

О.П. Витовская, Т.С. Ахмад, Н.Г. Бычкова

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев

Нарушения цитокиновой регуляции у пациентов с диабетической ретинопатией

Цель работы. Изучить уровень основных про- и противовоспалительных цитокинов в плазме крови, а также их продукцию иммунокомпетентными клетками периферической крови у пациентов с диабетической ретинопатией (ДР). **Объект и методы исследования.** Обследовано 113 больных сахарным диабетом (СД) 2-го типа, из которых 57 — с сопутствующей ДР (основная группа) и 56 — без ДР (группа сравнения). Группы рандомизированы по возрасту и полу. Контрольную группу составили 35 здоровых лиц. **Результаты.** У пациентов с ДР отмечена высокая концентрация провоспалительных цитокинов в плазме крови, при этом уровень фактора некроза опухоли- α в 2,66 раза выше, чем у здоровых лиц, и на 32,9% выше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$); интерлейкина (ИЛ)- 1β — в 2,65 раза и на 21,9% ($p < 0,05$); ИЛ-6 — в 6,33 раза и в 2,95 раза ($p < 0,05$); ИЛ-8 — в 5,67 раза и в 2,34 раза ($p < 0,05$) соответственно. Одновременно выявлено повышение спонтанной и митоген-индуцированной продукции этих цитокинов иммунокомпетентными клетками периферической крови, а также достоверно более высокий уровень активированных лимфоцитов и растворимых молекул адгезии. **Выводы.** У пациентов с ДР отмечено нарушение процессов адгезии и кооперации иммунокомпетентных клеток, в результате чего усиливается их активация, эффекторные функции и миграция в очаг воспаления в сосудистой стенке, что сочетается с повышением спонтанной продукции провоспалительных цитокинов и трансформирующего фактора роста- β , которые также оказывают повреждающее действие на органы-мишени. Именно их постоянная неконтролируемая гиперпродукция является ключевым моментом последующего повреждения органа зрения при СД с развитием более тяжелых форм ДР.

Ключевые слова: сахарный диабет, диабетическая ретинопатия, иммунитет, цитокины, молекулы межклеточной адгезии, спонтанная и митоген-индуцированная продукция цитокинов.

Введение

Сахарный диабет (СД) представляет одну из актуальнейших медико-социальных и экономических проблем современной медицины. В 2007 г. Всемирная организация здравоохранения назвала СД проблемой всех возрастов и всех стран, а рост заболеваемости позволил говорить о его глобальной эпидемии (Zhang P. et al., 2010; WHO, 2012).

В связи с постоянно увеличивающимся числом больных СД во всем мире повышается распространенность поздних диабетических осложнений. Одним из наиболее прогностически неблагоприятных осложнений СД является диабетическая ретинопатия (ДР), в 30–90% случаев приводящая к слепоте и инвалидности по зрению у лиц трудоспособного возраста в экономически развитых странах и существенно влияющая на качество жизни больных. На долю ДР приходится 80–90% всей инвалидности по зрению, обусловленной СД (Балаболкин М.И. и соавт., 1999).

В последнее десятилетие значительно расширяются научные сведения об эндотелии сосудов как активно функционирующей сложной метаболической системе. Патологические реакции, приводящие к развитию сосудистых осложнений, протекают на уровне эндотелиальных клеток, которые являются инсулиннезависимыми, что делает их уязвимыми для повреждающего действия гипергликемии. Беспрепятственное проникновение глюкозы в эндо-

телиальные клетки нарушает продукцию эндотелием вазоактивных факторов, факторов роста и пролиферации (Балаболкин М.И. и соавт., 1999; Балашова Л.М., 1999).

