

© Барінова М.Е., Сулаєва О.М.

УДК 616-001.4 : 612.349 + 616.155.34 + 612.017.1

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ ТИРОЗИНОВИМ ФОСФОРИЛУВАННЯМ І ПРОДУКЦІЄЮ ЦИТОКІНІВ НЕЙТРОФІЛАМИ ПРИ РІЗНИХ ВАРІАНТАХ ПЕРЕБІГУ РАНОВОГО ПРОЦЕСУ ЗА УМОВ ІНСУЛІНОВОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ

М.Е.Барінова, О.М.Сулаєва

Кафедра дерматовенерології (зав. – проф. Р.Ф.Айзятуллов) Донецького національного медичного університету ім. М.Горького

Резюме. Проведена оцінка параметрів тирозинового фосфорилювання і регуляторної функції нейтрофілів у хворих на цукровий діабет II типу із загоєнням (n=16) і тривалим незагоєнням (n=13) ран стопи. Різні варіанти перебігу ранового процесу супроводжуються формуванням різних кореляційних зв'язків між активністю тирозинкіназ, тирозинфосфатаз і продукцією нейтрофілами ІЛ-1, ФНП та ІЛ-6, що віддзеркалює різний ступінь дезрегуляції внутрішньоклітинних сигнальних систем та індивідуальні особливості реактивності організму.

Ключові слова: цукровий діабет, тирозинове фосфорилювання, нейтрофіли, цитокіни.

Порушення імунологічного гомеостазу, що лежить в основі гнійних ускладнень цукрового діабету (ЦД) II типу, є одним із проявів дезрегуляторного синдрому [1], ініціальним чинником якого є зниження чутливості інсулінових рецепторів (ІР). Порушення реалізації сигналів, що запускаються з ІР, супроводжується зміною тирозинового фосфорилювання (ТФ) та рівня внутрішньоклітинного Ca^{2+} [2], який бере участь у регуляції таких параметрів функціонування лейкоцитів, як адгезія, міграція, фагоцитоз, секреторна активність [3]. Завдяки цитокіновій продукції нейтрофіли (НФ) здатні регулювати власну фагоцитарну активність, киснево-незалежні процеси й апоптоз, а також впливати на діяльність інших клітин (ендотелію, моноцитів/макрофагів, опасистих клітин, фібробластів та ін.) [4], оптимізуючи перебіг запально-репаративного процесу. Постає питання – яким чином зміна параметрів ТФ відбивається на функціональному стані НФ при гнійному запаленні за умов ЦД II типу і яка специфіка співвідношень між цими параметрами за умов загоєння ранової поверхні або його порушення?

Мета дослідження. З'ясувати взаємозв'язок між динамікою продукції цитокінів нейтрофілами протягом ранового процесу і станом ТФ

при різних варіантах перебігу ранового процесу за умов інсулінової резистентності.

Матеріал і методи. Проаналізовано результати лікування гнійно-некротичного ураження нижніх кінцівок у 29 хворих на ЦД II типу з нейропатичною та змішаною формами синдрому діабетичної стопи. Обстежено 14 чоловіків і 15 жінок, вік хворих – від 20 до 78 ($62,3 \pm 6,5$) років. Тривалість захворювання становила $10,5 \pm 3,2$ років. У 16 (55,2 %) пацієнтів (1 група) розтин флегмони з висіченням нежиттєздатних тканин сприяв загоєнню рани. У 13 (44,8 %) пацієнтів (2 група) у процесі лікування виникла необхідність виконання багатоетапної некректомії локальних вогнищ вторинного некрозу і мало місце пролонгування (понад місяць) ранового процесу. Консервативне лікування в обох групах проводили з використанням загальноприйнятих методів [5]. НФ виділяли з периферичної крові хворих на ЦД шляхом центрифугування (протягом 30 хв при 400 g) на подвійному градієнті фіколу-верографіну (1,077 і 1,093). Завись НФ після відмивання розводили середовищем 199 до концентрації $5 \cdot 10^6$ клітин у 1 мл. Супернатанти фільтрували через фільтри (діаметр пор $0,24$ мкм). Контролем були НФ, виділені з крові 10 добровольців-донорів. Для одержання активованих НФ у пробірку вносили суспензію часток полістерольного латексу (діаметр $1,5$ мкм) з розрахунку 108 часток на 1 мл суспензії. НФ інкубували з латексом протягом години при $37^\circ C$, потім центрифугували при 1500 об/хв протягом 15 хв. Вміст

