

Взаимосвязь биохимических показателей и avidности антител у больных сахарным диабетом типа 2

Эфендиев А.М., Азизова Г.И., Гусейнова Г.Р.

The relationship between biochemical parameters and antibody avidity in diabetes mellitus type 2 patients

Efendiyev A.M., Azizova G.I., Huseynova G.R.

Азербайджанский медицинский университет, г. Баку, Азербайджан

© Эфендиев А.М., Азизова Г.И., Гусейнова Г.Р.

Проведено исследование некоторых биохимических и иммунных показателей (иммуноглобулины А, М, G, циркулирующие иммунные комплексы, фагоцитарное число, Т-лимфоциты, avidность антител).

Avidитет и соотношение высоко- и низкоavidных нормальных антител в сыворотке крови определяли с помощью тест-систем для экспресс-диагностики доклинических и клинически выраженных форм иммунологической недостаточности. Все больные (47 человек) в зависимости от уровня гликемии и продолжительности заболевания были разделены на три группы: находящиеся в стадии компенсации, субкомпенсации и декомпенсации. В качестве контроля служили 17 здоровых доноров.

У больных сахарным диабетом (СД) наблюдалось снижение содержания высокоavidных антител до 75, 57 и 26% соответственно, тогда как у здоровых доноров этот показатель был равен 89%. Наоборот, содержание низкоavidных антител нарастает соответственно до 25, 43, 74% (в контроле 11%).

У больных СД изменения метаболических показателей отрицательно влияют на avidность антител: происходит резкое снижение высокоavidных антител класса G с аномальной конформацией и низкой функциональной и протективной активностями, что свидетельствует о нарушении протективной системы функции В-системы иммунитета.

Ключевые слова: сахарный диабет типа 2, иммуноглобулины, avidность антител.

We evaluated some biochemical and immune parameters, such as IgA, IgM, IgG, CIC, phagocytic index, T-lymphocytes, as well as avidity of antibodies in type 2 diabetic patients.

Avidity, high- and low-avid antibody ratio was determined by test-systems for express-diagnostics of clinical and preclinical forms of immunologic deficiency. All patients (N = 47), depending on the level of glycemia and disease duration were divided into 3 groups: in the stage of compensation, subcompensation and decompensation. Control group included 17 healthy subjects.

Value of high-avid antibodies in diabetes mellitus patients decreased in 75, 57 and 26% respectively, whereas in healthy subjects it is 89%. Conversely, increased amount of low-avid antibodies was observed, respectively 25, 43, and 74% (11% in control).

These parameters prove antibody-folding disorders in diabetes mellitus and show that, change of metabolic parameters affects antibody avidity: G class high-avid antibody level decreases and shows weak protective function. This indicates functional disorders in B-system immunity.

Key words: type 2 diabetes mellitus, immunoglobulines, antibody avidity.

УДК 616.379-008.64-098.811.1-097.3:577.15

Введение

Экспертная оценка распространенности сахарного диабета (СД) позволяет считать, что к 2010 г. в мире будет насчитываться более

230 млн, а к 2025 г. — 300 млн больных СД, из которых 80—90% составят больные СД типа 2 [9].

В последние годы появились данные о том, что у больных сахарным диабетом, как правило, отмечается гиперактивация В-системы имму-

нитета, которая выражается в увеличении в крови числа В-лимфоцитов, нарастании числа плазматических клеток и уровня секретируемых антител (иммуноглобулинов (Ig) M, G, E), повышении количества циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Некоторые авторы отмечают корреляционную связь между содержанием в крови ЦИК, системой комплемента и тяжестью течения метаболических заболеваний [7].

Цель настоящей работы — исследование содержания IgA, IgM, IgG, ЦИК, фагоцитарного числа, а также avidности антител на фоне метаболических нарушений различной степени.

Материал и методы

Проведены исследования крови 47 больных сахарным диабетом типа 2, в том числе мужчин — 22, женщин — 25, в возрасте от 42 до 65 лет. Основная часть пациентов находилась на лечении в хозрасчетном эндокринологическом диспансере г. Баку. Продолжительность болезни колебалась от 2 мес до 23 лет.