К основным патогенетическим механизмам развития ДР (стимуляция формирования микроаневризм и ремоделирование капиллярной сети с последующей ишемией) относят цитокиновый дисбаланс, включающий повышение уровня эндотелина, отмечаемое даже у пациентов с коротким стажем лечения СД (Балашова Л.М., 1999). Изучение изменений цитокинового профиля у больных ДР представляет большой интерес для получения более полного представления о патогенезе заболевания и разработке новых методов его лечения (Балаболкин М.И. и соавт., 1999; Балашова Л.М., 1999).

Цель работы — изучить уровень основных про- и противовоспалительных цитокинов в плазме крови, а также их продукцию иммунокомпетентными клетками (ИКК) периферической крови у пациентов с ДР.

Объект и методы исследования

Обследовано 113 больных СД 2-го типа, из которых 57 — с сопутствующей ДР (основная группа) и 56 — без ДР (группа сравнения). Группы рандомизированы по возрасту и полу. Контрольную группу составили 35 здоровых лиц без признаков СД и ДР.

Содержание про- и противовоспалительных цитокинов, уровень растворимых молекул адгезии sICAM-1 и sVCAM-1 определяли методом иммуноферментного анализа с помощью сертифицированных в Украине наборов для иммуноферментного анализа «Вектор-Бест» (Россия), «Pro Con» (Россия) и «Diaclon» (Франция). Для получения супернатантов клетки периферической крови (использовали разведенную в 4 раза гепаринизированную кровь) инкубировали в присутствии митогена (липополисахарид, фитогемагглютинин, кон-А-индуцированный синтез) и в среде культивирования (RPMI-1640 без митогена — спонтанный синтез) в течение 24–48 ч в 5% атмосфере CO_2 при температуре 37 °С. После культивирования пробы центрифугировали в течение 10 мин при 400 g, собирали надосадочную жидкость для дальнейшего тестирования (Копелян И.И., Григорьева М.П., 1972).

Содержание активированных субпопуляций лимфоцитов (CD11b+, CD25+, CD54+, CD62L+, CD95+, HLA-DR+) в периферической крови определяли непрямым иммунофлюоресцентным методом с помощью моноклональных антител ЗАО «Сорбент-сервис» (Россия) (Передерий В.Г. и соавт., 1995).

Статистическую обработку данных проводили методами вариационной статистики (критерий Стьюдента) с использованием пакета прикладных программ Microsoft XP «Excel», а также с помощью специализированной программы «STAT-GRAPHICS Plus версия 2.1».

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований у пациентов основной группы и группы сравнения отмечены значительные нарушения цитокинового профиля плазмы крови (рис. 1). У больных СД 2-го типа с ДР содержание фактора некроза опухоли (ФНО)- α выше, чем у здоровых лиц, в 2,66 раза и на 32,9% выше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$); интерлейкина (ИЛ)-1 β — в 2,65 раз и на 21,9% ($p < 0,05$); ИЛ-6 — в 6,33 раза и в 2,95 раза ($p < 0,05$); ИЛ-8 — в 5,67 раз и в 2,34 раза ($p < 0,05$) соответственно. Одновременно выявлено и достоверное повышение концентрации трансформирующего фактора роста (ТФР)- β в плазме крови в основной группе в 2,54 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной, а в группе сравнения — в 1,87 раза ($p < 0,05$). Полученные данные могут быть связаны с тем, что ФНО- α рассматривают как медиатор инсулинорезистентности при ожирении и СД, снижающий активность тирозинкиназы инсулинового рецептора, а также угнетающий активность внутриклеточных транспортеров глюкозы в мышечной и жировой тканях. Наличие у больных СД дислипидемии и атеросклероза также обуславливает специфические изменения в иммунной системе, поскольку за последние годы накоплено большое количество данных об участии иммунных механизмов в патогенезе атеросклероза и предложены иммунные теории атерогенеза (Балашова Л.М., 1999; WHO, 2012).

