

УДК 616.61:616.379-008.64-092:616.155.33

*В.Ю. Гальчінська, І.І. Топчій, Н.В. Єфімова, П.С. Семенових, О.Л. Борисова*  
*ДУ «Національний інститут терапії ім. Л.Т. Малої НАМН України», м. Харків*

### **ЕКСПРЕСІЯ РЕЦЕПТОРІВ СЕЛЕКТИНУ PSGL-1 НА МОНОЦИТАХ ПРИ ДІАБЕТИЧНІЙ НЕФРОПАТІЇ**

На ізольованих моноцитах, виділених з периферичної крові хворих на діабетичну нефропатію і здорових донорів, вивчали експресію рецепторів селектину PSGL-1. Вже на початкових стадіях хвороби має місце суттєве підвищення рівня експресії рецепторів до селектину на моноцитах периферичної крові. Прогресування захворювання супроводжується зниженням експресії PSGL-1. Активація й адгезія моноцитів сприяють виникненню ускладнень цукрового діабету, лабораторною ознакою яких може служити порушення експресії рецепторів селектину.

**Ключові слова:** діабетична нефропатія, молекули міжклітинної адгезії, PSGL-1.

Патологічні механізми розвитку діабету та його ускладнень, а саме діабетичної нефропатії (ДН), включають розвиток каскаду реакцій запалення, ендотеліальну дисфункцію та прокоагулянтний дисбаланс. Відомо, що суттєву роль в реалізації цих процесів відіграють молекули адгезії, зокрема селектини [1, 2].

Селектини – сімейство адгезивних білків, які мають три характерні риси: варіабельне число (від 2 до 9) повторів комплемент-регуляторних білків, домен епідермального фактора росту (EGF) і N-кінцевий лектиновий домен. Добре охарактеризовано три члени цього сімейства: E-селектин, L-селектин і P-селектин. L-селектин експресується на нейтрофілах, лімфоцитах, моноцитах і інших мієлоїдних клітинах [3], але не на ендотеліоцитах. Він опосередковує переміщення клітин уздовж судинної стінки мікроциркуляторного русла, що є першим кроком адгезії лейкоцитів до ендотелію і накопичення їх в зоні запалення. E-селектин в звичайних умовах також не експресується на ендотеліальних клітинах, але при дії інтерлейкіна-1, фактора некрозу пухлини і  $\gamma$ -інтерферону починається його синтез і експресія на поверхні ендотеліоцитів. E-селектин сприяє адгезії і скупченню переважно поліморфноядерних лейкоцитів і,

головним чином, на стадії раннього розвитку атерому. Найбільше значення E-селектин має в розвитку запального ураження судин.

Під дією P- і E-селектинів відбувається часткова затримка лейкоцитів з неповною зупинкою на поверхні ендотелію – ролінг. Причому P-селектин, який постійно синтезується ендотеліоцитами і міститься в гранулах тромбоцитів, забезпечує початкову стадію, швидкий ролінг лейкоцитів, швидкість якого починає сповільнюватися при експресії E-селектину.

Селектини специфічно взаємодіють з PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1/CD162), який є сіаломуцином і експресується на моноцитах, гранулоцитах, частині B-лімфоцитів, T-лімфоцитах периферичної крові і деяких CD34<sup>+</sup>-клітинах [2, 3].

Підвищення рівнів розчинних адгезивних молекул E-, P- та L-селектину було відзначено при ряді захворювань [4–6], зокрема, при цукровому діабеті (ЦД) 2-го типу [7, 8]. На даний час проводиться активне дослідження взаємодії селективнів з відповідними рецепторами, зокрема з PSGL-1. Проте стосовно останнього отримані дані є недостатніми та досить неоднорідними. Зокрема, роль PSGL-1 в розвитку ДН до кінця не з'ясована.

© В.Ю. Гальчінська, І.І. Топчій, Н.В. Єфімова та ін., 2013

Метою даної роботи стало визначення рівнів експресії PSGL-1 на моноцитах периферичної крові у хворих на ДН в залежності від індексу маси тіла (ІМТ) і стадії захворювання.

