УДК 616.379-008.64+616.36:612.352.2

# Уровни провоспалительных цитокинов и эндотоксемии у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и неалкогольной жировой болезнью печени

***Е.А. Литвиненко[1], П.Н. Боднар[1], Н.И. Лисяный[2], Л.Н. Бельская[2]***

**[1]Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев**

**[2]ГУ «Институт нейрохирургии имени академика А.П. Ромоданова НАМН Украины», г. Киев**

**В статье изложены результаты изучения уровней провоспалительных цитокинов и эндотоксемии у больных с сахарным диабетом (СД) 2-го типа и неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП). У больных с СД 2-го типа и НАЖБП или при их сочетании отмечено увеличение сывороточной концентрации ФНО-α, ИНФ-γ, ИЛ-6 и ИЛ-8. Наибольшее повышение содержания провоспалительных цитокинов и С-реактивного белка у больных с СД 2-го типа и НАЖБП по сравнению с больными с СД 2-го типа или НАЖБП свидетельствует о более выраженной воспалительной и иммунопатологической реакции. Установлено повышение уровня антител IgG к липополисахариду и молекулам средней массы у больных с СД 2-го типа и НАЖБП и выявлена корреляция с уровнями провоспалительных цитокинов, что свидетельствует о патогенетической роли эндотоксинов грамотрицательной микрофлоры кишечника в индукции системного воспаления у этих больных.**

***Ключевые слова:*** *цитокины, эндотоксемия, сахарный диабет, неалкогольная жировая болезнь печени.*

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), являющаяся компонентом сахарного диабета (СД), метаболического синдрома, ожирения, в настоящее время широко распространена в развитых странах. Данные заболевания имеют общие патогенетические факторы, предопределяющие их потенцирование, развитие и прогрессирование. Сочетание НАЖБП с СД 2-го типа вдвое увеличивает риск гепатоцеллюлярной карциномы и цирроза печени [1].

Центральную роль в механизме развития НАЖБП играют инсулинорезистентность, активация глюконеогенеза и жировая инфильтрация гепатоцитов. Определенное значение в развитии стеатогепатита имеет индукция оксидативного стресса [2]. В результате перекисного окисления липидов (ПОЛ) вырабатывается значительное количество свободных радикалов, которые индуцируют повышенный синтез провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли α (ФНО-α), интерлейкины (ИЛ) 1β, 6, 8, матриксные металлопротеиназы). Гиперпродукция цитокинов приводит к развитию воспалительного процесса и некротическим изменениям в печеночных клетках [3]. Важную роль в развитии воспалительного компонента при НАЖБП отводят бактериальной эндотоксемии, связанной с дисбиозом кишечника. Проникновение в кровь и в печень кишечных эндотоксинов способствует усилению синтеза провоспалительных цитокинов. Эндотоксины и цитокины вовлекаются в патогенез стеатогепатита и приводят к дальнейшему циррозу [4, 5].

В то же время многие вопросы развития воспалительной реакции и роли эндотоксемии при НАЖБП и СД 2-го типа остаются до конца не изученными.

**Цель исследования:** изучить уровни провоспалительных цитокинов и эндотоксемии у больных СД 2-го типа и НАЖБП.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находились 110 больных, среди которых 60 пациентов с СД 2-го типа и НАЖБП (I группа), 25 пациентов – с СД 2-го типа (II группа) и 25 пациентов с НАЖБП (III группа). Контрольную группу составили 25 пациентов.

Оценку эндогенной интоксикации в сыворотке крови проводили по спектру молекул средней массы (МСМ) с помощью метода, описанного Л.Л. Громашевской [6]. Принцип метода основан на освобождении сыворотки крови от высокомолекулярных пептидов и белков с использованием трихлоруксусной кислоты и количественном определении полученного после центрифугирования надосадочной жидкости уровня МСМ по поглощению в монохроматическом световом потоке при длине волн 254 нм и 280 нм. Выделяли 2 фракции МСМ: при 254 нм – токсическая фракция (гидрофобные токсины и продукты неполного распада белков) и 280 нм – ароматическая фракция (ароматические аминокислоты). Результаты представлены в условных единицах экстинкции с вычислением коэффициента распределения: КР=Е 280/Е 254.

