

СИСТЕМА ПОЛИМОРФНО-ЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-го ТИПА У ДЕТЕЙ

*Кафедра детских инфекционных болезней ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Россия, 355017, г. Ставрополь, ул. Мира, 310;
тел. (8652) 35-23-31. E-mail: postmaster@stgma.ru*

При оценке полиморфно-ядерных лейкоцитов при сахарном диабете 1-го типа у детей установлено снижение их бактерицидной активности с дефицитом поглощения, секреции активных радикалов кислорода, функционального резерва. Показано увеличение готовности к апоптозу, что сопровождалось повышением экспрессии CD95, снижением – Bcl2. Выявлено увеличение цитотоксического потенциала нейтрофилов в виде повышения уровня миелопероксидазы и лизосомальных катионных белков.

Ключевые слова: диабет, дети, нейтрофилы, функция, апоптоз.

L. Yu. BARYCHEVA, N. E. ERDNI-GORYAEVA, M. V. GOLUBEVA

SYSTEM OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES AT DIABETES OF I TYPE BY CHILDREN

*The cathedral of children' infectious diseases GBOU VPO «Stavropol state medical university»
Ministry of health guard of Russian Federation,
Russia, 355017, Stavropol, Mira street 310; tel. (8652) 35-23-31. E-mail: postmaster@stgma.ru*

In assessing of polymorphonuclear leukocytes at diabetes of I type by children is fixed the decrease of their bactericidal activity with a deficit of absorption, secretion of active oxygen radicals, functional reserve. It is shown the increase of the readiness to apoptosis, that was accompanied by increasing of the expression of CD95, decreasing – Bcl2. The increase of the cytotoxic potential of neutrophils in the form of the increasing level of myeloperoxidase and lysosomal cationic proteins is revealed.

Key words: diabetes, children, neutrophil, function, apoptosis.

Введение

Согласно данным современных исследователей дисфункция полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) является частью сценария патогенеза сахарного диабета [2, 3, 7]. Установлено участие ПМЯЛ в разрушении β -клеток поджелудочной железы, патогенезе микроваскулярных повреждений [14].

У больных сахарным диабетом выявляются дефектный хемотаксис, низкая бактерицидная активность нейтрофилов, аномальная продукция супероксида, лейкотриенов, секреция лизосомальных ферментов, а также изменение базального уровня внутриклеточного кальция [2, 3, 4, 10]. Известно, что структурно-метаболический статус ПМЯЛ неразрывно связан с выполнением ими профессиональных задач. Дисфункция нейтрофилов становится основой низкой резистентности больных сахарным диабетом, их подверженности инфекционным заболеваниям [2, 3, 5, 7].

Цель исследования – изучение функциональной активности и маркеров апоптоза полиморфно-ядерных лейкоцитов при сахарном диабете 1-го типа у детей.

Материалы и методы исследования

Обследовано 25 детей с сахарным диабетом 1-го типа (СД1) в возрасте 7–16 лет. В группу I вошли 12 детей с длительностью заболевания менее 3 лет, в группу II – 13 детей со стажем заболевания более 3 лет. Контрольную группу составили 15 здоровых детей. Настоящее исследование проведено на базе эндокринологического отделения ДГКБ им. Г. К. Филиппского г. Ставрополя.

Для оценки программируемой клеточной гибели выявляли количество нейтрофильных гранулоцитов (НГ), экспрессирующих маркеры апоптоза.

Нейтрофилы выделяли на двойном градиенте плотности Ficoll-Paque и фиколл-урографии (GE Healthcare, Швеция). Суспензию клеток трижды отмывали в среде RPMI-1640 («Вектор-Бест», Россия). В культурах нейтрофилов оценивали количество клеток, экспрессирующих CD95, CD95L, Bcl2, методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Invitrogen, США).

Фагоцитарный индекс определяли по способности нейтрофильных гранулоцитов поглощать частицы меламиноформальдегидных латексов.

Уровень кислородзависимой бактерицидности НГ оценивали в НСТ-тесте по числу формазанположительных клеток.

