

УДК 616.155.32:616.379-008.64

Цитокиновый статус и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови больных сахарным диабетом 2 типа и неалкогольной жировой болезнью печени

Е.А. Кондратюк¹,
П.Н. Боднар¹,
Н.И. Лисяный²,
Л.Н. Бельская²,
А.И. Потапова²

¹Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца

²ГУ «Институт нейрохирургии им. академика А.П. Ромоданова НАМН Украины»

Резюме. Среди механизмов развития сахарного диабета 2-го типа (СД2), одна из ведущих ролей отводится иммунопатологическому звену патогенеза. Выступая на этапе манифестации в качестве ответной реакции на влияние пусковых факторов, иммунные нарушения определяют в дальнейшем характер течения данной патологии, в том числе, скорость развития и выраженность его специфических осложнений, в частности, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП). Цель исследования – изучить содержание цитокинов и основных субпопуляций лимфоцитов у больных с СД2 и НАЖБП. Под наблюдением находилось 118 больных, среди которых 64 пациента с СД2 и НАЖБП (I группа), 26 пациентов – с СД2 (II группа) и 28 пациентов с НАЖБП (III группа). Контрольную группу составили 25 условно здоровых доноров. Установлено, что для каждой из изученных патологий, а именно, СД2, НАЖБП или их сочетания, характерен свой цитокиновый статус, который отражает как наличие воспалительных процессов, так и направленность иммунопатологических реакций в организме. Выявленное изменение уровня цитокинов и субпопуляционного состава лимфоцитов при сочетании СД2 с НАЖБП можно использовать как для диагностики, так и для прогнозирования неблагоприятного развития данной патологии, в частности, развития воспалительной реакции в печени (повышение уровня ИЛ-1 β), интенсивности и направленности иммунопатологических реакций (повышение ИНФ- γ , снижение

* адреса для листування (Correspondence): Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, бул. Т. Шевченка, 13, м. Київ, 01601, Україна.
e-mail: zdovado@ukr.net

Оригінальні дослідження

ИЛ-4, изменение содержания НК клеток), интенсивности разрастания соединительной ткани и степени фиброобразования (повышение ИЛ-10). Выводы. 1. У больных с СД2, НАЖБП или при сочетании данных патологий отмечаются изменения в цитокиновом статусе, отражающие интенсивность иммунных реакций воспаления, их направленность и возможный прогноз фиброобразования в печени. 2. Увеличение содержания ИЛ-1 β , ИЛ-17 и ИНФ- γ в крови свидетельствуют о наличии высокой воспалительной и иммунопатологической реакции у больных СД2 и НАЖБП. 3. Установлен дисбаланс в составе субпопуляций лимфоцитов, проявляющийся снижением уровня в крови CD8 $^+$ и CD16 $^+$ клеток при относительно стабильном уровне Т-хелперной (CD4 $^+$) субпопуляции клеток и увеличением содержания CD20 $^+$ клеток, развивающийся на фоне увеличенного содержания циркулирующих иммунных комплексов. 4. У больных с НАЖБП и СД2 отмечается повышенная апоптотическая готовность лимфоцитов, что проявляется увеличением содержания CD95 $^+$ клеток в крови. 5. Выявленные изменения в уровне цитокинов и субпопуляционном составе лимфоцитов при сочетании СД2 с НАЖБП можно использовать для диагностики и оценки степени тяжести нарушений при данной патологии.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, неалкогольная жировая болезнь печени, цитокины, лимфоциты, иммунные комплексы.

Распространенность сахарного диабета (СД) с каждым годом неуклонно растет. Количество больных СД в мире в 2013 году составило 382 млн человек, а по прогнозам Всемирной Диабетической Федерации к 2035 году эта цифра увеличится до 592 млн за счет пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2) [1].

Ведущая роль в развитии СД2 типа принадлежит иммунопатологическим механизмам, которые определяют в дальнейшем характер течения данной патологии, скорость развития и выраженность специфических осложнений. Основная роль в механизмах развития НАЖБП принадлежит инсулинорезистентности, активации глюконеогенеза и индукции оксидативного стресса, который повреждает печеночные клетки и запускает воспалительный процесс, приводящий к патологическим изменениям в гепатоцитах. От 10 до 75% случаев СД2 ассоциируется с неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП). Сочетание СД2 с НАЖБП увеличивает риск возникновения карциномы и цирроза печени вдвое [2-10]. В то же время, многие вопросы, касающиеся иммунных механизмов развития СД2 и НАЖБП, остаются недоизученными.

