

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.03.094>

УДК 616.379-008.64-002:577.2

**В.В. Пушкаръов, Л.К. Соколова, О.І. Ковзун,
С.А. Червякова, Т.С. Вацеба, В.М. Пушкаръов, М.Д. Тронько**

ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України”, Київ
E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

Активация МАРК в мононуклеарах крови людини при діабеті 1-го та 2-го типу

Представлено членом-кореспондентом НАН України М.Д. Троньком

До складу мононуклеарних клітин периферичної крові (РВМС) в основному входять моноцити і лімфоцити, які беруть участь в розвитку цукрового діабету та інших аутоімунних захворювань. Ret/Ras/Raf/MEK/ERK (мітогенактивовані протеїнкінази, МАРК) є сигнальним каскадом, який контролює такі клітинні процеси, як проліферація, виживання, ангиогенез, ріст і рухливість клітин. Досліджено активацію в РВМС головної ефекторної протеїнкінази цього каскаду – ERK1/2. Для визначення кількості фосфо-ERK1/2 використовували набори для імуноферментного аналізу.

Показано, що активації ERK1/2 у РВМС хворих на діабет 2-го типу не спостерігається, тоді як у хворих на діабет 1-го типу чи аутоімунний тиреоїдит вона істотно зростає. Однак у хворих на діабет 1-го типу з аутоімунним тиреоїдитом активація ERK1/2 у РВМС знижується до контрольного рівня, що можна пояснити конкуренцією між двома аутоімунними процесами за спільні сигнальні шляхи. Обговорюється роль МАРК-каскаду в патогенезі аутоімунних захворювань.

Ключові слова: мононуклеарні клітини периферичної крові, мітогенактивовані протеїнкінази, діабет 1-го та 2-го типу, аутоімунний тиреоїдит.

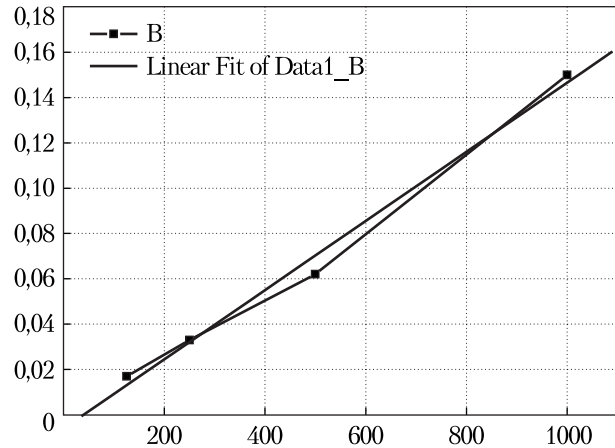
До складу мононуклеарних клітин периферичної крові (РВМС) в основному входять моноцити і лімфоцити – надзвичайно пластичні клітини, які беруть участь у процесах клітинного і гуморального імунітету. Зокрема, лімфоцити і макрофаги беруть участь в розвитку цукрового діабету (ЦД) та інших аутоімунних захворювань [1, 2].

ЦД 1-го типу є аутоімунним захворюванням, при якому панкреатичні β-клітини зруйновані аутореактивними Т-клітинами і запальними процесами. При ЦД 2-го типу макрофаги, Т-клітини, В-клітини та інші підтипи імунних клітин інфільтруються в метаболічні тканини, ініціюючи низькорівневий запальний процес [2].

Аутоімунний тиреоїдит (АІТ) пов'язаний з утворенням аутоантитіл, які з'являються здебільшого за наявності лімфоцитів у щитоподібній залозі (ЩЗ). Лімфоцити виробляють

Цитування: Пушкаръов В.В., Соколова Л.К., Ковзун О.І., Червякова С.А., Вацеба Т.С., Пушкаръов В.М., Тронько М.Д. Активация МАРК в мононуклеарах крови людини при діабеті 1-го та 2-го типу. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2020. № 3. С. 94–99. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.03.094>

Рис. 1. Калібрувальна крива для визначення кількості фосфо-ERK1/2 методом імуноферментного аналізу



антитіла до пероксидази ЩЗ, тиреоглобуліну, рецептора тиреотропного гормону та інших білків. При АІТ спостерігається широка інвазія ЩЗ лімфоцитами і макрофагами, яка породжує аутореактивність, пов'язану з Т- і В-клітинами [3, 4].

