

Выводы

1. У больных СД 1-го типа с наибольшим стажем заболевания имеются выраженные микрососудистые осложнения (ретинопатия, нефропатия). Механизмы развития и прогрессирования сосудистых осложнений сопряжены с нарушением микрореологических свойств тромбоцитов.

2. У пациентов СД 1-го типа выраженность структурных и функциональных изменений мембраны тромбоцитов (возрастание микровязкости липидной фазы, угнетение активности Na^+ , K^+ -АТФазы) коррелируется со степенью выраженности сосудистых осложнений. Нарушения структурно-метаболического статуса мембраны тромбоцитов наиболее выражены у пациентов СД 1-го типа с декомпенсацией углеводного обмена.

3. Значимая роль нарушений структурных свойств мембраны тромбоцитарных клеток в механизмах изменения их функциональных свойств позволяет использовать для профилактики и коррекции диабетических микроангиопатий препараты, обладающие мембраностабилизирующим эффектом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З. С., Момот А. П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. — М., 2001.
2. Болдырев А. А. Введение в биомембранологию. — М., 1990.
3. Бышевский А. Ш., Галан С. Л., Деметьева И. А. и др. // Тромбоциты (состав, функции, биомедицинское значение). — Тюмень, 1996.
4. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. — М., 1980.
5. Геннис Р. Биомембраны: молекулярная структура и функции. — М., 1997.
6. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов. — М., 1989.
7. Древал В. И. // Биохимия. — 1986. — № 9. — С. 1562—1569.
8. Зубаилов Д. М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. — Казань, 2000.
9. Казеннов А. М., Маслова М. Н., Шалабодов А. Д. // Биохимия. — 1984. — № 7. — С. 1089—1094.
10. Кравец Е. Б., Яковлева Н. М., Рязанцева Н. В. // Сахарный диабет. — 2005. — № 1. — С. 14—17.
11. Мацкевич Ю. А., Казеннов А. М., Маслова М. Н. // Эволюция биохимия и физиол. — 1994. — № 4. — С. 497—504.
12. Петрищев Н. Н., Папаян Л. П. Гемостаз (физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний). — СПб., 1999.
13. Чуринов К. В., Янушкина Т. С., Кузнецов С. Р. // Тер. архив. — 1991. — № 6. — С. 91—96.
14. Boldyrev A. A., Lopina O. D., Prokopjeva V. D. et al. // Biochem. Int. — 1983. — Vol. 6. — P. 297—305.

Поступила 18.01.06

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2006

УДК 616.379-008.64-092:612.124.017.1]-078.33

М. Р. Овсепян, А. С. Бояджян, Л. П. Оганесян

АКТИВАЦИЯ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА ПО КЛАССИЧЕСКОМУ И АЛЬТЕРНАТИВНОМУ ПУТИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ТЕЧЕНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА¹

Лаборатория макромолекулярных комплексов Института молекулярной биологии (дир. — акад. НАН РА К. Г. Карагезян) НАН РА, Ереван

Целью настоящей работы являлась оценка функциональной активности классического и альтернативного путей активации комплемента при сахарном диабете 2-го типа (СД2) на поздних стадиях развития заболевания. Для достижения отмеченной цели в крови больных СД2 и здоровых лиц были определены общая гемолитическая активность классического пути активации комплемента, общая гемолитическая активность альтернативного пути активации комплемента и гемолитические активности C1-, C2-, C3- и C4-компонента комплемента. Согласно полученным данным, у больных СД2 на поздних стадиях развития заболевания наблюдается статистически достоверное повышение как общей гемолитической активности классического пути активации комплемента (в 1,5 раза, $p < 0,01$; $t = 2,54$), так и гемолитических активностей отдельных компонентов комплемента — C1 и C3 в 2,2 раза (соответственно $t = 2,05$; $p < 0,046$; $t = 3,9$; $p < 0,0004$), а C4 в 1,8 раза ($t = 2,05$; $p < 0,046$), тогда как общая гемолитическая активность альтернативного пути и гемолитическая активность C2-компонента комплемента остаются в пределах нормальных значений ($p > 0,5$). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что альтернативный путь активации комплемента, по всей вероятности, не вносит своего вклада в процесс активации C3-конвертазы и последующей генерации C3d и дальнейшего формирования цитолитического мембраноатакующего комплекса.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, гемолитическая активность, больные.