**Матеріал і методи.** Було обстежено 60 хворих на ЦД 2-го типу з ДН (38 хворих з нормальним ІМТ і 22 хворих з підвищеним ІМТ). Середній вік пацієнтів – (46,52,3) року. Контрольну групу склали 14 здорових донорів. ІМТ обчислювали за формулою

$$I = m/h^2,$$

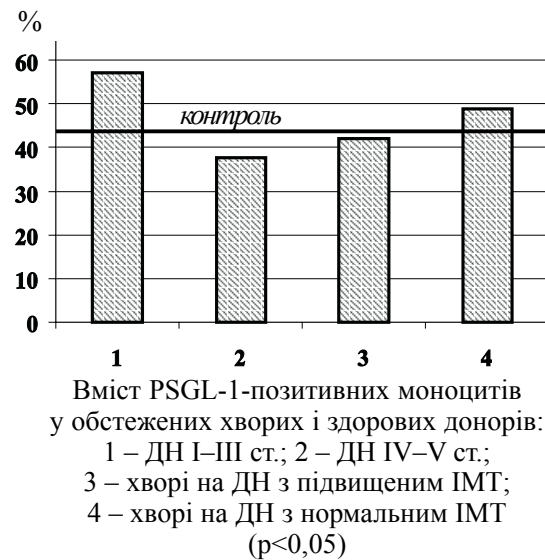
де  $m$  – маса тіла, кг;  $h$  – зріст, м.

Моноцити виділяли з периферичної крові хворих і здорових осіб методом градієнтного центрифугування. У дослідженні використовували суспензію клітин, що містила не менше 90 % живих клітин. Життєздатність клітин визначали шляхом забарвлення 0,1%-вим розчином трипанового синього. Моноцити ( $1 \cdot 10^6$  кл/мл) інкубували в середовищі 199 («ПанЭко», Росія) з 10%-вим вмістом телячої ембріональної сироватки («ПанЭко», Росія). Для створення моделі діабетичного мікрооточення в умовах *in vitro* ізольовані клітини інкубували у середовищі з підвищеним вмістом глюкози (33 мМоль/л). Кількість антиген-позитивних клітин оцінювали непрямим імуногістохімічним методом з використанням моноклональних антитіл до антигену CD162 (ООО «Сорбент», Москва).

Статистичну обробку проводили з використанням непараметричного критерію Манна–Уїтні. Вірогідними вважали розходження при  $p < 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** Лігандами PSGL-1 (CD162) є Р-селектин (CD62P) та в значно меншій мірі Е-селектин (CD62E) і L-селектин (CD62L), через взаємодію з якими PSGL-1 бере участь в адгезії лейкоцитів до активованих тромбоцитів, активованого ендотелію та інших лейкоцитів у вогнищі запалення. PSGL-1 експресується на всіх лейкоцитах крові і відіграє важливу роль в міграції цих клітин у вогнища запалення. Лейкоцити крові в нормі не взаємодіють з ендотелієм кровеносних судин. Проте запалення викликає експресію адгезивних молекул і їх рецепторів (зокрема Р-селектину) на поверхні стінки кровеносної судини. Лейкоцити крові можуть взаємодіяти з молекулами клітинної адгезії. Першим етапом цього процесу є взає-

модія PSGL-1 з Р-селектином та/або Е-селектином на ендотеліальних клітинах і адгезованих тромбоцитах. Ця взаємодія приводить до ролінгу лейкоцитів крові на поверхні ендотеліальних клітин, який завершується стійким прилипанням і трансміграцією лейкоцитів у зону запалення. Високий рівень експресії Р-селектину і PSGL-1 спостерігається при септичному шоці, ревматоїдному артриті, синдромі утрудненого дихання, ішемії та ін. [2, 5]. Зниження концентрації цих двох молекул виявлено при системному склерозі [5]. В нашому дослідженні було виявлено тенденцію до зростання експресії PSGL-1 моноцитами у хворих на ДН з високим ІМТ, а кількість PSGL-1-позитивних клітин була вірогідно вищою на початкових стадіях ДН в порівнянні з контрольною групою та групою хворих на ДН з протеїнурією (рисунок).



Той факт, що прогресування захворювання не супроводжується, як очікувалось, зростанням експресії PSGL-1, важко пояснити однозначно. З однієї сторони, може мати місце виснаження рецепторного апарату клітин, з іншої – рецептори або рецепторні комплекси можуть більш активно відщеплюватися від моноцитів, сприяючи підвищенню як рівнів розчинних молекул [9], так і створенню агрегатів з тромбоцитами. В роботі [10] відзначається зниження експресії PSGL-1 на лейкоцитах у пацієнтів з ХНН з серцево-судинними ускладненнями на фоні збільшення кількості тромбоцитарно-моноцитарних агрегатів. Не можна виключити і блокаду PSGL-1-за-

лежних механізмів на певних стадіях ДН. Як свідчать дані [3], PSGL-1-залежна та PSGL-1- незалежна активація клітин різниться при системному та локальному запаленні.