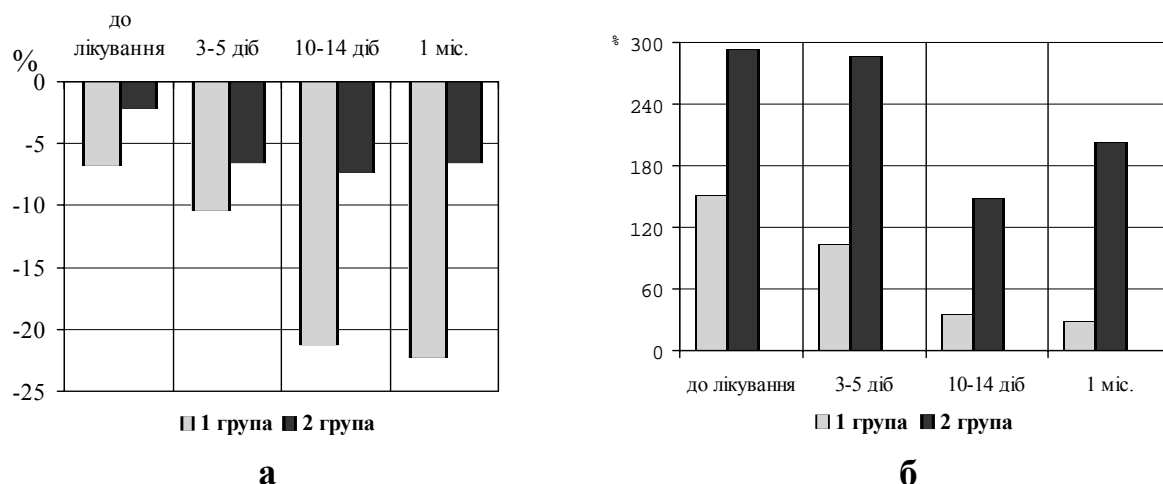


Рис. Модулюючі ефекти інгібіторів тирозинкінази (а) і тирозинфосфатази (б) на АТФ-індуковану агрегацію тромбоцитів у хворих на цукровий діабет із загоєнням (1 група) та тривалим незагоєнням (2 група) ран стопи в динаміці лікування. На осі ординат – ступінь зміни агрегації тромбоцитів (у %) відносно контролю (інкубація з АТФ), прийнятого за 100 %.

цитокінів (ІЛ-1, ФНП і ІЛ-6) визначали імуноферментним методом. З огляду на універсальний характер зміни ТФ в умовах інсулінової резистентності, про динаміку ТФ судили за зміною агрегації тромбоцитів (АТ) за умов їхньої інкубації з інгібіторами тирозинкінази (ТЗК) і тирозинфосфатази (ТЗФ). Для виділення тромбоцитів (Тц) забирали кров з літрової вени в пластикові пробірки з кислим цитратдекстрозним антикоагулянтом у співвідношенні його і крові – 1:6. Виділені шляхом центрифугування і відмиті Тц суспендували в буферному розчині такого складу (мкМ): NaCl (138), KCl (3), MgCl₂ (1), глюкоза (10), НЕРЕС (10), Na₂PO₄ (0,37), р 7,4. Суспензію ділили на три пробірки, у кожен з яких вносили 200 мкМ АТФ, ліганд Р_{2U}-рецепторів, що генерує Ca²⁺ сигнал у Тц. У такий спосіб АТ дозволяла побічно судити про внутрішньоклітинний вміст Ca²⁺. Через 3 хв у другу пробірку додавали 100 мкМ геністейну (ГСТ, специфічний інгібітор ТЗК), у третю – 25 мкМ феніларзиноксиду (ФАО, блокатор ТЗФ). Функціональну відповідь Тц реєстрували модифікованим методом G.Vorn шляхом вимірювання оптичної щільності світлового потоку, що проходить через суспензію Тц, на спектрофотометрі СФ-46. У досліджах використовували маткові розчини ГСТ (100 мМ) і ФАО (20 мМ), що готували в диметилсульфоксиді. У роботі використані реактиви фірми "Sigma" (США). Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики із застосуванням кореляційного аналізу.