ТФР- β продуцируется макрофагами, лимфоцитами и дендритными клетками, а в печени — рекрутированными печеню макрофагами и Купферовскими клетками и играет ключевую роль в регуляции иммунного гомеостаза. Основные его эффекты связаны с угнетением пролиферации Т- и В-лимфоцитов, а именно цитотоксических CD8 $^+$ -лимфоцитов, Т-хелперов 1-го, 2-го и 17-го типа, секреции Т-лимфоцитами ИЛ-2, -12. Дефекты сигнальных путей ТФР- β обуславливают усиление пролиферации и эффекторной функции иммунных клеток и могут привести к неконтролируемой форме иммунного ответа. При патологических состояниях именно ТФР- β является индуктором процессов фиброза, повышает синтез коллагена звездчатыми клетками печени. Гиперпродукция ТФР- β и других цитокинов инициирует и регулирует неангиогенез, при этом патологический процесс в сетчатке часто прогрессирует и приводит к развитию пролиферации (Балоболкин М.И. и соавт., 1999).

С учетом выявленной высокой концентрации в плазме крови провоспалительных цитокинов проведено исследование продукции про- и противовоспалительных цитокинов ИКК периферической крови у больных СД и ДР. Спонтанная продукция представлена на рис. 2.

У больных ДР отмечен высокий уровень спонтанной продукции провоспалительных цитокинов как в сравнении с показателями у здоровых лиц, так и больных СД 2-го типа без ДР. В основной группе уровень спонтанной продукции ФНО- α был выше аналогичной группы сравнения на 41,01% ($p < 0,05$),

ИЛ-1 β — на 32,8% ($p < 0,05$), ИЛ-6 — на 25,1% ($p < 0,05$), ИЛ-8 — на 24,3% ($p < 0,05$), ТФР- β — на 75,8% ($p < 0,05$), а ИЛ-4 — ниже на 28,6% ($p < 0,05$). Это обусловлено наличием постоянной антигенной стимуляции аутоантигенами ткани глаза и пораженного эндотелия сосудов как проявления СД 2-го типа.

Показатели митогенстимулированной продукции про- и противовоспалительных цитокинов представлены на рис. 3.

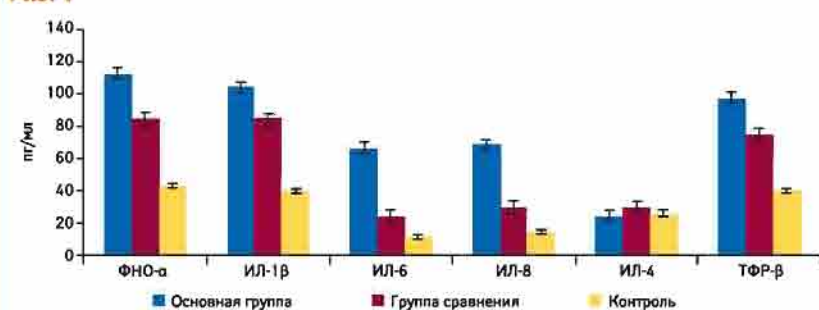
Установлено повышение уровня митоген-индуцированной продукции провоспалительных цитокинов, особенно ФНО- α и ИЛ-1 β , по отношению как к уровню здоровых лиц, так и больных СД без ДР.

С учетом высокой концентрации в плазме крови, а также высоких уровней спонтанной и митоген-индуцированной продукции проведено исследование количественного состава активированных субпопуляций лимфоцитов как их основных продуцентов.