Про додаткові ще не вивчені властивості цих рецепторів свідчить робота [11]. Її автори показали здатність антитіл до PSGL-1 посилювати апоптоз Т-клітин, не змінюючи зв'язування Р-селектину з Т-клітинами.

Не викликає сумніву той факт, що ключову роль у запуску й підтримці властивих ДН патологічних проявів грає підвищений рівень глюкози крові. Неферментативне глікозування білків, аутоокиснення глюкози, що приводить до підвищення рівня агресивних вільних радикалів, безпосередня глікозотоксичність здійснюють запуск каскаду реакцій з боку імунної, фібринолітичної та інших систем [12, 13]. При ДН патогенетичні функції моноцитів і нейтрофілів можуть також стимулюватися протеїнуриєю та уремією [12, 14].

Для більш детального вивчення впливу високих рівнів глюкози нами проведено серію експериментів *in vitro* на ізольованих моноцитах і нейтрофілах периферичної крові. Інкубація клітин у середовищі з додаванням високих концентрацій глюкози або глікозованого протеїну (умови діабетичного мікрооточення) призводила до вірогідного підвищення експресії CD162 (PSGL-1) на моноцитах ( $p < 0,05$ ). Так, кількість PSGL-1-позитивних клітин в умовах з високим вмістом глюкози становила ( $57,8 \pm 6,4$ )%, у контролі – ( $44,3 \pm 5,8$ ) %.

Ці дані відображають можливий механізм реалізації патогенетичного впливу гіперглікемії. Аналіз літературних даних щодо впливу високих концентрацій глюкози на експресію адгезивних молекул і їх рецепторів також дозволяє зробити висновок про стимулюючий вплив на цей процес навантаження глюкозою *in vivo* або інкубації ізольованих клітин з глюкозою *in vitro* [7].

### Список літератури

1. Goldberg R.B. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications / R.B. Goldberg // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 94 (9). – P. 3171–3182.
2. Sokup A. Adhesion molecules in type 2 diabetes / A. Sokup // Przegl Lek. – 2005. – Vol. 62 (4). – P. 234–237.
3. A down-regulatable E-selectin ligand is functionally important for PSGL-1-independent leukocyte-endothelial cell interactions / R.C. Zanardo, C.S. Bonder, J.M. Hwang [et al.] // Blood. – 2004. – Vol. 104 (12). – P. 3766–3773.

Хронічна гіперглікемія у експериментальних тварин підвищує експресію на лейкоцитах рецепторів адгезивних молекул – PSGL-1 і CD11a, що, у свою чергу, призводить до ескалації процесів ролінгу і адгезії лейкоцитів та робить вагомий внесок в розвиток судинних уражень при діабеті [7, 8]. Автори [15] вважають, що підвищення адгезії лейкоцит-ендотеліоцит є ключовим моментом в розвитку нефропатії, ретинопатії та атерогенезу у хворих на діабет і може визначатися рівнем і механізмом глікозування білків.

Аналіз отриманих результатів щодо експресії PSGL-1 моноцитами дозволяє з упевненістю говорити про порушення адгезивних властивостей цих клітин при ДН, особливо на початкових стадіях захворювання та в умовах гіперглікемії. Для більш конкретної відповіді щодо ролі рецептора селектину в виникненні та прогресуванні ДН потрібні більш комплексні дослідження. Проте не викликає сумніву, що ідентифікація морфологічних і біохімічних маркерів міжклітинної взаємодії повинна в перспективі сприяти більш глибокому розумінню механізмів патогенезу ДН, покращенню диференційної діагностики та створенню принципово нових напрямків терапії цього захворювання.

### Висновки

1. У хворих на діабетичну нефропатію вже на початкових стадіях хвороби має місце суттєве підвищення рівня експресії рецепторів селектину (PSGL-1) на моноцитах периферичної крові.
2. Прогресування захворювання не супроводжується подальшим зростанням кількості клітин, що експресують рецептори до селектину.
3. Інкубація ізольованих клітин з глюкозою *in vitro* стимулює експресію PSGL-1 моноцитами.

