

УДК 616.831-005.1-071.7

РОЛЬ ПОРУШЕНЬ ЦИТОКІНОВОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ У РОЗВИТКУ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ ТИПУ 2

*Н.В.ПАШКОВСЬКА, А.І.КУРЧЕНКО,
В.М.ПАШКОВСЬКИЙ, В.О.КРИВИЧ*

Буковинський державний медичний університет (м. Чернівці),
Національний медичний університет ім. О.О.Богомольця (м.Київ)

Цукровий діабет (ЦД) останнім часом набув ознак «неінфекційної епідемії», яка охопила більше чверті мільярда жителів нашої планети. В Україні за останні 15 років захворюваність на цю ендокринно-обмінну патологію зростає удвічі. Кількість пацієнтів з ЦД ще у 2006 році подолати мільйонну позначку, водночас, за даними епідеміологічних досліджень, реальний показник є принаймні утричі вищим [1].

Поряд з цим зростає число ускладнень ЦД, серед яких важливе місце посідають діабетичні ангіопатії. Більшість дослідників вважають, що механізм ураження ендотелію судин при ЦД є надзвичайно складним та багатоланцюговим, відводячи провідну роль гіперглікемії, процесам неферментативного гліколізування білків, дисліпідемії тощо [2].

Водночас питання ролі порушень експресії прозапальних цитокінів у формуванні морфофункціональних порушень ендотелію у хворих на цукровий діабет типу 2 є дискусійним, а існуючі дані літератури – суперечливі, що вказує на актуальність подальших досліджень в цьому напрямку.

Мета дослідження - з'ясування ролі порушень цитокінової регуляції імунної відповіді у розвитку ендотеліальної дисфункції у хворих на цукровий діабет типу 2.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Обстежено 43 хворих на цукровий типу 2 (46,5% чоловіків та 53,5% жінок, середній вік - 55,3±8,59 року, середня тривалість ЦД - 8,2±4,29 року) та 20 практично здорових осіб, що склали контрольну групу. Дослідження проводилося на базі Чернівецького обласного ендокринологічного центру.

Рівень глікемії досліджували глюкозооксидазним методом із використанням наборів НПП «Філісит діагностика» (Україна), глікозильованого гемоглобіну (HbA1c) - на автоматичному аналізаторі глікозильованого гемоглобіну D10 «Bio-Rad Laboratories Inc.» (Франція). Імунореактивний інсулін (ІРІ) досліджували імунофер-

ментним методом із використанням реактивів фірми DRG International Inc. (США). Ступінь інсулінорезистентності встановлювали за індексом маси тіла (ІМТ), індексами Caro, HOMA-IR [3] Функціональний стан ендотелію вивчали за результатами дослідження ендотеліозалежної вазодилатації плечової артерії (ЕЗВД) [4], вмістом у крові стабільних метаболітів монооксиду нітрогену (NO) за Green L.C. [5], а також ендотеліну-1 (ЕТ-1) («Bender MedSystems», Австрія) імуноферментним методом. Кількість циркулюючих у крові ендотеліоцитів визначалася за методом J. Hladovec у модифікації Н.Н.Петрищева та співавторів [6].

Вміст в сироватці крові цитокінів, зокрема фактору некрозу пухлин- α (TNF- α), інтерлейкіну-1- β (IL-1- β), інтерлейкіну-6 (IL-6), інтерлейкіну-8 (IL-8), розчинної молекули міжклітинної адгезії 1 типу (ICAM-1) визначали імуноферментним методом із застосуванням комерційних тест-систем фірм «Diacclone» (Франція) та «Bender MedSystems» (Австрія).

Статистичний аналіз результатів дослідження здійснювався за спеціальними програмами із застосуванням параметричних (t-критерій Стьюдента) та непараметричних (ранговий критерій Манна-Уїтні, парний Т-критерій Вілкоксона) методів варіаційної статистики, які порівнювалися із адекватними групами контролю. Математичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програм Primer of Biostatistics. Version 4.03 (Glantz S., США), SPSS 16.0, Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Перший етап нашого дослідження полягав у встановленні ступеня інсулінорезистентності у хворих на ЦД типу 2.

