания.
2. Увеличение экспрессии CD95L на лимфоцитах и нейтрофильных гранулоцитах при СД1 может способствовать усилению процессов запрограммированной клеточной гибели в островковых β -клетках поджелудочной железы, инфильтрированных иммунокомпетентными клетками.

Список литературы

1. Пекарева Е. В. Маркеры апоптоза у больных сахарным диабетом 1 типа в дебюте заболевания / Е. В. Пекарева и др. // Сахарный диабет. – 2009. – № 4. – С. 86-89.
2. Пекарева Е. В. Роль апоптоза в патогенезе сахарного диабета 1 типа / Е. В. Пекарева, Т. В. Никонова, О. М. Смирнова // Сахарный диабет. – 2010. – № 1. – С.45-48.
3. Adeghate E. An update on the etiology and epidemiology of diabetes mellitus / E. Adeghate, P. Schattner, E. Dunn // Ann NY. Acad Sci, 2006. – Vol. 1084. – P. 1–29.
4. Clinical significance of neutrophil apoptosis in peripheral blood of patients with type 2 diabetes mellitus / C. Sudo et al. // Lab Hematol. 2007; 13(3):108-12 (снижена).
5. Filep J. G. Neutrophil apoptosis: a target for enhancing the resolution of inflammation / J. G. Filep, E. I. Kebir // J. Cell Biochem. – 2009. – Vol. 108. – P. 1039–1046.
6. Human polymorphonuclear neutrophil responses to *Burkholderia pseudomallei* in healthy and diabetic subjects / S. Chanchamroen et al. // Infect Immun. – 2009. – Vol. 77. – P. 456–463 (снижен апоптоз).
7. Impact of Lymphocyte Apoptosis in Diabetes mellitus / K. A. Awadhesh et al. // Asian Journal of Medical Sciences. – 2011. – № 2. – P. 1-6.
8. Inflammation is more persistent in type 1 diabetic mice / D. T. Graves et al. // J. Dent. Res., 2005. – Vol. 84. – P. 324–328.
9. Juliana C. Alves Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis / C. Juliana, C. Janine, C. Alves // Indian J. Endocrinol. Metab. – 2012 March. – Supp 11. – № 16. – P. 27–36.
10. Luo H. R. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation / H. R Luo, F. Loison // Am. J. Hematol. – 2008. – Vol. 83. – P. 288–295.

Рецензенты:

Щетинин Е.В., д.м.н., профессор, проректор по научной и инновационной работе СтГМУ, заведующий кафедрой ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г.Ставрополь.

Голубева М.В., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой детских инфекционных болезней ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г.Ставрополь.