В группе больных ДР отмечены более глубокие по сравнению с больными СД 2-го типа без офтальмологических осложне-

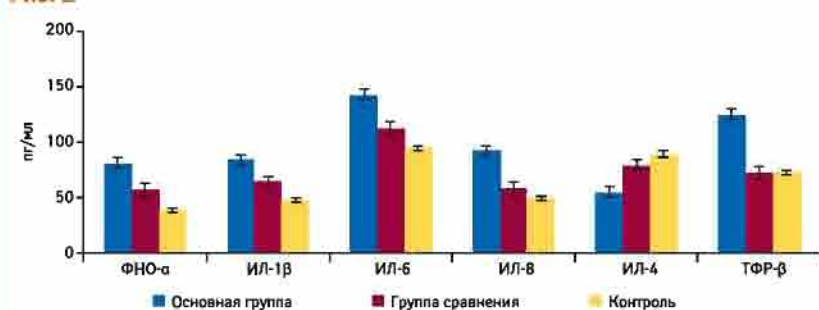
ний, нарушения процессов активации: уровень Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор ИЛ-2 (CD25 $^+$ -лимфоциты), превышал показатель группы сравнения на 30,12% ($p < 0,05$), количество активированных HLA-DR $^+$ -лимфоцитов — на 21,80% ($p < 0,05$), а CD95 $^+$ -лимфоцитов — в 2,82 раза ($p < 0,05$). Также выявлено повышение относительного числа активированных лимфоцитов с фенотипом CD54 $^+$ на 26,80% ($p < 0,05$), CD11b $^+$ -лимфоцитов — на 35,52% ($p < 0,05$) и CD62L $^+$ -лимфоцитов — на 14,84% ($p < 0,05$). Именно рецептор CD11b обеспечивает адгезию макрофагов и нейтрофилов к эндотелиальной стенке и служит лигандом ICAM-1, а CD62L (L-селектин) — обеспечивает адгезию и прилипание лимфоцитов к эндотелиальной стенке. Выявлена высокая концентрация в плазме крови растворимой сосудистой молекулы адгезии sVCAM, уровень которой в основной группе превышал таковой группы сравнения на 24,26% ($p < 0,05$), а sICAM-1 — на 21,75% ($p < 0,05$). Следовательно более выраженный по интенсивности воспалитель-

Рис. 1



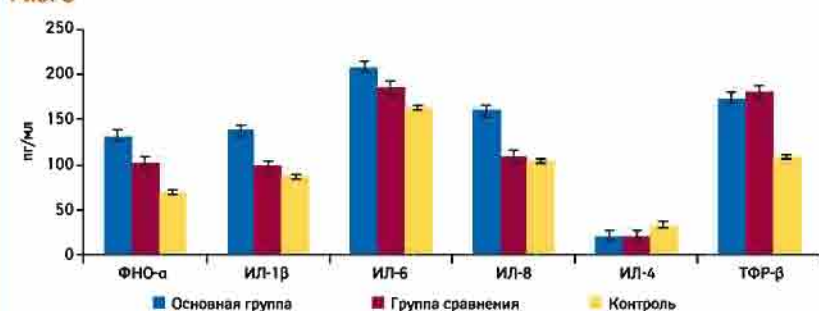
Концентрация цитокинов в плазме крови у пациентов с ДР

Рис. 2



Спонтанная продукция цитокинов ИКК периферической крови у пациентов с ДР

Рис. 3



Показатели митогенстимулированной цитокинсинтезирующей функции иммунокомпетентных клеток у пациентов с ДР

Таблиця Содержание активированных субпопуляций лимфоцитов и растворимых молекул адгезии в периферической крови больных ДР (M±m)

Показатель	Группа		
	основная (n=57)	сравнения (n=56)	контрольная (n=35)
CD25 ⁺ -лимфоциты, %	18,23±1,15*	14,01±0,65**	9,1±0,39
HLA-DR ⁺ -лимфоциты, %	21,64±1,25*	17,34±1,06**	13,1±1,27
CD95 ⁺ -лимфоциты, %	11,62±0,21**	5,08±0,22**	3,12±0,04
CD54 ⁺ -лимфоциты, %	25,12±1,13**	19,81±0,73**	12,06±1,15
CD 11b ⁺ -лимфоциты, %	36,21±1,8*	26,72±1,1**	21,5±1,4
CD62L ⁺ -лимфоциты, %	40,93±1,2*	35,64±1,3**	28,3±1,7
sVCAM, пг/мл	68,5±1,9*	55,1±1,7**	18,6±1,9
sICAM-1, пг/мл	496,3±12,4*	399,4±12,7**	275,5±17,28

*Достоверность различия показателей с контрольной группой (p<0,05); **достоверность различия показателей между группами; n – количество больных.