Ret/Ras/Raf/MEK/ERK (мітогенактивовані протеїнкінази (МАРК)) є сигнальним каскадом, який пов'язує сигнали факторів росту на рецепторах клітинної мембрани з транскрипційними факторами, які регулюють експресію генів, що контролюють такі важливі клітинні процеси, як проліферація, виживання, ангиогенез, ріст і рухливість клітин [5]. Цей сигнальний шлях розглядають як основний, що контролює поділ клітини [6]. Він значною мірою визначає функціонування клітин крові при різних захворюваннях, в тому числі при діабеті та його ускладненнях.

За мету ставилося дослідження активації в РВМС головної ефекторної протеїнкінази, яка входить до МАРК-каскаду – ERK1/2.

Матеріали та методи. Дослідження проводилося на базі відділу діабетології ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України”. Усі пацієнти підписували інформовану згоду на використання біоматеріалів у подальших діагностичних та наукових дослідженнях. Відразу ж після забору кров розводили в 2 рази PBS (рН 7,4) і виділяли РВМС як описано раніше [7]. Зібрані РВМС промивали PBS центрифугуванням при 200 g для видалення тромбоцитів і заморожували при -80°C до використання. Для визначення кількості фосфо-ERK1/2 (ф-Тре202/Тре204, ф-Тре185/Тир187 відповідно) використовували набори для імуноферментного аналізу 85–86012 фірми “Invitrogen” (США). Клітини лізували в буфері для екстракції, що містив інгібітори протеаз і фосфатаз. Дослідження проводили в триплетах. Концентрацію білка в лізаті визначали за допомогою наборів (BCA protein assay kit) фірми “Novagen” (США). Вимірювання здійснювали на мікропланшетному рідері фірми “Bio-tek Instruments” (США) при довжині хвилі 450 нм.

Аналіз калібрувальної кривої (рис. 1) свідчить про задовільне узгодження експериментальної кривої з теоретичною та незначний розкид даних. Результати експериментів представлені як $M \pm \text{Std}$, $n = 3\div 13$. Для порівняння груп даних використовували t -критерій Стьюдента та One-Way ANOVA. Значення $P \leq 0,05$ вважалися вірогідними.

Результати та обговорення. Усі пацієнти були розбиті на п'ять груп: 1 – контроль ($n = 3$) – здорові особи, репрезентативні за віком та ІМТ; 2 – хворі на діабет 2-го типу ($n = 13$); 3 – хворі на діабет 2-го типу з АІТ ($n = 3$); 4 – хворі на діабет 1-го типу ($n = 7$); 5 – хворі на діабет 1-го типу з АІТ ($n = 3$).

З таблиці видно, що до складу РВМС в основному входять моноцити/макрофаги і лімфоцити (Т-клітини, В-клітини і NK) [2, 8], які відіграють ключову роль у патогенезі ЦД 1-го та 2-го типу, діабетичних ускладнень та АІТ [2, 4].

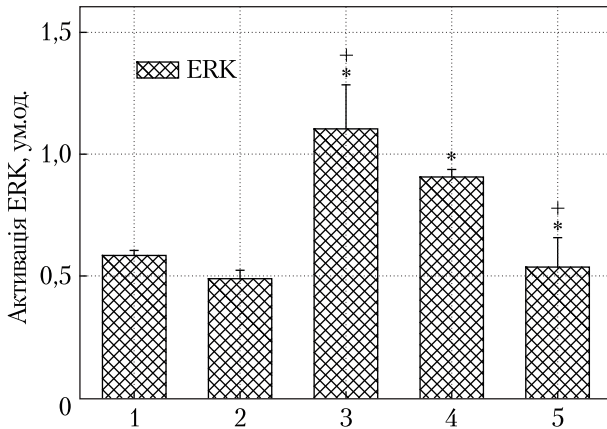


Рис. 2. Активация ERK у РВМС хворих на діабет 1-го та 2-го типу і аутоімунний тиреоїдит: 1 – контроль ($n = 3$); 2 – діабет 2-го типу ($n = 13$); 3 – діабет 2-го типу+АІТ ($n = 3$); 4 – діабет 1-го типу ($n = 7$); 5 – діабет 1-го типу +АІТ ($n = 3$). * – відміни від контролю вірогідні, $P \leq 0,05$; + – відміни між групами 2 і 3 та 4 і 5 вірогідні, $P \leq 0,05$

Фосфорилування ERK1 (p44) по залишках Тре202/Тре204 і ERK2 (p42) по залишках Тре185/Тир187 означає їх активацію. Ми визначали сумарне фосфорилування обох протеїнкіназ у клітинах крові хворих досліджуваних груп.

