

РЕАКЦИЯ НА ИНСУЛИН И ГЛЮКОЗУ *IN VITRO* НЕЙТРОФИЛОВ ПАЦИЕНТОВ С ТЕРМИЧЕСКИМИ ТРАВМАМИ СОПРЯЖЕНА С ГЛИКЕМИЧЕСКИМ СТАТУСОМ *IN VIVO*

О.В. Петракова, О.Ю. Сыманович, Л.А. Хватова, И.Е. Гурманчук, М.Н. Маркевич
Белорусский государственный медицинский университет

В терапии пациентов с тяжелыми травмами, в том числе и термическими ожогами, важное место занимает снижение рисков развития сепсиса и других осложнений, вызванных травмой и бактериальной инвазией. В связи с этим, актуальным остается вопрос о состоянии иммунной системы и, в частности, о состоянии ее клеточного звена, ответственного за локальный иммунный ответ и предотвращение генерализации воспаления. Тяжелые травмы сопряжены с гипергликемией, которая косвенно отражает тяжесть состояния пациента, а также является важным прогностическим критерием [1, 3].

Большое количество исследований было проведено с целью поиска возможностей устранить данные риски, в том числе путем снижения воспалительного ответа, так как чрезмерное накопление медиаторов воспаления и системный характер воспаления могут приводить к полиорганной недостаточности. Как свидетельствуют исследования, проводимые ранее, регуляция экспрессии медиаторов воспаления, а, следовательно, и степени выраженности воспалительного ответа, осуществляется на клеточном уровне путем изменения активности транскрипционного фактора нуклеарного фактора κB (NF- κB). Так, показано, что активация NF- κB в ответ на связывание клеточных рецепторов с бактериальными компонентами, а также действие провоспалительных цитокинов, обеспечивают поддержание воспалительного процесса [2]. Безусловно, эти реакции являются нормальным ответом клетки, однако при сепсисе или системном воспалительном ответе, чрезмерная активация NF- κB и увеличение содержания активного комплекса в ядре в ряде случаев свидетельствует о тяжести состояния пациента и неблагоприятном прогнозе.

Цель исследования: проведение оценки влияния гипергликемии *in vivo* на адгезивную и метаболическую активность полинуклеаров пациентов с термическими травмами, а также активность NF- κB в данных клетках.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужила стабилизированная гепарином периферическая кровь пациентов с термическими травмами (II–III–IV степени тяжести), находящихся на лечении в ожоговом отделении УЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи». Непосредственно после доставки материала осуществлялось выделение популяции полинуклеаров (центрифугирование на градиенте плотности фикол-верографин). В исследование было включено 55 пациентов, средний возраст которых составлял 47 лет \pm 17 (от 20 до 82 лет). Площадь полученных ожогов была от 34,5% \pm 15,2 (от 10 до 70%) (наблюдались глубокие ожоги, ингаляционная травма), площадь глубоких ожогов составила 18,4% \pm 9,4 (от 0 до 40%). Забор материала для исследования (периферическая кровь) производили в период со 2 по 10-е сутки после получения травмы. В зависимости от количества инсулина, необходимого для удержания концентрации глюкозы в крови на уровне нормогликемии пациентов разделили на две группы. Группа 1 – пациенты с термическими травмами, для поддержания уровня глюкозы в крови которым был необходим инсулин в количестве не более 100 ЕД. Группа 2 — пациенты с термическими травмами, для поддержания уровня глюкозы в крови был необходим инсулин в количестве от 101 до 200 ЕД.

В работе оценивали спонтанную и модифицированную *in vitro* инсулином, глюкозой и РМА активность клеток. Конечная концентрация инсулина составила 10 и 100 нг/мл, глюкозы — 11 мМ и 100 мМ. С целью оценки влияния метаболических регуляторов на функциональные параметры клеток также проводили коинкубацию глюкозы и инсулина с активатором протеинкиназы С, РМА. Конечная концентрация РМА (Sigma) составила 100 нг/мл. Также оценивали активность NF- κB в цитоплазматических и нуклеарных (ядерные) фракциях клеток. Разделение белков по молекулярной массе проводили в полиакриламидном геле с последующим переносом на PVDF-мембрану методом электроблоттинга. Белок р65 выявляли с помощью специфичных антител согласно протоколу производителя. Учет результатов проводили путем считывания диффузной оптической плотности образца в программе ImageJ 1.47q с последующей стандартизацией результатов с учетом общего количества белка в образцах.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования изменений под действием *in vitro* глюкозы и инсулина, функциональных параметров нейтрофилов и способности клеток к стимуляции у пациентов

с термическими травмами в группе 1, показали, что глюкоза в концентрациях 11 мМ и 100 мМ в случае адгезивной активности и в концентрации 11 мМ в случае метаболической активности у этих пациентов приводила к достоверному ($p=0,05$) росту функциональных параметров клеток (рис. 1, 2).

