



УДК 571.27:616.379-008.64

© 2010

Т. І. Галенова, В. В. Конопельнюк, Л. І. Кот, О. В. Богданова,
Л. І. Остапченко

Рівень прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 2 типу

(Представлено членом-кореспондентом НАН України С. О. Костеріним)

У сироватці крові щурів за умов експериментальної моделі цукрового діабету (ЦД) 2 типу визначено показники вуглеводного та ліпідного обміну, а також вміст фактора некрозу пухлин- α та інтерферону- γ . Встановлено підвищення вмісту глюкози, тригліцеридів, вільних жирних кислот, а також розвиток інсулінорезистентності у дослідних тварин. У тварин з експериментальною моделлю ЦД 2 типу виявлено підвищений вміст фактора некрозу пухлин- α , однак знижений рівень інтерферону- γ .

Цукровий діабет (ЦД) 2 типу — хронічне ендокринне захворювання, основними патогенетичними факторами якого виступають гіперглікемія, зниження чутливості периферичних тканин до інсуліну та порушення функціонування β -клітин підшлункової залози. В основі патогенезу інсулінонезалежної форми діабету знаходиться інсулінорезистентність (ІР) — недостатня відповідь клітин на дію інсуліну при його достатній кількості в крові. Стан ІР можна виявити задовго до появи клінічних ознак ЦД 2 типу, оскільки знижена чутливість до інсуліну може компенсуватися збільшеним синтезом цього гормону в підшлунковій залозі. Проте з часом β -клітини втрачають здатність синтезувати інсулін, пригнічується процесінг проінсуліну та секреція інсуліну, зменшується кількість секретуючих клітин в острівцях Лангерганса.

За останні роки представляє великий інтерес роль аутоімунних реакцій за участю цитокінів у патогенезі ЦД 2 типу. Цитокіни є сигнальними поліпептидними молекулами, які синтезуються і секретуються клітинами імунної системи, а також ендотеліальними клітинами кісткового мозку, фібробластами, адипоцитами й іншими видами клітин та інтегрують місцеві й системні процеси імунної відповіді. Відомо, що розвиток ІР супроводжується дисбалансом у системі цитокінів: підвищенням рівня інтерлейкіну-6 (ІЛ), фактора некрозу пухлин- α (ФНП α) та зниженням ІЛ-10, ІЛ-4. ФНП α може опосередковано пригнічувати стимульоване інсуліном тирозинове фосфорилування інсулінового рецептора й субстрату-1

цього рецептора, тим самим інгібувати процес сигнальної трансдукції [1]. Також ФНП α порушує функцію транспортного білка ГЛЮТ-4, який забезпечує інсулінозалежне включення глюкози у м'язову і жирову тканини, що також сприяє ІР [1].

Таким чином, у патогенезі ЦД 2 типу запальні цитокіни можуть відігравати значну роль, яка на сьогодні недостатньо з'ясована. Метою наших досліджень було визначення вмісту прозапальних цитокінів (ТНФ α й ІФН γ (інтерферон- γ)) у сироватці крові щурів за умов експериментального ЦД 2 типу.

Матеріали та методи досліджень. Досліди проводили на білих нелінійних щурах обох статей масою 230–250 г. Експериментальний ЦД 2 типу викликали одноразовим внутрішньочеревним введенням новонародженим одно-дводенним щурят розчину стрептозотоцину з розрахунку 80 мг на 1 кг маси тіла [2]. До контрольної групи входили щури, яким у тому самому віці внутрішньочеревно вводили 10 ммоль/л цитратний буфер (рН 4,5), який використовували для розведення стрептозотоцину.

Через 180 діб у піддослідних тварин встановлювали рівень глюкози в крові натще, досліджували стан ліпідного обміну та визначали чутливість периферичних тканин до інсуліну. Рівень глюкози визначали за допомогою приладу “ГЛЮКОФОТ-ІІ” (Україна), згідно з інструкцією. Стан ліпідного обміну характеризували за показниками вмісту в сироватці крові холестеролу, тригліцеридів та вільних жирних кислот (ВЖК). Концентрацію холестеролу та тригліцеридів у крові визначали спектрофотометрично за допомогою наборів реактивів фірми LACHEMA (Росія). Рівень ВЖК визначали, згідно з методом [3].