4. Leukocyte CD11b and CD62l expression in response to interstitial inflammation in CAPD patients / E. Dadfar, J. Lundahl, E. Fernvik [et al.] // *Perit. Dial Int.* – 2004. – Vol. 24 (1). – P. 28–36.
5. Risk factor correlates of platelet and leukocyte markers assessed by flow cytometry in a population-based sample / A.R. Folsom, N. Aleksic, A. Sanhueza, E. Boerwinkle // *Atherosclerosis.* – 2005. – Vol. 205. – P. 272–278.
6. Intercellular adhesion molecule-1 concentration is genetically correlated with insulin resistance, obesity, and HDL Concentration in Mexican Americans / J.W. Kent, A.G. Comuzzie, M.C. Mahaney [et al.] // *Diabetes.* – 2004. – Vol. 53. – P. 2691–2695.
7. Monocyte and neutrophil adhesion molecule expression during acute hyperglycemia and after antioxidant treatment in type 2 diabetes and control patients / M.J. Sampson, I.R. Davies, J.C. Brown [et al.] // *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.* – 2002. – Vol. 22(7). – P. 1187–1193.
8. Elevated soluble cell adhesion molecules E-selectin and intercellular cell adhesion molecule-1 in type-2 diabetic patients with and without asymptomatic peripheral arterial disease / T.A. Elhadd, G. Kennedy, R. Robb [et al.] // *Int. Angiol.* – 2004. – Vol. 23 (2). – P. 128–133.
9. Inflammatory markers, adiponectin, and risk of type 2 diabetes in the Pima Indian / K. Takahashi, S. Mizuarai, H. Araki [et al.] // *Diabetes Care.* – 2003. – Vol. 26. – P. 1745–1751.
10. Increased platelet–monocyte aggregates and cardiovascular disease in end-stage renal failure patients / N. Ashman, M.G. Macey, S.L. Fan, U. Azam // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2003. – Vol. 18. – P. 2088–2096.
11. A novel apoptosis-inducing anti-PSGL-1 antibody for T cell-mediated diseases / C.C. Huang, Y.F. Lu, S.N. Wen, W.C. Hsieh // *Eur. J. Immunol.* – 2005. – Vol. 35 (7). – P. 2239–2249.
12. *Williams T.M.* Macrophages in renal development, injury, and repair / T.M. Williams, M.H. Little, S.D. Ricardo // *Semin Nephrol.* – 2010. – Vol. 30 (3). – P. 255–267.
13. Leukocytes in diabetic retinopathy / R. Chibber, B.M. Ben-Mahmud, S. Chibber, E.M. Kohner // *Current Diabetes Reviews.* – 2007. – Vol. 3. – P. 3–14.
14. *Wang Y.* Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease / Y. Wang, Y.P. Wang, G. Zheng // *Kidney international.* – 2007. – Vol. 72. – P. 290–299.
15. Protein kinase C beta-2-dependent phosphorylation of core 2 GlcNAc-T promotes leukocyte-endothelial cell adhesion: a mechanism underlying capillary occlusion in diabetic retinopathy / R. Chibber, B.M. Ben-Mahmud, G.E. Mann [et al.] // *Diabetes.* – 2003. – Vol. 52 (6). – P. 1519–1527.

***В.Ю. Гальчинская, И.И. Топчий, Н.В. Ефимова, П.С. Семеновых, Е.Л. Борисова***

**ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ СЕЛЕКТИНА PSGL-1 НА МОНОЦИТАХ ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ**

На изолированных моноцитах, выделенных из периферической крови больных с диабетической нефропатией и здоровых доноров, изучали экспрессию рецепторов селектина PSGL-1. Уже на начальных стадиях болезни имеет место существенное повышение уровня экспрессии рецепторов к селектину на моноцитах периферической крови. Прогрессирование заболевания сопровождается снижением экспрессии PSGL-1. Активация и адгезия моноцитов способствует возникновению осложнений сахарного диабета, лабораторным признаком которых может служить нарушение экспрессии рецепторов селектина.

***Ключевые слова:*** диабетическая нефропатия, молекулы межклеточной адгезии, PSGL-1.

***V.Yu. Galchinskaya, I.I. Topchij, N.V. Efimova, P.S. Semenovich, Ye.L. Borisova***

**SELECTIN RECEPTOR PSGL-1 EXPRESSION ON MONOCYTES IN DIABETIC NEPHROPATHY**

On isolated peripheral blood monocytes of patients with diabetic nephropathy and healthy donors investigated selectin receptors (PSGL-1) expression. An essential elevation of selectin receptors expression on peripheral blood monocytes was found already at initial stages of DN. Progression of the disease was accompanied by decrease of PSGL-1 expression. Activation and adhesion of monocytes may contribute to diabetic complications, selectin receptors expression may be laboratory sign of such changes.

***Key words:*** diabetic nephropathy, intercellular adhesion molecules, PSGL-1.

*Поступила 08.10.13*