Целью настоящего исследования было изучить особенности цитокинового статуса и основных субпопуляций лимфоцитов у больных СД2 и НАЖБП.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 118 больных, среди которых 64 пациента с СД2 и НАЖБП (I группа), 26 пациентов с СД2 (II группа) и 28

пациентов с НАЖБП (III группа). Контрольную группу составили 25 условно здоровых лиц.

Концентрацию цитокинов (интерлейкинов (ИЛ) 1 β , 2, 4, 10, 17 и ИНФ- γ) определяли в сыворотке периферической крови методом иммуноферментного анализа (ИФА), основанного на твердофазном «сэндвич»-варианте, с использованием наборов «Вектор-Бест» (Россия). На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубировали с иммобилизованными в лунках специфическими против определенного цитокина антигенами. Имеющийся в образцах цитокин связывался с иммобилизованными антигенами, затем связавшийся цитокин взаимодействовал со вторичными антителами. Завершение реакции осуществляли путем внесения субстратной смеси. Интенсивность желтого окрашивания, пропорциональную концентрации содержащегося в образце определенного цитокина, определяли на спектрофотометре «Immunochem» («High Technology, Inc.», США) при длине волны 540 нм.

Количественный состав субпопуляций лимфоцитов в периферической крови изучали на проточном цитофлюориметре «FC-500» («Beckman Coulter», США) по программе Cytomics CXP Software с использованием двойных комбинаций моноклональных антител производства «Beckman Coulter» (США) и антител фирмы «Сорбент» (Россия). При этом оценивали (в %) показатели Т-клеточной популяции: общее количество Т-лимфоцитов (CD3 $^+$), количество Т-хелперов (CD4 $^+$), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8 $^+$), естественных клеток-

киллеров (NK-клеток – (CD16⁺), В-клеточной популяции (CD19⁺) лимфоцитов, а также относительное содержание лимфоцитов, несущих маркеры ранней активации (CD25⁺) и маркерный антиген апоптоза (CD95⁺). Постановку реакции определения субпопуляций лимфоцитов с помощью моноклональных антител проводили согласно инструкции [11] в цельной крови с последующим лизисом эритроцитов.

Определение циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке периферической крови проводили методом селективной преципитации комплексов антиген-антитело в 3,75% полиэтиленгликоле с последующим фотометрическим определением плотности преципитации [12].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием статистических пакетов MedCalc 14.12.0 (MedCalc Software, 1993-2014) и MedStat.

Результаты и их обсуждение

Изучение цитокинового статуса крови больных СД2, НАЖБП или при их сочетании показало, что при СД2 (II группа) уровень одного из основных провоспалительных цитокинов ИЛ-1β в сыворотке крови превышал контрольные значения в 1,7 раза (таблица 1). У больных с НАЖБП (III группа) установлено повышение уровня ИЛ-1β в 2,6 раза ($p < 0,001$), что свидетельствует о наличии признаков системной воспалительной реакции. Концентрация ИЛ-1β в крови у больных

СД2 с НАЖБП (I группа), в сравнении с другими группами обследованных, была наиболее высокой ($p < 0,001$). Это свидетельствует об усилении воспалительной реакции в организме, в частности в печени, при сочетанной патологии и согласуется с данными научной литературы [13].

В наших исследованиях установлено статистически достоверное ($p < 0,001$) повышение уровня провоспалительного цитокина ИНФ-γ. Так, у больных с СД2 нами зафиксировано более чем двукратное повышение ИНФ-γ по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы. Значительное его изменение в сыворотке крови было установлено у больных с НАЖБП ($p < 0,001$), а у больных СД2 с НАЖБП выявлено более чем 5-кратное увеличение содержания ИНФ-γ в сравнении с контрольными значениями и 2-кратное повышение соответствующих показателей у больных СД2 ($p < 0,001$). Увеличение концентрации ИНФ-γ в сыворотке крови при сочетании СД2 с НАЖБП указывает на значительную активность участия Th1 звена иммунных реакций в повреждении печени при данной патологии. ИНФ-γ *in vitro* нарушает сигналинг инсулина в адипоцитах – эффект, который может связывать воспаление, опосредованное Т-клетками, с инсулинорезистентностью [14].

ИНФ-γ является индуктором активации макрофагов, играющих значительную роль в иммуногенезе СД2 и НАЖБП. Он стимулирует макрофагальную продукцию провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО-α [15], которые, в свою очередь, активируют протеолитическую активность. Несбалансированное увеличение интенсивности протеолиза приводит к прогрессирующей деструкции мембран гепатоцитов, ускорению их апоптоза, агрессивной дегенерации ключевых компонентов внеклеточного матрикса печеночной ткани [16].

Изучение содержания ИЛ-2 выявило достоверное увеличение его уровня ($p < 0,001$) в крови больных с НАЖБП (III группа) или при сочетании СД2 с НАЖБП (I группа) по сравнению с контролем, но в тоже время у больных СД2 нами не отмечено повышения продукции этого интерлейкина.

