

## E-SELECTIN (CD 62) IN PATIENTS WITH DIABETIC MICROANGIOPATHY - THE INDICATION OF ENDOTHELIUM ACTIVATION?

*T.V. Kochemasova<sup>1</sup>, M.V. Shestakova<sup>1</sup>, V.A. Gorelysheva<sup>1</sup>,  
T.V. Osipova<sup>2</sup>, A.Y. Baryshnikov<sup>2</sup>, I.I. Dedov<sup>1</sup>*  
<sup>1</sup>Endocrinology Research Center RAMS  
<sup>2</sup> N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS

### ABSTRACT

The aim of our work was to study the clinical significance of the soluble E-selectin (CD 62) (to examine the E-selectin level) in the serum of patients with Type 1 Diabetes on various stages of the disease in absence and presence of microangiopathy (diabetic retinopathy and nephropathy). Therefore 30 patients with newly diagnosed and long-standing Diabetes Type 1 with presence and absence of microangiopathy (diabetic retinopathy and nephropathy) were under supervision. Routine laboratory, ophthalmologic, special immunological with soluble E-selectin examination, tests were performed.

The data achieved show the increased E-selectin level in all subgroups of patients vs controls. In newly diagnosed DM Type 1 the high s E-selectin level is observed. In long-standing DM Type 1 and absence of microangiopathy the s E-selectin level is also increased. The expressive endothelium activation is mentioned on the late complications. In patients with neovascularisation and proteinuria the s E-selectin level is two times higher than that in other subgroups. We failed to find any correlations of s E-selectin with sex, DM duration, cholesterol and triglycerides. The data achieved reflect the ongoing endothelium activation at the early disease stages. We failed to confirm the poor prognostic significance of s E-selectin because the material amount and supervision time were limited. We hope to confirm this suggestion later.

The soluble E-selectin is elevated at the early stages of Diabetes Type 1 in the absence of microangiopathy. While progressing, the serum levels of this marker increase, reflecting the chronicle endothelium injury and activation, especially in the group with proteinuria & proliferative diabetic retinopathy. Further investigation of this mechanism, its correlation with metabolic control and confirmation of the poor prognostic significance is necessary.

## Е-СЕЛЕКТИН (CD 62) У БОЛЬНЫХ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ МИКРОАНГИОПАТИЕЙ - ПОКАЗАТЕЛЬ АКТИВАЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ?

*Т.В. Кочемасова<sup>1</sup>, М.В. Шестакова<sup>1</sup>, В.А. Горельшиева<sup>1</sup>,  
Т.В. Осипова<sup>2</sup>, А.Ю. Барышников<sup>2</sup>, И.И. Дедов<sup>1</sup>*  
Эндокринологический научный центр РАМН<sup>1</sup>  
Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН<sup>2</sup>

### РЕЗЮМЕ

Целью нашего исследования было определить уровень растворимой формы Е-селектина у больных сахарным диабетом 1 типа на разных сроках заболевания при отсутствии и наличии микрососудистых осложнений (диабетической ретино и нефропатии). Для этого были обследованы 30 пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 1 типа и отсутствием микрососудистых осложнений и длительным течением заболевания с наличием и отсутствием микроангиопатий. Проведены общеклиническое лабораторное, офтальмологическое, а также специальное иммунологическое с определением уровня растворимой формы Е-селектина обследования.

При обследовании выявлено достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение уровня растворимой формы Е-селектина во всех подгруппах больных по сравнению с донорами. При впервые выявленном СД 1 типа уже отмечается возрастание содержания этой адгезивной молекулы. В то же время при длительном течении СД 1 типа и отсутствии осложнений концентрация Е-селектина остается высокой, хотя и не более значений, характерных для впервые выявленного СД 1 типа. При наличии тяжелых сосудистых осложнений (пролиферации на глазном дне, выраженной диабетической нефропатии) уровень адгезина начинает превышать нормальное значение почти в два раза. Не удалось установить корреляции Е-селектина с такими показателями как пол, возраст, длительность

диабета, уровнями общего холестерина и триглицеридов.

Полученные результаты свидетельствуют о начале процесса активации эндотелия уже на самых ранних сроках заболевания. Выраженная активация эндотелиальных клеток нарастает параллельно развитию осложнений. Небольшой объём материала и недлительный срок наблюдения пока не позволяют однозначно ответить на вопрос о прогностическом значении E-селектина. Возможно, при накоплении достаточного количества наблюдений удастся подтвердить высказанное предположение.

**Введение.** Диабетические микроангиопатии (ретинопатия, нефропатия) являются одними из наиболее тяжелых и прогностически значимых осложнений сахарного диабета (СД) [1, 2, 7, 14].

