

Ю.Г. Кияк, Н.В. Фартушок, Ю.І. Онищук, Ю.М. Федевич, Г.В. Башта

Профіль прозапальних цитокінів при цукровому діабеті 1-го типу

Обстежено 70 пацієнтів з цукровим діабетом 1-го типу, з важкою і легкою формою, які перебували на стаціонарному лікуванні у клінічній лікарні швидкої медичної допомоги міста Львова. Проведено визначення цитокінового профілю прозапальних цитокінів. Встановлено, що у пацієнтів обох груп всі показники перевищували значення норми. Спостерігалася позитивна кореляція між вмістом прозапальних цитокінів у крові та важкістю перебігу захворювання.

Ключові слова: цукровий діабет 1-го типу, прозапальні цитокіни, фактор некрозу пухлин α , розчинний рецептор фактора некрозу пухлин, інтерлейкіни 1 β , 6, 8.

ВСТУП

Патогенез цукрового діабету 1-го типу (ЦД) досить складний, а згідно з останніми дослідженнями у його розвитку важлива роль належить цитокінам [6, 11, 15]. Їх взаємодія з β -клітинами призводить до нагромадження в останніх оксиду азоту та інших вільних радикалів, що активують апоптоз інсулінопродукуючих клітин [4, 7].

Слід також зазначити, що продукція прозапальних цитокінів при ЦД 1-го типу є результатом активації специфічних імунних реакцій адаптивного імунітету [1, 10, 12]. Проте роль прозапальних цитокінів у патогенезі ЦД 1-го типу залишається не визначеною. Фактор некрозу пухлин α (ФНП- α) є типовим прозапальним цитокіном і одним із маркерів неспецифічного генералізованого запалення. Він бере участь у розвитку багатьох захворювань і через розчинний рецептор фактора некрозу пухлин (sФНП-R1) може впливати на метаболізм глюкози [8, 9, 13].

Нині є літературні дані про деструктивну дію ФНП- α на ізольовані острівці Лангерганса, які *in vitro* виділені з підшлункової залози і про те, що він є одним з головних цитокінів, який *in vivo* індукує апоптоз інсулінопродукуючих клітин.

При ЦД 1-го типу змінюється вміст розчинного рецептора sФНП-R1, який є природним антагоністом ФНП- α , що здатний пригнічувати його цитотоксичну активність [14].

Водночас інформація про роль різних видів цитокінів при ЦД 1-го типу у людини досить невелика і фрагментарна. Доведено значення цих біологічно активних сполук у початкових механізмах розвитку цього захворювання [1, 7].

Тепер стає зрозумілим, що на ранніх етапах утворення інсулітів завдяки хемокінам відбувається цілеспрямована міграція з циркуляції до острівців Лангерганса антигензалежних лейкоцитів (моноцитів, CD4+-Th1-клітин, CD8-клітин і, можливо, ЕК-клітин), які потім локально секретують цілий спектр інтерлейкінів (ІЛ) -2, -12, -18, ФНП- β , прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β тощо), а також цитотоксичні γ -інтерферон (ІФН), ФНП- α , що викликають апоптоз і некроз [20, 21]. Показана також участь хемокінів у виникненні таких важких ускладнень, як мікро-і макроангіопатії у більш віддалені терміни лікування ЦД 1-го типу.

Метою нашого дослідження було вивчення вмісту ФНП- α , sФНП-R1, ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8 залежно від стадії та від важкості ЦД 1-го типу.

© Ю.Г. Кияк, Н.В. Фартушок, Ю.І. Онищук, Ю.М. Федевич, Г.В. Башта

МЕТОДИКА

Обстежено 70 хворих з ЦД 1-го типу, які перебували на стаціонарному лікуванні у кардіологічному та терапевтичному відділеннях комунальної міської клінічної лікарні швидкої медичної допомоги міста Львова. Всі хворі віком $59,9 \pm 3,4$ років залежно від важкості захворювання розділені на дві групи. До I групи ввійшли 50 хворих чоловіків з важким ступенем захворювання, до II – 20 хворих з легким ступенем. Важкі супутні захворювання у пацієнтів були виключені. Контрольну групу склали 20 практично здорових чоловіків відповідного віку. Пацієнтів лікували за класичною схемою, згідно з протоколом. Обстеження проводили відповідно до вимог комітету з біоетики Львівського національного медичного університету.