Результати дослідження та їх обговорення. У пацієнтів 1-2 груп на момент госпіталізації виявлено зниження рівня внутрішньоклітинного Ca²⁺ відповідно в 4 і 7 разів. Даний фено-

мен зумовлений порушенням балансу ТФ внаслідок зниження активності ТЗК і підвищення ТЗФ (рисунок). З огляду на універсальний характер впливу балансу ТФ на рівень внутрішньоклітинного Ca²⁺ і системні зміни інсулінової рецепції в організмі за умов ЦД, отримані in vitro на суспензії Тц дані можуть бути екстрапольовані на інші клітини, зокрема й на НФ. Зміна рівня Ca²⁺ і балансу ТФ асоційована з порушенням діяльності НФ: незважаючи на те, що НФ периферичної крові хворих на ЦД знаходилися в активованому стані, рівень їхньої функціональної активності, і зокрема продукції цитокінів, виявився вірогідно нижчим, ніж у контролі. Так, дефіцит продукції ІЛ-1, ФНП і ІЛ-6 порівняно з активованими НФ здорових людей становив відповідно 32,3 %, 12,1 % і 20,5 % – у 1 групі, 43,1 %, 25,5 % і 14,6 % – у 2 групі.

Під впливом терапевтичних заходів у 1-й групі відзначено поступове відновлення рівня ТФ (і внутрішньоклітинного Ca²⁺): на 3-5 добу – внаслідок зниження активності ТЗФ, а з 10-14 доби – за рахунок підйому активності ТЗК на фоні триваючого зниження активності ТЗФ. Ці зміни супроводжувалися стимуляцією запальної реакції з завершенням альтеративної фази запалення в рані й активацією репаративної регенерації тканин ранового дефекту з 10-14 доби, результатом чого було загоєння ран через 18-24 діб після початку лікування. Виявлено взаємозв'язок між підвищенням продукції ІЛ-1 (на 3-5 добу лікування) і зниженням актив-

ності ТЗФ ($r=-0,860$; $p<0,01$), а також стимуляцією продукції ІЛ-6 (з 10-14-добы) і активацією ТЗК ($r=+0,759$). Ці дані демонструють селективність взаємозв'язку між різними ланками системи ТФ та цитокінпродукуючою функцією НФ.

У 2-й групі зареєстровані інші параметри ТФ і цитокінової секреції у динаміці лікування. У хворих із синдромом тривалого незагоєння ран стопи на момент госпіталізації зареєстрований низький рівень активності ТЗК, що позитивно корелював з вираженням (на 43,1 % і 25,5 %) дефіцитом продукції ІЛ-1 і ФНП (відповідно $r_1=+0,725$; $r_2=+0,631$). На 3-5 добу лікування не виявлено впливу ТФ на цитокінову продукцію НФ: невірогідна зміна продукції ІЛ-1 і незначний (у порівнянні з 1-ю групою) підйом рівнів ФНП на 15,5 % і ІЛ-6 на 7,6 % ($p_{1,2}<0,05$) асоційовані з толерантністю активності ТЗК і ТЗФ, а також з відсутністю наочного ефекту проведеної терапії у даний термін спостереження. Статистично значиме зниження активності ТЗФ на 10-14 добу обернено корелювало з приростом продукції ІЛ-1 (на 34,8 %, $p<0,01$, $r=-0,910$) і ІЛ-6 (на 96,5 %, $p<0,001$, $r=-0,730$), прямо – зі зниженням концентрації ФНП (на 17,6 %, $p<0,05$, $r=+0,814$). Проте наприкінці місяця на фоні відсутності вираженої динаміки активності ТЗК і ТЗФ зареєстровані: виражений підйом продукції ІЛ-1, підвищення секреції ФНП і ІЛ-6. Причому рівень ІЛ-6 перевищив показник активованих НФ донорів на 136,6 % ($p<0,001$).

