

Мембраноатакующий комплекс как показатель гиперактивации комплемента при сахарном диабете 2 типа

¹Аракелова Э.А., ¹Овсепян М.Р., ¹Бояджян А.С., ¹Аракелян А.А., ²Геворкян А.А., ²Мамиконян А.А.

¹Институт молекулярной биологии, Ереван
(директор – проф. А.С. Бояджян)

²Медицинский центр «Армения», Ереван
(директор – проф. Г.Г. Григорян)

Цель. Анализ уровней конечного продукта активации системы комплемента – мембраноатакующего комплекса (МАК), а также гемолитических активностей C1 и C3 компонентов комплемента в крови больных сахарным диабетом 2 типа (СД2) и здоровых лиц.

Материалы и методы. Субъектами исследования являлись 37 больных СД2 (женщин – 20, мужчин – 17; средний возраст – 58 ± 9 лет ($M \pm \delta$)) и 37 здоровых лиц без наследственной отягощенности сахарным диабетом (женщин – 20, мужчин – 17, средний возраст – 52 ± 12 лет ($M \pm \delta$)). Определение уровней МАК в образцах сыворотки крови субъектов исследования проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). При определении гемолитических активностей C1 и C3 компонентов комплемента в качестве субстрата использовали эритроциты барана, сенсибилизированные кроличьими антителами, и дефицитные по этим компонентам сыворотки.

Результаты. Согласно полученным данным, у больных СД2 средние значения всех вышеотмеченных параметров достоверно превышали таковые у здоровых лиц.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют, что патогенез СД2 характеризуется гиперактивацией системы комплемента, включая классический и терминальный каскад, и гиперпродукцией его цитотоксических продуктов.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, мембраноатакующий комплекс, система комплемента

The membrane attack complex as an indicator of complement hyperactivation in type 2 diabetes mellitus

¹Arakelova E.A., ¹Ovsepian M.R., ¹Boyadzhyan A.S., ¹Arakelyan A.A., ²Gevorkyan A.A., ²Mamikonyan A.A.

¹Institute of Molecular Biology, Erevan

²Armenia Medical Centre, Erevan

Aim. Comparative analysis of the levels of the membrane attack complex (MAC) – an end product of complement activation, and of hemolytic activities of C1 and C3 complement components in sera of patients with diabetes mellitus 2 (DM2) and healthy subjects.

Materials and methods. 37 DM2 patients (7 men, 26 women, mean age 58 ± 9 years ($M \pm \delta$)) and 37 healthy subjects without a family history of hereditary diabetes (17 men, 20 women, mean age 52 ± 12 years). Serum MAC levels were measured by ELISA, C1 and C3 hemolytic activities by using rabbit antibody-sensitized ram erythrocytes and C1, C3-deficient sera.

Results. Mean values of all measured parameters in DM2 patients were significantly higher than in controls.

Conclusion. Pathogenesis of DM2 is characterized by hyperactivation of the complement system including both the classical and terminal cascades and by hyperproduction of its cytotoxic products.

Key words: type 2 diabetes mellitus, membrane attack complex, complement system

Комплемент является важным фактором врожденного иммунитета, играющим существенную роль в развитии иммунных и воспалительных реакций. Представляя собой первичный барьер на пути развития инфекционных процессов, инициируя огромное разнообразие клеточных и гуморальных реакций и межмолекулярных взаимодействий, формирующих иммунный ответ, комплемент, по сути, является цитотоксичной системой защиты организма, обеспечивающей в норме элиминацию инородных патогенов, токсических продуктов тканевого распада, опсонизацию некротических и апоптотических клеток, облегчая их захват фагоцитами, индукцию и усиление воспаления, а также секрецию иммунорегуляторных молекул и удаление из кровотока иммунных комплексов. Однако неконтролируемая активация комплемента, приводящая к гиперпродукции опсонов, медиаторов воспалительных процессов и цитолитических комплексов, в патологических условиях может приводить к повреждению здоровых тканей организма [1–6].

Система комплемента активируется в каскаде протеолитических реакций и состоит из более чем 60 растворимых и мембраносвязанных белков, включая рецепторы и регуляторы. Существуют три пути активации комплемента – классический, альтернативный и лектиновый, отличающиеся составом

компонентов и пусковыми механизмами. Конечный этап, так называемый терминальный каскад комплемента, идентифицирован для всех трех путей. Этот каскад запускается расщеплением C3 компоненты комплемента на активные фрагменты под действием C3-конвертазы (продукта активации всех трех путей) и приводит к формированию мембраноатакующего комплекса (C5b-9; МАК) или конечного продукта активации комплемента. Встраиваясь в плазматическую мембрану, МАК приводит к ее перфорации и лизису клетки. МАК может также выступать триггером апоптоза, инициировать продукцию клетками медиаторов воспаления, цитокинов, простагландинов, тромбоксанов, лейкотриенов, активных форм кислорода и экспрессию адгезивных молекул [1–6].