Чутливість тканин до інсуліну встановлювали за допомогою інсулін-глюкозотолерантного тесту [4], проведеного з власними модифікаціями. Перед проведенням тесту натщесерце тварин анестезували інтраперитонеальною ін'єкцією тіопенталу натрію у дозі 40 мг/кг. За допомогою зонду щурам *per os* вводили розчин глюкози в загальному об'ємі 2 мл із розрахунку 2 г на 1 кг маси тварини. За допомогою внутрішньовенного катетера через 30, 60, 90 хв та 120 хв відбирали проби крові у об'ємі 100 мкл та визначали концентрацію глюкози. У більшості випадків на 120 хв концентрація глюкози в крові досягала плато максимальних значень, після чого внутрішньовенно вводили розчин інсуліну в розрахунку 0,35 U на кілограм маси тварини. Рівень глюкози визначали в крові кожні 5 хв протягом 20 хв після введення інсуліну. У ході тесту, після введення інсуліну, спостерігалось лінійне зниження рівня глюкози крові, кут нахилу лінії свідчив про чутливість периферичних тканин до інсуліну. Для кількісного обрахунку отриманих результатів за індекс чутливості периферичних тканин до інсуліну приймали швидкість зниження глюкози в крові після введення інсуліну. Чим вищий показник, тим краща чутливість тканин до інсуліну.

Рівень прозапальних цитокінів ТНФ α та ІФН γ у сироватці крові піддослідних тварин визначали методом імуноферментного аналізу з використанням наборів реактивів Biotrak ELISA System фірми “Healthcare”, згідно з інструкціями.

Статистичний аналіз здійснювали за допомогою прикладних програм статистичного аналізу Microsoft Excel. Для оцінки міжгрупових відмінностей застосовували параметричний критерій Стьюдента. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Відомо, що розвиток ЦД 2 типу супроводжується тривалими порушеннями вуглеводного, ліпідного та білкового обмінів, що призводить до патологічних змін у функціонуванні різних органів та систем.

У ході досліджень було доведено, що у піддослідних тварин розвиток експериментального ЦД 2 типу супроводжувався появою гіперглікемії натще, змінами ліпідного обміну та

показників чутливості тканин до інсуліну (табл. 1). Так, у групі щурів з експериментальним ЦД спостерігалось підвищення рівня глюкози в крові натще в 1,5 раза порівняно зі значеннями контрольної групи. Аналізуючи отримані дані, нами встановлено зниження швидкості засвоєння глюкози периферичними тканинами у тварин з експериментальним ЦД у 3,7 раза порівняно з контрольною групою (див. табл. 1). Результати можуть вказувати на стан ІР, який відіграє важливу роль у патогенезі ЦД 2 типу.

У ході досліджень нами встановлено, що за умов розвитку ЦД 2 типу відбувалося підвищення концентрації тригліцеридів у 1,7 раза відносно їх вмісту в крові контрольних щурів. Слід відзначити зростання рівня холестеролу в крові в 2,4 раза у піддослідних тварин з експериментальним ЦД порівняно зі значеннями контрольної групи. Вміст ВЖК у сироватці крові щурів з експериментальним ЦД 2 типу був підвищений у 3 рази порівняно з контролем (див. табл. 1). Такі зміни ліпідного метаболізму можуть бути наслідком гіперглікемії й ІР периферичних тканин та можуть підтвердити розвиток експериментального ЦД 2 типу в групі піддослідних тварин.

На сьогодні механізми розвитку ІР знаходяться у сфері інтенсивних наукових досліджень. Все більше уваги приділяється ролі імунного запалення в патогенезі цього стану. Дослідженнями на тваринах з ожирінням та ІР за допомогою точкових мутацій гену, що кодує ТНФ α , встановлено, що у тварин з нестачею ТНФ α знижувався рівень ВЖК у крові та зростала чутливість тканин до інсуліну [5]. Також встановлено, що імунонейтралізація ТНФ α шляхом введення антитіл рецептора ТНФ призводить до підвищення утилізації глюкози периферичними тканинами у 2–3 рази у відповідь на дію інсуліну [6].