Содержание лизосомально-катионных белков определяли методом М. Г. Шубича по интенсивности окраски бромфеноловым синим. На высушенные мазки из гепаринизированной крови наносили по 2 мл 5%-ной сульфосалициловой кислоты. Через 1 мин 30 сек. мазки тщательно промывали дистиллированной водой (pH-7,0). Высушенные мазки покрывали 0,1%-ным раствором бромфенолового синего. Через 1–2 мин последовательно промывали в 0,05 М боратном буфере и дистиллированной воде. Докрашивали 1%-ным раствором софранина в течение 2 минут. Содержание катионных белков оценивали, вычисляя средний цитохимический коэффициент по принципу Астальди.

Уровень миелопероксидазы определяли по методу Грэхема-Кнолля. Высушенные мазки из гепаринизированной крови покрывали 1–2 мл спиртоформалинового фиксатора. Через 5 мин промывали в дистиллированной воде. На высушенные мазки на 10 мин наносили бензидиновый реактив, в последующем окрашивали по Романовскому-Гимзе. Для оценки результатов исследований определяли средний цитохимический коэффициент (СЦК) в соответствии с методом Астальди.

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 с нормальным распределением были представлены как среднее±стандартная ошибка средней ($X\pm s_x$); признаки, характеризующиеся ненормальным распределением, – в виде медианы и интерквартильного (25-й и 75-й процентиля) размаха [Me (Q1-Q)]. Достоверными считали различия при $p<0,05$.

Результаты исследования

При изучении функциональной активности ПМЯЛ установлено снижение уровня фагоцитоза у детей со стажем заболевания более 3 лет ($72,9\pm 2,35$, $p<0,05$) по сравнению с группой здоровых детей. У пациентов с длительностью СД1 менее 3 лет показатели фагоцитоза не отличались от нормальных значений (табл. 1).

У пациентов обеих групп установлено увеличение цитознзимохимических показателей – уровня миелопероксидазы и лизосомальных катионных белков по

сравнению со здоровыми детьми ($p<0,05$) с более высокими значениями МП в группе с длительностью заболевания более 3 лет ($p<0,05$) (табл. 1).

Показатели оксидазной активности нейтрофилов по результатам спонтанного НСТ-теста достоверно уменьшались (табл. 1), что согласуется с данными, представленными в литературе [7, 12]. Уровень функционального резерва (ИС НСТ) был снижен у детей со стажем заболевания более 3 лет.

При сравнительной характеристике показателей функциональной активности НГ в группе детей с длительностью СД1 более 3 лет установлены более низкие показатели фагоцитоза ($p<0,05$) и ИС НСТ-теста ($p<0,05$) по сравнению с детьми, имеющими стаж заболевания менее 3 лет (табл. 1).

При исследовании маркеров апоптоза полиморфноядерных лейкоцитов выявлено увеличение экспрессии CD95, снижение – Vcl2 (табл. 2). Максимальные показатели CD95 зарегистрированы у детей со стажем заболевания более 3 лет.

Установлено увеличение процента ПМЯЛ, экспрессирующих CD95L. Наиболее высокие показатели отмечены у детей с длительностью заболевания более 3 лет.

Обсуждение

Полученные данные согласуются с результатами большинства исследований, посвященных фагоцитарной активности у пациентов с сахарным диабетом [2, 9, 10, 12–13].

Известно, что нарушению поглотительной и хемотаксической функций ПМЯЛ способствуют гипергликемия

Таблица 1

Показатели функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов у детей с СД1

Показатели	Длительность СД1 менее 3 лет (II) (n=12)	Длительность СД1 более 3 лет (III) (n=13)	Контрольная группа (n=15)	P
Фагоцитоз, %	82,6±2,33	72,9±2,35*	81,0±1,65	PII–III<0,05
КБ (СЦК), усл. ед.	1,8±0,04*	1,7±0,05*	1,4±0,03	
МП (СЦК), усл. ед.	2,5±0,03*	2,7±0,07*	2,1±0,04	PII–III<0,05
НСТ, %	3,0±0,41*	3,6±0,58*	7,7±0,7	
ИС НСТ, усл. ед.	2,5±0,37	1,7±0,36*	2,6±0,05	PII–III<0,05

Примечание: * – $p<0,05$ по сравнению со здоровыми, PII–III<0,05 – достоверность межгрупповых различий (критерий Ньюмена–Кейлса, критерий Данна).