Нарушения иммунного статуса организма вносят существенный вклад в патогенез обоих типов сахарного диабета (СД) [7–9]. Хорошо известно, что преждевременная инвалидность и смертность больных СД 2 типа (СД2) в первую очередь связана с его макроваскулярными осложнениями (атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, острый инфаркт миокарда, инсульт, гангрена нижних конечностей и пр.), индуцирующими развитие воспалительных реакций [10, 11]. С другой стороны, гиперактивация иммунного ответа организма, индуцируемая окислительным стрессом или рядом других факторов, приводит

к дисфункции инсулинпродуцирующих бета-клеток и инсулинорезистентности [12, 13], способствуя развитию СД2.

В связи с вышеизложенным, представляется интересным изучение функционального состояния системы комплемента при СД2. Результаты наших предыдущих исследований свидетельствуют о значительном повышении в крови больных СД2 активности классического и альтернативного каскадов комплемента [14]. В настоящей работе мы провели сравнительный анализ уровней МАК, а также гемолитической активности С1 и С3 компонентов комплемента в крови больных вышеотмеченным заболеванием. В исследование были также включены здоровые лица (ЗЛ) в качестве контроля.

Методы

Субъектами исследования являлись 37 больных СД2 (женщин – 20, мужчин – 17; средний возраст – 58 ± 9 лет ($M \pm \delta$)) и 37 здоровых лиц без наследственной отягощенности СД (женщин – 20, мужчин – 17, средний возраст – 52 ± 12 лет ($M \pm \delta$)). Больные состояли на учете в Научно-медицинском центре «Армения» МЗ РА. Диагностирование пациентов проводили врачи вышеуказанного учреждения согласно Международной классификации болезней (10 издание, МКБ-10). Средняя длительность заболевания диабетом у больных СД2 составляла 11 ± 7 лет ($M \pm \delta$). У всех больных СД2 наблюдалось тяжелое течение заболевания, сопровождающееся осложнениями, характерными для поздних этапов развития диабета (макроангио-, микроангио- и нейропатии). Группу ЗЛ (без наследственной отягощенности инсультом, инфарктом миокарда и СД) добровольно составили сотрудники НАН РА. Никто из субъектов исследования не страдал онкологическими или аутоиммунными заболеваниями, не переносил инсульт или инфаркт миокарда, острых инфекционных заболеваний, не подвергался хирургическим операциям и не принимал препараты иммуномодуляторного действия как минимум за 12 месяцев до проведения настоящего исследования. Взятие крови было проведено с согласия больных или их близких, а также с разрешения Комитета по этике Института молекулярной биологии НАН РА.

Забор крови проводили в 9:00 часов натощак пункцией из локтевой вены. Пробы сразу помещали в лед, затем центрифугировали при 3000g в течение 10 минут и отбирали сыворотку, которую использовали в последующих экспериментах. Образцы сыворотки хранили при -30°C .

Определение уровней МАК в образцах сыворотки крови субъектов исследования проводили ранее описанным нами методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) [15]. В качестве связывающих антител были использованы мышиные моноклональные антитела, специфичные к неопитопам С9 компоненты МАК, экспонированной на поверхности еще не включенных в мембраны водорастворимых МАК. Связанные с антителами МАК обнаруживали при использовании кроличьих антител (конъюгированных с пероксидазой хрена), полиспецифичных к другой компоненте МАК – белку S, и о-фенилендиамин дигидрохлорида (в 3% перекиси водорода) в качестве субстрата. Измерения проводили при использовании прибора «Stat Fax 3200» (Awareness Technology Inc., USA) на микропланшетах с 96 ячейками, при длине волны 492 нм. Калибровку проводили при использовании стандартной сыворотки с известной концентрацией МАК. Концентрацию МАК выражали в микрограммах на 1 мл сыворотки (мкг/мл).

