

EXTRACELLULAR ADHESION MOLECULES ICAM - 1 (CD 54) and ICAM - 3 (CD 50) in PATIENTS WITH PROLIFERATIVE DIABETIC RETINOPATHIA

Kochemasova T.V., Shestakova M.V., Milenkaya T.M., Smirnova N.B., Gorelysheva V.A., Polosukhina E.R., Baryshnikov A.Y., Dedov I.I.
Endocrinology Research Center RAMS,
Russian N.N. Blokhin memorial cancer research center RAMS

ABSTRACT

Our study is devoted to investigation of expression of extracellular adhesion molecules ICAM-1 (CD54) and ICAM-3 (CD50) in patients with proliferative diabetic retinopathy. It was shown that patients with proliferative stage of retinopathy and essential neovascularisation have the statistically convincing increase of percent of CD54-positive lymphocytes and granulocytes of peripheral blood in comparison with healthy donors. This percent was $25,1 \pm 4,8\%$ and $52,5 \pm 1,6\%$ vs $12,4 \pm 3,0$ and $8,3 \pm 3,0$, respectively. At the same time in the stage of stabilization of the process in the eye-ground the percent of CD54-positive lymphocytes and granulocytes in patients does not differ from the latter in healthy donors. So the expression of ICAM-1 (CD54) could be represent like implicit index of activity of the process, inter alia in the eye-ground. The study of expression of ICAM-3 (CD50) did not give statistically convincing difference between patients and the control group.

Межклеточные молекулы адгезии ICAM - 1 (CD 54) и ICAM - 3 (CD 50) у пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией

Т.В.Кочемасова,¹ М.В.Шестакова,¹ Т.М.Миленькая,¹ Н.Б.Смирнова,¹
В.А.Горельшева,¹ Е.Р.Полосухина,² А.Ю.Барышников,² И.И.Дедов.¹
(Эндокринологический научный центр РАМН¹, Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН²)

РЕЗЮМЕ

Данная работа посвящена исследованию экспрессии межклеточных молекул адгезии ICAM-1 (CD54) и ICAM-3 (CD50) у пациентов с диабетической пролиферативной ретинопатией. Установлено, что у больных с пролиферативной стадией ретинопатии и выраженной неоваскуляризацией статистически достоверно возрастает процент CD54-позитивных Т-лимфоцитов и гранулоцитов периферической крови по сравнению со здоровыми донорами и составляет $25,1 \pm 4,8\%$ и $52,5 \pm 1,6\%$ vs $12,4 \pm 3,0$ и $8,3 \pm 3,0$. В то же время на стадии стабилизации процесса на глазном дне процент CD54-позитив-

ных лимфоцитов и гранулоцитов не отличается от такового у здоровых доноров. Таким образом, экспрессию ICAM-1 (CD54) можно рассматривать как косвенный показатель активности процесса, в частности, на глазном дне.

Введение

Диабетическая ретинопатия (ДР) является одним из самых тяжёлых микрососудистых осложнений сахарного диабета (СД) и одной из основных причин слепоты и слабовидения среди работоспособного населения промышленно развитых стран Европы и Амери-

ки [1,10,16,18,19].

Данные эпидемиологических исследований указывают на то, что какая-либо стадия ретинопатии спустя двадцать лет после начала заболевания при СД 1 типа отмечается почти всегда, а при СД 2 типа - более, чем в 60 % случаев [16]. Ewing et al указывают, что результирующий процент частоты развития ретинопатии у больных обоими типами СД равен 75 %. [23]

Многообразие диагностических подходов и сосуществование нескольких классификационных схем, разработанных в разное время и используемых в нашей стране и за рубежом, диктует целесообразность следования единому стандарту для характеристики стадийности процесса [Дедов И.И., Шестакова М.В., Максимова М.А., 2002].

В соответствии с принятой большинством клиницистов в настоящее время классификацией E.Kohner и M.Porta (1989) в течении ретинопатии выделяют три стадии - непролиферативную, препролиферативную, пролиферативную [1,10,18,19,25].