The study was undertaken to assess the functional activity of the classical and alternative pathways of complement activation in type 2 diabetes mellitus (DM-2) at late stages of the disease. For this purpose, the total hemolytic activity of the classical and alternative pathways of complement activation and the hemolytic activities of the complement components C1, C2, C3, and C4 were determined in the blood of patients with DM-2 and healthy individuals. According to the data obtained, patients with DM-2 at late stages of the disease have statistically significant increases in both the total hemolytic activity of the classical pathway of complement activation (by 1.5 times; $p < 0.01$; $t = 2.54$) and the hemolytic activities of individual complement components - C1 and C3 by 2.2 times ($t = 2.05$; $p < 0.046$ and $t = 3.9$; $p < 0.0004$, respectively) and C4 by 1.8 times ($t = 2.05$; $p < 0.046$) whereas the total hemolytic activity of the alternative pathway and the hemolytic activity of the complement component C2 remain in the normal range ($p > 0.5$). The findings suggest that the alternative pathway of complement activation is most likely to make no contribution to the activation of C3-converterase and the subsequent generation of C3d, and the further formation of the cytolytic and membrane-attacking complex.

Key words: type 2 diabetes mellitus, hemolytic activity, patients.

¹Авторы выражают благодарность А. А. Мамиконяну и А. А. Геворкян — врачам Республиканского медицинского центра "Армения" МЗ РА за содействие, оказанное при проведении данной работы.

Система комплемента является важным эффекторным звеном иммунного ответа организма. У человека она состоит из более чем 20 растворимых белков и примерно такого же числа мембраносвязанных белков (рецепторов и регуляторов), находящихся как в крови, так и практически во всех остальных тканях организма и в активированном состоянии взаимодействующих друг с другом по каскадному механизму. Активация комплемента включает каскад реакций последовательного протеолитического расщепления его компонентов, многие из которых, являясь проферментами, приобретают активность только после отщепления от них соответствующих фрагментов. Активация системы комплемента приводит к генерации опсоинов, цитолитических белковых комплексов и медиаторов воспалительных реакций — инициаторов и регуляторов некроза, апоптоза и фагоцитоза, обеспечивая защиту организма как от чужеродных патогенов, так и от токсичных продуктов тканевого распада, генерируемых в самом организме. Есть 3 пути активации комплемента: классический, альтернативный и лектиновый, отличающиеся составом компонентов и пусковыми механизмами. Все 3 пути в итоге приводят к активации C3-конвертазы и дальнейшему формированию цитолитического мембраноатакующего комплекса (МАК), как это показано на рис. 1 [5, 9]. Нарушение функциональной активности системы комплемента наносит необратимый вред организму и вносит свой вклад в развитие многих патологических процессов [5, 9, 10, 18, 19].

Интерес к исследованию функциональной активности системы комплемента на поздних стадиях развития сахарного диабета 2-го типа (СД2) был обусловлен тем, что патологические повреждения сосудистой, нервной и других тканей организма, характерные для этого этапа развития заболевания [1], обуславливают развитие так называемого воспалительного иммунного ответа организма, одним из важнейших медиаторов которого является система комплемента [13].

Целью настоящей работы являлась оценка функциональной активности классического и альтернативного путей активации комплемента при СД2 на поздних стадиях развития заболевания. Для достижения данной цели в крови больных СД2 и здоровых лиц были определены общая гемолитическая активность классического пути активации комплемента, общая гемолитическая активность альтернативного пути активации комплемента и гемолитические активности C1-, C2-, C3- и C4-компонента комплемента.