Средний уровень ИЛ-17 у больных I и III групп статистически достоверно ($p < 0,001$) превышал контрольные значения. Увеличение его уровня (в 3,5-4 раза) установлено у пациентов с НАЖБП или у пациентов при сочетании СД2 и НАЖБП, что может свидетельствовать о наличии значительной воспалительной реакции у этой группы больных. Известно, что ИЛ-17 принимает участие в развитии инсулинорезистентности: нарушает

Таблица 1. Содержание цитокинов в сыворотке крови больных СД2 и НАЖБП (пг/мл)

Показатели	Группы, Ме (QI – QIII)				Уровень значимости отличия, р
	I (n=64)	II (n=26)	III (n=28)	контроль (n=25)	
ИЛ-1β	6,85 ^{a,c,d} (6,6–7,2)	2,8 ^b (2,6–3,1)	4,15 ^{a,b} (3,85–4,6)	1,6 ^{b,d} (1,5–1,72)	<0,001
ИЛ-17	6,4 ^{a,c,d} (6,3–6,8)	2,3 ^b (2–2,4)	5,55 ^{a,b} (5,2–5,85)	1,6 ^{b,d} (1,5–1,77)	<0,001
ИЛ-2	1,7 ^{a,c} (1,5–2)	0,9 ^{b,d} (0,8–1,1)	1,7 ^{a,c} (1,5–1,95)	1,1 ^{b,d} (1–1,2)	<0,001
ИНФ-γ	4,8 ^{a,c,d} (4,5–5,1)	2 ^{b,d} (1,7–2,2)	4,5 ^{a,b,c} (4,2–4,9)	0,9 ^{b,d} (0,8–1)	<0,001
ИЛ-4	0,4 ^{a,c} (0,3–0,5)	0,7 ^{b,d} (0,6–0,8)	0,5 ^{a,c} (0,4–0,6)	0,9 ^{b,d} (0,7–0,9)	<0,001
ИЛ-10	12,55 ^{a,c,d} (11,5–13,75)	8,25 ^{a,b,d} (7,8–8,4)	10,25 ^{a,b,d} (9,6–10,65)	3,2 ^{b,c,d} (3,1–3,3)	<0,001

Примечания: здесь и в таблице 2: ^a – отличие от группы контроля статистически достоверно, $p < 0,01$; ^b – отличие от группы I статистически достоверно, $p < 0,01$; ^c – отличие от группы II статистически достоверно, $p < 0,01$; ^d – отличие от группы III статистически достоверно, $p < 0,01$, – (множественные сравнения: критерий Шеффе – в случае нормального распределения, критерий Данна – в случае отличия распределения от нормального).

Оригінальні дослідження

опосредованный инсулином транспорт глюкозы, ингибирует экспрессию генов, вовлеченных в метаболизм липидов, а также усугубляет опосредованное диетой ожирение [17].

Изучение провоспалительных цитокинов в крови исследуемых больных выявило разнонаправленный характер их изменений. Уровень ИЛ-4 у больных с НАЖБП был ниже значений контрольной группы ($p < 0,001$) и существенно не изменялся при СД2. У больных СД2 с НАЖБП отмечено статистически достоверное снижение ИЛ-4 как в сравнении со значениями в группе контроля, так и с соответствующими показателями больных СД2 ($p < 0,001$).

Уровень ИЛ-10 значительно возрастал в крови больных всех обследуемых групп ($p < 0,001$). Увеличение ИЛ-10 в крови при СД2 и НАЖБП является маркером замены печеночной ткани на соединительную, и трактуется как своеобразная «защитная» реакция печени на происходящие в ней воспалительные и деструктивные процессы [18]. Выявленные изменения цитокинового статуса у обследованных больных указывают на преобладание в организме и в печени, в частности, воспалительных и иммунопатологических процессов.

При изучении содержания основных субпопуляций лимфоцитов у больных СД2, НАЖБП и при их сочетании установлена разнонаправленная динамика. Так, у больных НАЖБП (III группа) или при сочетании СД2 с НАЖБП (I группа) отмечено снижение уровня CD3⁺ лимфоцитов (Т-клетки), и значительное увеличение уровня CD20 лимфоцитов (В-клетки) в I и II группах ($p < 0,001$). Уровень в крови Т-хелперных лимфоцитов (CD4) максимально увеличивался при СД2 типа, тогда как уровень CD8-цитотоксических лимфоцитов достоверно снижался во всех трех группах больных, что отразилось на увеличении иммунорегуляторного индекса ($p < 0,001$). Следовательно, имеется снижение уровня цитотоксических Т-лимфоцитов и увеличение уровня В-лимфоцитов в крови при сохранении уровня общих Т-лимфоцитов и Т-хелперных субпопуляций клеток. Содержание субпопуляции естественных киллерных клеток (CD16) было достоверно ($p < 0,001$) снижено у больных I и III групп (таблица 2).