Відомо, що за умов ЦД 2 типу на ліпоцитах відбувається підвищення експресії рецепторів до ТНФ, активізація яких включає механізми внутрішньоклітинної передачі сигналу за участю MAP-кіназ, що приводить до активації ядерного фактора транскрипції NF- κ B, який відповідає за репрограмування низки генів в адипоцитах. NF- κ B пригнічує експресію генів, продукти яких беруть участь у процесах регуляції включення, нагромадження та метаболізму жирів і вуглеводів [7].

У жирових клітинах ТНФ α пригнічує стимульоване інсуліном тирозинове фосфорилування інсулінового рецептора й субстрату-1 цього рецептора (IRS-1). Це відбувається внаслідок індукції серинового фосфорилування за рахунок дії активованих цитокіном протеїнкіназ (I κ B кіназа- β , c-Jun кінази тощо) [8]. Саме серинове фосфорилування IRS-1 блокує подальше проходження сигналу від інсулінового рецептора. Також ТНФ α пригнічує синтез IRS-1 та білка транспортера глюкози — ГЛЮТ-4. Таким чином, ТНФ α впливає на ІР клітин жирової тканини, що супроводжується пригніченням інсулінозалежного включення глюкози та розвитком гіперглікемії.

Таблиця 1. Стан вуглеводного та ліпідного обміну за умов експериментального ЦД 2 типу ($M \pm m$, $n = 8$)

Показник	Контроль	ЦД 2 типу
Глюкоза натще, ммоль/л	4,84 \pm 0,81	(7,45 \pm 0,65)*
Тригліцериди, г/л	2,55 \pm 0,20	(4,39 \pm 0,73)*
Холестерол, ммоль/л	2,42 \pm 0,19	(5,76 \pm 0,87)*
ВЖК, мг/л	23,60 \pm 4,67	(74,50 \pm 9,23)*
Швидкість засвоєння глюкози периферичними тканинами у відповідь на інсулін, ммоль глюкози/хв	0,15 \pm 0,03	(0,040 \pm 0,006)*