ний процесс с высокими уровнями провоспалительных цитокинов приводит к более сильной активации ИКК и синтеза ими адгезивных молекул. Высокая концентрация в плазме крови растворимых молекул адгезии sICAM-1 и sVCAM-1, кроме того, сочетается с повышенным уровнем экспрессии рецептора ICAM-1 (CD54⁺) на лимфоцитах периферической крови, а также рецепторов CD11b (лиганд CD 54 рецептора) и CD62L, которые обеспечивают прикрепление клеток к эндотелиальной стенке [10,11].

Именно адгезивные молекулы играют ключевую роль в процессах иммунного ответа и, безусловно, регулируют механизмы развития атеросклеротического воспаления, поскольку экспрессируются на одних клетках иммунной системы, связываются со своими контррецепторами и присоединяются друг к другу, что приводит к локальному накоплению, развитию стаза и тромбоза в сосудах. К ранним маркерам, свидетельствующим об активности воспалительного процесса, особенно на ранних этапах заболевания, и относят ICAM-1, VCAM-1, E-селектин. ICAM-1 относится к семейству иммуноглобулинов, а усиление его экспрессии вызывается такими цитокинами, как ИЛ-2 и ФНО-α. VCAM-1 – молекула адгезии сосудистых клеток, относится к семейству иммуноглобулинов, экспрессируется на поверхности активированного эндотелия (Передерий В.Г. и соавт., 1995).

Выводы

Таким образом, у больных ДР отмечено нарушение процессов адгезии и кооперации ИКК, в результате чего усиливается их активация, эффекторные функции и миграция в очаг воспаления в сосудистой стенке. Экспрессия адгезивных молекул на эндотелии и лимфоцитах является начальным этапом их рекрутирования в очаг воспаления, сопровождается возникновением широкого спектра иммунологических реакций, которые имеют в своей основе защитный характер, но в результате увеличенной длительности или интенсивности вызывают некротические или дистрофические изменения. Постоянная аутоактивация ИКК приводит к повышению спонтанной продукции провоспалительных цитокинов и ТФР-β, которые также оказывают повреждающее действие на органы-мишени. Именно их постоянное неконтролируемое гиперпродукция и является ключевым моментом последующего повреждения органа зрения при СД с развитием более тяжелых форм ДР.

Список использованной литературы

- WHO (2012) Burden: mortality, morbidity and risk factors (www.who.int/mediacentre/events/annual/world_diabetes_day/en/index.html).
- Zhang P., Zhang X., Brown J. et al. (2010) Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 87(3): 293–301.
- Балаболкин М.И., Клебанов Е.М., Кренинская В.М. (1999) Патогенез ангиопатий при сахарном диабете. *Сахарный диабет*, 1: 2–8.
- Валашова Л.М. (1999) Морфологические особенности и иммуногемостатические механизмы развития диабетической ретинопатии. *Вест. офтальмол.*, 115(5): 45–48.
- Копелен И.И., Григорьева М.П. (1972) Разработка микромодификации культивирования клеток крови. *Бюл. экп. биол. мед.*, 9: 119–122.
- Передерий В.Г., Земсков А.М., Бычкова Н.Г., Земсков В.М. (1995) Иммунный статус, принципы его оценки и коррекции иммунных нарушений. *Здоров'я*, Київ, 211с.