Сопоставляя относительное и абсолютное содержание отдельных субпопуляций лимфоцитов в крови больных, во всех исследуемых группах отмечаются однонаправленные изменения иммунных показателей, свидетельствующие, с одной стороны, о снижении цитотоксического звена, а с другой, о стимуляции В-клеточного звена иммунитета.

Важным показателем состояния иммунной системы является изучение активирующих процессов и апоптоза в клетках иммунной системы. Изучение уровня CD25⁺ лимфоцитов, отражающих ранние процессы активации лимфоцитов посредством воздействия на рецепторы ИЛ-2, показало, что при СД2 или НАЖБП отмечается их незначительное повышение по сравнению с нормой. При этом у пациентов с СД2 и НАЖБП выявлено статистически недостоверное снижение уровня CD25⁺ положительных клеток в крови, что указывает на нормальное, не нарушенное протекание процессов активации иммунных клеток, в частности, CD4 лимфоцитов, обеспечивающих развитие иммунопатологических реакций при этой патологии. В то же время, апоптотическая готовность клеток, выявляемых по уровню CD95⁺ клеток, во всех трех группах была увеличена в 1,8-2,0 раза ($p < 0,001$).

Следовательно, изменение иммунного статуса у больных СД2 с НАЖБП сопровождается экспрессией на лимфоцитах маркерного антигена

Таблица 2. Содержание основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови

Показатели	Группа, ±m				Уровень значимости отличия, p
	I (n=64)	II (n=26)	III (n=28)	контроль (n=25)	
лейкоциты, 10 ⁹ /л	5,8±0,1 ^c	6,3±0,2	6,9±0,2 ^{ab}	5,7±0,1 ^d	<0,001
лимфоциты %	36,1±0,4 ^{cd}	40,8±0,9 ^{abd}	31,1±0,7 ^{bc}	33,8±0,5 ^c	<0,001
CD 3, 10 ⁹ /л	54,6±0,3 ^{acd}	60,0±1,3 ^{bd}	51,5±0,5 ^{abd}	61,4±0,9 ^{bd}	<0,001
	абс, 1139±27 ^c	1546±72 ^{acd}	1074±22 ^{ac}	1179±35 ^{cd}	<0,001
CD 4, 10 ⁹ /л	32,1±0,4 ^{ac}	36,9±0,6 ^{ad}	31,2±0,5 ^{abc}	34,3±0,6 ^{bcd}	<0,001
	абс, 671±18 ^c	944±36 ^{abd}	651±16 ^c	658±20 ^c	<0,001
CD 8, 10 ⁹ /л	19,7±0,3 ^a	19,8±0,5 ^a	19,5±0,4 ^a	24,4±0,5 ^{bcd}	<0,001
	абс, 413±12 ^{ac}	503±18 ^{bd}	407±11 ^c	469±14 ^b	<0,001
иммунорегуляторный индекс	1,64±0,02 ^{ac}	1,89±0,05 ^{abd}	1,61±0,03 ^{ac}	1,4±0,03 ^{bcd}	<0,001
CD 20, 10 ⁹ /л	12,3±0,2 ^{ac}	13,1±0,4 ^{ac}	9,0±0,2 ^{bd}	9,5±0,2 ^{bc}	<0,001
	абс, 256±6 ^{acd}	333±14 ^{abd}	188±6 ^{bc}	182±6 ^{bc}	<0,001
CD 16, 10 ⁹ /л	11,8±0,3 ^a	12,0±0,3 ^a	11,5±0,3 ^a	16,6±0,4 ^{bcd}	<0,001
	абс, 247±9 ^{ac}	306±10 ^{bd}	241±8 ^{ac}	320±12 ^{bd}	<0,001
CD 25, 10 ⁹ /л	7,9±0,1 ^{cd}	8,7±0,2 ^{bd}	9,4±0,2 ^{abc}	8,5±0,2 ^c	<0,001
	абс, 166±4 ^{cd}	222±10 ^{ab}	196±6 ^{ab}	163±6 ^{cd}	<0,001
CD 95, 10 ⁹ /л	3,7±0,1 ^a	4,0±0,1 ^a	4,0±0,1 ^a	2,3±0,4 ^{bcd}	<0,001
	абс, 76±2 ^{ac}	90±3 ^{ab}	83±3 ^a	43±6 ^{bcd}	<0,001

апоптоза CD95, экспрессированного как на CD4⁺, так и на CD8⁺ субпопуляциях лимфоцитов человека, регулируемого ИЛ-2 и ИНФ- γ . Вероятно, такие изменения являются причиной дисбаланса в составе лимфоцитов, особенно, CD8 и CD16 клеток, отмеченного у больных этой группы.