Таблица 2

Показатели апоптоза нейтрофильных гранулоцитов у школьников с СД1

Показатели	Дети со стажем СД1 менее 3 лет (II) (n=12)	Дети со стажем СД1 более 3 лет (III) (n=13)	Контрольная группа (n=15)	P
CD95, %	77,6 (71,15–83,99)*	87,93 (84,24–91,63)*	58,43 (54,95–1,90)	PII–III<0,05
CD95L, %	9,5 (8,14–10,92)*	12,1 (10,22–13,96)*	7,3 (6,46–8,09)	PII–III<0,05
Vcl2, %	3,99 (2,9–5,08)	2,78 (2,36–3,19)*	5,38 (4,21–6,55)	

Примечание: * – $p<0,05$ по сравнению со здоровыми, PII–III<0,05 – достоверность межгрупповых различий (критерий Ньюмена–Кейлса, критерий Данна).

и гиперкетонемия, под действием которых НГ приобретают сферическую форму и в значительной мере теряют способность образовывать псевдоподии. В результате снижаются адгезивные и эмиграционные свойства НГ, затрудняются поглощение, киллинг и переваривание [18].

Самые низкие показатели фагоцитоза установлены в группе детей, страдающих сахарным диабетом более 3 лет, что может быть связано с длительным течением заболевания и функциональным истощением фагоцитирующих клеток.

Высокие уровни лизосомальных катионных белков и миелопероксидазы, по нашему мнению, могут свидетельствовать об увеличении цитотоксического потенциала ПМЯЛ и их повреждающей способности в отношении собственных тканей. Известно, что наиболее цитотоксичными продуктами миелопероксидазной системы являются гипохлорная кислота и гипохлорит-анион, которым принадлежит роль основных повреждающих агентов в биологических системах [1].

В исследовании показано снижение бактерицидной активности ПМЯЛ с дефицитом активных радикалов кислорода, функционального резерва.

Уменьшение оксидазной активности по данным спонтанного и стимулированного НСТ-тестов у пациентов с СД1 может быть обусловлено нарушением процесса дегрануляции – слияния специфических и азурофильных гранул ПМЯЛ с их фагосомами. Известно, что дегрануляция – энергозатратный процесс. В экспериментальных условиях показано, что при сахарном диабете в ПМЯЛ значительно сокращаются запасы гликогена, тормозится его синтез, снижается активность ключевых ферментов анаэробного окисления глюкозы и пентозного цикла, что приводит к уменьшению внутриклеточных запасов АТФ [11, 19].

Увеличение апоптотического потенциала нейтрофильных гранулоцитов на фоне функционально-метаболических изменений является отражением активного вовлечения ПМЯЛ в иммунопатогенез заболевания.

По данным литературных источников, интенсивность апоптоза нейтрофилов при СД может быть как низкой [6, 16, 20], так и высокой [5, 17]. Существует мнение, что замедление апоптоза НГ у больных с СД1, вероятно, инициирует процессы хронического воспаления с повреждением тканей, а также предрасполагает к затяжным бактериальным инфекциям [6, 14].

Полученные в работе 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 экспрессии CD95L на нейтрофильных гранулоцитах при СД1, вероятно, может способствовать усилению процессов запрограммированной клеточной гибели в островковых β -клетках поджелудочной железы, инфильтрированных иммунокомпетентными клетками.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о дисбалансе функциональной и метаболической активности нейтрофилов при сахарном диабете 1-го типа у детей. С одной стороны, система нейтрофильных гранулоцитов характеризуется высокой готовностью к апоптозу и низким антимикробным потенциалом с дефицитом фагоцитоза и синтеза активных

радикалов кислорода. С другой стороны, в цитохимическом статусе ПМЯЛ выявляются повышенные уровни миелопероксидазы и катионных белков, которые могут обладать повреждающей активностью в отношении собственных тканей.