Концентрацию цитокинов (ИЛ-6, 8, ИНФ-γ, ФНО-α) и СРБ (С-реактивный белок) определяли в сыворотке периферической крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов «Вектор-Бест» (Россия), основанного на твердофазном сэндвич-варианте, согласно инструкции фирмы производителя. На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубировали с иммобилизированными в лунках специфическими против определенного цитокина антигенами. Имеющийся в образцах цитокин связывается с иммобилизированными антигенами, затем связавшийся цитокин взаимодействует со вторичными антителами. Завершение реакции осуществляли путем внесения субстратной смеси. Интенсивность желтого окрашивания, которая пропорциональна концентрации содержащегося в образце определенного цитокина, учитывали на спектрофотометре «Immunochem» при длине волны 540 нм.

Определение циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке периферической крови проводили по методу [7], который основывается на селективной преципитации комплексов антиген–антитело в 3,75% полиэтиленгликоле с последующим фотометрическим определением плотности преципитации.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ «Statistica 6,0». Для оценки корреляционных взаимосвязей между показателями использовали коэффициент корреляции Спирмена. При величине коэффициента корреляции менее 0,3 связь оценивали как слабую, от 0,31 до 0,5 – как умеренную, выше 0,5 – как значительную.

*Таблица 1*

**Содержание цитокинов (пг/мг) и СРБ (мг/л) в сыворотке крови у обследованных больных**

| Показатели | Группы | | | |
|---|---|---|---|---|
| | НАЖБП + СД 2-го типа, n=60 | НАЖБП, n=25 | СД 2-го типа, n=25 | Контроль, n=25 |
| ФНО-α | 4,23±0,77*# | 2,19±0,49*# | 1,37±0,45*# | 0,56±0,047 |
| ИЛ-6 | 5,04±0,68* | 3,96±0,28* | 2,75±0,38 | 1,98±0,15 |
| ИЛ-8 | 4,55±0,48* | 3,6±0,27* | 2,53±0,23 | 1,90±0,13 |
| ИНФ-γ | 5,09±0,46*# | 4,55±0,41* | 1,92±0,17# | 0,84±0,06 |
| СРБ | 17,28±2,03*# | 12,07±1,15*# | 7,27 ±2,07*# | 3,43±0,17 |

Примечания: * – p<0,001 – достоверность различий с аналогичными показателями контроля;
# – p<0,05 – достоверность различий группы СД 2-го типа и НАЖБП с аналогичными показателями группы только СД 2-го типа или НАЖБП.

*Таблица 2*

**Содержание молекул средней массы и антител к ЛПС в сыворотке крови обследованных больных**

| Показатели | Группы | | | |
|---|---|---|---|---|
| | НАЖБП + СД 2-го типа, n=60 | НАЖБП, n=25 | СД 2-го типа, n=25 | Контроль, n=25 |
| $МСМ_{254}$, усл.ед. | 0,271±0,026* | 0,219±0,017 | 0,225±0,016* | 0,134±0,011 |
| $МСМ_{280}$, усл.ед. | 0,466±0,029*# | 0,311±0,015* | 0,367±0,020*# | 0,219±0,017 |
| 280/254 | 1,72±0,11 | 1,41±0,11 | 1,64±0,09 | 1,63±0,079 |
| IgG к ЛПС (усл.ед. опт.плот.) | 0,659±0,179*# (0,39-1,080) | 0,443±0,106* (0,190-0,720) | 0,242±0,060# 0,170-0,427 | 0,156±0,007 |

*Примечания:* * – p<0,05 – достоверность различий с аналогичными показателями контроля; # – p<0,05 – достоверность различий группы НАЖБП+СД 2-го типа с аналогичными показателями группы только СД 2-го типа или НАЖБП.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание цитокинов ФНО-α и ИНФ-γ, ИЛ-6, ИЛ-8 было повышено у больных СД 2-го типа, НАЖБП, а также при их сочетании (табл. 1). У больных с СД 2-го типа выявлено двукратное повышение ФНО-α и ИНФ-γ. Концентрации цитокинов в группе больных с НАЖБП составили 2,19±0,49 пг/мл для ФНО-α и 4,55±0,41 пг/мл для ИНФ-γ, что статистически достоверно (p<0,001) превышало контрольные показатели.