Згідно з одержаними даними, активації ERK1/2 у РВМС хворих на діабет 2-го типу не відбувалося (рис. 2, 2), тоді як у хворих на діабет 1-го типу вона зростала в понад 1,5 раза (див. рис. 2, 4), що можна пояснити інтенсивністю аутоімунних процесів при діабеті, у яких беруть участь РВМС. У хворих на діабет 2-го типу та АІТ активація ERK1/2 у РВМС зростала майже у 2 рази порівняно з контролем і більш ніж у 2 рази порівняно з групою 2 (див. рис. 2, 2 і 3). Найбільш цікавою виявилася група хворих на діабет 1-го типу та АІТ (див. рис. 2, 5), у яких спостерігалось зниження активації протеїнкінази до контрольного рівня.

Отже, у РВМС хворих на діабет 2-го типу, який характеризується інтенсивною інфільтрацією макрофагів і лімфоцитів у метаболічні тканини, активації проліферативних процесів не відбувається. Можливо поділ таких клітин має місце після інфільтрації. Аутоімунні процеси, характерні для хворих на діабет 1-го типу або АІТ (див. рис.2, 3 і 4), спричиняють підвищення активації ERK1/2, що, напевно, пов'язано з посиленням проліферації лімфоцитів та секреції лімфоцитами і макрофагами прозапальних цитокінів [8, 9].

Клітини, що складають основу РВМС людини

Склад РВМС людини	% від загальної кількості
Моноцити	10–30
Лімфоцити	70–90
Усі Т-клітини (CD3+)	45–70
CD4+Т-клітини (хелпери)	25–60 % від усіх Т-клітин
Цитотоксичні CD8+Т-клітини	5–30 % від усіх Т-клітин
В-клітини	5–15
НК-клітини	5–10
Дендритні клітини	1–2
Стовбурові клітини (CD34+)	0,1–0,2

Зниження активації ERK1/2 у РВМС хворих на діабет 1-го типу та АІТ до контрольного рівня, можливо, пов'язане з накладанням двох односпрямованих процесів щодо активації ERK1/2. Відомо, що активація ERK1/2 є необхідною умовою проліферації клітин, однак її гіперактивація часто призводить до пригнічення цієї протеїнкінази через спеціальні механізми, що ініціюються клітиною [10, 11]. Оскільки і АІТ і ЦД 1-го

типу пов'язані з активацією лімфоцитів, їх проліферацією, інфільтрацією та утворенням антитіл, цілком можливо, що спільні сигнальні механізми, ініційовані патогенетичними процесами при цих хворобах, конкурують між собою щодо активації ERK1/2.

PBMC є надзвичайно чутливою системою, яка реагує на численні патологічні зміни гомеостазу в організмі, а сигнальний каскад MAPK/ERK відіграє важливу роль у цих реакціях [12–14]. Тому вивчення ключових сигнальних шляхів в мононуклеарах крові може виявитися важливим для діагнозу, прогнозу хвороби і оцінки ефективності лікування.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Subramanian V., Ferrante A.W.Jr. Obesity, inflammation, and macrophages. *Nestle Nutr. Workshop Ser. Paediatr. Program.* 2009. **63**. P. 151–159. <https://doi.org/10.1159/000209979>
2. Тронько Н.Д., Пушкарев В.М., Соколова Л.К., Пушкарев В.В., Ковзун Е.И. Молекулярные механизмы патогенеза сахарного диабета и его осложнений. Киев: Издательский дом Медкнига, 2018. 264 с.
3. Buzdugă C.M., Costea C.F., Dumitrescu G.F., Turliuc M.D., Bogdănici C.M., Cucu A., Dumitrescu N., Andrei L., Șapte E., Apostol D.G.C. Cytological, histopathological and immunological aspects of autoimmune thyroiditis: a review. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2017. **58**, №3. P. 731–738.
4. Iddah M.A., Macharia B.N. Autoimmune thyroid disorders. *ISRN Endocrinol.* 2013. **2013**. 509764. <https://doi.org/10.1155/2013/509764>
5. Mendoza M., Er E., Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* 2011. **36**, № 6. P. 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006>
6. Wortzel I., Seger R. The ERK cascade: distinct functions within various subcellular organelles. *Genes Cancer.* 2011. **2**, № 3. P. 195–209. <https://doi.org/10.1177/1947601911407328>
7. Vatseba T.S., Sokolova L.K., Pushkarev V.V., Kovzun O.I., Guda B.B., Pushkarev V.M., Tronko M.D. Activation of the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K1 signaling cascade in the mononuclear cells of peripheral blood: association with insulin and insulin-like growth factor levels in the blood of patients with cancer and diabetes. *Cytol. Genet.* 2019. **53**, № 6. P. 489–493.
8. Delves P.J., Martin S.J., Burton D.R., Roitt I.M. Roitt's essential immunology, 13th ed. Wiley, 2017. 556 p.
9. Arthur J.S.C., Ley S.C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2013. **13**. P. 679–692. <https://doi.org/10.1038/nri3495>
10. Pushkarev V., Guda B., Pushkarev V., Tronko N. Oncogene toxicity in thyroid carcinomas and other types of tumors. *Cytol. Genet.* 2018. **521**, № 52. P. 54–61. <https://doi.org/10.3103/S0095452718010103>
11. Гуда Б.Б., Пушкарьов В.В., Ковзун О.І., Пушкарьов В.М., Тронько М.Д. Токсичність MAPK у карциномах ЩЗ. Механізми пригнічення сигнального каскаду. Огляд літератури та власних даних. *Шну-тальна хірургія*. 2019. **3**. С. 84–96. <https://doi.org/10.11603/2414-4533.2019.3.10551>
12. Ciliberti M.G., Albenzio M., Inghese C., Santillo A., Marino R., Sevi A., Caroprese M. Peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine production in sheep as affected by cortisol level and duration of stress. *J. Dairy Sci.* 2017. **100**, № 1. P. 750–756. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11688>
13. Zheng Q., Xu J., Gao H., Tao R., Li W., Shang S., Gu W. Receptor expression and responsiveness of human peripheral blood mononuclear cells to a human cytomegalovirus encoded CC chemokine. *Braz. J. Infect. Dis.* 2015. **19**, № 4. P. 403–409. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.05.007>
14. Zheng Q., Tao R., Gao H., Xu J., Shang S., Zhao N. HCMV-encoded UL128 enhances TNF- α and IL-6 expression and promotes PBMC proliferation through the MAPK/ERK pathway in vitro. *Viral Immunol.* 2012. **25**, № 2. P. 98–105. <https://doi.org/10.1089/vim.2011.0064>