По длительности течения СД были выделены три группы больных: I группа — с давностью диабета от 2 мес до 1 года, II группа — от 1 года до 5 лет, III группа — более 11 лет.

Диабетическая микроангиопатия (ДМА) диагностирована у большинства обследованных (36 человек). У 17 пациентов с микроангиопатией была установлена доклиническая (I) стадия микроангиопатии, у 11 — функциональная (II) стадия и у 19 — органическая (III) стадия, характеризующаяся необратимыми сосудистыми изменениями.

Из 27 больных СД с сопутствующими ему воспалительными заболеваниями внутренних органов у 7 наблюдалось обострение хронического бронхита, у 4 очаговая пневмония, у 12 пиелонефрит, у 1 гнойный отит, у 14 хронический тонзиллит и у 9 катаральный холецистит.

Сахароснижающими препаратами лечился 21 человек, 26 — инсулином.

В комплексном лечении СД наряду с диетой и сахароснижающими средствами применялись липотропные препараты, спазмолитики, антибиотики, сульфаниламиды, витамины группы B (B₁, B₆, B₁₂, B₁₅), физиотерапия.

Aвидность антител и иммунологические показатели в сыворотке больных были исследованы в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (г. Москва). По длительности заболевания, а также по уровню гликемии все пациенты были разделены на три группы: до 1 года — стадия компенсации (16 человек), от 6 до 10 лет — стадия субкомпенсации (14 человек) и более 10 лет — стадия декомпенсации (17 пациентов). Классификацию больных по стадиям проводили на основе критериев, принятых Европейским бюро Международной федерации диабетологов и Европейским бюро ВОЗ (1998) [1]. Кровь 17 здоровых доноров служила в качестве контроля.

Количество глюкозы определяли глюкозооксидазным методом с помощью готового реактивного набора [3], количество гликолизированного гемоглобина HbA_{1c} — по методу Ю.А. Князева и соавт. [2]. Количество общего белка устанавливали биуретовым методом, альбумины — бромкрезолом. Содержание кальция исследовали с помощью набора реактивов Human (Германия), уровень креатинина и мочевины — с помощью реактивного набора Lachema (Чехия).

Для оценки состояния иммунной системы организма изучали содержание Т-лимфоцитов по методу Jondal и соавт., фагоцитарную активность нейтрофилов определяли по способности поглощать дрожжевые клетки [4], содержание основных классов иммуноглобулинов (G, A, M) — по методу G. Manchini [6].

Концентрацию ЦИК (фракцию, обогащенную ЦИК, осаждаемую 3,5%-м полиэтиленгликолем (ПЭГ)) устанавливали по методу Н.А. Гриневич и соавт. [4]. Выделение ЦИК проводили осаждением сыворотки крови, разбавленной в 5 раз боратным буфером в концентрации 1 моль (H₃BO₃ в концентрации 0,1 моль, KCl — 0,1 моль, NaOH — 0,1 моль, pH = 8,6), равным объемом ПЭГ (6 кДа) в том же буфере. Конечная концентрация ПЭГ составляла 3,5%. После инкубации при температуре 4 °С в течение 18–20 ч смесь центрифугировали 15 мин при 3 000g и отделяли осадок, представляющий собой ЦИК.

Оценку протективной активности В-системы иммунитета проводили на основании анализа

конформационного состояния молекулы IgG и авидитета антител, для чего IgG1 выделяли из сывороток крови доноров, больных СД, методом хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе. Чистоту полученных препаратов подтверждали методом электрофореза в полиакриламидном геле и методом радиальной иммунодиффузии по Ухтерлони с применением коммерческих антисывороток к классам иммуноглобулинов и подклассам IgG человека, а также с помощью N-концевого секвенирования Fab- и Fc-фрагментов методом Эдмана. Fc-фрагмент получали путем гидролиза иммуноглобулинов трипсином. Гидролиз проводили в NH₄ HCO₃ буфере с концентрацией 0,05 моль, pH = 7,8 при температуре 37 °С в течение 24 ч при соотношении фермента и субстрата 1 : 20. Полученные фрагменты разделяли при помощи ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе [8].

