

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ НА НЕЙТРОФИЛАХ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Долгушин И.И.¹, Тарабрина Ю.О.¹, Колесников О.Л.¹, Колесникова А.А.¹

¹ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России», Челябинск, Россия (454092, Челябинск, ул. Воровского 64), e-mail: olekol08@rambler.ru

Изучена экспрессия молекул адгезии на нейтрофилах больных сахарным диабетом 2 типа (СД2) и у пациентов с синдромом диабетической стопы (ДС). Количество лейкоцитов было повышено только у лиц с синдромом ДС. Наличие СД2 приводило к уменьшению относительного и абсолютного количества нейтрофилов с фенотипами CD 16+11b+ и CD 16+11b+66b+. В группе больных с синдромом ДС снижена экспрессия CD62L, CD11b, а также совместная экспрессия CD 62LCD 66b, CD11bCD 66b. После дополнительной стимуляции фторболмиристатацетатом в группе СД2 статистически значимо возросло почти в 2 раза абсолютное содержание клеток с фенотипом CD 16+66b+. В группе ДС относительно группы сравнения возросло число нейтрофилов, имеющих фенотипы CD 16+62L+, CD 16+62L+66b+, CD 16+11b+66b+. Наличие синдрома ДС приводило к увеличению (по сравнению с группой СД2) клеток, на мембране которых представлены CD 16+62L+, CD 16+11b+, CD 16+62L+66b+, CD 16+11b+62L+. Полученные данные свидетельствуют о снижении функциональной активности нейтрофилов при СД2 и синдроме ДС. Однако клетки этих пациентов имеют достоверно более выраженный функциональный резерв.

Ключевые слова: нейтрофил, молекулы адгезии, CD11b, CD66b, CD62L, сахарный диабет

ADHESION MOLECULE EXPRESSION ANALYSIS ON TYPE II DIABETES MELLITUS PATIENT NEUTROPHILS

Dolgushin I.I.¹, Tarabrina Y.O.¹, Kolesnikov O.L.¹, Kolesnikova A.A.¹

¹SouthUrals State Medical University, (454092, Chelyabinsk, Vorovskiy Street 64), e-mail:olekol08@rambler.ru

Adhesion molecule expression analysis on type II diabetes mellitus patient neutrophils (DM2) and on patients with diabetic foot (DF) syndrome was studied. Leukocyte quantity increased only in patients with DF syndrome. DM2 presence resulted in decreasing of relative and absolute neutrophil quantity with CD 16 + 11b + and CD 16 + 11b + 66b+ phenotypes. CD 62L, CD 11b and joint CD 62LCD 66b, CD11bCD 66b expressions reduced in patients with CD11bCD 66b group. After additional stimulation with phorbolmiristatazetat in DM2 group absolute cell quantity with CD 16 + 66b + phenotype increased statistically considerably almost twice. Neutrophil number with CD 16 + 62L +, CD 16 +62L+66b+, CD 16+11b+66b+ phenotypes increased in comparing with the ones in DM group. Presence of DM syndrome resulted in increasing (in comparison with DM2 group) the cells, the membrane of which CD 16+62L+, CD 16+11b+, CD 16+62L+66b+, CD 16+11b+62L+ were presented. The data obtained show the decrease of functional neutrophil activity in DM2 and DF syndrome. However, the cells of these patients have undoubtedly a more expressed functional reserve.

Keywords: neutrophil, adhesion molecules, CD11b, CD66b, CD62L, diabetes mellitus.

Сахарный диабет является весьма распространённым заболеванием. На январь 2013 года в Российской Федерации зарегистрировано 3,8 миллиона больных, а, по данным эпидемиологических наблюдений, общее число таких пациентов может составлять 9 – 10 миллионов [1]. Это заболевание является хроническим, затрагивает практически все стороны обмена веществ и, как правило, сопровождается поражением самых различных структур организма (сетчатка глаза, почки, сердце и т.д.). Иммунная система, которая активно участвует в поддержании гомеостаза, неизбежно вовлекается в патологический процесс. У больных с тяжелыми осложнениями диабета повышены способность моноцитов к выработке активных форм кислорода и способность нейтрофилов к поглощению чужеродных частиц при снижении общей гемолитической активности системы комплемента [3, 5]. При наличии синдрома диа-