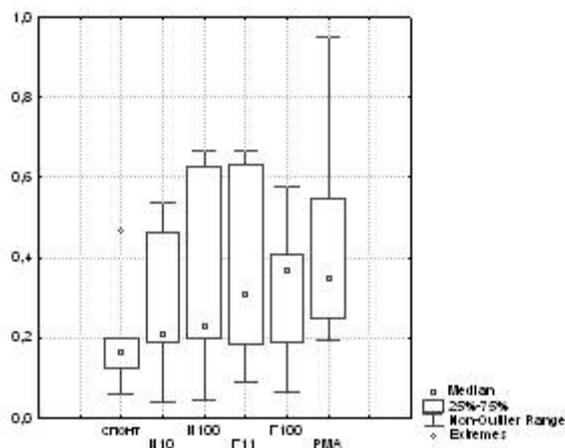


Рис. 1. Влияние инсулина и глюкозы на метаболическую активность нейтрофилов периферической крови пациентов с термическими травмами (группа 1)

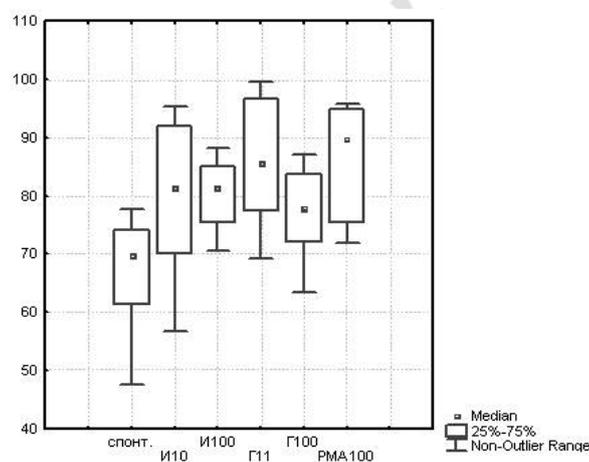


Рис. 2. Влияние инсулина и глюкозы на адгезивную активность нейтрофилов периферической крови пациентов с термическими травмами (группа 1)

При этом стимулирующий эффект РМА в отношении метаболической активности в коинкубационных тестах сохранялся только в пробах с инсулином (10 и 100 нг/мл) ($p=0,04$) и глюкозой в дозе 11 мМ ($p=0,05$), а глюкоза в дозе 100 мМ у некоторых пациентов отменяла эффект РМА. И напротив, при анализе влияния глюкозы и инсулина на стимулированную РМА адгезивную активность клеток было выявлено, что при дозах инсулина в 10 нг/мл и глюкозы в 11 мМ ($p<0,05$) происходила частичная отмена стимулирующего эффекта РМА.

Результаты исследования изменений под действием *in vitro* глюкозы и инсулина, функциональных параметров нейтрофилов и способности клеток к стимуляции у пациентов с термическими травмами в группе 2 не выявили достоверного влияния данных препаратов на клетки. При том характерной особенностью функциональных свойств нейтрофилов пациентов данной группы был сниженный ответ на стимуляцию РМА ($p<0,05$).

В коинкубационных тестах было выявлено, что инсулин в дозе 100 нг/мл и глюкоза в дозе 11 мМ приводили к росту метаболической активности клеток по сравнению с пробами, в которые вносился только РМА ($p=0,02$), т.е. в этих дозах препараты позволяли восстановить сниженный ранее ответ клеток на стимулятор РМА. И обратная картина наблюдалась при анализе влияния модуляторов на адгезивную активность клеток, в данной группе пациентов инсулин в дозе 100 нг/мл и глюкоза в дозе 11 мМ достоверно снижали ответ клеток на РМА ($p=0,02$).

Далее было проведено исследование активности NF- κ B в нейтрофилах крови выделенных групп пациентов, которое показало, что только у части пациентов с применением выбранного нами метода был выявлен белок р65 в цитоплазме и/или ядре нейтрофилов. Отрицательный результат на наличие р65, по видимому, связан с особенностями функционирования NF- κ B, а именно с тем, что данная субъединица могла находиться в цитоплазме в связанном состоянии в составе стабилизирующего белкового комплекса (дополнительные субъединицы и ингибитор), а в ядре в комплексе с промоторными участками советующих генов.

Детальный анализ показал, что как снижение, так и увеличение потребности пациентов в инсулине для поддержания гликемии в коридоре допустимых значений характеризуется регистрацией в цитоплазме клеток р65. Тогда как в остальных случаях белок в цитоплазме нейтрофилов не выявлялся (рис. 3).