Авидитет и соотношение высоко- и низкоавидных нормальных антител в сыворотке крови определяли с помощью тест-систем для экспресс-диагностики доклинических и клинически выраженных форм иммунологической недостаточности.

Статистическую обработку данных проводили непараметрическим методом с помощью критерия Вилкоксона (Манна-Уитни). Данные приведены как $M \pm m$, где M – выборочное среднее значение, m – ошибка среднего.

Результаты

Исследованы некоторые биохимические и иммунологические показатели, а также авидность антител на разных стадиях СД-2.

При длительном и стойком нарушении углеводного обмена, т.е. при декомпенсации сахарного диабета и отсутствии адекватной коррекции заболевания, уровень Hb_{1Ac} нарастает (табл. 1). Параллельно с гемоглобином неэнзиматическому гликолизированию подвергаются и

другие белки организма, дисфункция рецепторов, что может вызвать такие изменения, как утолщение мембраны, нарушения метаболизма, характерные для прогрессирования СД.

На стадиях компенсации и субкомпенсации в биохимических показателях (табл. 2) не наблюдается заметных изменений. На стадии декомпенсации уровень креатинина и мочевины заметно повышается; кальций снижается, что объясняется диабетической нефропатологией.

Таблица 1

Уровень гликемии и гликолизированного гемоглобина у больных СД типа 2

Группа	Количество обследованных	Средняя суточная гликемия, ммоль/л	Hb _{1Ac} , %
СД-2 в состоянии компенсации	16	6,04 ± 0,16*	6,20 ± 0,18*
СД-2 в состоянии субкомпенсации	14	8,10 ± 0,27 *	7,50 ± 0,12*
СД-2 в состоянии декомпенсации	17	9,20 ± 0,17*	10,30 ± 0,24**
Контроль	17	4,01 ± 0,15	5,50 ± 0,08

* Достоверность отличий от контрольной группы $p < 0,001$.

Нужно отметить, что продолжительность СД отрицательно влияет на показатели клеточного иммунитета, особенно функциональной активности. Уровень IgA, IgG, ЦИК и В-лимфоцитов у больных с длительностью диабета до 1 года был существенно ниже, чем при длительности 6–10 и более 10 лет. Наиболее высокий уровень IgG наблюдался при давности СД более 10 лет, IgM — 6–10 лет по сравнению с болевшими до 1 года.

Как видно из табл. 3, с увеличением продолжительности диабета возрастало содержание IgA, IgG, ЦИК и В-лимфоцитов в крови. Показатели Т-системы иммунитета, наоборот, были снижены.

Таблица 2

Биохимические показатели больных СД типа 2

Группа	Количество обследованных	Общий белок, г/л	Альбумин, г/л	Креатинин, мкмоль/л	Мочевина, ммоль/л	Кальций, ммоль/л
СД-2 в состоянии компенсации:	16	75,80 ± 1,38	48,20 ± 0,80	90,30 ± 0,62*	5,97 ± 0,09**	2,00 ± 0,03

компенсации	14	76,00 ± 0,73	41,20 ± 0,67*	117,50 ± 5,12*	9,60 ± 0,16*	1,89 ± 0,03**
субкомпенсации	17	50,70 ± 0,73*	35,20 ± 0,95*	371,00 ± 5,94*	12,70 ± 0,3*	1,68 ± 0,06*
декомпенсации	17	75,60 ± 0,96	46,40 ± 1,01	74,10 ± 1,65	6,50 ± 0,16	2,06 ± 0,06
Контроль						

Примечание. * – достоверность отличий от контрольной группы $p < 0,001$; ** – $p < 0,05$.