Изучается механизм межклеточных взаимодействий, нарушение которого может приводить к « повреждению » привычных клеточных коопераций, необходимых для нормального функционирования органов и тканей [6,7,11,13,15,17]. Полагают, что указанные межклеточные взаимодействия регулируются системой цитокинов, в частности, интерлейкином - 1 (ИЛ-1) и фактором некроза опухолей (TNF- б [6,15,17]. Именно они воздействуют на особые белковые структуры - молекулы адгезии и способствуют их усиленной экспрессии на поверхности различных клеток(20,22,24,26).

Ведётся активная работа по выяснению патогенетической роли эндотелия и форменных элементов крови в развитии и прогрессировании ДР [1,22,24,27]. Рядом исследователей молекулам адгезии отводится роль косвенных показателей активационно - адгезионной способности клеток [1,2,21,28]. Реакции с участием молекул адгезии и их контррецепторов между эндотелиальными клетками и форменными элементами крови (лимфоцитами, гранулоцитами, моноцитами, тромбоцитами и др) внутри сосудов мелкого и крупного калибра в условиях неблагоприятных метаболических, гемодинамических и реологических сдвигов при СД могут способствовать возникновению зон микро и макротромбоза [1,3,21,29]. Как в ходе экспериментальных, так и клинических исследований обнаружено вышеупомянутое повышение уровня молекул адгезии на разных стадиях ДР - непролиферативной, препролиферативной, пролиферативной[23,24,25,28,29]. Последняя выражается, главным образом, в появлении новообразованных сосудов на глазном дне, образовании зон фиброза и глиоза. Новообразование сосудов сетчатки происходит в ответ на ее ишемию. Физиологический и патологический ангиогенез - высококоординируемый и многостадийный процесс [1,17,23,]. Новообразованные сосуды - структурно и функционально неполноценные и хрупкие - могут стать причиной обширных кровоизлияний сетчатки. В стимуляции пролиферации клеток принимают участие белки базальной мембраны (ламинин и факторы роста), фибронек-

тин и ангиогенные факторы (металлопротеиназы, гиалуронатные олигосахариды) способствуют взаимодействию клеток с внеклеточным матриксом. Молекулы адгезии клеток, в частности, представители семейств иммуноглобулинов и селектинов, по мнению ряда исследователей, обладают проангиогенными свойствами. В связи с этим адгезины могут являться показателями активности процесса, в частности, на глазном дне (1,6).

Целью нашего исследования являлось определение экспрессии межклеточных молекул адгезии - 1 и 3 (ICAM - 1 и 3 (CD 54 и CD 50), от англ. Intercellular Adhesion Molecule) лейкоцитами у больных на пролиферативной стадии ДР.

Материалы и методы в исследование включены 23 пациента с СД 1 типа (6 мужчин и 17 женщин) и 17 лиц контрольной группы (7 мужчин и 10 женщин). Медиана возраста в обеих группах составила 26, 5 0,6 лет.

Группа (n = 23) с длительным течением СД 1 типа (медиана длительности заболевания 26,1 1,2 лет) и пролиферативной стадией ретинопатии (ДР 3) была разделена на две подгруппы - с наличием обширных очагов неоваскуляризации (n = 17) и стабилизированным процессом на глазном дне (n = 6) .

Из исследования исключались лица с наличием других аутоиммунных заболеваний, воспалительных очагов любой локализации, болезней печени, злокачественных новообразований, заболеваний системы крови.

Офтальмологическое обследование проводили с помощью методов прямой и непрямой офтальмоскопии с фотографированием глазного дна на камере FF5 Zeiss.

Диагноз и стадию ДР устанавливали согласно классификации E. Kohner и M. Porta , 1992

Лабораторное обследование включало биохимические исследования крови с определением уровня гликированного гемоглобина (HbA1c), общего холестерина (ОХ) и триглицеридов (ТГ) .