Несмотря на определённые успехи, достигнутые в последние годы в изучении клиники и механизмов развития отдельных проявлений микроангиопатии, тема изучения особенностей их патогенеза является актуальной [3, 4, 8, 24, 25]. К настоящему времени накоплены сведения, полученные в ходе экспериментальных и клинических исследований, которые освещают нарушения в системе межклеточных взаимодействий и факторов, которые их обеспечивают: цитокинов, внеклеточного матрикса, растворимых медиаторов, онкогенов, адгезивных молекул [5, 6, 9, 13, 16, 23].

До последнего времени в большинстве исследований изучение адгезивных молекул у больных СД проводилось изолированно. Внимание к ним продиктовано тем, что при помощи этих, сравнительно мало известных, но биологически важных, параметров можно оценивать активационную и/или адгезионную способность клеток (лейкоцитов, тромбоцитов, эндотелиальных клеток и др.) на разных этапах сахарного диабета и его осложнений [12, 17, 20, 21]. Если ранее подобные исследования проводились в общем контексте последних, то теперь признано целесообразным оценивать роль отдельных адгезинов применительно к микро- и макроангиопатиям [18, 19, 22].

При условиях неблагоприятных для организма метаболических, гемодинамических и реологических сдвигов подобные реакции внутри сосудов мелкого калибра приводят к тому, что адгезивные молекулы, экспрессируемые одними клетками, связываются со своими контррецепторами, находящимися на других клетках, что вызывает их присоединение друг к другу [10, 20, 21]. Это способствует локальному накоплению клеток, развитию стаза и тромбоза в сосудах, что может приводить к возникновению зон окклюзии, ускоряя развитие микроангиопатий [21, 23]. В связи с этим представляет интерес продолжение поиска маркёров, которые могут отражать активность описываемых процессов, причём на самых ранних сроках заболевания. К одним из таких индикаторов относят ICAM-1, VCAM-1, E-селектин - молекулы адгезии, относящиеся к различному семейству [10].

E-селектин или ELAM-1 (от англ. Endothelial leucocyte adhesion molecule) CD 62 - гликопротеид с молекулярной массой 95-115 kDa - адгезивная молекула, выявляемая на эндотелиальных клетках, которая характерна только для активированного эндотелия. После стимуляции цитокинами (интерлейкинами - 1, -2 и фактором некроза опухолей) эндотелиальные клетки синтезируют и экспрессируют E-селектин. Анти-

E-селективные антитела частично ингибируют адгезию нейтрофилов к цитокинактивированному эндотелию. Контррецепторы к E-селектину пока не охарактеризованы на молекулярном уровне [10].

Сделано предположение о том, что повышение растворимых форм E-селектина в сыворотке или плазме крови свидетельствует об активации эндотелия сосудов и создаёт предпосылки для развития последующей цепи рецепторных взаимодействий, реализующейся в адгезии форменных элементов (лейкоцитов и тромбоцитов) с развитием стаза крови (маргинации или краевого стояния) и повреждения окружающих тканей, возникающего в результате миграции клеток сквозь сосудистую стенку и выделения ими токсических субстанций (протеаз, свободных радикалов кислорода, метаболитов арахидоновой кислоты и др.). В ряде исследований показана проангиогенная способность этой молекулы [10].

Целью настоящего исследования являлось определение уровня растворимой формы E-селектина у больных сахарным диабетом 1 типа на разных сроках заболевания при отсутствии и наличии микрососудистых осложнений (диабетической ретино- и нефропатии).

**Материалы и методы.** В исследование включены 30 пациентов с сахарным диабетом 1 типа (17 женщин и 13 мужчин) и 10 лиц контрольной группы (6 женщин и 4 мужчины). Медиана возраста в обеих группах составила 26,4 года. Все больные СД 1 типа были разделены на три подгруппы:

подгруппа (n = 10) с впервые выявленным СД 1 типа (длительность заболевания не более 12 месяцев) и отсутствием микрососудистых осложнений;

подгруппа (n = 10) с длительным течением СД 1 типа и отсутствием микрососудистых осложнений (длительностью заболевания от момента постановки диагноза, равной  $17,8 \pm 1,2$  лет);

подгруппа (n = 10) с длительным течением СД 1 типа и выраженными сосудистыми осложнениями (пролиферативной стадией ретинопатии и протеинурической стадией нефропатии) (длительностью заболевания от момента постановки диагноза, равной  $13,5 \pm 1,7$  лет).

Характеристика данных представлена в таблице 1.