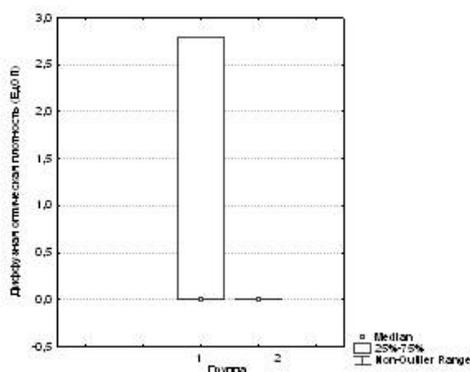


Рис. 3. Содержание р65 в цитоплазматических экстрактах нейтрофилов пациентов с термическими травмами

В результате работы было также выявлено, что потребность пациентов в инсулине свыше 80 ЕД сочетается с транслокацией р65 в ядра нейтрофилов и, следовательно активацией транскрипции советующих генов (рис. 4).

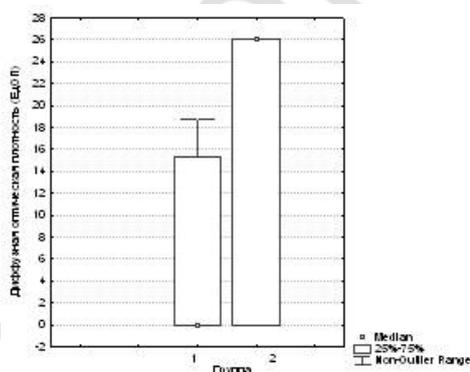


Рис. 4. Содержание р65 в ядерных экстрактах нейтрофилов пациентов с термическими травмами

Накопление р65 в ядрах клеток свидетельствуют об активации воспалительного процесса и, скорее всего, о росте тяжести состояния пациентов. При этом большее количество р65 в ядерной фракции было выявлено в группе 2, где гипергликемия была более выраженной, и для ее коррекции потребовалось большее количество инсулина для поддержания концентраций глюкозы близких к норме.

Выводы. Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе, показали, что высокий уровень глюкозы *in vitro* в культуральной среде приводит к активации адгезивных и метаболических свойств нейтрофилов пациентов группы с низкой потребностью в инсулине, но не с высокой. Более того, высокая потребность пациентов в инсулине, необходимом для коррекции гипергликемии характеризуется снижением способности нейтрофилов отвечать на стимуляцию *in vitro* PMA. Вместе с тем при низкой потребности в инсулине глюкоза и инсулин *in vitro* способны отменять или частично снижать стимулирующий эффект PMA, тогда как при высокой потребности в инсулине эти модуляторы восстанавливают

метаболический ответ клеток на PMA и еще более снижают их адгезивные характеристики. При этом потребность пациентов в инсулине свыше 80 ЕД сочетается с транслокацией p65 в ядра нейтрофилов.

Полученные результаты свидетельствуют о высоком патогенетическом значении белков комплекса нуклеарного фактора κB в контроле функций нейтрофильных гранулоцитов при гипергликемии в условиях тяжелых термических травм, а также о наличии принципиальных отличий в действии *in vitro* инсулина и глюкозы на клетки в зависимости от степени гипергликемии *in vivo*.

THE RESPONSE TO INSULIN AND GLUCOSE *IN VITRO* OF NEUTROPHIL IN PATIENTS WITH THERMAL INJURY IS ASSOCIATED WITH GLYCEMIC STATUS *IN VIVO*

O.V. Petrakova, O.U. Symanovich, L.A. Khvatova, I.E. Gurmanchuk, M.N. Marhevich

Serious injuries are associated with hyperglycemia, which indirectly reflects the severity of disease of the patient, and it's an important predictor of outcome. Hyperglycemia and inflammation are supported by the production of mediators of inflammation, where the degree of activation of NFκB plays the central role.

The aim of the study was to evaluate *in vivo* effects of hyperglycemia on adhesive and metabolic activity of polynuclear cells of peripheral blood of patients with thermal injuries, and the activity of NF-κB in these cells. The investigation shows that that the high levels of glucose *in vitro* in a culture medium leads to the activation and adhesion of neutrophils metabolic properties of patients with low insulin requirements, but not high. Moreover, the high demand of patients in the insulin necessary for the correction of hyperglycemia is characterized by the decrease in the ability of neutrophils to respond to PMA stimulation *in vitro*. However, in group with low glucose, glucose and insulin *in vitro* can cancel or reduce partially the stimulating effect of PMA, whereas at high insulin demand these modulators reduced metabolic response of cells to PMA and further reduce their adhesion characteristics. In this case, the need for insulin in patients over 80 units combined with translocation of p65 in the nucleus of neutrophils.

Литература.

1. Holm C., Hörbrand F., Mayr M. et al. Acute hyper glycaemia following thermal injury: friend or foe? // Resuscitation. – 2004. – Vol. 60. – P: 71-77.
2. Liu SF., Malik AB. Nf-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation// Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol . – Vol.290, №4. – P: 622-645.
3. Otto-Buczowska E., Dworzevcki T., Mazur-Dworzecka U. et at. Alterations in blood glucose homeostasis during septic or injury stress-hyperglycemia // Family Medicine & Primary Care Review. – 2008. – Vol.10, №2. – P: 197-205.