

Э.Ф. Баринов, Ю.Е. Лях, М.Э. Баринава, В.Г. Гурьянов

## Цитокиновый ответ при синдроме диабетической стопы: возможности прогнозирования нарушения заживления ран

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

**Ключевые слова:** цитокины, заживление ран, сахарный диабет.

С целью определения ведущих факторов незаживления ран при сахарном диабете проведен анализ клинико-лабораторных данных и уровня цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО $\alpha$ , ИЛ-4, ИЛ-10) у 102 пациентов с синдромом диабетической стопы. Развитие СДС сопровождается вариабельной реакцией системы крови и интерцитокиновых отношений. На основании статистического анализа с применением алгоритма генетического отбора отобрано 2 признака: ФНО $\alpha$  и ИЛ-4. Разработанная математическая модель позволяет постулировать ведущую роль данных цитокинов в незаживлении ран и прогнозировать исход СДС у пациентов с начально сходными клинико-лабораторными показателями.

## Цитокинова відповідь при синдромі діабетичної стопи: можливості прогнозування порушення загоєння ран

Е.Ф. Барінов, Ю.Є. Лях, М.Є. Барінова, В.Г. Гур'янов

З метою визначення провідних факторів незагоєння ран при цукровому діабеті проведено аналіз клініко-лабораторних даних і концентрації цитокинів (ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-6, ФНПа, ІЛ-4, ІЛ-10) у 102 пацієнтів з синдромом діабетичної стопи. Розвиток СДС супроводжується варіабельною реакцією системи крові та інтерцитокинових відносин. На підставі статистичного аналізу із застосуванням алгоритму генетичного відбору визначено 2 ознаки: ФНПа та ІЛ-4. Розроблена математична модель дозволяє постулювати провідну роль даних цитокинів у патогенезі порушення перебігу ранового процесу і прогнозувати результат СДС у пацієнтів з початково подібними клініко-лабораторними показниками.

**Ключові слова:** цитокини, загоєння ран, цукровий діабет.

**Патологія.** – 2011. – Т.8, №2. – С. 30–32

## Cytokine response in the diabetic foot syndrome – the predictability of disturbances of wound healing

E.F. Barinov, J.E. Lyakh, M.E. Barinova, V.G. Guryanov

To determine the key factors in wounds non-healing under diabetes the clinical, laboratory data and the cytokines levels (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10) were analyzed in 102 patients with diabetic foot syndrome. The development of DFS was accompanied by variable response of blood and intercytokine relations. Based on statistical analysis using the algorithm of genetic selection two features have been selected: TNF $\alpha$  and IL-4. The developed mathematical model allows us to postulate a leading role of these cytokines in violation of the wound process and predict the outcome of the DDS in patients with initially similar clinical and laboratory parameters.

**Key words:** cytokines, wound healing, diabetes mellitus.

**Pathologia.** 2011; 8(2): 30–32

Анализ ключевых механизмов патогенеза синдрома диабетической стопы (СДС) требует обсуждения изменений в системе цитокинов [3,6]. Повышение концентрации цитокинов в плазме крови сопровождается развитием многих заболеваний; более того, показана широкая вариабельность продукции цитокинов даже в пределах отдельных нозологических единиц. Не менее дискуссионным представляется вопрос о правомочности оценки отдельных цитокинов с целью прогнозирования течения и исхода различных воспалительных заболеваний [4]. Можно предположить, что в случае гнойно-некротического поражения нижних конечностей (ГНПНК) у больных с СДС реализуются определенные каскады цитокинов, детерминирующие развитие острого воспалительного ответа, выраженность альтерации и кинетику клеток, а в конечном итоге – заживление или незаживление ран.

### Цель работы

Анализ интерцитокиновых отношений при СДС для определения причинно-следственных отношений и

ведущих факторов нарушения регуляции раневого процесса кожи.