Забір крові проводили з ліктьової вени зранку натще в стані спокою на першу добу перебування пацієнта в стаціонарі та після закінчення лікування. До крові добавляли 2 % ЕДТА і центрифугували при 3000 об/хв. Отриману сироватку зберігали в морозильній камері при -30°C . Визначення вмісту цитокінів у сироватці крові пацієнтів проводили імуноферментним методом за допомогою наборів реагентів («Bio Source Europe S.A.», Бельгія).

Через 3 тиж лікування проводили повторний забір крові за вищевказаною методикою. Після закінчення курсу терапії у всіх заморожених зразках сироватки крові визначали

зазначені показники із використанням імуноферментного аналізу (ELISA).

Ступінь важкості стану хворого оцінювали за такими показниками:

1. Легка форма: ЦД 1-го типу без мікро- і макросудинних ускладнень.

2. Середньої важкості: ЦД 1-го типу на цукрознижувальній терапії без або за наявності початкових стадій ускладнень: діабетична ретинопатія, непроліферативна стадія; діабетична нефропатія на стадії мікроальбумінурії; діабетична полінейропатія.

3. Важка форма: Лабільний перебіг ЦД (часті гіпоглікемії і/або кетоацидотичні стани); ЦД 1-го типу із важкими судинними ускладненнями: діабетична ретинопатія, проліферативна або непроліферативна стадія; діабетична нефропатія, стадія протеїнурії або хронічної ниркової недостатності; синдром діабетичної стопи; автономна полінейропатія; постінфарктний кардіосклероз; серцева недостатність; стан після перенесеного інсульту або порушень мозкового кровообігу; оклюзійне ураження судин нижніх кінцівок.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При аналізі імунного статусу хворих на 1-шу та 14-ту доби лікування досліджували вміст прозапальних цитокінів: ФНП- α , sФНП-R1, ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8 (таблиця).

У обох групах хворих виявлено достовірне підвищення всіх показників цитокінів

Зміни вмісту прозапальних цитокінів у сироватці крові хворих на цукровий діабет (ЦД) 1-го типу

Показники, пг/мл	Контрольна група	Важка форма ЦД		Легка форма ЦД	
		I група		II група	
		1-ша доба	14-та доба	1-ша доба	14-та доба
Фактор некрозу пухлин α	$4,48 \pm 0,21$	$13,15 \pm 0,83$	$6,23 \pm 0,03$	$7,87 \pm 0,75$	$5,21 \pm 0,03$
Розчинний рецептор фактора некрозу пухлин	$1,43 \pm 0,03$	$3,64 \pm 0,67$	$1,72 \pm 0,35$	$2,13 \pm 0,91$	$1,32 \pm 0,25$
Інтерлейкін					
1β	$15,55 \pm 0,47$	$32,79 \pm 0,72$	$14,37 \pm 0,32$	$21,43 \pm 1,10$	$12,26 \pm 0,41$
6	$6,93 \pm 0,49$	$15,32 \pm 0,86$	$7,20 \pm 0,58$	$7,28 \pm 0,53$	$6,53 \pm 0,94$
8	$6,90 \pm 0,43$	$29,54 \pm 0,76$	$8,51 \pm 0,76$	$25,71 \pm 0,78$	$7,42 \pm 0,73$

$P < 0,001$ відносно контролю.

на 1-шу добу захворювання порівняно з контрольною групою ($P < 0,001$).

Серед пацієнтів I групи значення ФНП- α були втричі більшими порівняно з контролем ($P < 0,001$) та в 1,7 раза вищі, ніж у пацієнтів II групи. На 14-ту добу спостереження виявлено достовірне його зниження у 2,1 раза порівняно з 1-ю добою, що в 1,4 раза переважає значення контрольної групи ($6,23 \text{ пг/мл} \pm 0,03 \text{ пг/мл}$). У пацієнтів II групи ФНП- α на 14-ту добу знизився в 1,5 раза та перевищував контроль на 16 %. ФНП- α є типовим прозапальним цитокином і вважається одним із маркерів неспецифічного генералізованого запалення [23, 30].

Результати дослідження підтверджують, що підвищення вмісту ФНП- α характерно для гострої фази запалення, коли на ранній стадії проходить деструкція β -клітин. Це відображає пік аутоімунного процесу, який відбувається у підшлунковій залозі [31]. Внаслідок руйнування β -клітин і пригнічення аутоімунного процесу вміст ФНП- α знижується. Проте при погіршенні стану хворого, виникненні запальних і судинних ускладнень може відбутися повторне значне підвищення цього показника, що свідчить про несприятливий прогноз лікування.