Гемолитическую активность С1 и С3 компонентов комплемента определяли ранее описанным методом при использовании эритроцитов барана, сенсibilизированных кроличьими антителами в качестве субстрата и дефицитных по этим компонентам сывороток [16]. С1-дефицитную сыворотку получали аффинной хроматографией сыворотки крови

человека как описано ранее [17]. С3-дефицитную сыворотку получали обработкой сыворотки крови морской свинки зимоаном ранее описанным методом [18]. Активность выражали в процентах лизированных эритроцитов (% лизиса). Долю лизированных эритроцитов определяли с учетом их спонтанного лизиса (контроль) и рассчитывали по отношению к 100% лизису (положительный контроль). Измерения проводили при длине волны 414 нм на спектрофотометре CE-292 (Cesil Instruments Ltd., UK).

Статистическую обработку полученных данных, включающую непараметрический U-тест Манна–Уитни, проводили используя программный пакет «SPSS-13». Значения $p < 0,05$ были приняты как статистически достоверные.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований было установлено, что уровни МАК в крови больных СД2 в среднем в 1,6 раза достоверно превышают уровни МАК в крови ЗЛ. Уровни С1 и С3 компонентов комплемента в крови больных СД2 в среднем в 2,2 раза превышали аналогичные параметры ЗЛ. Результаты статистического анализа полученных данных представлены в таблице 1.

С1q является начальным звеном классического каскада комплемента, С3 является начальным звеном альтернативного каскада комплемента и, одновременно, как уже было отмечено, мишенью С3-конвертазы, запускающей терминальный каскад комплемента [1–6]. Полученные нами данные подтверждают результаты наших предыдущих экспериментов, свидетельствующих о гиперактивации альтернативного и классического каскадов комплемента при СД2, а кроме того, представляют убедительные доказательства гиперактивации терминального каскада комплемента при отмеченном заболевании. Наши данные находятся в соответствии с результатами ранее опубликованных иммуногистохимических исследований, выявивших накопление промежуточного и конечного продуктов активации комплемента С3d и МАК, соответственно, на стенках эндоневральных микрососудов и микрососудов сетчатки у больных СД [19, 20].

Таким образом, очевидно, что при СД2, на этапе поздних осложнений происходит гиперактивация системы комплемента, включая его альтернативный, классический и терминальный каскады, и гиперпродукция его цитотоксических продуктов.

Гиперактивность системы комплемента при СД2 может быть обусловлена комплексом гормонально-метаболических и генетических нарушений, наблюдающихся при данной патологии [21–23]. С другой стороны, накопление продуктов активации системы комплемента может в значительной степени способствовать дальнейшему прогрессированию заболевания.

В основе хронических осложнений СД2 лежит повреждение стенок микрососудов, а также нарушение тромбоцитарно-сосудистого и гуморального звеньев системы гемостаза [11, 24]. Это меняет их антигенные и функциональные характеристики, вызывает нарушение проницаемости и прочности стенки сосуда, развитие в ней иммунопатологических реакций, сужение просвета сосудов и уменьшение площади их внутренней поверхности, развитие отека, сужение просвета микрососудов и углубление в них дистрофических процессов [11, 24]. Очевидно, что наряду с другими факторами, сверхпродукция хе-

Таблица 1

Уровни МАК, С1 и С3 компонент комплемента в крови больных СД2 и ЗЛ			
Исследуемая группа	МАК, мкг/мл	С1, % лизиса	С3, % лизиса
ЗЛ	$6,9 \pm 1,7^a$	$9,8 \pm 1,2^c$	$4,0 \pm 0,9^e$
СД2	$11,1 \pm 3,0^b$	$21,5 \pm 5,0^d$	$9,0 \pm 1,9^f$

^{a,b} – $p < 0,0007$; ^{c,d} – $p < 0,0018$, ^{e,f} – $p < 0,015$

мотоксинов, опсопинов, анафилатоксинов и МАК в результате гиперактивации системы комплемента может в значительной степени способствовать прогрессированию отмеченных патологических изменений.

Так, например, вопрос о причинной взаимосвязи между уровнем гликемии и риском развития хронических осложнений при СД2 получил свое реальное клиническое выражение в соотношении уровня компенсации углеводного обмена и частоты развития микро- и макроангиопатий. Показано, что риск развития сосудистой патологии при СД2 значительно возрастает даже при незначительном повышении (на 1%) уровня гликированного гемоглобина [25]. В этой связи интересно отметить, что помимо цитотоксических эффектов, встраивание МАК в мембраны клеток сосудистого эндотелия приводит к высвобождению факторов роста, стимулирующих пролиферацию клеток, способных также при длительном воздействии индуцировать гипертрофию и тромбогенную трансформацию сосудистой стенки [1–6]. В норме продукция МАК, даже в условиях гиперактивации системы комплемента, находится под контролем регуляторного белка CD59, способного препятствовать формированию МАК в процессе активации комплемента [26, 27]. Однако, как свидетельствуют экспериментальные данные, в гликированном состоянии CD59 теряет способность ингибировать образование МАК [28–30]. Это факт представляет непосредственный интерес в свете полученных нами данных, поскольку, как известно, для патогенеза СД2 характерны повышение пролиферации гладкомышечных клеток сосу-

дов и ретинальных эндотелиальных клеток и, как результат, гипертрофия и тромбогенная трансформация сосудистой стенки, приводящие к нарушению проницаемости сосудов и ангиопатиям [11, 24].