Дані антропометричних досліджень наведені в таблиці 1. Як видно з представлених результатів, в основній групі ІМТ вірогідно перевищував відповідний у контролі на 18,2%, об'єм талії - на 6,3% серед чоловіків та на 17,6% серед жінок відповідно.

Таблиця 1

Характеристика показників антропометрії та вуглеводного обміну у хворих на цукровий діабет типу 2

Показники	Контрольна група, n=20 (M±m)	Цукровий діабет типу 2, n=43 (M±m)
Індекс маси тіла, кг/м ²	24,04±0,298	28,57±0,508 *
Обвід талії, см: чоловіки	90,21±0,673	95,83±0,614*
жінки	74,06±0,565	88,00±1,042*
Інсулін, мкОД/л	9,66±0,427	30,39±0,906*
HbA1c, %	5,56±0,098	8,86±0,225*
Індекс HOMA-IR	2,15±0,110	13,42±0,846*
Індекс Саго (глюкоза/інсулін)	0,54±0,028	0,33±0,022*

Примітки: n- кількість спостережень;
* – вірогідні зміни щодо контролю

Нормальна маса тіла зареєстрована тільки у 18,6% хворих, у той час як у 41,9% діагностована надлишкова маса тіла, 25,6% - ожиріння I ступеня, 9,3% –II ступеня, 4,6% - III ступеня відповідно. Абдомінальне ожиріння встановлено у майже третини (32,6%) пацієнтів. Такі результати свідчать про значний ризик інсулінорезистентності та розвитку метаболічних порушень у досліджуваних пацієнтів.

За результатами лабораторних досліджень відмічалось вірогідне зростання показника HbA1c на 57,9%. Рівень сироваткового інсулі-

ну та індекс HOMA-IR вірогідно перевищували контрольні показники у 3,2 раза та 6,2 раза відповідно, індекс Саго-IP зменшувався на 24,5%.

Як відомо, інсулінорезистентність супроводжується підвищенням експресії прозапальних цитокінів, що, у свою чергу, веде до розвитку та прогресування змін з боку різних органів та систем, зокрема серцево-судинної.

Як показали результати дослідження, ЦД типу 2 супроводжується розвитком вираженої ендотеліальної дисфункції (табл. 2).

Таблиця 2

Характеристика показників функціонального стану ендотелію та цитокінової регуляції у хворих цукровий діабет типу 2

Показники	Групи, кількість спостережень, вірогідність змін	
	Контрольна група n=20 (M±m)	Цукровий діабет типу 2 n=43 (M±m)
ЕЗВД, %	10,86±0,406	4,93±0,098*
Ендотелін-1, пмоль/л	6,34±0,319	14,10±0,446*
Метаболіти NO, мкмоль/л	16,80±0,906	7,20±0,259*
Ендотеліоцити, 104/л	3,20±0,138	17,24±0,546*
TNF-α, пг/мл	24,19±1,46	106,50±3,940*
IL-1-β, пг/мл	30,14±2,281	115,40±6,477*
IL-6, пг/мл	20,06±1,382	76,97±3,841*
IL-8, пг/мл	34,74±2,370	112,40±3,618*

Примітки: n- кількість спостережень;
* – вірогідні зміни щодо контролю

Зокрема показник ЕЗВД знижувався на 54,6% з високим ступенем вірогідності ($P < 0,001$). На цьому фоні відмічалася статистично значуще зростання вмісту ендотеліального судинозвужувального пептиду ET-1 у 2,2 раза. Значний ступінь ушкодження судинного ендотелію при ЦД типу 2 також підтверджувався суттєвим вірогідним зменшенням вмісту в крові стабільних метаболітів монооксиду

нітрогену (на 57%). Найбільш помітних змін зазнавав показник кількості злущених ендотеліоцитів в периферичній крові, який вірогідно зростав у 5,3 раза.