Порушення цитокинової регуляції у пацієнтів із діабетичною ретинопатією

О.П. Витовська, Т.С. Ахмед, Н.Г. Бычкова

Резюме. Мета роботи – вивчити рівень основних про- і протизапальних цитокинів у плазмі крові, а також їх продукцію імункомпетентними клітинами периферичної крові у пацієнтів із діабетичною ретинопатією (ДР). **Об'єкт і методи дослідження.** Обстежено 113 хворих на цукровий діабет (ЦД) 2-го типу, з яких 57 – із супутньою ДР (основна група) і 56 – без ДР. Групи рандомізовані за віком і статтю. Контрольну групу становили 35 здорових осіб. **Результати.** У пацієнтів із ДР відзначено високу концентрацію прозапальних цитокинів у плазмі крові, при цьому рівень фактора некрозу тканин-α вищий за такий у здорових осіб у 2,66 разів і на 32,9% вищий, ніж у групі порівняння (p<0,05); інтерлейкін (ІЛ)-1β – у 2,63 разів і на 21,9% (p<0,05); ІЛ-6 – у 6,33 разів і у 2,95 разів (p<0,05); ІЛ-8 – у 5,67 разів і у 2,34 разів (p<0,05) відповідно. Водночас виявлено підвищення спонтанної та мітогеніндукованої продукції цих цитокинів імункомпетентними клітинами периферичної крові, а також достовірно вищий рівень активованих лімфоцитів і розчинних молекул адгезії. **Висновки.** У хворих на ДР відзначено порушення процесів адгезії та кооперативної імункомпетентних клітин, внаслідок чого посилюється їх активация, ефекторні функції та міграція у вогнище запалення в судинній

стінці, що посилюється з підвищенням спонтанної продукції прозапальних цитокинів і трансформуючого фактора росту-β, які також спричиняють пошкодження дію на органи-мишені. Саме їх постійна неконтрольована гіперпродукція і є ключовим моментом подальшого пошкодження органів зору при ЦД із розвитком таких форм ДР.

Ключові слова: цукровий діабет, діабетична ретинопатія, імунітет, цитокини, молекули молекулярної адгезії, спонтанна і мітоген-індукована продукція цитокинів.

Violation of the cytokine regulation in patients with diabetic retinopathy

O.P. Vytovskaya, T.S. Ahmed, N.G. Bychkova

Summary. Aim – to study the levels of key pro- and anti-inflammatory cytokines in plasma and their production by immune cells of peripheral blood in patients with diabetic retinopathy (DR). **Material and methods.** The study surveyed 113 patients with type 2 diabetes, among whom 57 patients had associated DR (main group) and 56 – without DR (comparison group). Groups were randomized by age and sex. The control group consisted of 35 healthy persons. **Results.** It was established that patients with DR have a high plasma concentration of proinflammatory cytokines, the level of tumor necrosis factor-α was higher than healthy individuals to 2.66 times and 32.9% higher than in the comparison group (p<0.05); IL-1β – 2.65 times and 21.9% (p<0.05); IL-6 – 6.33 times and 2.95 times (p<0.05); IL-8 – 5.67 times and 2.34 times (p<0.05), respectively. Also it was detected increased spontaneous and mitogeninduced products of these cytokines by immune cells of peripheral blood and significantly higher levels of activated lymphocytes and soluble adhesion molecules. **Conclusions.** Patients with DR discovered a violation of the processes of adhesion and cooperation of immune cells, resulting in their enhanced activation, affective functions and migration in the focus of inflammation in the vascular wall, combined with increase of spontaneous production of proinflammatory cytokines and transforming growth factor-β, which also have a deleterious effect on the target organs. It is their constant uncontrolled hyper-production and will be the key point of the subsequent damage to your eyes in patients with diabetes mellitus with the development of more severe forms of DR.

Key words: diabetes mellitus, diabetic retinopathy, immunity, cytokines, intercellular adhesion molecules, spontaneous and mitogeninduced production of cytokines.

Адрес для переписки:

Тата Салах Ахмад
01023, Київ, ул. Шейковська, 39/1
Александровская городская клиническая
больница
E-mail: taha.s.a@live.com

Получено 04.11.2016