Материалы и методы

В ходе экспериментов были исследованы образцы сывороток крови 54 больных СД2 (из них 35 женщин), находящихся на лечении в Республиканском медицинском центре "Армения" МЗ РА. Средний возраст больных составлял $56,20 \pm 12,34$ года ($M \pm \delta$), средняя продолжительность заболевания — $9,4 \pm 6,1$ года ($M \pm \delta$). 95% обследованных имели характерные для поздних стадий диабета ос-

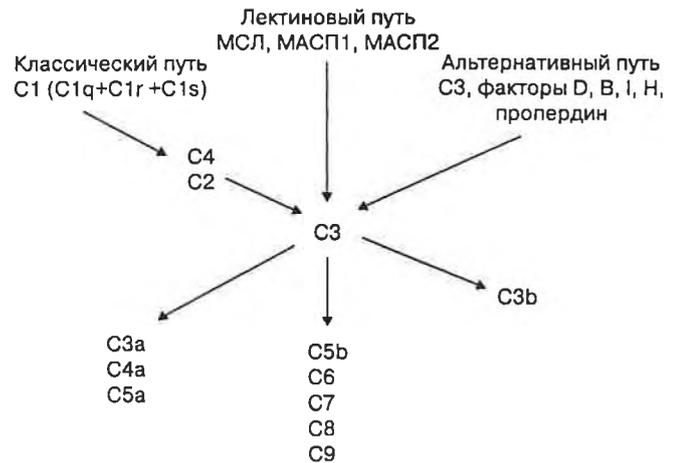


Рис. 1 Активация комплемента по классическому, альтернативному и лектиновому пути.

В результате запуска каскада протеолитических реакций генерируются: анафилотоксины (C5a, C3a), вызывающие высвобождение гистамина из базофилов и тучных клеток; хемотаксины (C3a, C4a, C5a), вызывающие миграцию иммунокомпетентных клеток к поврежденным тканям; опсоины (C3a, C4a, C5b), которые, связываясь с поверхностью дефектных или чужеродных клеток или с иммунными комплексами, облегчают и стимулируют фагоцитоз (активируя макрофаги); модуляторы иммунного ответа (C3a подавляет, а C5a усиливает продукцию антител). Кульминацией процесса активации комплемента является формирование МАК (C5b—C9). МАК участвует в процессах как некротической, так и апоптотической гибели дефектных или чужеродных клеток: его адсорбирование на мембране клетки приводит к лизису последней [5, 15]. C1q, C1r, C1s — субъединицы C1-компонента комплемента; МСЛ — маннансвязывающий лектин; МАСП1 — маннанактивируемая сериновая протеаза 1; МАСП2 — маннанактивируемая сериновая протеаза 2.

ложения (микро- и макроангиопатии, нейропатии). Диагностирование пациентов проводили врачи отделения эндокринологии. В качестве контроля использовали образцы сывороток крови 39 здоровых добровольцев (из них 20 женщин). Средний возраст здоровых лиц составлял $33,96 \pm 13,48$ года ($M \pm \delta$). Ни больные, ни здоровые лица не страдали заболеваниями аутоиммунной природы и не переносили каких-либо острых инфекционных или других серьезных заболеваний как минимум за 1 мес до начала исследований. Пациенты были информированы, что проведенные исследования будут иметь лишь научную значимость. Все они дали согласие на забор 5 мл венозной крови.

Забор крови проводили в 9:00 утра натошак пункцией из вены. Пробы сразу же помещали на лед, затем центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин и отбирали сыворотку, которую использовали в последующих экспериментах. Образцы сыворотки хранили при -30°C .