Результати кореляційного аналізу показали (табл. 3), що функціональний стан ендотелію пов'язаний із ступенем інсулінорезистентності, зокрема з ІМТ, обводом талії, інсулінемією, індексом HOMA-IR, а також рівнем HbA_{1c}.

Таблиця 3

Дані лінійно-регресійного аналізу кореляцій між показниками функції ендотелію та вуглеводного обміну у хворих на цукровий діабет типу 2

Показники	ЕЗВД	ендотелін-1	метаболіти NO	ендотеліоцити
HbA _{1c}	R=-0,517*	R=0,298	R=-0,464*	R=0,585*
Інсулін	R=-0,539*	R=-0,589*	R=-0,421*	R=0,652*
HOMA-IR	R=-0,545*	R=-0,488*	R=-0,309	R=0,622*
ІМТ	R=-0,475	R=0,569*	R=-0,401*	R=0,487
Обвід талії	R=-0,574*	R=0,597*	R=-0,503*	R=0,576*

Примітки: * – достовірність кореляційного зв'язку;
n – число пар у регресійному аналізі.

Відомо, що у формуванні діабетичних ангіопатій цитокинам належить важлива роль забезпечення клітинних реакцій, з якими пов'язано не тільки ушкодження судинного ендотелію, а й формування, розвиток і подальша «доля» атеросклеротичної бляшки. При цьому утворюється проліферативний пул на місці запалення і фактично створюється вся конструкція останньої [7]. Ось чому наступним етапом нашого дослідження було встановлення особливостей показників цитокинової регуляції при ЦД типу 2.

Серед прозапальних агентів, що беруть участь в ушкодженні судинної стінки, особливої уваги заслуговує TNF- α . Зростання його в крові спостерігають вже на ранніх етапах патологічного процесу у відповідь на пошкодження ендотелію модифікованими ліпопротеїнами. Цей прозапальний цитокін посилює експресію молекул адгезії, активує макрофаги, нейтрофіли, сприяє секреції простагландинів, надає хемотаксичної дії на різні клітини, зумовлює при цьому синтез білків гострої фази запалення [8]. У обстежених нами пацієнтів встановлено вірогідне збільшення вмісту в сироватці крові TNF- α у 4,4 раза (табл. 4).

Відомо, що окрім TNF- α активований ендотелій секретує такі сполуки, як IL-1 та IL-2, що здатні активувати макрофаги інтими. У свою

чергу, активовані макрофаги виробляють в субендотеліальний простір набір цитокинів, що викликають подальшу активацію ендотелію, зокрема IL-1, IL-6, IL-8 тощо [9]. За результатами нашого дослідження при ЦД типу 2 експресія IL-1 та IL-6 вірогідно зростала у 3,8 раза.

Відомо, що IL-8, який відноситься до групи хемокінів, володіє вираженими прозапальними властивостями, викликає експресію молекул міжклітинної адгезії і підсилює прилипання нейтрофілів до ендотеліальних клітин та субендотеліальних матричних білків, що свідчить про його основну роль в опосередкуванні запальної відповіді за атеросклерозу [10]. У хворих на ЦД типу 2 нами зареєстровано вірогідне зростання сироваткового вмісту IL-8 порівняно із контролем у 3,2 раза.

Таким чином, при ЦД типу 2 порушення цитокинової регуляції характеризується зростанням експресії цитокинів TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8.

Проведений кореляційний аналіз (табл. 3) показав, що експресія досліджуваних цитокинів у хворих на ЦД тісно пов'язана з показниками вуглеводного обміну, інсулінорезистентності, а також функціонального стану ендотелію, що засвідчує роль порушень цитокинової регуляції у механізмах виникнення судинних порушень при ЦД.