* — $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

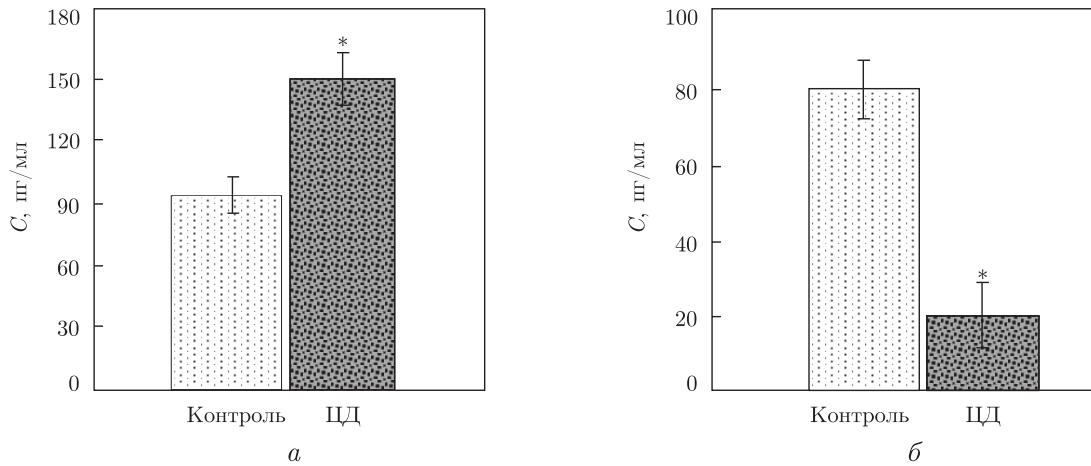


Рис. 1. Концентрація прозапальних цитокінів: ТНФ α (а) та ІФН γ (б) у сироватці крові щурів у контролі та за умов експериментального ЦД 2 типу; ($M \pm m$), $n = 8$; * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Зміни у функціонуванні ліпоцитів мають пряме відношення до розвитку ІР не лише місцево, в самих адипоцитах, а й системно — в інших тканинах та органах організму, зокрема у м'язах та печінці. Це відбувається за рахунок опосередкованої дії цього цитокіну, яка супроводжується підвищеним синтезом ВЖК адипоцитами, пригніченням синтезу адипонектину та стимуляцією гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової осі. Відомо, що ТНФ α є інгібітором активності ліпопротеїнової ліпази в жировій тканині та стимулятором гормоночутливої ліпази, яка в умовах блокади сигнального інсулінового каскаду не може інгібуватися інсуліном [9]. Це призводить до посиленого ліполізу та вивільнення з жирових клітин ВЖК. Підвищення концентрації ВЖК у плазмі супроводжується зростанням кількості діацилгліцеридів та естерів довголанцюгових жирних кислот-СоА у м'язових клітинах. Обидві сполуки активують протеїнкіназу С- ζ , яка ініціює серинове фосфорилування IRS-1 з подальшим пригніченням його тирозинового фосфорилування [10], що унеможливає адекватну відповідь клітини на інсулін. Також ВЖК інгібують активність глікогенсинтази за рахунок активації протеїнкінази В, тим самим зменшують утворення глікогену в м'язах.

Оскільки нами було підтверджено зростання вмісту ВЖК у нашій експериментальній моделі, доцільним було з'ясувати роль ТНФ α у формуванні симптомокомплексу експериментального ЦД 2 типу. Нами було досліджено рівень цього прозапального цитокіну у сироватці крові дослідних тварин та тварин контрольної групи (рис. 1, а).

У результаті досліджень встановлено, що за умов експериментального ЦД 2 типу рівень ТНФ α у сироватці крові щурів зростав у 1,6 раза порівняно з контролем.

Постійний підвищений рівень ТНФ α може опосередковано впливати на функціонування імунної системи шляхом зменшення всієї популяції лімфоїдних клітин, що може спричинити зменшення кількості інших цитокінів, зокрема ІФН γ . За умов зниження концентрації циркулюючого ІФН γ організм є чутливим до різних інфекцій [11], відбувається розвиток хронічних ускладнень, характерних для ЦД 2 типу [12]. ІФН γ був відкритий як універсальний противірусний агент. На сьогодні відомо, що ІФН γ є лімфокином з плейотропною функцією, який необхідний для формування адекватної імунної реакції. Нами було досліджено рівень ІФН γ за умов експериментального інсулінонезалежного ЦД. Вміст ІФН γ за таких умов знижувався в 4 рази порівняно з контролем (див. рис. 1, б).

Таким чином, у ході досліджень нами встановлено, що за умов ЦД 2 типу відбувається значне зниження рівня ІФН γ у сироватці крові піддослідних тварин. Така зміна може бути наслідком порушення функціонування неспецифічної ланки імунітету у відповідь на активацію гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи, що підтверджується патологічним станом.

ТНФ α поряд із ІЛ-6 та ІЛ-1 виступає активатором гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи, що спричиняє зростання вмісту глюкокортикоїдних гормонів у периферичній крові та істотну імуносупресорну дію [13]. Так, глюкокортикоїди ініціюють апоптичну загибель незрілих попередників Т- і В-лімфоцитів та зрілих Т-клітин [14], що супроводжується не лише лімфоцитопенією, а й атрофією тимуса та зменшенням маси периферичних лімфоїдних органів, що, в свою чергу, може призвести до формування вторинного імунодефіциту [14].

Отже, підвищення концентрації ТНФ α за умов ЦД може бути причиною зменшення кількості в крові основних субпопуляцій лімфоїдних клітин, зокрема Т-хелперів і Т-цитотоксичних клітин, які є основним джерелом ІФН γ , і призвести до зниження загального рівня ІФН γ у крові, що загалом узгоджується з отриманими нами результатами.

Підвищену концентрацію ТНФ α у сироватці крові щурів при ЦД 2 типу можна також пояснити його підвищеним синтезом макрофагами в умовах гіперглікемії. Відомо, що моноцити периферичної крові здорових людей здатні значно підвищувати синтез ТНФ α при додаванні в культуру мононуклеарів глюкози [15]. Показано, що за умов ЦД 2 типу відбувається посилена експресія ТНФ α адипоцитами, яка пропорційна підвищенню маси тіла та об'єму жирової тканини.