При определении общей гемолитической активности классического пути активации комплемента в качестве тест-объекта использовали бараньи эритроциты, сенсibilизированные полиспецифическими кроличьими антителами ("Sigma-Aldrich Co.", США) [20]. Инкубационная смесь содержала 200 мкл сыворотки, предварительно разбавленной в 30 раз 50 мМ барбиталовым буфером (рН 7,5), содержащим 25% глюкозы, 1% желатина, 0,15 мМ CaCl₂ и 0,5 мМ MgCl₂ (Б1) и 200 мкл сенсibilизированных бараньих эритроцитов. Смесь инкубировали при 37°C в течение 60 мин при постоянном встряхивании, далее центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин, после чего измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 414 нм (A₄₁₄) против отрицательного контроля

(спонтанный лизис), в котором сыворотка была помещена равным объемом Б1. Это позволяет вычесть из общего количества лизированных клеток долю, обусловленную их спонтанным лизисом. Общую гемолитическую активность рассчитывали, основываясь на значении A_{414} положительного контроля (100% лизис), и выражали в процентах лизированных клеток. Для получения положительного контроля 200 мкл сенсibilизированных бараньих эритроцитов инкубировали при 37°C в течение 60 мин при постоянном встряхивании и далее центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок ресуспендировали в 400 мкл воды и, пропуская суспензию через наконечник шпателя, вызывали механический лизис клеток. Бараньи эритроциты получали ранее описанным методом [14]. Конечное число эритроцитов в смеси после сенсibilизации составило $5 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл ($A_{541} = 0,35$). В зависимости от полученного значения A_{541} эритроцитную смесь либо разбавляли Б1, либо концентрировали посредством центрифугирования и последующего слива определенного количества надосадочной жидкости.

Определение общей гемолитической активности альтернативного пути активации комплемента проводили таким же образом, что и в случае классического пути, за исключением того, что в качестве тест-объекта вместо бараньих эритроцитов использовали кроличьи ($1 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл), сенсibilизацию эритроцитов не проводили, Б1 содержал 5 мМ ЭГТА и не содержал $CaCl_2$, а концентрация в нем $MgCl_2$ составляла 7 мМ. Еще одно различие заключалось в том, что разбавление исследуемых сывороток перед добавлением в инкубационную смесь составляло 1:6.

Определение гемолитических активностей С1-, С2-, С3- и С4-компонента комплемента проводили по ранее описанному методу [14] следующим образом: к 100 мкл сыворотки, разбавленной Б2 (в 100 раз для С1, в 8 раз для С2, в 1000 раз для С3 и в 4000 раз для С4), добавляли 100 мкл С1-, С2-, С3- или С4-дефицитной сыворотки, разбавленной Б2 соответственно в 20, 4, 15 и 20 раз и 200 мкл сенсibilизированных бараньих эритроцитов. В качестве положительного контроля использовали смесь, содержащую 100 мкл Б2, 100 мкл разбавленной С1-, С2-, С3- или С4-дефицитной сыворотки и 200 мкл сенсibilизированных бараньих эритроцитов. Далее все процедуры проводили так же, как и в случае определения общей гемолитической активности классического пути активации комплемента.

Дефицитные сыворотки были получены ранее описанным методом [14]. С1-, С3- и С4-дефицитные сыворотки хранили при -196°C до дальнейшего использования. Получение С2-дефицитной сыворотки проводили непосредственно перед опытом.

Оптические измерения проводили с помощью прибора SE-292 фирмы "Cesil Instruments Ltd." (Великобритания) в кюветах длиной оптического пути 1 см.