Из исследований 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 стандартной фундус-камере FF5 «Zeiss».

Лабораторное обследование включало биохими-

Таблица 1  
Характеристика групп обследуемых (M ± m)

| Показатели                                   | Контрольная группа (n = 10) | Впервые выявл СД 1 типа, J (n = 10) |
|--|-----------------------------|-------------------------------------|
| Пол, м/ж                                     | 4 / 6                       | 6 / 4                               |
| Возраст, годы                                | 26,9 ± 0,9                  | 24,8 ± 1,6                          |
| Длительность от момента диагностики СД, годы | –                           | <12 мес.                            |
| Hb A1c, %                                    | < 6,2                       | 9,2 ± 0,5                           |
| Общий холестерин сыворотки, ммоль/л          | 4,0 ± 0,27                  | 5,45 ± 0,82                         |
| Триглицериды сыворотки крови, ммоль/л        | 0,99 ± 0,08                 | 0,86 ± 0,07                         |

ческие анализы крови (с определением уровня гликированного гемоглобина (Hb A1c) методом аффинной хроматографии наборами «ФОСФОСОРБ» (РФ), общего холестерина (ОХ) и триглицеридов (ТГ) на аппарате «Spectrum» ССХ («Abbott», США); определение суточной альбуминурии нефелометрическим методом (биохимический анализатор «Копе», Финляндия) и определение протеинурии.

Уровень растворимой формы Е-селектина в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом (реактив фирмы «R & D», Великобритания).

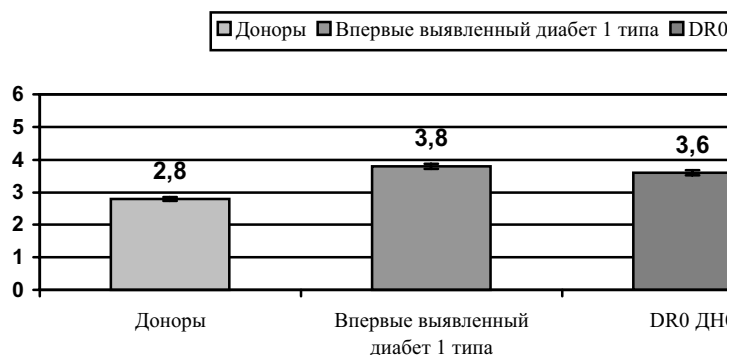
Статистическая обработка материала проведена в ГНЦ РАМН с использованием программы Excel. Оценка достоверности различий средних величин для независимых переменных осуществлялась по критерию Стьюдента (t). Статистическая обработка материала проведена совместно с Б.В.Зингерманом.

**Результаты и обсуждение.** При сравнении трёх подгрупп пациентов и лиц контрольной группы не было выявлено достоверных различий между такими показателями как пол и возраст (p > 0,05). Уровни гликированного гемоглобина, общего холестерина и триглицеридов не отличались у больных в выделенных подгруппах (p > 0,05).

Отличия касались длительности СД от момента постановки диагноза, изменений, обнаруженных на глазном дне и в почках. Достоверные различия выявлены между уровнями растворимых форм Е-селектина в обозначенных подгруппах и контрольной группе (диаграмма 1).

У 10 пациентов с впервые выявленным СД 1 типа отсутствовали офтальмоскопические признаки диабетической ретинопатии. Нормоальбуминурия свидетельствовала об отсутствии диабетической нефропатии. В

Диаграмма 1  
Уровень Е-селектина у пациентов с диабетической ретинопатией (микроангиопатией)



T-test (p)

|                                  | Доноры    | Впервые выявленный диабет 1 типа |
|----------------------------------|-----------|----------------------------------|
| Впервые выявленный диабет 1 типа | 0.0019542 |                                  |
| ДН0 – ДР0                        | 0.0369505 | 0.6454158                        |
| ДН3 – ДР3                        | 0.0000555 | 0.0030370                        |

подгруппах с длительным течением СД у 10 больных не отмечено клинических проявлений микроангиопатий, у 10 было зафиксировано наличие пролиферативной стадии ретинопатии (с участками новообразованных сосудов) и протеинурическая стадия нефропатии (устанавливаемой на основании макроальбуминурии > 300 мг/сут). Все пациенты были сопоставимы по полу, возрасту, степени компенсации СД.