У больных с СД 2-го типа и НАЖБП выявлено наибольшее повышение содержания ФНО-α и ИНФ-γ в сыворотке крови. Среди больных данной группы в 64,5% случаев мы выявили значительное повышение уровней ФНО-α и ИНФ-γ (в 5–8 раз по сравнению со значениями контрольной группы), а в 12,5% случаев наблюдалось умеренное повышение (значения превышали контрольный уровень не более чем в 2 раза) данных цитокинов. У больных с НАЖБП значительное повышение содержания ФНО-α в сыворотке крови (в 4–5 раз) отмечено только в 28% случаев, а ИНФ-γ – в 26,5% случаев.

Средний уровень других цитокинов, в частности ИЛ-6 и ИЛ-8, был повышен в 1,5 раза у больных с СД 2-го типа и в среднем в 2 раза у больных с НАЖБП. При сочетании этих патологий (СД 2-го типа и НАЖБП) уровень данных цитокинов превышал контрольные показатели в 3 раза, что, по-видимому, свидетельствует о более интенсивной воспалительной реакции в организме у больных этой группы.

О более выраженном системном воспалительном процессе при сочетании СД 2-го типа и НАЖБП свидетельствует статистически достоверное (p<0,05) повышение уровня сывороточного СРБ не только по сравнению с контролем, но и по сравнению с соответствующими показателями больных только с СД 2-го типа или только с НАЖБП (см. табл. 1).

Значительное повышение уровней ФНО-α, ИНФ-γ, ИЛ-6, ИЛ-8 у больных с СД 2-го типа и НАЖБП отражает прогрессирующий характер воспаления и свидетельствует о роли цитокинов в патогенезе этой патологии. Активация макрофагов под влиянием ФНО-α сопровождается выработкой избыточных количеств реактивных форм кислорода и оксида азота, обладающих прямым цитотоксическим эффектом на гепатоциты. ФНО-α также активирует внутриклеточные сигнальные молекулы, в том числе стресс-киназы и ингибитора каппа-киназы-бета, что делает клетки устойчивыми к действию инсулина и нарушает его связывание с рецептором. Воздействие ФНО-α на инсулиновый рецептор типа 1 проявляется в его фосфорилировании, уменьшении сродства к инсулину, уменьшение количества белка ГЛЮТ4, уменьшении захвата и утилизации глюкозы клетками, нарастании гипергликемии, повреждении сосудов и развитии СД 2-го типа [8]. С другой стороны, ФНО-α стимулирует синтез жирных кислот в печени, повышает уровень сывороточных триглицеридов [9], стимулирует продукцию липопротеидов очень низкой плотности. ФНО-α при участии ИНФ-γ оказывает прямое цитотоксическое действие на гепатоциты и участвует в патогенезе фиброза печени [10].

Индукторами повышенной секреции провоспалительных цитокинов ФНО-α, ИНФ-γ, ИЛ-6, ИЛ-8 могут служить эндотоксин (ЭТ) грамотрицательной микрофлоры кишечника [11], реактивные формы кислорода и продукты перекисного окисления липидов [3]. В связи с этим в ходе исследования было проведено изучение в сыворотке больных уровня антител IgG к липополисахариду (ЛПС) и содержания МСМ как показателя эндогенной интоксикации. Мы обнаружили 2-кратное повышение уровня антител Ig класса G к ЛПС у больных с СД 2-го типа и 3–4-кратное его повышение у 31% больных с НАЖБП. При сочетании СД 2-го типа и НАЖБП уровень антител IgG к ЛПС статистически достоверно (p<0,05) превышал контрольные значения – 0,659±0,179 усл.ед. и 0,156±0,007 усл.ед. соответственно. У 68,3% обследованных больных выявлено значительное (в 6–7 раз) повышение данного показателя (табл. 2).

Анализ уровней изучаемых цитокинов позволил выявить прямую корреляцию между уровнем ФНО-α, ИЛ-6 и уровнем антител IgG к ЛПС у больных с НАБЖП (ФНО-α и уровень антител IgG к ЛПС, r=0,68; ИЛ-6 и уровень антител IgG к ЛПС, r=0,65), и у больных с сочетанной патологией СД 2-го типа + НАЖБП (ФНО-α и уровень антител IgG к ЛПС, r=0,67; ИЛ-6 и уровень антител IgG к ЛПС, r=0,56), что, по-видимому, свидетельствует о роли эндотоксинов грамотрицательной микрофлоры в индукции системного воспаления при данных патологиях.