Кроме того, показано, что, как свидетельствуют клинические и экспериментальные данные, для СД2 характерна интенсификация апоптоза в нейрональной и сосудистой ткани, стимулирующая развитие ретинопатии [31, 32]. В этой связи и основываясь на полученных нами данных, не исключено, что определенный вклад в этот процесс вносят продукты протеолитической активации C3 и C4 компонентов комплемента (C3b, C4b, iC3b и C3dg), являющиеся известными триггерами апоптоза [1–6].

Таким образом, основываясь на полученных нами и вышеприведенных данных, можно заключить, что один из механизмов развития сосудистых осложнений СД2, индуцируемых, в частности, гипергликемией, может заключаться в гликировании ингибитора МАК и переводе его в неактивное состояние.

С другой стороны, вышеописанные патологические изменения в сосудистой ткани, а также множество других метаболических и гормональных нарушений, характерных для СД2, могут, в свою очередь, активировать систему комплемента, приводя к накоплению физиологически активных продуктов протеолиза компонентов комплемента (медиаторов воспаления, триггеров апоптоза и факторов, повышающих проницаемость сосудов), способствующих дальнейшему прогрессированию осложнений СД2.

Литература

- Volanki J.E., Frank M.M. The human complement system in health and disease // Mircel Dekker. – Inc, New York, 1998.
- Sakamoto M., Fujisawa Y., Nishioka K. Physiologic role of the complement system in host defense, disease, and malnutrition // Nutrition. – 1998. – V. 14 (4). – P. 391–398.
- Sim R.B., Laich A. Serine proteases of the complement system // BiochemSoc. Trans. – 2000. – V. 28 (5). – P. 545–550.
- Mollnes T.E., Song W.C., Lambris J.D. Complement in inflammatory tissue damage and disease // Trends Immunol. Today. – 2002. – V. 23 (2). – P. 61–66.
- Cole D.S., Morgan B.P. Beyond lysis: how complement influences cell fate // Clin. Sci. – 2003. – V.104 (5). – P. 455–466.
- Nauta A.J., Roos A., Daha M.R. A regulatory role for complement in innate immunity and autoimmunity // Int. Arch. Allergy Immunol. – 2004. – V. 134 (4). – P. 310–323.
- Handwerker B.S., Fernandes G., Brown D.M. Immune and autoimmune aspects of diabetes mellitus // Hum. Pathol. – 1980. – V. 11 (4). – P. 338–352.
- Pino S.C., Kruger A.J., Bortell R. The role of innate immune pathways in type 1 diabetes pathogenesis // Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. – 2010. – V. 17 (2). – P. 126–130.
- Donath M.Y., Shoelson S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease // Nat. Rev. Immunol. – 2011. – V.11 (2). – P. 98–107.
- Barış N., Erdoğan M., Sezer E., Saygılı F., Mert Özgönül A., Turgan N., Ersöz B. Alterations in L-arginine and inflammatory markers in type 2 diabetic patients with and without microalbuminuria // Acta Diabetol. – 2009. – V. 46 (4). – P. 309–316.
- Huysman E., Mathieu C. Diabetes and peripheral vascular disease // Acta Chir. Belg. – 2009. – V. 109 (5). – P. 587–594.
- Kaneto H., Matsuoka T.A., Nakatani Y., Kawamori D., Miyatsuka T., Matsuhisa M., Yamasaki Y. Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes // J. Mol. Med. – 2005. – V.83 (6). – P. 429–439.
- Solinas G., Vilcu C., Neels J.G., Bandyopadhyay G.K., Luo J.L., Naulger W., Grivennikov S., Wynshaw-Boris A., Scadeng M., Olefsky J.M., Karin M. JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity // Cell Metab. – 2007. – V. 6 (5). – P. 386–397.
- Овсеян М.Р., Бояджян А.С., Оганесян Л.П., Мамиконян А.А., Геворкян А.А. Активация системы комплемента по классическому и альтернативному пути при длительном течении сахарного диабета 2-го типа // Проблемы эндокринологии (Москва). – 2006 (6). – С. 14–17.
- Morgan B.P., Daniels R.H., Williams B.D. Measurement of terminal complement complexes in rheumatoid arthritis // Clin. Exp. Immunol. – 1988. – V. 73. – P. 473–478.
- Watford W.T., Ghio A.J., Wright J.R. Complement-mediated host defense in the lung // Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. – 2000. – V. 279 (5). – P. 790–798.
- Daha M.R. Purification of complement component / In Doods, A.W. and Sim, R.B. eds: Complement. A practical approach. Oxford University press, Oxford. – 1997. – P. 121–133.
- Morgan B.P. Measurement of complement hemolytic activity, generation of complement-depleted sera, and production of hemolytic intermediates / In: Morgan, B.P. ed. Methods in molecular biology. Complement methods and protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey. – 2000. – V. 150. – P. 61–71.
- Rosoklija G.B., Dwork A.J., Younger D.S., Karlikaya G., Latov N., Hays A.P. Local activation of the complement system in endoneurial microvessels of diabetic neuropathy // Acta Neuropathol. – 2000. – V. 99 (1). – P. 55–62.
- Gerl V.B., Bohl J., Pitz S., Stoffels B., Pfeiffer N., Bhakdi S. Extensive deposits of complement C3d and C5b-9 in the choriocapillaris of eyes of patients with diabetic retinopathy // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2002. – V.43 (4). – P. 1104–1108.
- Галстян Г.Р. Метаболические нарушения при сахарном диабете 2 типа и методы их коррекции // Русский медицинский журнал. – 2001. – Т. 9 (24). – С. 1098–1100.
- DeFronzo R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus // Med. Clin. N. Am. – 2004. – V. 88. – P. 787–835.
- Ahlqvist E., Ahluwalia T.S., Groop L. Genetics of type 2 diabetes // Clin. Chem. – 2011. – V. 57 (2). – P. 241–254.
- McMillan D.E. Development of vascular complications in diabetes // Vasc. Med. – 1997. – V. 2 (2). – P. 132–142.
- UKPDS Group. Intensive blood glucose control with sulphonylurea or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes // Lancet. – 1998. – V. 352. – P. 837–853.
- Acosta J., Qin X., Halperin J. Complement and complement regulatory proteins as potential molecular targets for vascular diseases // Curr. Pharm. – 2004. – V. 10 (2). – P. 203–211.
- Huang Y., Smith C.A., Song H., Morgan B.P., Abagyan R., Tomlinson S. Insights into the human CD59 complement binding interface toward engineering new therapeutics // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280 (40). – P. 34073–34079.