Надійшло до редакції 06.12.2019

REFERENCES

1. Subramanian, V. & Ferrante, A. W. Jr. (2009). Obesity, inflammation, and macrophages. *Nestle Nutr. Workshop Ser. Paediatr. Program.*, 63, pp. 151-159. <https://doi.org/10.1159/000209979>
2. Tronko, N. D., Pushkarev, V. M., Sokolova, L. K., Pushkarev, V. V. & Kovzun, O. I. (2018). Molecular mechanisms of pathogenesis of diabetes and its complications. Kyiv: Publishing house Medkniha (in Russian).

3. Buzdugă, C. M., Costea, C. F., Dumitrescu, G. F., Turliuc, M. D., Bogdănici, C. M., Cucu, A., Dumitrescu, N., Indrei, L., Şapte, E. & Apostol, D. G. C. (2017). Cytological, histopathological and immunological aspects of autoimmune thyroiditis: a review Rom. J. Morphol. Embryol. 58, No. 3, pp. 731-738.
4. Iddah, M. A. & Macharia, B. N. (2013). Autoimmune thyroid disorders. ISRN Endocrinol. 2013, 509764. <https://doi.org/10.1155/2013/509764>
5. Mendoza, M., Er, E. & Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. Trends Biochem. Sci., 36, No. 6, pp. 320-328. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006>
6. Wortzel, I. & Seger, R. (2011). The ERK cascade: distinct functions within various subcellular organelles. Genes Cancer. 2, No. 3, pp. 195-209. <https://doi.org/10.1177/1947601911407328>
7. Vatsaba, T. S., Sokolova, L. K., Pushkarev, V. V., Kovzun, O. I., Guda, B. B., Pushkarev, V. M. & Tronko, M. D. (2019). Activation of the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K1 signaling cascade in the mononuclear cells of peripheral blood: association with insulin and insulin-like growth factor levels in the blood of patients with cancer and diabetes. Cytol. Genet., 53, No. 6, pp. 489-493.
8. Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R. & Roitt, I. M. (2017). Roitt's essential immunology. 13th ed. Wiley and Sons, Ltd.
9. Arthur, J. S. C. & Ley, S. C. (2013). Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. Nat. Rev. Immunol., 13, pp. 679-692. <https://doi.org/10.1038/nri3495>
10. Pushkarev, V., Guda, B., Pushkarev, V. & Tronko, N. (2018). Oncogene toxicity in thyroid carcinomas and other types of tumors. Cytol. Genet., 521, No. 52, pp. 54-61. <https://doi.org/10.3103/S0095452718010103>
11. Guda, B. B., Pushkarev, V. V., Kovzun, O. I., Pushkarev, V. M. & Tronko, M. D. (2019). Toxicity of MAPK in thyroid carcinoma. Mechanisms of suppression of signal cascade (review of literature and own data). Spytalna Khirurgiya, 3, pp. 84-96. (in Ukrainian). <https://doi.org/10.11603/2414-4533.2019.3.10551>
12. Ciliberti, M. G., Albenzio, M., Inghese, C., Santillo, A., Marino, R., Sevi, A. & Caroprese, M. (2017). Peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine production in sheep as affected by cortisol level and duration of stress. J. Dairy Sci., 100, No. 1, pp. 750-756. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11688>
13. Zheng, Q., Xu, J., Gao, H., Tao, R., Li, W., Shang, S. & Gu, W. (2015). Receptor expression and responsiveness of human peripheral blood mononuclear cells to a human cytomegalovirus encoded CC chemokine. Braz. J. Infect. Dis., 19, No. 4, pp. 403-409. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.05.007>
14. Zheng, Q., Tao, R., Gao, H., Xu, J., Shang, S. & Zhao, N. (2012). HCMV-encoded UL128 enhances TNF- α and IL-6 expression and promotes PBMC proliferation through the MAPK/ERK pathway in vitro. Viral Immunol., 25, No. 2, pp. 98-105. <https://doi.org/10.1089/vim.2011.0064>