Определение экспрессии CD 54 (ICAM - 1) и CD 50 (ICAM - 3) на поверхности лейкоцитов (лимфоцитов и гранулоцитов) проводили при помощи моноклональных антител (МКА) против соответствующих антигенов, результаты учитывали методом проточной цитофлюориметрии на проточном цитометре FACS cap (Beckton Dickinson). К 100 мл периферической крови добавляли 20 мкл МКА и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре , после чего клетки отмывали центрифугированием в PBS в течение 7 минут при 1500 об \ мин. Затем к клеткам добавляли по 20 мкл меченой антисыворотки барана против иммуноглобулинов мыши линии BALB \ С (производство НПЦ «МедБиоСпектр») и инкубировали 30 мин при 4 С. Для удаления эритроцитов к клеткам добавляли 2 мл лизирующего раствора (Vecton Dickinson) и тщательно перемешивали на вортексе. Инкубировали при комнатной температуре, в защищённом от света месте в течение 10 мин. Центрифугировали 7 мин при 1500 об \ мин. После проведения процедуры лизиса клетки отмывали дважды в PBS, после чего ресуспендировали в PBS, содержащим 1 % формалина и 0,1 % азида натрия. Экс-

прессию антигенов на лимфоцитах и гранулоцитах учитывали на цитофлюориметре FACScan (Beckton Dickinson). Гейт (окно) популяции клеток устанавливали на основе комбинации светорассеяния и размера клеток. При учёте реакции подсчитывали 5 000 событий. Каждый маркер считали диагностически значимым, если он выявлялся не менее, чем на 10% исследуемых клеток.

Антитела любезно предоставлены профессором А.Ю.Барышниковым.

Статистическая обработка материала проведена в отделе компьютеризации Гематологического Научного Центра РАМН (Директор - академик РАН АИ Воробьев) совместно с Б.В.Зингерманом с использованием программ Excell и Statistica. Оценка достоверности различий средних величин для независимых переменных осуществлялась по критерию Стьюдента (t).

Результаты и их обсуждение

Как известно, темп развития осложнений у больных СД может быть обусловлен комплексом взаимосвязанных и взаимообусловленных причин [1,4,5,8,9,12,18]. К ним относят характер дебюта заболевания, качество метаболического контроля, эффективность и адекватность проводимого лечения. Многочисленные исследования последних лет посвящены патогенетической роли генетических, гемореологических, метаболических, иммунологических факторов в развитии ДР [1,14,16].

У всех обследованных пациентов данной группы начало заболевания было острым и последующее течение диабета у них характеризовалось длительными периодами гипергликемии или нестабильностью уровня сахара крови.

При осмотре пациентов методами прямой и непрямой

Таблица 1

КЛИНИКО - ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ

	Контрольная группа	Пациенты с пролиферативной диабетической ретинопатией	Пациенты с пролиферативной диабетической ретинопатией и контролем
Возраст, лет	55 ± 5	55 ± 5	55 ± 5
Средняя продолжительность заболевания, лет	15 ± 3	15 ± 3	15 ± 3
Средняя продолжительность заболевания от дебюта, лет	15 ± 3	15 ± 3	15 ± 3
Средняя продолжительность заболевания от дебюта, лет	15 ± 3	15 ± 3	15 ± 3
Средняя продолжительность заболевания от дебюта, лет	15 ± 3	15 ± 3	15 ± 3
Средняя продолжительность заболевания от дебюта, лет	15 ± 3	15 ± 3	15 ± 3
Средняя продолжительность заболевания от дебюта, лет	15 ± 3	15 ± 3	15 ± 3
Средняя продолжительность заболевания от дебюта, лет	15 ± 3	15 ± 3	15 ± 3
Средняя продолжительность заболевания от дебюта, лет	15 ± 3	15 ± 3	15 ± 3
Средняя продолжительность заболевания от дебюта, лет	15 ± 3	15 ± 3	15 ± 3
Средняя продолжительность заболевания от дебюта, лет	15 ± 3	15 ± 3	15 ± 3