Снижение содержания НК клеток, секретирующих цитокины Th2-типа, в крови, в том числе ИЛ-4 и ИЛ-13, может способствовать развитию провоспалительного Th1 состояния, что приводит к избыточной продукции ФНО- α и ИНФ- γ . Увеличение провоспалительных цитокинов способствует формированию в печени окислительного стресса, развитию воспалительного процесса и некротических изменений в гепатоцитах. [19].

Снижение уровня цитотоксических лимфоцитов и натуральных киллеров можно объяснить их миграцией из крови в пораженные органы (печень и поджелудочную железу). Вместе с тем, не было установлено значительной активации лимфоцитов, оцениваемой по уровню рецептора к ИЛ-2 (CD25⁺ клеток). Это можно объяснить значительным преобладанием в упомянутых процессах В-клеточного гуморального звена. Косвенным подтверждением развития гуморальной иммунной реакции при НАЖБП является 2-кратное увеличение уровня иммунных комплексов (**рисунок**), что свидетельствует не только о недостаточной фильтрующей функции печени, но и о наличии высокого уровня комплексов антиген+антитело в крови.

По результатам проведенных нами исследований установлено наличие дисбаланса в субпопуляционном составе лимфоцитов, что согласуется с результатами, полученными другими авторами, отмечавшими увеличение иммунорегуляторного индекса, апоптотической готовности лимфоцитов и снижение уровня цитотоксических Т-лимфоцитов у больных СД2 [3,10]. В работах указанных авторов также не выявлено достовер-

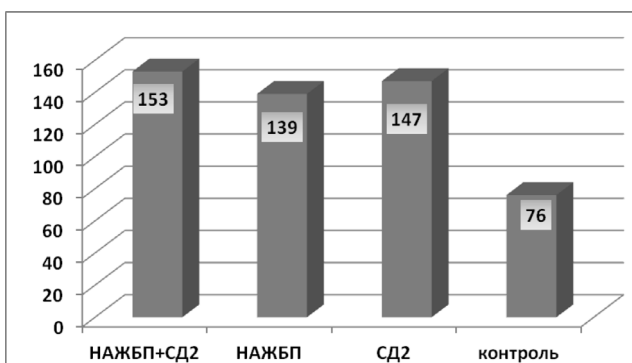


Рисунок. Содержание иммунных комплексов в сыворотке крови (усл. ед.)

ной ранней активации лимфоцитов, определяемой по уровню CD25 клеток. В то же время, полученные нами данные не совпадают с данными К.П. Зака и соавт. [20], отмечавших у больных с неалкогольным стеатогепатитом снижение уровня CD4 лимфоцитов в крови при сохранности CD8 и CD16 цитотоксических клеток, что можно объяснить различной тяжестью заболевания у обследованных больных и методами исследования, а именно, различиями между иммуноморфологическим и цитометрическим методом определения этих клеток в крови.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что для каждой из изученных патологий (СД2, НАЖБП и их сочетания) характерен свой цитокиновый статус, который отражает как наличие воспалительных процессов, так и направленность иммунопатологических реакций в организме. Выявленные изменения уровней цитокинов и субпопуляционного состава лимфоцитов при сочетании СД2 с НАЖБП можно использовать для диагностики, а также для прогнозирования неблагоприятного развития данной патологии, интенсивности разрастания соединительной ткани и степени фиброобразования.

Выводы

1. У больных СД2, НАЖБП или при их сочетании отмечаются изменения в цитокиновом статусе, отражающие интенсивность иммунных реакций воспаления, их направленность и возможный прогноз фиброобразования в печени.
2. Увеличение содержания ИЛ-1 β , ИЛ-17 и ИНФ- γ свидетельствует о наличии высокой воспалительной и иммунопатологической реакции у больных СД2 с НАЖБП.
3. Выявлен дисбаланс в составе субпопуляций лимфоцитов, проявляющийся снижением уровня в крови CD8⁺ и CD16⁺ клеток при стабильном уровне Т-хелперной (CD4⁺) субпопуляции клеток и увеличении содержания CD20⁺ клеток на фоне повышенного содержания циркулирующих иммунных комплексов.
4. У больных СД2 с НАЖБП отмечается повышенная апоптотическая готовность лимфоцитов, что проявляется увеличением содержания CD95⁺ клеток в крови.
5. Показатели уровня цитокинов и субпопуляционного состава лимфоцитов являются информативными для диагностики и оценки степени тяжести нарушений при СД2 и НАЖБП.