### Пациенты и методы исследования

В работе проведен анализ клинико-лабораторных показателей 102 пациентов с СДС; средний возраст пациентов составлял 62,4 $\pm$ 5,6 лет. Оценка тяжести и глубины поражения конечностей проводилась согласно классификации Wagner. На основании исхода процесса все пациенты с СДС были разделены на две группы – с благоприятным (1 группа, n=56, с заживлением ран) и неблагоприятным исходом (2-я группа, n=46, с длительным незаживлением ран нижней конечности). Концентрацию цитокинов в плазме крови определяли методом иммуноферментного анализа (PR2100 Sanofi diagnostic pasteur). Анализ полученных данных осуществляли с применением методов биостатистики [1] и математического (нейросетевого) моделирования [5], для чего использовали статистические пакеты MedStat [1], CIA и Statistica Neural Networks.

**Результаты и их обсуждение**

Проведенный анализ цитокиновой системы у пациентов с СДС выявил значимый подъем уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО $\alpha$ ) и умеренное, хотя и статистически значимое, повышение ИЛ-4 и ИЛ-10. Уровень ИЛ-1 $\beta$  у пациентов 1 и 2 группы находился в диапазоне от 113 до 195 пг/л. Концентрация ИЛ-1 $\beta$  в плазме крови положительно коррелировала с исходом раневого процесса ( $r=0,568$ ;  $p<0,01$ ), количеством палочкоядерных нейтрофилов ( $r=0,525$ ,  $p<0,01$ ) и СОЭ ( $r=0,329$ ,  $p<0,05$ ), а также системным уровнем ФНО $\alpha$  ( $r=0,861$ ,  $p<0,001$ ) и ИЛ-6 ( $r=0,578$ ,  $p<0,002$ ). Уровень ФНО $\alpha$  у больных с СДС составлял  $173,0\pm 5,3$  пг/л (ДИ=87-246) в 1-й группе и  $216,5\pm 9,23$  (ДИ=124-296) пг/мл – во 2 группе. Концентрация ФНО $\alpha$  коррелировала с количеством лейкоцитов ( $r=-0,55$ ;  $p<0,01$ ), в том числе, палочкоядерных лейкоцитов ( $r=0,538$ ;  $p<0,01$ ), лимфоцитов ( $r=-0,49$ ;  $p<0,05$ ) и моноцитов ( $r=-0,33$ ;  $p<0,05$ ). Анализ межцитокиновых отношений позволил выявить наличие корреляционной связи между повышением ФНО $\alpha$  и уровнем ИЛ-6 ( $r=0,479$   $p<0,02$ ), ИЛ-4 ( $r=0,372$   $p<0,05$ ) и ИЛ-10 ( $r=0,357$ ;  $p<0,05$ ). Концентрация ИЛ-6 варьировала в 1 группе в диапазоне от 15,9 до 41,2 пг/мл, а во 2 – от 12,8 до 30,6 пг/мл. Медианы содержания ИЛ-6 статистически значимо не отличались между группами, хотя значительно превышали показатель в контроле ( $p<0,01$ ). Более информативным представляется анализ уровней ИЛ-4 и ИЛ-10, поскольку их медиана в 1 группе составляла соответственно  $16,8\pm 0,5$  пг/мл и  $20,7\pm 1,3$  пг/мл. Во 2-й группе данные показатели были ниже: соответственно  $12,5\pm 1,5$  пг/мл и  $13,2\pm 0,7$  пг/мл. Уровни ИЛ-4 и ИЛ-10 отрицательно коррелировали с тяжестью ГНПНК ( $r_1=-0,588$ ;  $p<0,01$  и  $r_2=-0,318$ ;  $p<0,05$  соответственно).

На основе проведенного статистического анализа клинико-лабораторных показателей и изучения межцитокиновых связей впервые удалось разработать математическую модель, позволяющую прогнозировать исход ГНПНК, исходя из параметров, зарегистрированных на момент госпитализации. В результате применения используемого алгоритма отобрано всего два признака: содержание в плазме ФНО $\alpha$  и ИЛ-4. На выделенном наборе признаков построена модель, чувствительность которой составила 81,8% (95% ДИ 50,9% – 98,9%), специфичность – 92,9% (95% ДИ 71,9% – 100%). Полученная модель прогнозирования исхода ГНПНК описывается уравнением:

$$Y = 0,005 \times X_1 - 0,047 \times X_2 + 0,263,$$

где:  $X_1$  – содержание ФНО $\alpha$  в плазме крови,

$X_2$  – содержание ИЛ-4 в плазме крови,

$Y$  – исход раневого процесса.