Примечание * достоверно отличается от контрольной группы ($p < 0,05$)

** достоверно отличается и от контрольной группы, и от подгруппы с ДР 3 и стабилизацией процесса ($p < 0,05$)

мой офтальмоскопии был выявлен выраженный рост новообразованных сосудов в области диска зрительного нерва и плоскости сетчатки. При этом у 7 больных процесс неоваскуляризации развился в достаточно короткие сроки (от нескольких дней до недель), что подтверждалось сопоставлением серии осмотров, проведенных при обращении пациентов к офтальмологу - эндокринологу. Анамнестически периодам столь выраженного прогрессирования процесса на глазном дне чаще всего предшествовали эпизоды гипогликемии (нередко ятрогенного характера), нервная или физическая нагрузка. Практически все больные этой подгруппы не соблюдали правил самоконтроля основного заболевания. Следует отметить, что на момент данного обследования этим пациентам ещё не проводилось лазерной коагуляции сетчатки. В этой же группе обследуемых отдельно были выделены пациенты со стабилизированным процессом на глазном дне (наличием редукции новообразованных сосудов, зон фиброза и глиоза).

Примечательно, что практически у всех больных (85 %) уже имелись признаки диабетической нефропатии, а также полинейропатии. Все пациенты с ДР 3 имели в анамнезе или находились на плановой терапии ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента.

Не было установлено достоверных различий между подгруппами с наличием неоваскуляризации и стабилизированным процессом на глазном дне по полу, возрасту и длительности СД 1 типа от момента постановки диагноза СД 1 типа ($p > 0,05$). Указанные подгруппы были также сопоставимы между собой по уровням HbA1c, общего холестерина и триглицеридов, которые у пациентов с ДР 3 были очень высокими.

Данные, полученные в результате проведения иммунологического обследования больных и статистические достоверности различий, представлены в таблице.

Пролиферативная стадия ДР с выраженной неоваскуляризацией характеризуется возрастанием значений CD 54 позитивных лимфоцитов до 25,13 4,8 % и резким ростом таковых гранулоцитов - 52,5 1,62 %. В то же время, на стадии стабилизации процесса на глазном дне отмечается снижение экспрессии CD 54 на лимфоцитах до уровня 11,5 3,0 % и гранулоцитов до 5,28 1,62 %. Мы не выявили разницы между уровнем CD 50 у пациентов с СД 1 типа и здоровых лиц ($p > 0,05$).

Суммируя полученные данные, можно сделать предположение, что у больных СД 1 типа и ДР 3, сопоставимых по полу, возрасту, степени компенсации и длительности заболевания, но разной степенью активности процесса на глазном дне, активационно-адгезивная способность лимфоцитов и гранулоцитов, оцениваемая по уровню ICAM-1 (CD 54), неоднородна: высокая при наличии неоваскуляризации и низкая на стадии стабилизации процесса. Таким образом, ICAM-1 (CD 54) можно рассмотреть как косвенный показатель активности процесса, в частности, на глазном дне.

Нам не удалось установить корреляции между степенью экспрессии CD 54 и CD 50 на лимфоцитах и гранулоцитах и такими показателями как пол, возраст,

длительность СД, а также уровнями гликированного гемоглобина, общего холестерина и триглицеридов.

На сегодняшний день очень важным аспектом остаётся не до конца выясненный вопрос о природе описанных иммунологических показателей - молекул адгезии и их связи с метаболическим контролем [21,22,24,26,27]. Рядом исследователей высказывается предположение о том, что гипергликемия per se способна вызывать повышенную выработку цитокинов (TNF- β и IL-1), которые усиливают экспрессию молекул адгезии на поверхности различных клеток [6,17,24,26]. Как в нашем, так и в других исследованиях не выявлено корреляции между содержанием адгезинов и уровнем HbA1c, что не позволяет дать однозначный ответ на вопрос о влиянии гипергликемии на эти иммунологические показатели. Кроме этого, описанные выше различные стадии ретинопатии имеются у больных, отличающихся по количеству CD 54 позитивных лейкоцитов, но с одинаковым качеством метаболического контроля не подтверждает роли гипергликемии, как фактора, однозначно регулирующего изучаемые процессы.