Оригінальні дослідження

Список использованной литературы

1. IDF Diabetes Atlas, 6th edition. IDF, 2013. 155 p.
2. Хворостінка В.М., Лавриненко О.В., Журавльова Л.В. Патогенетичні аспекти жирової дистрофії печінки при цукровому діабеті 2 типу // Сучасна гастроентерологія. 2009, №3, 91-97 (Hvorostinka V.M., Lavrinenko O.V., Zhuravliova L.V. Pathogenetic aspects of fatty liver disease in type 2 diabetes // Suchasna gastroenterologia. 2009, N3, 91-97).
3. Тихонова Т.М. Особенности состояния клеточного иммунитета у больных сахарным диабетом в зависимости от варианта течения заболевания // Междунар. мед. ж. 2011, №4, 82-86. (Tikhonova T.M. Features of cellular immunity state in patients with diabetes, depending on the variant of the disease // Mezhdunarodnyj Medychnyj Zhurnal. 2011, N4, 82-86.)
4. Маммаев С.Н., Багомедова Н.В., Богомолов П.О. Цитокиновая система при неалкогольном стеатогепатите // РЖГГН. 2007, №4, 35-39. (Mammaev S.N., Bagomedova N.V., Bogomolov P.O. Cytokine system in nonalcoholic steatohepatitis // RJGGN. 2007, N4, 35-39).
5. Боднар П.М., Михальчишин Г.П., Кобиляк Н.М. Неалкогольна жировая хвороба печінки у хворих на цукровий діабет типу 2: патогенез, діагностика та лікування // Ендокринологія. 2012, 17, №1, 94-101. (Bodnar P.M., Myhalchysyun G.P., Kobyliak N.M. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes: pathogenesis, diagnosis and treatment. // Endokrynologia. 2012, 17, N1, 94-101).
6. Кляритьська І.Л., Стіліді О.І. Система цитокінів при неалкогольному стеатогепатиті // Архів клінічної та експериментальної медицини. 2010, 19, №2, 167-192. (Klyarytska I.L., Stilidi O.I. The system of cytokines in nonalcoholic steatohepatitis // Archive klinichnoi ta Eksperimentalnoj Meditsyny. 2010, 19, N2, 167-192).
7. Diehl A.M. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. 2002, 282, 105-115.
8. Сульская Ю.В., Белоглазов В.А. Клеточное звено иммунитета у больных сахарным диабетом 2-го типа // Иммунология та алергологія. 2009, №4, 55-61. (Sulskaya Yu.V., Beloglazov V.A. Cellular immunity in patients with type 2 diabetes mellitus // Immunologia ta alergologia. 2009, N4, 55-61).
9. Белякова Н.А., Руденко Е.В., Михайлова Д.Г., Егорова Е.Н., Некрасова Е.Г., Гогина Е.Д. Состояние иммунной системы у больных сахарным диабетом 2 типа // Вопросы патогенеза. 2011, №2, 9-11 (Belyakova N.A., Rudenko E.V., Mihaylova D.G., Egorova E.N., Nekrasova E.G., Gogina E.D. The immune system in patients with type 2 diabetes // Voprosy patogeneza. 2011, N2, 9-11).
10. Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Сото С.Х., Сенцова Т.Б., Плотникова О.А., Шарафетдинов Х.Х., Семенченко И.Ю., Кузнецов В.Д. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови больных сахарным диабетом типа 2 и ожирением // Вопросы питания. 2012, 81, №5, 60-65 (Trushina E.N., Mustafina O.K., Soto S.H., Sentsova T.B., Plotnikova O.A., Sharafetdinov H.H., Semenchenko I.Yu., Kuznetsov V.D. Subpopulations of lymphocytes in peripheral blood of patients with type 2 diabetes and obesity // Voprosy pitaniya. 2012, 81, N5, 60-65).
11. Пинегин Б.В., Ярилин А.А., Симонова А.В., Климова С.В., Мазуров Д.В., Дамбаева С.В., Бахус Г.О. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека / Пособие для врачей-лаборантов // Гос. научный центр РФ. Ин-т иммунологии мин. здравоохранения РФ. М.-2001. 53 с. (Pinegin B.V., Yarilin A.A., Simonova A.V., Klimova S.V., Mazurov D.V., Dambaeva S.V., Bahus G.O. The use of flow cytometry to assess the functional activity of the human immune system / Manual for doctors, technicians // Gov. Scientific Center of Russia. Institute of Immunology min. of healthcare of RF M., 2001, 53 p.)
12. Гашкова В., Мате Н. // Чехословацкая медицина. 1978, №2, 117. (Gashkova V., Mate N. // Czechoslovak medicine. 1978, N2, 117).
13. Корнійчук І.Ю. Особливості цитокінової регуляції та кооперації при неалкогольній жировій хворобі печінки на фоні ожиріння // Буковинський медичний вісник. 2011, 15, 2, 214-217. (Korniychuk I.Yu. Peculiarities of cytokine regulation and cooperation with nonalcoholic fatty liver disease in obese background // Bukovynskiy Med. Visnyk. 2011, 15, N2, 214-217).
14. Mc Gillicuddy F.C., Chiquoine E.H., Hinkle C.C., Kim R.J., Shah R., Roche H.M., Smyth E.M., Reilly M.P. Interferon gamma attenuates insulin signaling, lipid storage, and differentiation in human adipocytes via activation of the JAK/STAT pathway // J. Biol. Chem. 2009, 284, N46, 31936-31944.
15. Кетлинский С.А., Калинин Н.М. Цитокины мононуклеарных фагоцитов в регуляции воспаления и иммунитета // Иммунология. 1995, №3, 30-44 (Ketlinskiy S.A., Kalinina N.M. Cytokines of mononuclear phagocytes in the regulation of inflammation and immunity // Immunologia. 1995, N3, 30-44).
16. Сивкова А.А., Ларева Н.В., Лузина Е.В., Томина Е.А. Роль цитокинов и белков теплового шока в формировании различных клинических форм неалкогольной жировой болезни печени // Забайкальский медицинский вестник. 2011, №2, 79-85. (Sivkova A.A., Lareva N.V., Lusina Ye.V., Tomina Ye.A. The role of cytokines and heat shock proteins in the formation of a variety of clinical forms of non-alcoholic fatty liver disease // Zabaikalskii Medicinskiy Vestnik. 2011, N2, 79-85).
17. Zuniga, L.A., Shen W.-J., Joyce-Shaikh B., Pyatnova E.A., Richards A.G., Thom C., Andrade S.M., Cua D.J., Kraemer F.B., Butcher E.C. IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity // J. Immunol. 2010, 185, N11, 6947-6959.
18. Mykhalchysyn G., Bodnar P., Kobyliak N. Diagnostic effectiveness of adiponectin for nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. // Science progress in European countries: new concepts and modern solutions, proceedings of the 1st International scientific conference. ORT Publishing. Stuttgart. 2013, 45-50.
19. Kremer M.I., Hines I.N. Natural killer T cells and non-alcoholic fatty liver disease: Fat chews on the immune system // World J. Gastroenterol. 2008, 14, N3, 487-488.
20. Зак К.П., Тронько М.Д., Попова В.В., Бутенко А.К. Цукровий діабет, імунітет, цитокіни / Київ: Книга-плюс. 2014, 500 с. (Zak K.P., Tronko M.V., Popova V.V., Butenko A.K. Diabetes, immunity, cytokines / Kyiv: Book Plus. 2014, 500 p.)