Багато показників функціональної активності НФ є Ca^{2+} -залежними параметрами [3]. У свою чергу, контроль внутрішньоклітинного Ca^{2+} -гомеостазу є багатофакторною динамічною системою, у формуванні якої беруть участь різні внутрішньоклітинні сигнальні системи, що ініціюють активність протеїнкіназ А, В, С і G [6]. Роль тирозинкіназ і тирозинфосфатаз зводиться до модулювання ефектів агоністів, що впливають на транспорт Ca^{2+} через плазмолему чи його мобілізацію/закачування у внутрішньоклітинні депо [2]. В цілому внутрішньоклітинний рівень Ca^{2+} залежить від характеру взаємозв'язку і ступеня спряженості роботи даних внутрішньоклітинних сигнальних систем. Причому домінування ефекту кожної із зазначених систем сигналізації визначає не тільки динаміку рівня Ca^{2+} , але й специфіку функціональної активності НФ на різних етапах запального кас-

каду. З огляду на те, що ініціюючим патогенетичним чинником порушення функціонування лейкоцитів при ЦД II типу є порушення ТФ, важливо з'ясувати взаємозалежність між динамікою його параметрів і регуляторною функцією НФ.

Факти, виявлені в даній роботі, дозволяють констатувати: 1) зниження ТФ супроводжується пригніченням цитокінової продукції НФ; 2) у разі оптимальної терапевтичної корекції й адекватної реакції організму на лікування спостерігається відновлення ТФ, що супроводжується зміною регуляторної функції НФ, внаслідок чого запускається багатоступінчастий каскад механізмів запально-репаративного процесу, результатом якого є загоєння ранового дефекту; 3) стимуляція прозапальної активності НФ і продукції ними ключового цитокіну, що регулює ефективність гострої фази запалення і завершення альтерації ІЛ-1, асоційована зі зниженням активності ТЗФ; 4) підвищення тирозинкіназної активності на фоні терапії корелювало зі стимуляцією продукції ІЛ-6, що є координатором трансформації нейтрофільної фази запалення на моноцитарно-макрофагову, яка супроводжується очищенням рани і початком репарації ранового дефекту; 5) толерантність системи ТФ у хворих 2-ї групи веде до порушення спряженості даної системи сигналізації з цитокіновою продукцією, що обумовлює зміну характеру секреції цитокінів: відсутність реакції на ранніх етапах і пізній підйом продукції ІЛ-1, ФНП та ІЛ-6.

Наявність виражених кореляційних зв'язків між параметрами ТФ і цитокінової продукції у хворих на ЦД у динаміці ранового процесу змушує задуматися про молекулярні механізми її реалізації. Зміна ТФ може модулювати функцію НФ різними шляхами: 1) за рахунок прямого фосфорилування і дефосфорилування специфічних білків/ефекторних молекул, що визначають запуск і амплітуду секреції різних цитокінів [2]; 2) шляхом зміни внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} ; це не тільки прямо позначається на функціональній активності клітин, але й веде до запуску конкуруючих систем, що беруть участь у контролі Ca^{2+} -гомеостазу; 3) за допомогою регуляції чутливості рецепторів, зокрема й ІР, модулюючи ефективність впливу різних лігандів; наприклад, тирозинфосфатаза 1В

(РТР-1В) є негативним регулятором ланцюжка внутрішньоклітинної сигналізації, що запускається з IP [7]; 4) за рахунок зміни активності внутрішньоклітинних сигнальних систем, наприклад, активація ТЗК може стимулювати каскад серин-треонінових кіназ (зокрема, MAP-кіназ), що беруть участь у регуляції активності лейкоцитів і продукції ними цитокінів [1].

Необхідно підкреслити, що цитокіни можуть прямо чи опосередковано впливати на різні ланки системи тирозинового фосфорилування. Наприклад, ФНП стимулює експресію РТР-1В і сприяє підвищенню активності процесів дефосфорилування, зокрема рецепторів до інсуліну і розвитку інсулінової резистентності. ІЛ-1 стимулює звільнення арахідонової кислоти і синтез

її метаболітів, що не тільки модулюють рівень внутрішньоклітинного Ca^{2+} , але й здатні пригнічувати активність ТЗФ, потенціювати тим самим ефекти кіназ [7]. Крім того, показано, що толерантність до дії інсуліну і тривале пригнічення ТФ за умов ЦД супроводжується підвищенням продукції ІЛ-6 [8], у зв'язку з чим гіперсекреція даного цитокіну нині розглядається як одна з ознак інсулінової резистентності.