Выявлено достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение уровня растворимой формы Е-селектина во всех подгруппах больных по сравнению с донорами. Представляет интерес тот факт, что при впервые выявленном СД 1 типа уже отмечается возрастание содержания этой адгезивной молекулы ( $3,76 \pm 0,19$  нг/мл), что в 1,5 раза превышает таковую у здоровых лиц ( $2,83 \pm 0,17$  нг/мл). Данный факт может свидетельствовать о начале процесса активации эндотелиальных клеток до появления первых клинических признаков микроангиопатии. Некоторое снижение уровня CD 62 в сыворотке крови констатируется у больных с отсутствием микрососудистых осложнений ( $3,60 \pm 0,29$  нг/мл) по сравнению с подгруппой с впервые выявленным СД 1 типа ( $3,76 \pm 0,19$  нг/мл). Выраженное повышение показателя отмечается у пациентов при наличии тяжёлых сосудистых осложнений (пролиферации на глазном дне, выраженной диабетической нефропатии), составляя  $5,29 \pm 0,38$  нг/мл. По всей видимости, степень активности эндотелиальных клеток и в самом деле неравнозначна.

Нам не удалось установить корреляции Е-селектина с такими показателями, как пол, возраст, длительность диабета, уровнями общего холестерина и триглицеридов.

Не вполне ясен на сегодняшний день механизм активации эндотелиальных клеток. Наиболее вероятной представляется следующая цепочка событий: гипергликемия → повреждение эндотелия → выработка цитокинов стимулирующего действия (интерлейкина-1 и фактора некроза опухолей -  $\alpha$ ) → повышение экспрессии молекул адгезии (в частности, Е-селектина) [21]. Понятно, что в условиях неблагоприятных метаболических, гемореологических, гемодинамических сдвигов указанные процессы интенсивно нарастают, способствуя локальному присоединению клеток к стенкам сосудов. Таким образом, создаются условия для развития ишемии с последующей выработкой факторов роста, обладающих проангиогенной активностью. Вероятно, этими причинами можно объяснить высокий уровень CD62 у на стадии ДР3 и протеинурии ( $5,29 \pm 0,38$  нг/мл). Подобная точка зрения разделяется Olson J.A. (1997) [23].

Однако, чем можно объяснить отсутствие корреляции уровня Е-селектина с показателями метаболического контроля, в частности, уровнем гликозилированного гемоглобина? Кроме того, как уже было отмечено, подгруппы с отсутствием и выраженными признаками ДР были сопоставимы по полу, возрасту, показателям метаболического контроля. Учитывая соблюде-

ние жёстких критериев отбора больных и высокую чувствительность реактивов фирмы «R&D», вероятно, следует расширить сферу выяснения возможных причин, которые способны влиять на процессы активации эндотелия.

Опираясь на данные зарубежных источников [20, 23], мы также имеем основание для того, чтобы сделать предположение о неблагоприятном прогностическом значении Е-селектина в плане развития микроангиопатии.

Безусловно, необходимо проведение комплексного обследования пациентов с определением уровня других молекул адгезии в сыворотке крови, поиском параллелей, например, с той же межклеточной (CD 54, ICAM-1), сосудистой молекулами (CD 106, VCAM-1), факторами свёртывающей системы крови (фактором фон Виллебранда и др.), уже изученными на сегодняшний день показателями активации эндотелия (NO, эндотелином и др.) [8]. Требуется проведение дальнейших исследований с целью получения целостности в представлении о роли адгезивных молекул в развитии осложнений СД с увеличением количества обследуемых и длительности срока наблюдения.

Следует также обратить внимание на то обстоятельство, что определение уровня молекул адгезии в сыворотке крови действительно является высоко чувствительным тестом, но специфичность может быть оценена лишь в отношении эндотелиальных клеток. (Как было отмечено, Е-селектин (CD 62) - адгезивная молекула, характерная только для активированного эндотелия. Другие же молекулы адгезии могут экспрессироваться как эндотелиальными, так и другими клетками).

Наиболее вероятными последствиями описанных процессов представляются обусловленные взаимодействием активированных эндотелиальных клеток и форменных элементов крови процессы микротромбоза, которые в капиллярах сетчатки и почечных клубочков способствуют формированию участков ишемии, активации секреции ростовых факторов и прогрессированию диабетических ангиопатий [8, 10].

Как уже было отмечено, небольшой объем материала и недлительный срок наблюдения пока не позволяют однозначно ответить на вопрос о прогностическом значении Е-селектина. Возможно, при накоплении достаточного количества сведений удастся подтвердить высказанное предположение. На сегодняшний день можно утверждать, что при СД имеет место активация эндотелиальных клеток, нарастающая параллельно развитию осложнений.