Очень важное значение придается выяснению корреляционных зависимостей адгезивных молекул с рядом гемореологических показателей [28]. Проводятся исследования, посвященные изучению взаимосвязи представителей различных семейств адгезинов с фибриногеном, фактором фон Виллебранда, тромбомодулином [6,17,29]. Мы также планируем проведение дальнейших клиничко-экспериментальных трайлов по изучению обозначенных механизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балаболкин М.И. \ Сахарный диабет, Москва, Медицина, 2000
2. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М. \ Проблемы эндокринологии, № 6, т.46, стр 29 - 34, 2000
3. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. \ Сахарный диабет, № 1 (2), стр 2 - 8, 1999
4. Бахритдинова Ф.А. \ Вестник офтальмолога, т 112, № 2 \ 2, 1996
5. Беляева М.И., Шестаков В.А \ Методические рекомендации, Москва, 1981
6. Боценовский В.А., Барышников А.Ю. \ Успехи современной биологии, том 114, вып 6, стр 741 - 753, 1994
7. Васильев С.А. \ Автореферат Д.м.н., Москва, 1999
8. Ветров Ю.Д. \ VII Съезд офтальмологов России, Москва, Тезисы докладов, стр 422, 2000
9. Герасимов А.А. \ Автореферат....к.м.н., Москва, 1991
10. Дедов И.И., Фадеев В.В. \ Руководство для врачей, Москва, 1998
11. Жабоедов Г.Д., Сидорова М.В., Скрипник Р.Л. \ VII съезд офтальмологов России, Тезисы докладов, часть I, стр 436, 2000
12. Зайцева Н.С., Дудникова Л.К., Слепова О.С., Шевченко Т.Ф. \ Вестник офтальмолога, том 113, № 1, 1997

13. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Рубакова Э.И. \ Systema цитокинов, Москва, 1999
 14. Миленькая Т.М, Бессмертная Е.Г \ Врач, №1, стр 8 - 11, 2000
 15. Насонов Е.Л. \ Русский медицинский журнал, том 8, № 17 (118) , стр 718 - 722, 2000
 16. Нестеров А.П.\ Проблемы эндокринологии, № 3, том 43, стр 16 - 19, 1997
 17. Пальцев М.А., Иванов А.А. \ Межклеточные взаимодействия \ Москва, Медицина, 1995
 18. Смирнова Н.Б. \ Автореферат ... к.м.н., Москва, 1998
 19. Смирнова О.М. \ Диабетогрaфия , № 12, стр 15 - 19, 1998
 20. Abraham C, Griffith J, Miller J \ Journal of Immunology, vol 162, № 8, pp 4399 - 4406, 1999
 21. Ceriello A \ Diabetes, Nutrition & Metabolism, Clinical and Experimental \ vol 12, № 1, pp 42 - 47, 1999
 22. Cominacini L, Garbin U, Fratta Passini A, La Cascio V \ Diabetologia, Vol 39, № 10, pp 1242, 1996
 23. D , Amore P \ Investigative Ophthalmology and Visual Science \ vol 35, № 12, pp 3974 - 3979, 1994
 24. Fasching P, Veitl M, Rohac M, Strelі C, Schneider B, Waldhausl W \ Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism , № 81 (12) , pp 4313 - 4317, 1996
 25. Kohner EM \ British Medical Journal, 307, pp 1195 - 9, 1993
 26. Limb G A, Webster L, Soomro H, Janikoun S, Shilling J \ Clinical Experimental Immunology, 118 (2) , pp 213
-