бетической стопы у моноцитов снижена способность к выработке активных форм кислорода, а нейтрофилы демонстрировали активацию фагоцитоза [2]. Подвижность нейтрофилов больных сахарным диабетом в тесте хемотаксиса под агарозой была значимо ниже, чем у здоровых лиц. При этом у больных обнаружена повышенная спонтанная адгезия к нейлоновым волокнам и увеличенная экспрессия молекул адгезии (CD 11b, CD 11c)[7]. Другие исследователи продемонстрировали, что от 98 до 100% нейтрофилов и моноцитов больных сахарным диабетом 2 типа и людей из группы контроля экспрессировали CD11b и CD11a в одинаковой степени. Плотность молекул адгезии на поверхности клеток также практически не различалась [8].

Цель исследования

Изучить экспрессию молекул адгезии (CD66b, CD62L, CD11b) на мембране нейтрофилов больных сахарным диабетом 2 типа в покое и после дополнительной стимуляции.

Материал и методы исследования

Обследовано 33 человека. Группа «Сахарный диабет» включала 12 больных сахарным диабетом 2 типа (СД2), группа «Диабетическая стопа» – 8 человек. В группу «Сравнение» (n = 13) включили пациентов без нарушения углеводного обмена, страдающих артериальной гипертензией и/или ИБС. Такой выбор обусловлен состоянием пациентов с СД2, у которых также диагностировали ИБС и/или артериальную гипертензию. Сравнение состояния этих пациентов позволяло определить влияние именно СД2 на изучаемые показатели. Возраст людей, включенных в исследование составил: группа «Сравнение» 54,00(50,50;71,00)года, группа «Сахарный диабет» 61,00 (52,50; 64,00) год, группа «Диабетическая стопа» 63,00(49,25;70,00) года (значимых различий не обнаружено). С помощью проточного цитофлюориметра (FC 500, BeckmanCoulter) определяли содержание нейтрофилов и моноцитов, на мембране которых экспрессированы молекулы адгезии CD11b, CD62L, CD66b. Показатели оценивали дважды – до и после стимуляции форболмиристатацетатом (ФМА). Гейтирование проводили по наличию экспрессии CD16 при дополнительной дифференцировке клеток по показателям светорассеяния. Результаты обрабатывали с помощью пакета прикладных статистических программ SPSS, результаты выражали в виде медианы и квартилей. Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни (U) или Вальда-Вольфовица (W). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$ [4].

Результаты исследования и их обсуждение

Общее количество лейкоцитов у лиц группы сравнения и СД2 практически не различалось (таблица 1). У пациентов с синдромом диабетической стопы по сравнению с группой 2 количество лейкоцитов статистически значимо увеличилось, медиана возросла в 1,22 раза.

Это отражает наличие острого воспалительного процесса у этой группы обследуемых. При этом относительная доля сегментоядерных нейтрофилов и их абсолютное содержание оставались одинаковыми во всех группах.

Таблица 1

Содержание лейкоцитов в периферической крови

Показатель	Группа 1 «Сравнение»(n = 13)	Группа 2 «Сахарный диабет» (n = 12)	Группа 3 «Диабетическая стопа» (n = 8)
Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$)	6,90 (5,05; 10,85)	6,85 (6,10; 7,55)	8,350 (6,13; 10,73) P (2-3) = 0,025 W
Сегментоядерные нейтрофилы (%)	67,00 (55,50; 71,00)	67,00 (63,25; 70,00)	67,00 (57,00; 70,25)
Сегментоядерные нейтрофилы ($\times 10^9/\text{л}$)	5,11 (3,56; 6,98)	4,48 (4,09; 5,30)	5,21 (4,13; 6,76)

CD62L определяет молекулу адгезии, которая относится к группе L-селектинов, экспрессируется на всех типах лейкоцитов. L-селектин связывается с активированными клетками эндотелия контролирует перекатывание лейкоцитов. Экспрессия является конституциональной и не требует активации клеток. CD11b связывается с молекулами интегинов семейства β_2 . Эти молекулы имеют однотипную цепь β_2 , и разные α цепи. CD11b определяет α_m цепь. Интегрины обеспечивают взаимодействие внутриклеточного цитоскелета с микроокружением внеклеточного матрикса (фибронектин и т.д.). CD66b определяет гликопротеин, относящийся к группе карциноэмбриональных антигенов, которые участвуют в обеспечении различных функций, и, в частности, указывают на активацию нейтрофилов [6].