Таблица 3

Иммунологические показатели и avidность антител у больных СД типа 2

Показатель	Контроль	Стадия СД-2		
		Компенсация	Субкомпенсация	Декомпенсация
IgG, мг/мл	14,40 ± 0,21	17,20 ± 0,37*	21,90 ± 0,36*	22,60 ± 0,44*
IgM, мг/мл	2,40 ± 0,07	2,73 ± 0,09***	2,66 ± 0,09**	2,70 ± 0,09**
IgA, мг/мл	1,80 ± 0,06	2,30 ± 0,07*	3,30 ± 0,08*	3,80 ± 0,1*
ЦИК, мг/мл	0,50 ± 0,03	0,80 ± 0,11***	1,60 ± 0,08*	1,50 ± 0,03*
Фагоцитарное число, %	92,00 ± 0,86	76,00 ± 1,47*	63,20 ± 1,83*	49,00 ± 0,97*
Высокоавидные антитела, %	89,00 ± 1,18	75,00 ± 0,83*	57,00 ± 1,52*	26,00 ± 0,64*
Низкоавидные антитела, %	11,00 ± 1,18	25,00 ± 0,83*	43,00 ± 1,52*	74,00 ± 0,61*
T-лимфоциты, %	58,70 ± 0,67	55,60 ± 0,92**	44,6 ± 1,14*	35,60 ± 0,41*

Примечание. * – достоверность отличий от контрольной группы $p < 0,001$; ** – $p < 0,05$; *** – $p < 0,01$.

Как следует из табл. 3, количество T-лимфоцитов в периферической крови при длительности болезни до 1 года мало отличается от такового у практически здоровых людей. Чем продолжительнее болезнь, тем более глубокий характер приобретают нарушения иммунного статуса.

Обсуждение

Представление о сахарном диабете как иммунодефицитном состоянии получает все большее признание исследователей. Тем не менее в литературе данные об изменении показателей клеточного и гуморального иммунитета при СД достаточно противоречивы. Своевременное определение иммунных нарушений у этого контингента больных, возможно, позволит предотвратить развитие ряда осложнений. Несмотря на многочисленные исследования, вопрос о связи различных иммунных сдвигов в организме с метаболическими нарушениями у пациентов, страдающих сахарным диабетом, до сих пор не ясен.

Одним из индикаторов состояния иммунного статуса организма и развития аутоиммунных процессов является уровень ЦИК в крови. Известно, что длительная циркуляция ЦИК в организме даже при незначительном повышении их уровня способствует формированию их отложений в тканях, повышенной агрегации и адгезии

тромбоцитов, что, в свою очередь, приводит к нарушению микроциркуляции крови и закупорке сосудов, повреждению и некрозу тканей со всеми вытекающими отсюда последствиями. В связи с вышесказанным резонно предположить, что ЦИК могут играть определенную роль в патогенезе поздних осложнений СД (микро- и макроангиопатия, нейропатия).

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что длительность сахарного диабета и диабетическая микроангиопатия характеризуются нарушением клеточной дифференцировки T-лимфоцитов, угнетением их пролиферативной активности, гипериммуноглобулинемией всех классов и наличием в сыворотке крови ЦИК. Можно полагать, что отмеченные сдвиги в иммунной системе организма способствуют осложнению СД и усугубляют метаболические нарушения при этой патологии.

Полученные результаты свидетельствуют о повышенной концентрации ЦИК при СД (по сравнению с нормой) на поздних стадиях развития заболевания, что согласуется с данными литературы. Это дает основание предположить, что увеличение ЦИК как следствие развития аутоиммунных реакций играет существенную роль в патогенезе поздних осложнений СД.

Известно, что ключевую роль в механизмах иммунологического распознавания чужеродных антигенов играют специфические антитела под-

классов G1–G3, которые в процессе иммунного ответа подключают каскад молекулярных и клеточно-опосредованных механизмов естественной защиты организма, ведущих к селективному уничтожению и элиминации чужеродных антигенов и патогенов. Однако между количеством специфических антител класса G и их протективной активностью не всегда отмечается линейная зависимость. Протективная активность сывороток определяется не только аффинностью и идиотипическим спектром антител, а в большей мере соотношением в них высоко- и низкоавидных специфических антител, при этом только высокоавидные антитела класса G поливалентно связываются с эпитопами антигена и ведут к реализации эффекторных функций антител, т.е. подключению в иммунный ответ молекулярных и клеточных механизмов естественной защиты организма [5].