Значення sФНП-R1 у пацієнтів з важкою формою ЦД 1-го типу – ($3,64 \pm 0,67$) пг/мл на 1-шу добу було в 2,5 та в 1,7 раза вище порівняно з II групою відповідно. Після лікування на 14-ту добу значення цього показника зменшилися в 2 рази у I групі та в 1,6 раза у II групі порівняно з 1-ю добою захворювання, що наблизило його до норми.

Цитокинові рецептори відіграють важливу роль у підтриманні гомеостазу лейкоцитів в організмі за допомогою регуляції їх міграції та адгезії [1, 22]. Слід відмітити, що вони мають чітку селективну вибірковість за відношенням до певного фенотипу клітин.

ІЛ-1 β у I групі на 1-шу добу вдвічі перевищував контроль ($P < 0,001$) та в 1,5 раза – значення у II групі. Через 14 діб цей показник у I групі нижчий в 2,3 раза порівняно з 1-ю добою та менший від контролю на 8 %. У пацієнтів

з легкою формою ЦД ІЛ-1 β у 1,4 раза перевищує контрольні значення та на 14-ту добу лікування нижчий на 21 % відносно контролю.

Згідно з літературними даними, ІЛ-1 β розглядається як ключовий медіатор, що викликає гальмування секреції інсуліну і стимуляцію експресії гена, який кодує індуцибельну синтазу оксиду азоту. Остання призводить до синтезу NO та смерті β -клітин підшлункової залози через некроз або апоптоз в експериментальних тварин при спонтанному аутоімунному діабеті [16].

Однак у людини цитотоксичність ІЛ-1 β на острівці Лангерганса проявляється при сумісній дії з γ – ІФН і /або ФНП- α . Вважають, що загибель β -клітин у людини настає внаслідок апоптозу [4].

Вміст ІЛ-6 у I групі пацієнтів на 1-шу добу захворювання перевищував у 2,2 раза значення контрольної групи ($P < 0,001$) та в 1,2 раза – II групи ($P < 0,001$). На 14-ту добу захворювання цей показник у I групі був вдвічі меншим, ніж на 1-шу добу, а у II групі за цей час наблизився до контролю.

Після лікування значення ІЛ-6 знизилися у I та II групах майже в 3,5 раза порівняно з показниками на 1-шу добу, але в 1,2 раза перевищували норму. Значне підвищення вмісту цього цитокину зумовлено інфекцією, ЦД і нестачею інсуліну, а також зростанням вмісту ФНП- α .

На 1-шу добу вміст ІЛ-8 у I групі у 4,2 раза вищий від норми та в 1,2 раза від значень у II групі. Після лікування цей показник залишався на 23 % вищим у порівнянні з контролем, тоді як у II групі майже наближався до норми.

Проаналізувавши наведені вище результати, з'ясували, що при гострій запальній реакції зміни вмісту ІЛ-8 найбільш виражені.

Відомо, що ІЛ-8 контролює переміщення циркулюючих Т-лімфоцитів, нейтрофілів та еозинофілів гранулоцитів і базофілів із кровотоку у тканини та вогнища запалення [17, 19]. Він може індукувати активність мігруючих лейкоцитів, їх адгезію до судинної стінки. Підвищення вмісту ІЛ-8 у крові часто

передусе розвитку атеросклерозу та серцево-судинним захворюванням [7, 12, 15, 16].

Нами встановлено кореляційні зв'язки між усіма прозапальними цитокінами, які досліджували, що свідчить про важливу роль запального процесу в патогенезі ЦД 1-го типу.

Переважно цитокіни діють на клітину, кон'юговану з клітиною-продуцентом або на сусідню. Для них характерно, що одна і та сама клітина може секретувати декілька різних цитокінів і в той же час цитокін може продукуватися різними її видами [8, 11]. Тому інформація про стан цитокінової системи у хворих на діабет важлива, з одного боку, їх значенням у розвитку ЦД, а з іншого – формуванням запальної відповіді [4, 5, 7, 13, 14].

Таким чином, отримані результати вказують, що ФНП- α , sФНП-R1, ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8 беруть активну участь у механізмі розвитку початкового етапу аутоімунного процесу в острівцях Лангерганса. Особливо ІЛ-8 у латентній стадії розвитку захворювання, направляє антигензалежні лімфоцити, які секретують прозапальні цитокіни із крові в острівці Лангерганса, що призводить до загибелі β -клітин, тому, очевидно, він може бути раннім маркером передіабету [3, 4].