После обучения модели проведена оптимизация порога принятия – отвержения решения; критическое значение составило  $Y_{\text{crit}}=0,389$ . В случае, когда в результате расчетов в рамках построенной модели имело место значение  $Y < Y_{\text{crit}}$ , прогнозируется благоприятный исход – заживление ран конечностей в течение месяца. При значении  $Y > Y_{\text{crit}}$ , то есть  $Y$ , превышающем 0,389 про-

гнозируется неблагоприятный исход – нарушение заживления и/или прогрессирование гнойно-некротического процесса.

**Клинические примеры:**

*Пример 1.* Пациент Б.С., 61 год, длительность СД 2 типа – 10 лет, поступил в стационар впервые с СДС; раневой процесс соответствовал Wagner 3 степени, смешанная форма, площадь поражения 14 см<sup>2</sup>. В анализе крови: количество лейкоцитов –  $4,1 \times 10^9$ /л, палочкоядерных – 3%, сегментоядерных – 67%, лимфоцитов – 23%, моноцитов – 5%, эозинофилов – 2%. СОЭ – 37, уровень глюкозы в крови – 8,9 ммоль/л. Содержание цитокинов в периферической крови составило (в пг/мл): ИЛ-1 $\beta$  – 168,2, ФНО $\alpha$  – 192, ИЛ-6 – 23,7, ИЛ-4 – 20,8, ИЛ-10 – 16,1. При использовании полученной математической модели получено значение  $Y=0,279$ , позволяющее прогнозировать благоприятный исход раневого процесса. В результате первичной некроэктомии и проводимой комплексной терапии у пациента на 6 сутки отмечено очищение раны, на 8 появились грануляции. Через 14 дней с явлениями эпителизации раневой поверхности пациент был выписан из стационара.

*Пример 2.* Пациент К.К., 46 лет, длительность СД 2 типа – 10 лет, поступил в стационар впервые с СДС; раневой процесс соответствовал Wagner 3 степени, смешанная форма, площадь поражения 15 см<sup>2</sup>. В анализе крови количество лейкоцитов –  $5,4 \times 10^9$ /л, палочкоядерных – 8%, сегментоядерных – 67%, лимфоцитов – 13%, моноцитов – 15%, эозинофилов – 1%. СОЭ – 64, уровень глюкозы в крови – 10,6 ммоль/л. Содержание цитокинов в периферической крови составило (в пг/мл): ИЛ-1 $\beta$  – 163, ФНО $\alpha$  – 258, ИЛ-6 – 18,6, ИЛ-4 – 12,8, ИЛ-10 – 15,3. При использовании полученной математической модели получено значение  $Y=0,998$ , позволяющее прогнозировать неблагоприятный исход раневого процесса. На момент госпитализации выполнена некроэктомия. В течение первых 4 дней после операции отмечались мокнущие раны. В дальнейшем развился феномен «застывшей раны», проведена аутодермопластика. На этом фоне появились вялые грануляции; через 2 недели раневой процесс осложнился развитием остеомиелита.

Интерес к цитокинам при наличии у пациентов диабетических ран не случаен и связан, в первую очередь, с сопряженностью эффектов инсулина и цитокинов в узле тирозинового фосфорилирования. В данном контексте, с одной стороны, инсулин, стимулируя тирозинкиназы и другие трансдукторные системы, модулирует функциональное состояние лейкоцитов, и отсутствие данного сигнала сопровождается дисфункцией лейкоцитов и развитием иммунодефицитного состояния. С другой стороны, ФНО $\alpha$ , повышая экспрессию тирозинфосфатаз, способствует активации процессов дефосфорилирования, в частности, рецепторов к инсулину и развитию инсулиновой резистентности [6], тогда как ИЛ-1 $\beta$  стимулирует освобождение арахидоновой кислоты и синтез ее метаболитов, которые не только модулируют уровень внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , но и способны ингибировать