Исследование уровней МСМ в сыворотке больных всех групп выявило повышение содержания МСМ как токсической, так и ароматической фракции по сравнению с показателями контроля.

Содержание токсической фракции $МСМ_{254}$ в сыворотке больных с СД 2-го типа и НАЖБП составило 0,271±0,026 усл.ед. при контроле 0,134±0,011 усл.ед., при этом показатели $МСМ_{254}$ у больных только с СД 2-го типа или только с НАЖБП были несколько ниже – 0,225±0,016 усл.ед. и 0,219±0,017 усл.ед. соответственно. Содержание ароматической фракции $МСМ_{280}$ в 1,5 раза превышало показатели контроля у больных с СД 2-го типа или НАЖБП и более чем в 2 раза – при сочетании данных патологий. Значительное повышение концентрации МСМ не только отражало повышенный уровень эндотоксемии при СД 2-го типа и НАЖБП и при сочетанном поражении, но и рассматривалось в качестве прогностически неблагоприятного показателя течения и исхода заболевания.

Таким образом, мы обнаружили, что сочетание СД 2-го типа и НАЖБП сопровождается повышением уровня провоспалительных цитокинов (ФНО-α, ИНФ-γ, ИЛ-6 и ИЛ-8) и уровня СРБ в сыворотке крови по сравнению с больными только с СД 2-го типа или НАЖБП, что свидетельствует о более выраженном воспалительном процессе в печени. Повышение уровней антител IgG к ЛПС и МСМ у больных с СД 2-го типа и НАЖБП и их корреляция с уровнями провоспалительных цитокинов свидетельствует о патогенетической роли эндотоксинов грамотрицательной микрофлоры кишечника в индукции системного воспаления, что необходимо учитывать при разработке патогенетически обоснованных подходов лечения данной патологии.

## ВЫВОДЫ

1. У больных с СД 2-го типа и НАЖБП или при их сочетании отмечено увеличение сывороточной концентрации ФНО-α, ИНФ-γ, ИЛ-6 и ИЛ-8.

2. Наибольшее увеличение содержания провоспалительных цитокинов и С-реактивного белка у больных с СД 2-го типа и НАЖБП по сравнению с больными с СД 2-го типа или НАЖБП свидетельствует о более выраженной воспалительной и иммунопатологической реакции.

3. Установлено повышение уровня антител IgG к ЛПС и МСМ у больных с сочетанием СД 2-го типа и НАЖБП и выявлена корреляция с уровнями провоспалительных цитокинов, что свидетельствует о патогенетической роли эндотоксинов грамотрицательной микрофлоры кишечника в индукции системного воспаления у этих больных.

### Рівні прозапальних цитокінів та ендотоксемії у пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу та неалкогольною жировою хворобою печінки

***К.О. Литвиненко, П.М. Боднар, М.І. Лисяний, Л.М. Бєльська***

У статті наведені результати вивчення рівнів прозапальних цитокінів та ендотоксемії у хворих із цукровим діабетом (ЦД) 2-го типу та неалкогольною жировою хворобою печінки (НАЖХП). У хворих із ЦД 2-го типу і НАЖХП або при їх поєднанні відзначено збільшення сироваткової концентрації ФНП-α, ІНФ-γ, ІЛ-6 та ІЛ-8. Найбільше підвищення вмісту прозапальних цитокінів і С-реактивного білка у хворих із ЦД 2-го типу і НАЖХП у порівнянні з хворими з ЦД 2-го типу або НАЖХП свідчить про більш виражену запальну та імунопатологічну реакції. Установлено підвищення рівня антитіл IgG до ліпополісахариду та молекул середньої маси у хворих із ЦД 2-го типу та НАЖХП і виявлена кореляція з рівнями прозапальних цитокінів, що свідчить про патогенетичну роль ендотоксинів грамнегативної мікрофлори кишечнику в індукції системного запалення у цих хворих.