Как видно из таблицы 2, наличие СД2 приводило к уменьшению относительного и абсолютного количества нейтрофилов с фенотипом CD16+11b+ в 2,73 и 3,07 раза соответственно. При одновременной оценке экспрессии трех антигенов обнаружено, что число нейтрофильных гранулоцитов с фенотипом CD16+11b+66b+ также сократилось (относительное – в 2,67 раза, абсолютное – в 2,81 раза). В группе 3 изменения, в целом, аналогичны описанным выше. По сравнению с группой «Сравнение» и группой «Сахарный диабет» снижена экспрессия CD62L, CD11b, а также совместная экспрессия CD62L и CD66b, CD11b и CD66b. Но при этом возросло абсолютное количество нейтрофилов с фенотипом CD16+66b+, что может быть связано с упомянутым выше увеличением содержания лейкоцитов. В целом можно говорить о некотором снижении функциональной активности нейтрофилов у лиц с сахарным диабетом 2 типа и синдромом диабетической стопы.

После дополнительной стимуляции фоболмиристатацетатом ситуация изменилась. В группе 2 значимо возросло почти в 2 раза абсолютное содержание клеток с фенотипом

CD16+66b+ (таблица 3). Остальные показатели не отличались от группы сравнения. В группе «Диабетическая стопа» относительно группы 1 возросло число нейтрофилов, имеющих фенотипы CD16+62L+, CD16+62L+66b+, CD16+11b+66b+. Наличие синдрома диабетической стопы приводило к увеличению (по сравнению с группой 2) клеток, на мембране которых представлены CD16+62L+, CD16+11b+, CD16+62L+66b+, CD16+11b+62L+. Однако наши данные скорее свидетельствуют о формировании некоего дисбаланса в состоянии клеток, поскольку уровень нейтрофилов с фенотипом CD16+66b+ значительно уменьшился.

Для дополнительной оценки способности нейтрофилов реагировать на дополнительные стимулы был рассчитан показатель функционального резерва по следующей формуле: ((стимулированный показатель – спонтанный показатель)/спонтанный показатель) x 100. Данные представлены в таблице 4. У пациентов с сахарным диабетом относительно группы сравнения функциональный резерв по экспрессии CD11b+ и CD11b+66b+ возрос в 3,6 раза. В группе 3 относительно группы сравнения также возросла интенсивность реакции на стимул по экспрессии CD11b+ (в 8,9 раза), и дополнительно вырос резерв по экспрессии CD62L+ - в 1,9 раза. Также выявлено возрастание функционального резерва по сравнению с больными СД2 по экспрессии CD6b+, CD62L+, CD62L+66b+.

Таблица 2

Содержание в периферической крови нейтрофилов, экспрессирующих молекулы адгезии

Популяция нейтрофилов	Группа 1 «Сравнение»(n = 13)	Группа 2 «Сахарный диабет» (n = 12)	Группа 3 «Диабетическая стопа» (n = 8)
CD 16+66b+ (%)	99,64 (98,55; 99,89)	99,45 (96,24; 99,78)	98,26 (94,14; 99,78)
CD 16+66b+ (x 10 ⁹ /л)	3,75 (3,39; 6,68)	4,14 (3,36; 4,96)	6,83 (4,24; 8,29) P(1-3) = 0,042 U P(2-3) = 0,031 U
CD 16+62L+ (%)	3,39 (0,65; 5,40)	3,20 (0,26; 31,17)	2,00 (1,75; 30,83) P(1-3) = 0,004 W P(2-3) = 0,006 W
CD 16+62L+ (x 10 ⁹ /л)	0,15 (0,019; 0,26)	0,13 (0,009; 1,27)	0,14 (0,079; 2,65) P(1-3) = 0,018 W P(2-3) = 0,001 W
CD 16+11b+ (%)	33,39 (20,37; 43,06)	12,25 (1,35; 23,17) P(1-2) = 0,003 U	4,12 (2,78; 9,08) P(1-3) = 0,001 U P(2-3) = 0,006 W
CD 16+11b+ (x 10 ⁹ /л)	1,41 (0,77; 2,40)	0,46 (0,053; 0,80) P(1-2) = 0,003 U	0,30 (0,21; 0,40) P(1-3) = 0,001 U