(Надійшло до редакції 28.01.2015)

Цитокиновий статус і субпопуляційний склад лімфоцитів периферичної крові хворих на цукровий діабет 2 типу та неалкогольною жировою хворобою печінки

К.О. Кондратюк¹, П.М. Боднар¹, М.І. Лісяний², Л.М. Бельська², А.І. Потапова²

¹Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

²ДУ «Інститут нейрохірургії ім. академіка А.П. Ромоданова НАМН України»

Резюме. Серед механізмів розвитку цукрового діабету 2 типу (ЦД2) одна з провідних ролей належить імунопатологічній ланці патогенезу. Виступаючи на етапі маніфестації в якості відповіді на вплив пускових факторів, імунні порушення визначають у подальшому характер перебігу даної патології, у тому числі, швидкість розвитку і виразність його специфічних ускладнень, зокрема неалкогольною жировою хворобою печінки (НАЖБП). Мета дослідження – вивчити вміст цитокінів та основних субпопуляцій лімфоцитів у хворих із ЦД2 та НАЖБП. Під спостереженням перебувало 118 хворих, серед яких 64 пацієнта із ЦД2 та НАЖБП (I група), 26 пацієнтів – із ЦД2 (II група) і 28 пацієнтів із НАЖБП (III група). Контрольну групу склали 25 умовно здорових донорів. Встановлено, що для кожної з вивчених патологій, а саме, ЦД2, НАЖБП або їх поєднанні притаманний свій цитокиновий статус, який відображає як наявність запальних процесів, так і спрямованість імунопатологічних реакцій в організмі. Виявлені зміни рівнів цитокінів та субпопуляційного складу лімфоцитів при поєднанні ЦД2 з НАЖБП можна використовувати як для діагностики, так і для прогнозування несприятливого розвитку даної патології, зокрема розвитку запальної реакції в