***Ключові слова:*** *цитокіни, ендотоксемія, цукровий діабет, неалкогольна жирова хвороба печінки.*

### Levels of proinflammatory cytokines and endotoxemia in patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease

***E.A. Lytvynenko, P.N. Bodnar, N.I. Lysianuy, L.N. Belska***

The article presents results of a study of proinflammatory cytokines and endotoxemia in patients with type 2 diabetes and NAFLD. Patients with type 2 diabetes and NAFLD or their combination have increased serum concentration of TNF-α, IFN-γ, IL-6 and IL-8. The greatest increase of proinflammatory cytokines and C-reactive protein in patients with type 2 diabetes and NAFLD compared with patients with type 2 diabetes or NAFLD indicates more severe inflammatory and immunopathological reaction. We found an increased level of IgG antibodies to LPS and HMM in patients with type 2 diabetes and NAFLD which correlates with the levels of proinflammatory cytokines, indicating the pathogenic role of endotoxin of gram-negative intestinal microflora in the induction of systemic inflammation in these patients.

***Key words:*** *cytokines, endotoxemia, diabetes, nonalcoholic fatty liver disease.*

## Сведения об авторах

**Боднар Петр Николаевич** – Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, 01601, г. Киев, бульвар Т.Г. Шевченко, 1. E-mail: endo@nmu.kiev.ua

**Литвиненко Екатерина Алексеевна** – Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, 01601, г. Киев, бульвар Т.Г. Шевченко, 1. E-mail: kateryna_lytvynenko@mail.ru

**Лисяный Николай Иванович** – ГУ «Институт нейрохирургии имени О.П. Ромоданова НАМН Украины», 04050, г. Киев, ул. Платона Майбороды, 32

**Бельская Людмила Николаевна** – ГУ «Институт нейрохирургии имени О.П. Ромоданова НАМН Украины», 04050, г. Киев, ул. Платона Майбороды, 32

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боднар П.М., Михальчишин Г.П., Кобиляк Н.М. Неалкогольна жирова хвороба печінки у хворих на цукровий діабет типу 2: патогенез, діагностика та лікування //Ендокринологія. – 2012. – Т. 17, № 1. – С. 94–101.
2. Хворостінка В.М., Лавриненко О.В., Журавльов Патогенетичні аспекти жирової дистрофії печінки при цукровому діабеті 2 типу //Сучасна гастроентерологія. – 2009. – № 3. – С. 91–97.
3. Маммаев С.Н., Багомедова Н.В., Богомолов П.О. Цитокиновая система при неалкогольном стеатогепатите //РЖГГН. – 2007. – № 4. – С. 35–39.
4. Кляритська І.Л., Стіліді О.І. Система цитокінів при неалкогольному стеатогепатиті //Архів клінічної та експериментальної медицини. – 2010. – Т. 19, № 2. –С. 167–192.
5. Mieeabilityle L., Valenza V., La Torre G. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. //Hepatology. – 2009. – V. 49. – P. 1877–1887.
6. Громошевская Л.Л. Средние молекулы как один из показателей «метаболической интоксикации» в организме //Лаб. диагностика. – 1997. – № 1. – С. 11–16.
7. Гашкова В., Мате Н. //Чехословацкая медицина. – 1978. – № 2. – С. 117.
8. Буеверов А.О., Маевская М.В. Некоторые патогенетические и клинические вопросы неалкогольного стеатогепатита. //Клин. персп. гастроэнтеролог. и гепатол. – 2008. – № 3. – С. 2–9.
9. Орловський В.Ф., Муренець Н.О. Хронічне запалення при неалкогольній жировій хворобі печінки //Патологія. – 2010. – Т. 7. – № 3. – С. 99–102.
10. Корнійчук І.Ю. Особливості цитокінової регуляції та кооперації при неалкогольній жировій хворобі печінки на фоні ожиріння //Буковинський медичний вісник. – 2011. – Т. 15, № 2. – С. 214–216.
11. Белоглазов В.А., Гордиенко А.И., Ильченко Ф.Н. Роль эндотоксина грамотрицательной микрофлоры кишечника в патогенезе системного хронического воспаления у больных при ожирении, метаболическом синдроме и сахарном диабете 2 типа //Клиническая хирургия. – 2012. – № 8. – С. 4–5.

*Статья поступила в редакцию 02.04.2014*