Секреция низкоавидных антител класса G с аномальной конформацией, низкой функциональной активностью, как было показано ранее, приводит к ряду последствий, среди которых наиболее важным в патогенетическом отношении является образование с антигеном мелких растворимых длительно циркулирующих в крови иммунных комплексов, не способных активировать классический путь системы комплемента и подключать каскад FcγR- и CR-зависимых клеточно-опосредованных механизмов защиты. Такие мелкие растворимые ЦИК обладают цитотропностью, т.е. способностью к связыванию с тканями. Именно в силу этих причин можно считать, что аллергены и атопены, длительно циркулирующие в крови, ведут к гиперактивации В- и Т-звеньев иммунитета и супрессии антибактериальной активности макрофагальных клеток. С позиции нарастания низкоавидных IgG становится объяснимой персистенция в организме аллергенов и атопенов.

Таким образом, патогенез СД можно рассматривать как цепь взаимосвязанных меха-

низмов, среди которых триггерная роль принадлежит недостаточности протективной функции В-системы иммунитета, связанной с секрецией антител класса G с низкими авидитетом и протективной активностью.

Поэтому дальнейшие исследования иммунологических механизмов формирования осложнений СД, способствующие их ранней диагностике и разработке эффективных методов лечения, являются актуальной задачей.

Заключение

Установлено, что у больных СД изменения метаболических показателей отрицательно влияют на авидность антител: происходит резкое снижение высокоавидных антител класса G с аномальной конформацией и низкой функциональной активностью, что свидетельствует о нарушении протективной функции В-системы иммунитета.

Литература

1. Бондарь Т.П., Козинец Г.И. Лабораторно-клиническая диагностика сахарного диабета и его осложнений. М., 2003. 87 с.
2. Князев Ю.А., Вахрушева Л.Л., Сергеев Н.А. и др. Значение определения гликолизированного гемоглобина и лактата плазмы для характеристики состояния детей и подростков, больных сахарным диабетом // Педиатрия. 1987. № 9. С. 62–64.
3. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии: 2-е изд. Минск, 1982. С. 117.
4. Новиков Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса. М.: Витебский медицинский институт, 1996. 282 с.
5. Трофимова И.Б., Мишура Л.А., Волынская А.М. и др. Авидитет антител G класса в патогенезе атопического дерматита // Аллергология. 2003. № 3.
6. Manchini G., Nash D.R., Heremans J.F. Further studies on single radial immunodiffusion. III Quantitative analysis of related and unrelated antigens // Immunochemistry. 1970. № 7. P. 261–264.
7. Nicoloff G., Blazhev A., Petrovs C., Christova P. Circulating immune complexes among diabetic children // Clin. Dev. Immunol. 2004. № 11 (March) (1). P. 61.
8. Ouchterlony O., Nilsson L.A. Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis // Handbook of experimental immunology / D.M. Weir, ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1978. P. 1910.
9. Wild, Roglic G., Green A. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030 // Diabet. Care. 2004. V. 27. P. 1047–1053.

Поступила в редакцию 15.12.2008 г.

Утверждена к печати 17.06.2009 г.

Эфендиев А.М., Азизова Г.И., Гусейнова Г.Р. Взаимосвязь биохимических показателей и avidности антител...

Сведения об авторах

А.М. Эфендиев – д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой биохимии Азербайджанского медицинского университета (г. Баку).

Г.И. Азизова – канд. хим. наук, доцент кафедры биохимии Азербайджанского медицинского университета (г. Баку).

Г.Р. Гусейнова – аспирант кафедры биохимии Азербайджанского медицинского университета (г. Баку).

Для корреспонденции

Гюнель Рашид кызы Гусейнова, тел.: +9 (9412) 495-39-53, моб.: (+99450) 576-44-14, e-mail: gunel.huseynova.r@gmail.com