CD 16+62L+66b+ (%)	5,64 (1,98; 13,55)	4,57 (0,41; 27,62)	1,74 (1,34; 29,98)
CD 16+62L+66b+ (x 10 ⁹ /л)	0,34 (0,068; 0,49)	0,20 (0,017; 1,29)	0,13 (0,057; 2,58) P(1-3) = 0,018 W P(2-3) = 0,001 W
CD 16+11b+66b+ (%)	32,22 (18,48; 44,42)	12,09 (0,41; 22,29) P(1-2) = 0,006 U	2,55 (2,13; 9,03) P(1-3) = 0,001 U P(2-3) = 0,006 W
CD 16+11b+66b+ (x 10 ⁹ /л)	1,35 (0,74; 2,48)	0,48 (0,016; 0,79) P(1-2) = 0,005 U	0,18 (0,17; 0,36) P(1-3) = 0,001 U P(2-3) = 0,001 W
CD 16+11b+62L+ (%)	0,79 (0,077; 6,63)	,062 (0,005; 0,67)	0,18 (0,006; 0,52)
CD 16+11b+62L+ (x 10 ⁹ /л)	,028 (0,005; 0,27)	0,002 (0,0002; 0,036)	0,007 (0,0005; 0,04)

Таблица 3

Содержание в периферической крови нейтрофилов, экспрессирующих молекулы адгезии, после дополнительной активации

Популяция нейтрофилов	Группа 1 «Сравнение»(n = 13)	Группа 2 «Сахарный диабет» (n = 12)	Группа 3 «Диабетическая стопа» (n = 8)
CD 16+66b+ (%)	52,18 (44,62; 97,08)	98,61 (57,27; 99,56)	70,64 (51,89; 94,11) P(2-3) = 0,006 W
CD 16+66b+ (x 10 ⁹ /л)	2,10 (1,74; 4,24)	4,11 (1,80; 4,95) P(1-2) = 0,02 W	5,15 (2,65; 6,89)
CD 16+62L+ (%)	54,35 (41,17; 74,85)	73,99 (60,88; 86,76)	59,74 (58,36; 75,71) P(1-3) = 0,004 W
CD 16+62L+ (x 10 ⁹ /л)	2,39 (1,61; 3,59)	2,81 (2,38; 3,63)	4,17 (3,12; 5,21) P(1-3) = 0,02 U P(2-3) = 0,013 U
CD 16+11b+ (%)	56,62 (35,26; 75,36)	41,44 (14,91; 71,37)	39,30 (8,68; 54,88)
CD 16+11b+ (x 10 ⁹ /л)	2,15 (1,07; 4,06)	1,43 (0,72; 2,39)	2,32 (0,42; 3,20) P(2-3) = 0,025 W
CD 16+62L+66b+ (%)	61,99 (41,19; 79,13)	68,93 (62,32; 79,59)	55,21 (49,96; 74,64)
CD 16+62L+66b+ (x 10 ⁹ /л)	2,58 (1,91; 3,49)	2,78 (2,32; 3,29)	3,72 (3,10; 4,49) P(1-3) = 0,03 U

			P(2-3) = 0,02 U
CD 16+11b+66b+ (%)	55,32 (35,82; 74,87)	39,20 (14,58; 71,15)	30,47 (6,07; 51,54) P(1-3) = 0,035 U
CD 16+11b+66b+ (x 10 ⁹ /л)	2,10 (1,05; 4,10)	1,38 (0,65; 2,39)	1,74 (0,35; 2,89)
CD 16+11b+62L+ (%)	22,65 (14,85; 54,51)	22,24 (7,29; 51,01)	16,63 (2,34; 28,98)
CD 16+11b+62L+ (x 10 ⁹ /л)	1,22 (0,43; 2,49)	0,78 (0,35; 1,97)	0,99 (0,20; 1,29) P(2-3) = 0,025 W