Висновок. За умов різного перебігу ранового процесу у хворих на цукровий діабет II типу виявлені особливості взаємозв'язку між тирозиновим фосфорилуванням і продукцією цитокінів нейтрофілами, що виражає індивідуальні особливості регуляції внутрішньоклітинних сигнальних систем.

Література

1. Paknys G., Kondrotas A.J., Kevelaitis E. *Diabetes mellitus and cellular immunity // Medicina.* – 2006. – V. 42, № 1. – P. 1-10.
2. Hunter T. *Tyrosine phosphorylation: past, present and future // Biochem. Soc. Trans.* – 1996. – V. 24, № 2. – P. 307-327.
3. Mastej K., Adamiec R. *Role of polymorphonuclear leukocytes in development vascular complications in diabetes // Pol. Merkur. Lekarski.* – 2006. – V. 20, № 1. – P. 36-40.
4. Долгушин И.И., Бухарин О.В. *Нейтрофилы и гомеостаз.* – Екатеринбург, 2001. – 278 с.
5. Антонюк С.М., Свиридов Н.В., Попандоупло А.Г. та ін. *Особливості хірургічного лікування хворих з ускладненими формами синдрому діабетичної стопи // Клін. хірургія.* – 2005. – № 10. – С. 36-40.
6. Marks A.R. *Intracellular calcium-release channels: regulation of cell life and death // Amer. J. Physiol.* – 1997. – V. 272, № 4. – P. 597-605.
7. Lobmann R., Schultz G., Lehnert H. *Molecular fundamentals of wound healing in diabetic foot syndrome // Med. Klin.* – 2003. – V. 98, № 3. – P. 292-301.
8. Kristiansen O.P., Mandrup-Poulsen T. *Interleukin-6 and diabetes // Diabetes.* – 2005. – V. 54, № 1. – P. 114-124.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ТИРОЗИНОВЫМ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕМ И ПРОДУКЦИЕЙ ЦИТОКИНОВ НЕЙТРОФИЛАМИ ПРИ РАЗНЫХ ВАРИАНТАХ ТЕЧЕНИЯ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА В УСЛОВИЯХ ИНСУЛИНОВОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Резюме. Проведена оценка параметров тирозинового фосфорилирования и регуляторной функции нейтрофилов у больных сахарным диабетом II типа с заживлением (n=16) и длительным незаживлением (n=13) ран стопы. Разные варианты течения раневого процесса сопровождаются формированием разных корреляционных связей между активностью тирозинкиназ, тирозинфосфатаз и продукцией ИЛ-1, ФНП и ИЛ-6, что отражает разную степень дисрегуляции внутриклеточных сигнальных систем и индивидуальные особенности реактивности организма.

Ключевые слова: сахарный диабет, тирозिनное фосфорилирование, нейтрофилы, цитокины.

RELATIONSHIP BETWEEN TYROSINE PHOSPHORYLATION AND CYTOKINE PRODUCTION BY NEUTROPHILS WITH DIFFERENT VARIANTS OF WOUND HEALING UNDER INSULIN RESISTANCE CONDITION

Abstract. An estimation of the parameters of tyrosine phosphorylation and the regulatory function of neutrophils has been carried out in patients with type 2 diabetes mellitus with healing (n=16) and prolonged non-healing (n=13) of foot wounds. Different variants of the wound process course are accompanied with the formation of various correlations between the activity of tyrosine kinases, tyrosine phosphatases and the production by neutrophils IL-1, TNF and IL-6, which reflects a diverse degree of dysregulation of intracellular signaling systems and the individual peculiarities of the organism's reactivity.

Key words: diabetes mellitus, tyrosine phosphorylation, neutrophils, cytokines.

M.Gorky National Medical University (Donetsk)

Надійшла 19.02.2007 р.
Рецензент – проф. С.А.Кашенко (Луганськ)