Таким чином, отримані нами експериментальні дані свідчать про залучення прозапальних цитокінів у патогенез ЦД 2 типу. Підвищення концентрації ТНФ α призводить внаслідок позитивного зворотного зв'язку до поглиблення стану ІР. Знижена концентрація ІФН γ є наслідком порушення функціонування неспецифічної ланки імунітету і може спричинити розвиток хронічних ускладнень, що супроводжують даний патологічний стан. Це зумовлює доцільність використання в клінічній практиці не лише цукрознижувальних препаратів, а й комплексної терапії, спрямованої на обережну корекцію порушень імунної системи.

1. *Stephens J. M., Lee J., Pilch P. F.* Tumor Necrosis Factor- α -induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes Is Accompanied by a Loss of Insulin Receptor Substrate-1 and GLUT4 Expression without a Loss of Insulin Receptor-mediated Signal Transduction // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**, No 2. – P. 971–976.
2. *Hemmings S. J., Spafford D.* Neonatal STZ model of type II diabetes mellitus in the Fischer 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2000. – **32**. – P. 905–919.
3. *Itaya K.* A more sensitive and stable colorimetric determination of free fatty acids in blood // *J. Lipid Res.* – 1977. – **18**. – P. 663–665.
4. *Zhang F., Ye C., Li G. et al.* The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters // *Exp Anim.* – 2003. – **52**, No 5. – P. 401–407.
5. *Uysal K. T., Wiesbrock S. M., Marino M. W., Hotamisligil G. S.* Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF α function // *Nature.* – 1997. – **389**. – P. 610–614.
6. *Hotamisligil G. S., Shargill N. S., Spiegelman B. M.* Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance // *Science.* – 1993. – **259**, No 5091. – P. 87–91.
7. *Ruan H., Hacoheh N., Golub T. R. et al.* Tumor necrosis factor- α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- κ B activation by TNF- α is obligatory // *Diabetes.* – 2002. – **51**. – P. 1319–1336.
8. *Lee D.-F., Kuo H.-P., Chen Ch.-T. et al.* IKK β suppression of TSC1 function links the mTOR pathway with insulin resistance // *Int. J. Mol. Med.* – 2008. – **22**, No 5. – P. 633–638.
9. *Coppack S. W.* Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue // *Proc. Nutr. Soc.* – 2001. – **60**. – P. 349–356.

10. Moeschel K., Beck A., Weigert C. et al. Protein Kinase C- ζ -induced Phosphorylation of Ser318 in Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) Attenuates the Interaction with the Insulin Receptor and the Tyrosine Phosphorylation of IRS-1 // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**. – P. 25157–25163.
11. Stalenhoef J. E., Alisjahbana B., Nelwan E. J. et al. The role of interferon-gamma in the increased tuberculosis risk in type 2 diabetes mellitus // Eur. J. Clin. Microbiol. & Infec. Diseases. – 2008. – **27**, No 2. – P. 97–103.
12. Doxey D. L., Nares S., Park B. et al. Diabetes-induced impairment of macrophage cytokine release in a rat model: potential role of serum lipids // Life Sciences. – 1998. – **63**, No 13. – P. 1127–1136.
13. Chrousos G. P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation // N. Engl. J. Med. – 1995. – **332**. – P. 1351–1362.
14. Cohen J. J. Lymphocyte death induced by glucocorticoids / Ed. by R.P. Schleimer, H.N. Claman, A.L. Oronsky. Anti-inflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects. – San Diego: Acad. Press, 1989. – P. 110–131.
15. Morohoshi M., Fujisawa K., Uchimura I. et al. Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes *in vitro* // Diabetes. – 1996. – **45**. – P. 954–959.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 02.07.2009

**T. I. Galenova, V. V. Konopelnyuk, L. I. Kot, O. V. Bogdanova,
L. I. Ostapchenko**

The level of pro-inflammatory cytokines in serum of rats under experimental conditions of type 2 diabetes mellitus

The parameters of carbohydrate and lipid metabolism and the contents of tumor necrosis factor- α and interferon- γ in serum of rats under experimental conditions of type 2 diabetes mellitus (DM) are determined. The increased levels of glucose, triglycerides, and free fatty acids and the development of an insulin resistant state in experimental animals are established. The high tumor necrosis factor- α content, but a low interferon- γ level, are shown in animals with the experimental model of type 2 DM.