Известно, что нейтрофильные гранулоциты являются связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом и выполняют главенствующую роль в антибактериальной защите. Нарушение их функциональной компетенции у детей с СД1 становится одним из факторов, способствующих снижению резистентности и предрасполагающих к развитию инфекционных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Huца H. A.* Роль лейкоцитарной системы в патогенезе диабетической микроангиопатии // Вестник СПбГУ. – 2009. – Вып. 4. – С. 49–53.
2. *Alba-Loureiro T. C., Hirabara S. M., Mendonça J. R., Curi R., Pithon-Curi T. C.* Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils // Journal of endocrinology. – 2006. – Vol. 188. – P. 295–303.
3. *Alba-Loureiro T. C., Munhoz C. D., Martins J. O., et al.* Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus // Braz. j. med. biol. res. – 2007. – Vol. 40. – P. 1037–1044.
4. *Awadhesh K. A., Deepa P., Hemant K., Manish M., Kamlakar T.* Impact of lymphocyte apoptosis in diabetes mellitus // Asian journal of medical sciences. – 2011. – № 2. – P. 1–6.
5. *Casqueiro J., Casqueiro J., Alves C.* Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis // Indian j. endocrinol. metab. – 2012. – Suppl. 1–16. – P. 27–36.
6. *Chancharoen S., Kewcharoenwong C., Susaengrat W., Ato M., Lertmemongkolchai G.* Human polymorphonuclear neutrophil responses to *Burkholderia pseudomallei* in healthy and diabetic subjects // Infect. immun. – 2009. – Vol. 77. – P. 456–463.
7. *Delamaire M., Maugeudre D., Moreno M., LeGoff M. C.* Exploration of the various steps of polymorphonuclear neutrophil function in diabetic patients // J. mal. vascul. – 1995. – № 20. – P. 107–112.
8. *Hatanaka E., Monteagudo P. T., Marrocos M. S., Campa A.* Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes // Clin. exp. immunol. – 2006. – Vol. 146. – P. 443–447.
9. *Kannan Y., Tokunaga M., Moriyama M., Kinoshita H., Nakamura Y.* Diabetic neutrophil dysfunction and troglitazone // Clin. exp. immunol. – 2004. – Vol. 137. – P. 263–271.
10. *Krol E., Agueel R., Banue S., Smogorzewski M., Kumar D., Massry S. G.* Amlodipine reverses the elevation in $[Ca^{2+}]_i$ and the impairment of phagocytosis in PMNLs of NIDDM patients. *Kidney Int.* – 2003. – Vol. 64. – P. 2188–2195.
11. *Meigs J. B., Hu F. B., Rifai N., et al.* Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus // JAMA. – 2004. – Vol. 291. – P. 1978–1986.
12. *Nurun A. H. M., NabiLaila N., Rahman I., Mahfuzur M., Boron K.* Polymorphonuclear neutrophil dysfunctions streptozotocin-induced type 1 diabetic rats // Journal of biochemistry and molecular biology. – Vol. 661–667.
13. *Panneerselvam S., Govindasamy S.* Sodium molybdate improves the phagocytic function in alloxan-induced diabetic rats // Chemical and biological interactions. – 2003. – Vol. 145. – P. 159–163.
14. *Rich J., Lee J. C.* The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection in the diabetic NOD mouse // Diabetes. – 2005. – Vol. 54. – P. 2904–2910.
15. *Shamaei-Tousi A., Stephens J. W., Bin R., et al.* Association between plasma levels of heat shock protein 60 and cardiovascular disease in patients with diabetes mellitus // Eur. heart. j. – 2006. – Vol. 27. – P. 1565–1570.

16. Sudo C., Ogawara H., Saleh A. W., Nishimoto N., Utsugi T. Clinical significance of neutrophil apoptosis in peripheral blood of patients with type 2 diabetes mellitus // *Lab. hematol.* – 2007. – № 13 (3). – P. 108–112.

17. Tennenberg S. D., Finkenauer R., Dwivedi A. Absence of lipopolysaccharide-induced inhibition of neutrophil apoptosis in patients with diabetes // *Arch. surg.* – 1999. – Vol. 134. – P. 1229–1233.