печінці (підвищення рівня ІЛ-1 β), інтенсивності та спрямованості імунopatологічних реакцій (підвищення ІНФ- γ , зниження ІЛ-4, зміни вмісту НК клітин), інтенсивності розростання сполучної тканини і ступеня фіброзоутворення (підвищення рівня ІЛ-10). Висновки: 1. У хворих із ЦД2, НАЖБП або при поєднанні даних патологій спостерігаються зміни цитокінового статусу, що відображають інтенсивність імунних реакцій запалення, їх спрямованість і можливий прогноз фіброзоутворення в печінці. 2. Збільшення вмісту в крові ІЛ-1 β , ІЛ-17 і ІНФ- γ свідчить про наявність високої запальної і імунopatологічної реакції у хворих на ЦД2 та НАЖБП. 3. Знайдено дисбаланс у складі субпопуляцій лімфоцитів, що проявляється зниженням рівня клітин CD8 $^{+}$ і CD16 $^{+}$ в крові при відносно стабільному рівні Т-хелперної (CD4 $^{+}$) субпопуляції клітин і збільшенням вмісту CD20 $^{+}$ клітин, що розвивається на тлі збільшеного вмісту циркулюючих імунних комплексів. 4. У хворих із НАЖБП і ЦД2 відмічається підвищена апоптотична готовність лімфоцитів, що проявляється збільшенням вмісту клітин CD95 $^{+}$ в крові. 5. Виявлені зміни рівнів цитокінів та субпопуляційного складу лімфоцитів при поєднанні ЦД2 з НАЖБП можуть бути використані для діагностики та оцінки ступеня тяжкості порушень при даній патології.

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, неалкогольна жирова хвороба печінки, цитокіни, лімфоцити, імунні комплекси.

Cytokine status and subpopulations of peripheral blood lymphocytes in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease

K.O. Kondratyuk¹, P.M. Bodnar¹, N.I. Lysianyj², L.N. Belskaya², A.I. Potapova²

¹O.O. Bogomolets National Medical University;

²State Institution «A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery, Natl Acad. Med. Sci. of Ukraine»

Summary. Among the mechanisms of type 2 diabetes mellitus (T2DM), one of the leading roles is attributed to the immunopathological link of pathogenesis. At the manifestation stage, in response to the impact of triggering factors, immune disorders determine the further character

of this disease, including the development and severity of its specific complications, in particular, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The aim of the study was an analysis of the content of cytokines and major lymphocyte subpopulations in patients with T2DM and NAFLD. We followed up 118 patients, including 64 patients with T2DM and NAFLD (group 1), 26 patients – with T2DM (group 2), and 28 patients with NAFLD (group 3). The control group consisted of 25 conditionally healthy donors. The study has established that each of the studied pathologies, namely T2DM, NAFLD, or its combination was characterized by a particular cytokine status which reflects both the presence of inflammatory processes and orientation of immunopathological reactions in the body. The changes observed in cytokine level and lymphocyte subpopulation composition in the presence of a combination of T2DM with NAFLD can be used both for the diagnosis and prediction of an unfavorable development of this disease, in particular, development of an inflammatory response in the liver (increased IL-1 β level), intensity and orientation of immunopathological reactions (increased IFN- γ level, decreased IL-4 level, changes in NK cell content), intensity of proliferation of connective tissue and fibrosis degree (increased IL-10 level). The authors came to the following conclusions: 1) In patients with T2DM, NAFLD, or a combination of these disorders, changes in cytokine status are observed, that reflect the intensity of the inflammatory immune responses, their orientation and possible fibrosis in the liver. 2) Increased blood levels of IL-1 β , IL-17 and IFN- γ indicate the presence of high inflammatory and immunopathological reactions in patients with T2DM and NAFLD. 3) An imbalance has been established in lymphocyte subpopulation composition, expressed by decreased blood levels of CD8 $^{+}$ and CD16 $^{+}$ cells in case of a relatively stable level of T helper (CD4 $^{+}$) cells and increased content of CD20 $^{+}$ cells, which develops in the presence of an increased level of circulating immune complexes. 4) Patients with NAFLD and T2DM showed an increased apoptotic willingness of lymphocytes, which manifests itself as an increased content of CD95 $^{+}$ cells in the blood. 5) The changes revealed in cytokine level and lymphocyte subpopulation composition in T2DM patients with NAFLD can be used to diagnose and assess the severity of disorders in this pathology.

Keywords: type 2 diabetes, nonalcoholic fatty liver disease, cytokines, lymphocytes, immune complexes.