ВИСНОВКИ

1. У пацієнтів з важкою формою ЦД (І група) та з легкою формою (ІІ група) вміст прозапальних цитокінів перевищував норму, що відповідає синдрому системної запальної відповіді.

2. У пацієнтів І групи показники були вищими, ніж у пацієнтів ІІ групи, що вказує на позитивний кореляційний зв'язок між вмістом у крові прозапальних цитокінів і важкістю захворювання.

3. При порівнянні вмісту у крові прозапальних цитокінів на момент надходження пацієнтів у клініку і на 14-ту добу відзначається позитивний кореляційний зв'язок між ними, опосередкований важкістю процесу.

4. Отримані результати дають змогу вважати, що при подальшому вивченні вмісту

цитокінів та їх рецепторів можливе створення нових ефективних методів профілактики й лікування ЦД 1-го типу і його ускладнень.

**Ю.Г. Кияк, Н.В. Фартушок, Ю.И. Онищук,
Ю.М. Федевич, Г.В. Башта**

ПРОФИЛЬ ПРОВСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-ГО ТИПА

Обследовано 70 пациентов с сахарным диабетом 1-го типа, с тяжелой и легкой формой, находящихся на стационарном лечении в клинической больнице скорой медицинской помощи города Львова. Проведено определение содержания провоспалительных цитокинов. Установлено, что в пациентов обеих групп все показатели превышали значення нормы. Наблюдалась позитивная корреляция между содержанием провоспалительных цитокинов в крови и сложностью течения заболевания.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа, провоспалительные цитокины, фактор некроза опухоли α , растворимый рецептор фактора некроза опухоли, интерлейкины 1 β , 6, 8.

**Y. Kyiak, N. Fartushok, Y. Onyschuk, Y. Fedevych,
G. Bashta.**

PROFILE OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS

The study involved 70 patients with type 1 diabetes who were under medical care in the clinical city hospital. Patients were divided into two groups: group I included patients with severe form of diabetes with complications and group II included patients without complications. The cytokine profile in the diabetes mellitus patients was investigated. The study showed that all indices of proinflammatory cytokines in patients of both groups were higher than in control healthy subjects. The positive correlation between the level of proinflammatory cytokines in blood and severity of the course of disease was revealed.

Key words: diabetes mellitus, proinflammatory cytokines, TNF- α , sTNF-R1, IL-1 β , IL-6, IL-8.

*Danylo Halytskyi Lviv National Medical University,
Department of Family Medicine and Biological Chemistry*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. – К.: Наук. думка, 1998. – 315 с.
2. Попова В.В., Зак К.П. Открытие аутоантител к островкам Лангерганса поджелудочной железы — выдающе-