активность тирозинфосфатаз, тем самым потенцируя эффекты киназ и тирозиновое фосфорилирование в целом [5]. Кроме того, установлено, что резистентность к действию инсулина и длительное ингибирование тирозинового фосфорилирования при СД сопровождается повышением продукции ИЛ-6 [4], в связи с чем длительная гиперсекреция данного цитокина сегодня рассматривается как один из признаков инсулиновой резистентности. Если ИЛ-6 может оказывать цитопротекторное действие, защищая лейкоциты от избыточного апоптоза, то ФНО $\alpha$  известен как мощный проапоптоген лимфоцитов, макрофагов и нейтрофилов. Не менее важным в трактовке полученных результатов является стимулирующий эффект ИЛ-6 на продукцию ИЛ-4 и ИЛ-10. Последние цитокины не только оказывают противовоспалительный эффект, но и вместе с ИЛ-12 играют роль в определении баланса между 1 и 2 классом Т-хелперов, детерминируя тип иммунологической реакции организма при нарушении микробиоценоза в ране [6]. Установлено, что ИЛ-4, ИЛ-10 контролируют локальный гомеостаз в ране за счет регуляции пролиферации и секреторной активности фибробластов, эндотелия, кератиноцитов, индуцируют рекрутирование лейкоцитов (опосредовано через ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО $\alpha$ ) и апоптоз клеток (ФНО $\alpha$ ), процесс формирования грануляционной ткани (ИЛ-6), ангиогенез (ИЛ-4, 10) и эпителизацию раневого дефекта.

#### Выводы

Развитие СДС сопровождается активацией острого воспалительного ответа при вариабельной реакции системы крови и изменениях интерцитокиновых от-

ношений. В этом контексте разработанная модель позволяет постулировать ведущую роль ФНО $\alpha$  и ИЛ-4 в патогенезе нарушения течения раневого процесса, прогнозировать исход СДС у пациентов с изначально сходными клинико-лабораторными показателями, а также наметить перспективы дальнейшего развития терапевтической стратегии.

#### Литература

1. Казаков В.Н. Теоретические и практические аспекты автоматизированной информационной системы «Депрессии» / Казаков В.Н., Лях Ю.Е., Кутько И.И., Панченко О.А., Мануйлова А.М., Гурьянов В.Г. // Серия «Очерки биологической и медицинской информатики». – Донецк: Из-во ДонГМУ, 2001. – 160 с.
2. Лях Ю.Е. Основы компьютерной биостатистики: анализ информации в биологии, медицине и фармации статистическим пакетом Medstat / Ю.Е. Лях, Г.В. Гурьянов, В.Н. Хоменко. – Донецк: Папакица Е.К., 2006. – 214 с.
3. Поиск эффективных модуляторов цитокинпродуцирующей функции макрофагов / А.А. Никитин, М.Т. Абидов, Е.О. Ковалевская [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – Т. 138, №9. – С. 293–295.
4. Microvascular reactivity and inflammatory cytokines in painful and painless peripheral diabetic neuropathy / J. Doupis, T.E. Lyons, S. Wu [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 94, №6. – P. 2157–2163.
5. Metz C.E. Statistical significance tests for binormal ROC curves / Metz C.E., Kronman H.B. // J. Math. Psychol. – 1980. – Vol. 22. – P. 218–243.
6. Werner S. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines / S. Werner, R. Grose // Physiol. Rev. – 2003. – Vol. 83. – P. 835–870.

#### Сведения об авторах:

Баринов Э.Ф., д. мед. н., профессор, зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии ДонНМУ им. М. Горького.

Лях Ю.Е., д. биол. н., профессор, зав. каф. информатики ДонНМУ им. М. Горького.

Баринава М.Э., к. мед. н., доцент каф. дерматовенерологии ДонНМУ им. М. Горького.

Гурьянов В.Н., к. физ.-мат. н., доцент каф. информатики ДонНМУ им. М. Горького.

#### Адрес для переписки:

Баринов Эдуард Федорович. 83003, г. Донецк, пр-т Ильича, 16, ДонНМУ им. М. Горького.