Разработка средств воздействия на этот механизм является перспективной областью для исследований. В качестве наиболее вероятных кандидатов рассматриваются препараты, обладающие антиоксидантной активностью [15, 22]. Однако до сих пор единственным доказанным методом профилактики прогрессирования сосудистых осложнений СД является оптимальная коррекция метаболических нарушений [1, 2, 7].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Анциферов М.Б., Галстян Г.Р., Миленккая Т.М. и соавт. Осложнения сахарного диабета (клиника, диагностика, лечение, профилактика). - М., 1995.
2. Балаболкин М.И. Сахарный диабет. - М: Медицина, 2000.
3. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений СД (лекция) // Проблемы эндокринологии, 2000, 46, № 6, С.29-34.
4. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. Патогенез ангиопатий при сахарном диабете // Сахарный диабет, 1999, 1, № 2, С. 2-8.
5. Боценовский В.А., Барышников А.Ю. Молекулы клеточной адгезии человека // Успехи современной биологии, 1994, 114, № 6, С.741-753.
6. Васильев С.А. Адгезивные гликопротеины в патогенезе и лечении иммунокомплексной патологии: Автореф. дис. д-ра мед. наук. - М., 1999.
7. Дедов И.И., Фадеев В.В. Введение в диабетологию. Руководство для врачей. - М., 1998.
8. Дедов И.И., Шестакова М.В., Кочемасова Т.В. и соавт. Дисфункция эндотелия в развитии сосудистых осложнений сахарного диабета ( проблемная статья ) // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова, 2001, 87, № 8, С.1073-1084.
9. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Рубакова Э.И. Система цитокинов. - М., 1999.
10. Кочемасова Т.В. Состояние эндотелия и адгезия лейкоцитов при сахарном диабете (Обзор литературы) // Сахарный диабет, 2000, № 3, С.59-62.
11. Нестеров А.П. Роль местных факторов в патогенезе диабетической ретинопатии // Вестник офтальмолога, 1994, 110, № 4, С.16-19.
12. Новикова-Билак Т.А., Слепова О.С. Клинико-лабораторные исследования при выявлении риска развития и прогрессирования диабетической ретинопатии // Сборник докл. VII съезд офтальмологов России.- М., 2000, с.-472.
13. Пальцев М.А., Иванов А.А. Межклеточные взаимодействия. - М: Медицина, 1995.
14. Смирнова Н.Б. Прогноз и лечебная тактика на ранних стадиях диабетической ретинопатии: Дис. канд. мед. наук. - М., 1998.
15. Bereta J., Bereta M., Allison A. Inhibitory Effect of Di-catechol Rooperol on VCAM-1 and iNOS Expression in Cytokine-stimulated Endothelium // Life Sciences, 1997, 60, № 4/5, P. 325-335.
16. Bevilacqua M., Butcher E., Furie B. Selectins: a family of adhesion receptors // Cell, 1991, № 67, P. 233.
17. Blann A.D., Lip G.Y.H. Endothelial Integrity, Soluble Adhesion Molecules and Platelets Molecules and Platelet Marker in Type 1 Diabetes Mellitus // Diabetic Medicine, 1998, № 15, P. 634-642.
18. Cominacini L., Fratta Pasini A., Garbin U. Elevated levels of soluble E-selectin in patients with IDDM and NIDDM : relation to metabolic control // Diabetologia, 1995, 38, № 9, P. 1122-1125.
19. Cominacini L., Garbin U., Campagnola M. E-selectin plasma concentration is influenced by glycaemic control in NIDDM patients: possible role of oxidative stress // Diabetologia, 1997, 40, № 5, P. 584-590.
20. Fasching P., Veitl M., Rohac M. Elevated concentrations of circulating adhesion molecules and their association with microvascular complications in IDDM // Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1996, 81, № 12, P. 4313-4317.
21. Hirata K., Shikata K., Matsuda M. Increased expression of selectins in kidneys of patients with diabetic nephropathy // Diabetologia, 1998, № 41, P. 185-192.
22. Lee D.Y., Yasuda M., Yamamoto T. Bufalin Inhibits Endothelial Cell Proliferation and Angiogenesis in Vitro // Life Science, 1997, 60, № 2, P. 127-135.
23. Olson J., Whitelaw M., McHardy K.C. Endothelial Adhesion molecules for Leucocytes Are Elevated in the Diabetic Retinopathy // Diabetologia, 1994, № 1, P. 37.
24. Porta M. Endothelium: the main actor in the remodelling of the retinal microvasculature in diabetes // Diabetologia, 1996, № 39, P. 739-744.
25. Tooke J.E. Endothelium: the main actor or choreographer in the remodelling of the retinal microvasculature in diabetes // Diabetologia, 1996, № 39, P. 745-746.