- еся досягнення в області предсказання виникнення і діагностики типу сахарного діабета в клініці // Лікар. справа. – 2006. – № 7. – С. 3–12.
3. Попова В.В., Мельниченко С.В., Зак К.П., Маньковський Б.Н. Рівень циркулюючого хемокіну – інтерлейкіну-8 у передклінічній і ранній клінічній стадіях цукрового діабету 1-го типу у дітей // Клін. ендокринологія та ендокрин. хірургія. – 2007. – № 2(19). – С. 38–41.
 4. Попова В.В., Мельниченко С.В., Лукашова Р.Г. Уровень цитокинов в крові дітей с вперше виявленим сахарним діабетом 1 типу // Доп. НАН України. – 2004. – № 5. – С. 190–193.
 5. Beyan H., De Witt H.J., Leslie D.G., Drexhage H.A. Abnormal monocyte-related biomarkers in type 1 diabetes; a study of identical twins // *Diabetologia*. – 2007. – № 50 (Suppl. 1). – P. 191.
 6. Bozza F.A., Salluh J.I., Japiassu A.M. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis // *Crit. Care*. – 2007. – №11 (2). – P. 49.
 7. Braunersreuther V., Mach F., Steffens S. The specific role of chemokines in atherosclerosis // *Thromb. Haemost.* – 2007. – № 97 (5). – P. 714–721.
 8. Delves P.J., Roitt I.M. The immune system. First of two parts. N // *Engl. J. Med.* – 2000. – № 343 (1). – P. 37–49.
 9. Devouassoux G., Levy P., Rossini E. Sleep apnea is associated with bronchial inflammation and continuous positive airway pressure-induced airway hyperresponsiveness // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – № 119 (3). – P. 597–603.
 10. Chavey C., Bibeau F., Gourgou-Bourgade S. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content // *Breast Cancer Res.* – 2007. – № 9 (1). – P. 15.
 11. Chazov E.I., Bepalova J.D., Arefieva T.I. The peptide analogue of MCP-1 65-76 sequence is an inhibitor of inflammation // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2007. – № 85 (3-4). – P. 332–340.
 12. Chow F.Y., Nikolic-Paterson D.J., Ma F.Y. Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice // *Diabetologia*. – 2007. – № 50 (2). – P. 471–480.
 13. Coll B., Alonso-Villaverde C., Joven J. Monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis: is there room for an additional biomarker // *Clin. Chim. Acta.* – 2007. – № 383 (1-2). – P. 21–29.
 14. Cruikshank W.W., Kornfeld H., Center D.M. Interleukin-16 // *J. Leukoc. Biol.* – 2000. – № 67 (6). – P. 757–766.
 15. Frangogiannis N.G. Chemokines in ischemia and reperfusion // *Thromb. Haemost.* – 2007. – № 97 (5). – P. 738–747.
 16. Gallagher K.A., Liu Z.J., Xiao M. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha // *J. Clin. Invest.* – 2007. – № 117 (5). P. 1249–1259.
 17. Gieryng A., Bogunia-Kubik K. The role of the SDF-1-CXCR4 axis in hematopoiesis and the mobilization of hematopoietic stem cells to peripheral blood // *Postepy Hig. Med. Dosw.* – 2007. – № 61. – P. 369–383.
 18. Hedman M., Faresjo M., Axelsson S. Suppressed Th1 and induced naive T-cell phenotype in type 1 diabetes children // *Diabetologia*. – 2007. – № 50 (Suppl. 1). – P. 191.
 19. Heinzel K., Benz C., Bleul C.C. A silent chemokine receptor regulates steady-state leukocyte homing in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – № 104 (20). – P. 8421–8426.
 20. Hojo S., Koizumi K., Tsuneyama K. High-level expression of chemokine CXCL16 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer // *Cancer Res.* – 2007. – № 67 (10). – P. 4725–4731.
 21. Ito A., Suganami T., Miyamoto Y. Role of MAPK phosphatase-1 in the induction of monocyte chemoattractant protein-1 during the course of adipocyte hypertrophy // *J. Biol. Chem.* – 2007. – № 282 (35). – P. 25445–25452.
 22. Kanamori H., Matsubara T., Mima A. Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – № 360 (4). – P. 772–777.
 23. Kara I.O., Sahin B., Gunesacar R. Expression of soluble CD27 and interleukins-8 and -10 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease stage and prognosis // *Adv. Ther.* – 2007. – № 24 (1). – P. 29–40.
 24. Kuwano Y., Fujimoto M., Watanabe R. Serum chemokine profiles in patients with alopecia areata // *Brit. J. Dermatol.* – 2007. – № 157 (3). – P. 466–473.
 25. Lee E.B., Kim J.Y., Zhao J. Haplotype association of IL-8 gene with Behcet's disease // *Tissue Antigens*. – 2007. – № 69 (2). – P. 128–132.
 26. Liebrich M., Guo L.H., Schluesener H.J. Expression of interleukin-16 by tumor-associated macrophages/activated microglia in high-grade astrocytic brain tumors // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* – 2007. – № 55 (1). – P. 41–47.
 27. Mehrad B., Keane M.P., Strieter R.M. Chemokines as mediators of angiogenesis // *Thromb. Haemost.* – 2007. – № 97 (5). – P. 755–762.
 28. Millward J.M., Caruso M., Campbell I.L. IFN-gamma-induced chemokines synergize with pertussis toxin to promote T cell entry to the central nervous system // *J. Immunol.* – 2007. – № 178 (12). – P. 8175–8182.
 29. Murdolo G., Hammarstedt A., Sandqvist M. Monocyte chemoattractant protein-1 in subcutaneous abdominal adipose tissue: characterization of interstitial concentration and regulation of gene expression by insulin // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – № 92 (7). – P. 2688–2695.
 30. Nishioka Y., Manabe K., Kishi J. CXCL9 and 11 in patients with pulmonary sarcoidosis: a role of alveolar macrophages // *Clin. Exp. Immunol.* – 2007. – № 149 (2). – P. 317–326.
 31. Nomura S., Ishii K., Kamitsuji Y. Elevation of activated platelet-dependent chemokines in patients with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab)-treated non-Hodgkin's lymphoma // *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* – 2007. – № 13 (2). – P. 206–212.