Таблиця 3

Дані лінійно-регресійного аналізу кореляцій між показниками цитокинової регуляції, функції ендотелію та вуглеводного обміну у хворих на цукровий діабет типу 2

Показники	TNF- α	IL-1- β	IL-6	IL-8
HbA1c	R=0,672*	R=0,584*	R=0,488*	R=0,561*
Інсулін	R=0,619*	R=0,575*	R=0,421*	R=0,455*
НОМА-IR	R=0,645*	R=0,500*	R=0,465*	R=0,298*
ІМТ	R=0,505*	R=0,345	R=0,408*	R=0,475*
Обвід талії	R=0,687*	R=0,511*	R=0,623*	R=0,398
ЕЗВД	R=-0,571*	R=-0,524*	R=-0,254	R=-0,441*
Ендотелін-1	R=0,487*	R=0,380*	R=0,462*	R=0,416*
Метаболіти NO	R=-0,620*	R=-0,431*	R=-0,389	R=-0,516*
Ендотеліоцити	R=0,741*	R=0,585*	R=0,498*	R=0,632*

Примітки: – достовірність кореляційного зв'язку;
n – число пар у регресійному аналізі.

Таким чином, у хворих на ЦД типу 2 посилюються процеси десквамації судинного ендотелію із одночасним зниженням ендотелійзалежної вазодилатації, зростанням експресії судиннозвужувальних чинників та зменшенням вмісту стабільних метаболітів монооксиду нітрогену, які пов'язані із зростанням експресії цитокінів TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8.

Аналіз даних літератури та результатів власних досліджень засвідчує, що, незважаючи на те, що механізм ураження ендотелію судин при ЦД є складним та багатоланцюговим, первинна роль у ньому належить гіперглікемії та пов'язаним з нею феноменом глюкозотоксичності. Неферментативне гликозилювання білків та інших сполук, що містять аміногрупи, аутоокиснення глюкози з підвищенням утворення вільних радикалів, пряма глюкозотоксичність здійснюють запуск каскаду реакцій з боку імунної, згортальної, фібринолітичної та інших систем. Це супроводжується посиленням експресії адгезивних молекул лейкоцитами, тромбоцитами та ендотеліальними клітинами [11].

Значний ступінь ендотеліальної дисфункції у хворих на ЦД типу 2, на нашу думку, зумовлений, окрім феномену глюкозотоксичності, наявністю інших патологічних механізмів, що пов'язані з гіперінсулінемією та інсулінорезистентністю.

ВИСНОВКИ

1. У хворих на цукровий діабет типу 2 посилюються процеси десквамації судинного ендотелію із зростанням показника ендотеліоцитемії, зниженням ендотелійзалежної вазо-

дилатації, підвищенням сироваткового рівня ендотеліну-1 та зменшенням вмісту стабільних метаболітів монооксиду нітрогену з високим ступенем вірогідності.

2. На тлі цукрового діабету типу 2 вірогідно зростає експресія прозапальних цитокінів - фактору некрозу пухлин- α , інтерлейкіну-1 β , інтерлейкіну-6, інтерлейкіну-8.
3. Ступінь прояву ендотеліальної дисфункції при цукровому типу 2 залежить від показників інсулінорезистентності (обводу талії, інсулінемії, індексу НОМА-IR) та пов'язана з експресією прозапальних цитокінів (фактору некрозу пухлин- α , інтерлейкіну-1 β , інтерлейкіну-6, інтерлейкіну-8).

ЛІТЕРАТУРА

1. Маньковский Б.Н. Лечение артериальной гипертензии у больных сахарным диабетом / Б.Н. Маньковский // Ліки України. -2009. - №5 (131). - С. 9-13.
2. Эндотелиальная дисфункция и микроциркуляторные нарушения у больных сахарным диабетом типа II // Ю.В. Башкирова, Т.А. Рудницкая, Р.С. Хапаев [и др.] // Бюллетень РАМН. - 2008. - №6 (134). - С. 182-186.
3. An investigation of the population impact of variation in HbA1c levels in older people in England and Wales: from a population based multi-centre longitudinal study / L. Gao, F.E. Matthews, L.A. Sargeant // MRC CFAS. BMC Public. Health. - 2008. - Vol. 11, №8. - P. 54.