Received 06.12.2019

*В.В. Пушкарёв, Л.К. Соколова, Е.И. Ковзун,
С.А. Червякова, Т.С. Вацеба, В.М. Пушкарёв, М.Д. Тронько*
ГУ "Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины", Киев
E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

АКТИВАЦИЯ МАРК В МОНОНУКЛЕАРАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДИАБЕТЕ 1-ГО И 2-ГО ТИПА

В состав мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) в основном входят моноциты и лимфоциты, участвующие в развитии сахарного диабета и других аутоиммунных заболеваний. Ret/Ras/Raf/MEK/ERK (митоген-активируемые протеинкиназы, МАРК) является сигнальным каскадом, который контролирует такие клеточные процессы, как пролиферация, выживание, ангиогенез, рост и подвижность клеток. Исследована активация в РВМС главной эффекторной протеинкиназы этого каскада — ERK1/2. Для определения количества фосфо-ERK1/2 использовали наборы для иммуноферментного анализа. Показано, что активации ERK1/2 в РВМС больных диабетом 2-го типа не наблюдается, тогда как у больных диабетом 1-го типа или аутоиммунным тиреоидитом она существенно возрастает. Однако у больных диабетом 1-го типа с аутоиммунным тиреоидитом активация ERK1/2 в РВМС снижается до контрольного уровня, что можно объяснить конкуренцией между двумя аутоиммунными процессами за общие сигнальные пути. Обсуждается роль МАРК-каскада в патогенезе аутоиммунных заболеваний.

Ключевые слова: мононуклеарные клетки периферической крови, митогенактивируемые протеинкиназы, диабет 1-го и 2-го типа, аутоиммунный тиреоидит.

V.V. Pushkarev, L.K. Sokolova, O.I. Kovzun, S.A.

Cherriakova, T.S. Vatsaba, V.M. Pushkarev, M.D. Tronko

V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the NAMS of Ukraine, Kyiv

E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

MAPK ACTIVATION IN HUMAN BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN TYPE 1 AND 2 DIABETES

The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) mainly includes monocytes and lymphocytes involved in the development of diabetes mellitus and other autoimmune diseases. Ret/Ras/Raf/MEK/ERK (mitogen-activated protein kinases, MAPK) is a signaling cascade that controls cellular processes such as proliferation, survival, angiogenesis, cell growth, and motility. The aim of the work was to study the activation in PBMC of the main effector protein kinase of this cascade – ERK1/2. Enzyme-linked immunosorbent assay kits were used to determine the amount of phospho-ERK1/2.

It is shown that activation of ERK1/2 in PBMC of patients with type 2 diabetes is not observed, while in patients with it increased significantly type 1 diabetes or autoimmune thyroiditis. However, in patients with type 1 diabetes with autoimmune thyroiditis, the activation of ERK1/2 in PBMC decreases to a control level, which can be explained by the competition between the two autoimmune processes for common signaling pathways. The role of the MAPK cascade in the pathogenesis of autoimmune diseases is discussed.

Keywords: *peripheral blood mononuclear cells, mitogen-activated protein kinases, types 1 and 2 diabetes, autoimmune thyroiditis.*