Таблица 4

Функциональный резерв нейтрофилов больных сахарным диабетом 2 типа

Популяция нейтрофилов	Группа 1 «Сравнение»	Группа 2 «Сахарный диабет»	Группа 3 «Диабетическая стопа»
CD 16+66b+	-47,53(-55,33; -1,63)	-0,596 (-40,85; -0,11)	-25,41 (-47,68; -3,83) p(2-3) = 0,001W
CD 16+62L+	1669,5 (874,8; 8406,8)	1085,2 (296,5; 25706,4)	3095,3 (746,5; 3862,4) p(1-3) = 0,018W p(2-3) = 0,006W
CD 16+11b+	54,88 (17,80; 176,92)	195,99 (149,46; 551,14) p(1-2) = 0,008 U	486,66 (6,60; 1281,97) p(1-3) = 0,001W
CD 16+62L+66b+	957,38 (303,49; 3147,06)	1340,78 (320,40; 16829,4)	3172,95 (644,01; 5517,99) p(2-3) = 0,025W
CD 16+11b+66b+	56,13 (15,94; 182,97)	199,82 (130,22; 1698,56) p(1-2) = 0,013U	634,14 (-17,03; 1614,19)
CD 16+11b+62L+	1180,8 (424,4; 7228,7)	21626,9 (2482,5; 60157,7)	1514,3 (-100,0; 9030,7)

Выводы

- Сахарный диабет 2 типа вызывает снижение способности нейтрофилов к экспрессии молекул адгезии. Дополнительная стимуляция сопровождается увеличением экспрессии CD66b.
- Синдром диабетической стопы вызывает снижение экспрессии молекул адгезии по сравнению с лицами без диабета и лицами, страдающими СД2. После стимуляции ФМА экспрессия молекул адгезии возросла по сравнению с группами 1 и 2.

3. Функциональный резерв нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с СД2 и синдромом диабетической стопы достоверно выше, чем в группе сравнения.

Список литературы

1. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. – М., 2013. – 120 с.
2. Долгушин И.И., Тарабрина Ю.О., Колесников О.Л., Колесникова А.А. Функциональное состояние клеток врожденного иммунитета у пациентов с синдромом диабетической стопы // Вестник Карагандинского университета. – 2013. – Т. 71, № 3. – С. 61-65.
3. Колесникова А.А., Долгушин И.И., Тарабрина Ю.О. и др. Анализ влияния наличия тяжелых осложнений на состояние больных сахарным диабетом 2-го типа // Проблемы эндокринологии. – 2012. - № 4-2. – С. 27.
4. Наследов А.Д. SPSS 15: профессиональный статистический анализ данных. – СПб.: Питер, 2008. – 416 с.
5. Тарабрина Ю.О., Колесников О.Л., Колесникова А.А., Абрамовских О.С. Оценка показателей липидного обмена и функционального состояния иммунной системы у больных сахарным диабетом 2 типа в зависимости от выраженности поздних осложнений // Вестник Челябинского государственного университета. – 2013. - № 7 (298). – С. 204-205.
6. Ярилин, А.А. Иммунология / А.А. Ярилин. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 752 с.
7. Delamaire M., Maugeudre D., Moreno M. et al. Impaired leucocyte functions in diabetic patients // Diabet Med. – 1997. – Vol. 14, N 1. – P. 29-34.
8. Sampson M.J., Davies I.R., Brown J.C. et al. Monocyte and Neutrophil Adhesion Molecule Expression During Acute Hyperglycemia and After Antioxidant Treatment in Type 2 Diabetes and Control Patients // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2002. – Vol. 22. – P. 1187-1193.

Рецензенты:

Абрамовских О.С., д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ЮУГМУ, г. Челябинск;

Тишевская Н.В., д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии ЮУГМУ, г. Челябинск.