4. *Sorensen K.E., Celermajer D.S., Spiegelhalter D.J. et al.* Noninvasive measurement of human endothelium-dependent arterial responses: accuracy and reproducibility // *Brit. Heart J.* – 1995. – Vol. 74. – P. 247-253.
5. *Green L.C.* Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids/ *L.C. Green, D.A. Wagner, G. Glogowski [et al.] // Analyt. Biochem.*- 1982.- Vol. 126.- P.131-138.
6. *Петрищев Н.Н., Беркович О.А., Власов Т.Д. и др.* Диагностическая ценность определения десквамированных эндотелиальных клеток крови// *Клин. лаб. диагностика.* - 2001. - №1. - С.50–52.
7. *Glaros T.* Macrophages and fibroblasts during inflammation, tissue damage and organ injury / *T. Glaros, M. Larsen, L.Li // Front. Biosci.* - 2009. - Vol. 14. - P. 3988-3993.
8. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction / *H. Zhang, Y. Park, J. Wu [et al.] // Clin. Sci.* - 2009. - Vol. 116, №3. - P. 219-230.
9. [Insights into the roles of the inflammatory mediators IL-1, IL-18 and PGE2 in obesity and insulin resistance / *O. Osborn, H. Gram, E.P. Zorrilla [et al.] // Swiss Med Wkly.* - 2008. - Vol. 138, №45-46. - P. 665-673.].
10. [*Fisman E.Z.* Biomarkers in cardiovascular diabetology: interleukins and matrixins. / *E.Z. Fisman, Y. Adler, A.Tenenbaum // Adv. Cardiol.* - 2008. - Vol. 45. - P. 44-64.].
11. *Wittchen E.S.* Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration / *E.S. Wittchen // Front. Biosci.* - 2009. - Vol. 1, №14. - P. 2522-2545.

РЕЗЮМЕ

РОЛЬ НАРУШЕНИЙ ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА В РАЗВИТИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ТИПА 2

*Н.В.Пашковская, А.И.Курченко,
В.М.Пашковский, В.О.Кривич*

У больных сахарным диабетом типа 2 установлено усиление процессов десквамации сосудистого эндотелия с ростом показателя эндотелиоцитемии, снижением эндотелийзависимой вазодилатации, повышением сывороточного уровня эндотелина-1 и уменьшением содержания стабильных метаболитов монооксида азота. Зарегистрирован достоверный рост экспрессии провоспалительных цитокинов - фактора некроза опухоли- α , интерлейкина-1, интерлейкина-6, интерлейкина-8. Экспрессия указанных цитокинов тесно связана с показателями углеводного обмена, инсулинорезистентности, а также функционального состояния эндотелия, что указывает на роль нарушений цитокиновой регуляции в механизмах возникновения сосудистых нарушений при сахарном диабете типа 2.

Ключевые слова: сахарный диабет, цитокины, эндотелиальная дисфункция

SUMMARY

ROLE OF THE DISORDERS OF CYTOKINE REGULATION OF IMMUNE RESPONSE IN THE DEVELOPMENT OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN CASE OF DIABETES MELLITUS TYPE 2

N.V.Pashkovska, A.I.Kurchenko, V.M.Pashkovsky, V.O.Krivich

Intensification of the processes of endothelial desquamation followed by increased endotheliocytemia, reduced endothelium-dependent vasodilatation, elevated endothelin-1 serum level and decreased content of stable metabolites of nitrogen monoxide was established in patients with diabetes mellitus type 2. The significant increase of pro-inflammatory cytokines expression – tumour necrosis factor- α , interleukin-1, interleukin-6, interleukin-8 was detected. Expression of above mentioned cytokines is closely connected with the indices of carbohydrate metabolism, insulin resistance and endothelium functional state, signifying the role of cytokine regulation disturbances in the development of vascular disorders in case of diabetes mellitus type 2.

Key words: diabetes mellitus, cytokines, endothelial dysfunction.