18. Tong P. C., Lee K. F., So W. Y. *et al.* White blood cell count is associated with macro- and microvascular complications in Chinese patients with type 1 diabetes // *Diab.* – 2004. – Care 27. – P. 216–222.

19. Walrand S., Guillet C., Boirie Y., Vasson M. P. In vivo evidence that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions // *Journal of leukocyte biology.* – 2004. – Vol. 76. – P. 1104–1110.

20. Zhang B., Hirahashi J., Cullere X., Mayadas T. N. Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation // *J. biol. chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 28443–28454.

08.08.2013

**И. С. БЕЛЯКОВА, И. В. СЕВОСТЬЯНОВА, О. С. ПОЛУНИНА,
В. А. ПОЛУНИНА, Н. Б. ГРИНБЕРГ**

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИАСТОЛИЧЕСКОЙ И СИСТОЛИЧЕСКОЙ ФУНКЦИЙ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

*Кафедра внутренних болезней педиатрического факультета
ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России;
Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121; тел. (8512) 52-41-43.
E-mail: irina-nurzhanova@yandex.ru*

Для оценки функционального состояния миокарда левого желудочка нами было обследовано 36 пациентов с бронхиальной астмой (БА) средней степени тяжести, 39 пациентов с тяжелым течением заболевания и 30 соматически здоровых лиц. По результатам эхокардиоскопического исследования у больных БА обеих групп было выявлено наличие диастолической дисфункции левого желудочка, которая нарастала по мере утяжеления заболевания. Кроме того, у больных БА тяжелого персистирующего течения имело место не только нарушение диастолической функции левого желудочка, но умеренное ухудшение его систолической функции, на что указывали удлинение времени изоволюметрического сокращения левого желудочка и увеличение доплеровского эхокардиографического индекса – индекса Tei.

Ключевые слова: бронхиальная астма, левый желудочек, систоло-диастолическая дисфункция, изоволюметрическое сокращение, изоволюметрическое расслабление.

**I. S. BELYAKOVA, I. V. SEVOSTYANOVA, O. S. POLUNINA,
V. A. POLUNINA, N. B. GRINBERG**

RESEARCH OF DIASTOLIC AND SYSTOLIC FUNCTION OF THE LEFT VENTRICLE AT PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

*Department of internal diseases of pediatric faculty State budget educational
institution of higher professional education «Astrakhan state medical academy»,
Russia, 414000, Astrakhan, Bakinskaya str., 121;
tel. (8512) 52-41-43. E-mail: irina-nurzhanova@yandex.ru*

To estimate a functional condition of a myocardium of the left ventricle we examined 36 patients with the moderate course of bronchial asthma (BA), 39 patients with the heavy course of the disease and 30 somatic healthy patients. According to the results of echocardiographic examination of the patients of both groups with BA we revealed the diastolic dysfunction of the left ventricle which intensified in the process of the disease increasing. According to lengthening of time of isovolumetric contraction of the left ventricle and increasing in a Doppler echocardiographic index – the Tei index – we revealed the destruction of diastolic function of the left ventricle and moderate impairment of systolic function at patients with BA of a heavy persistent current of the disease.

Key words: bronchial asthma, left ventricle, systolic-diastolic dysfunction, isovolumetric contraction, isovolumetric relaxation.

Бронхиальная астма (БА) привлекает к себе повышенное внимание специалистов, что связано как с отчетливым увеличением частоты, утяжелением течения этого заболевания, ростом осложнений, так и с существенным прогрессом в её диагностике и лечении. Эпидемиологическими исследованиями показано, что болеют БА в мире около 7 млн. человек, из них 1 млн. имеет тяжелую форму заболевания [7]. В последние годы накапливается все больше информации о том, что

изучение и оценка показателей эхокардиографического исследования могут иметь важное диагностическое значение для понимания патогенеза БА и прогнозирования развития осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы [1, 2, 3, 4, 6].

Цель работы – оценить диастолическую и систолическую функции левого желудочка у больных бронхиальной астмой среднетяжелого и тяжелого персистирующего течения.