28. Acosta J., Hettinga J., Fluckiger R., Krumrei N., Goldfine A., Angarita L., Halperin J. Molecular basis for a link between complement and the vascular complications of diabetes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – V. 97 (10). – 5450–5455.
29. Qin X., Goldfine A., Krumrei N., Grubissich L., Acosta J., Chorev M., Hays A.P., Halperin J.A. Glycation inactivation of the complement regulatory protein CD59. A possible role in the pathogenesis of the vascular complications of human diabetes // *Diabetes.* – 2004. – V. 53. – P. 2653–2661.
30. Cheng Y., Gao M. The effect of glycation of CD59 on complement-mediated cytotoxicity // *Cell. Mol. Immunol.* – 2005. – V. 2 (4). – P. 313–317.
31. Barber A.J., Gardner T.W., Abcouwer S.F. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2011. – V. 52 (2). – P. 1156–1163.
32. Park S.H., Park J.W., Park S.J., Kim K.Y., Chung J.W., Chun M.H., Oh S.J. Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina // *Diabetologia.* – 2003. – V. 46 (9). – P. 1260–1268.

Аракелова Элина Александровна
Овсепян Мери Робертовна

м.н.с., Институт молекулярной биологии, Ереван
к.б.н., научный сотрудник лаборатории макромолекулярных комплексов, Институт молекулярной биологии, Ереван

Бояджян Анна Суреновна

д.б.н., проф., зав. лабораторией макромолекулярных комплексов и директор, Институт молекулярной биологии, Ереван

E-mail: aboyajyan@sci.am

Аракелян Арсен Арташесович
Геворкян Астхик Артаваздовна
Мамиконян Ашот Андреевич

к.б.н., зав. группой биоинформатики, Институт молекулярной биологии, Ереван
к.м.н., врач-эндокринолог отделения эндокринологии, Медицинский центр «Армения», Ереван
д.м.н., проф., зав. отделением эндокринологии, Медицинский центр «Армения», Ереван