Обработку и анализ полученных результатов проводили с использованием программного пакета "Graphpad Prizm" ("GraphPad Software", США). Для

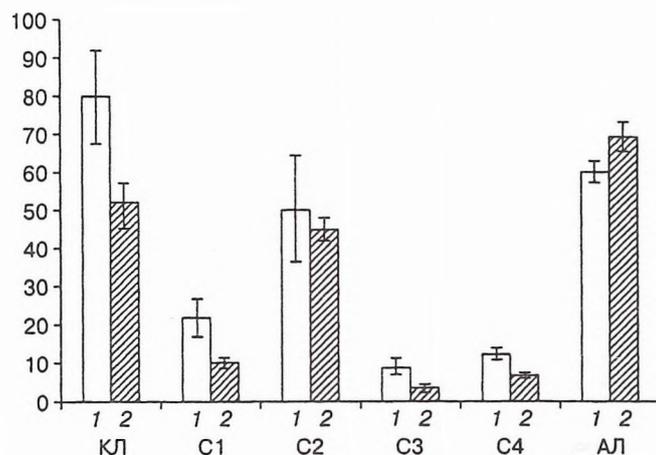


Рис. 2. Результаты среднестатистического анализа данных ($M \pm m$), полученных при определении общей гемолитической активности классического (КЛ) и альтернативного (АЛ) путей активации комплемента, а также гемолитической активности его С1-, С2-, С3- и С4-компонента.

По оси ординат — гемолитическая активность (в % лизированных клеток). 1 — больные СД2; 2 — контроль.

статистической обработки данных использовали *t*-критерий Стьюдента. Корреляционный анализ проводили по методу Пирсона.

Результаты и их обсуждение

Согласно полученным данным, у больных СД2 на поздних стадиях развития заболевания наблюдается статистически достоверное повышение как общей гемолитической активности классического пути активации комплемента (в 1,5 раза, $p < 0,01$; $t = 2,54$), так и гемолитических активностей отдельных компонентов комплемента — С1 и С3 в 2,2 раза (соответственно $t = 2,05$; $p < 0,046$; $t = 3,9$; $p < 0,0004$), а С4 в 1,8 раз ($t = 2,05$; $p < 0,046$), тогда как общая гемолитическая активность альтернативного пути и гемолитическая активность С2-компонента комплемента остаются в пределах нормальных значений ($p > 0,5$). Результаты статистической обработки полученных данных представлены на рис. 2.

Следует отметить, что ни один из отмеченных параметров не зависел от пола или возраста обследованных лиц, а также от длительности заболевания у больных СД2.

Корреляционный анализ показал статистически достоверную положительную корреляцию, с одной стороны, между уровнями общей гемолитической активности комплемента и гемолитической активности его С1-компонента ($r = 0,78$; $p = 0,008$), а с другой — между уровнями гемолитических активностей С1- и С4-компонента комплемента ($r = 0,85$; $p = 0,01$) у больных СД2.

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о повышении функциональной активности классического пути активации комплемента на поздних стадиях развития СД2, о чем свидетельствует повышение как общей гемолитической активности классического пути, так и гемолитических активностей С1-, С3- и С4-компонента комплемента по сравнению с нормой.

Следует отметить, что имеющиеся сегодня в литературе данные относительно функционального состояния классического пути активации комплемента в значительной степени противоречат друг другу [3, 4, 11, 21].

Результаты настоящей работы находятся в соответствии с экспериментальными данными, полученными McMillan в 1980 г. [12], свидетельствующими о повышении как общей гемолитической активности классического пути активации комплемента, так и гемолитических активностей его С3- и С4-компонента комплемента.

Данные о функциональной активности альтернативного пути активации комплемента при СД2 впервые представлены в настоящей работе. Согласно полученным данным, этот путь активации комплемента не вовлечен в патогенез поздних осложнений СД2.

Ранее иммуногистохимическими методами было показано наличие промежуточного и конечного продуктов активации комплемента (С3d и МАК соответственно) и на стенках эндоневральных микрососудов и микрососудов сетчатки у больных СД [8, 17], что свидетельствует о вовлечении гуморальных иммунных процессов, опосредованных активацией комплемента, в патогенез сосудистых осложнений сахарного диабета. В пользу этой гипотезы свидетельствует и тот факт, что аутоантитела к симпатическим и парасимпатическим нейронам приводят к апоптозу нейробластомных клеток путем активации комплемента [22]. Тестирование микрососудов сетчатки на наличие С-реактивного белка, маннансвязывающего лектина, С1q- и С4-компонента комплемента не выявило наличия последних, что позволило предположить возможную активацию комплемента альтернативным путем [8].

Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что альтернативный путь активации комплемента, по всей вероятности, не вносит своего вклада в процесс активации С3-конвертазы и последующей генерации С3d и МАК. Инициатором этого процесса при сахарном диабете скорее всего является образование антител к модифицированным белкам плазмы и сосудистой стенки с последую-

щим образованием иммунных комплексов (которые, как известно, при этой патологии повышены [2]), что и приводит к активации комплемента по классическому пути.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М. И. Эндокринология. — М., 1998. — С. 367—470.
2. Овсепян М. Р., Бояджян А. С., Геворкян А. А., Мамиконян А. А. // Иммунология. — 2004. — № 6. — С. 375—377.
3. Anil S., Remani P., Ankathil R. et al. // Ann. Dent. — 1990. — Vol. 49, N 2, 3. — P. 45.
4. Bergamaschini L., Gardinali M., Poli M. et al. // J Clin. Lab. Immunol. — 1991. — Vol. 35. — P. 121—127.
5. Cole D. S., Morgan B. P. // Clin. Sci. — 2003. — Vol. 104, N 5. — P. 455—466.
6. Danielle A. // Periodontal Abstracts. — 1996. — Vol. 44, N 3. — P. 69—77.
7. Davies C. S., Harris C. L., Morgan B. P. // Immunology. — 2005. — Vol. 114, N 2. — P. 280—286.
8. Gerl V. B., Bohl J., Pitz S. et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2002. — Vol. 43, N 4. — P. 1104—1108.
9. Hart M. L., Walsh M. C., Stahl G. L. // Mol. Immunol. — 2004. — Vol. 41, N 2, 3. — P. 165—171.
10. Holers V. M. // Clin. Immunol. — 2003. — Vol. 107, N 3. — P. 140—151.
11. Koistinen H., Vidal H., Karonen S. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2001. — Vol. 21, N 6. — P. 1034—1039.
12. McMillan D. // Diab. Metab. — 1980. — Vol. 14. — P. 415—421.
13. Morgan B. P., Daha M., Meri S., Nicholson-Weller A. // Trends in Immunol. Today. — 2000 — Vol. 21, N 12. — P. 603—605.
14. Morgan B. P. // Methods in Molecular Biology. Complement Methods and Protocols. / Ed. B. P. Morgan. — Totowa; New Jersey, 2000. — Vol. 150. — P. 61—71.
15. Nauta A. J., Roos A., Daha M. R. // Int. Arch. Allergy Immunol. — 2004. — Vol. 134, N 4. — P. 310—323.
16. Qin X., Goldfine A., Krumrei N. et al. // Diabetes. — 2004. — Vol. 53, N 10. — P. 2653—2661.
17. Rosoklija G. B., Dwork A. J., Younger D. S. et al. // Acta Neuropathol (Berl). — 2000. — Vol. 99, N 1. — P. 55—62.
18. Sakamoto M., Fujisawa Y., Nishioka K. // Nutrition. — 1998. — Vol. 14, N 4. — P. 391—398.
19. Shen Y., Halperin J. A., Benzaquen L., Lee C. M. // Brain Res. Protocols. — 1997. — Vol. 1, N 2. — P. 186—194.
20. Watford W. T., Ghio A. J., Wright J. R. // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. — 2000. — Vol. 279, N 5. — P. 790—798.
21. Weyer C., Tataranni P. A., Pratley R. E. // Diabetes Care. — 2000. — Vol. 23, N 6. — P. 779—785.
22. Zhang J., Gerhardinger C., Lorenzi M. // Diabetes. — 2002. — Vol. 51, N 12. — P. 3499—3504.

Поступила 13.03.06