

УДК 571.27:616.379-008.64

РІВЕНЬ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-1 β ТА ІНТЕРЛЕЙКІНУ-6 У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ

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

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, біологічний факультет
e-mail: konopelnjuk@rambler.ru

Надійшла до редакції 22.12.2009

В статті наведені результати дослідження рівня інтерлейкіну-1 β та інтерлейкіну-6 у сироватці крові щурів з експериментальним цукровим діабетом 2-го типу. Показано зростання рівня даних прозапальних цитокінів.

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, інтерлейкін-1 β , інтерлейкін-6.

ВСТУП

Цукровий діабет 2-го типу – хронічне ендокринне захворювання, основними патогенетичними факторами якого є гіперглікемія, зниження чутливості тканин до інсуліну та порушення функціонування β -клітин підшлункової залози.

Для цукрового діабету 2-го типу характерним є поєднання інсулінорезистентності – недостатньої відповіді клітин на дію інсуліну та зменшення продукції інсуліну, яке спричиняється втратою β -клітинами здатності синтезувати інсулін, пригніченням процесінгу проінсуліну та секреції інсуліну, зменшенням кількості секретуючих клітин в острівцях Лангерганса [1].

У зниженні інсулінпродукуючої здатності підшлункової залози велике значення має зростання концентрації прозапальних цитокінів. Фактор некрозу пухлин- α (ТНФа) та стимульоване ним підвищення синтезу інтерлейкіну-1 макрофагами острівців є відповідальним за розвиток нечутливості до інсуліну клітин підшлункової залози [2], загибель яких також відбувається внаслідок цитотоксичної дії вільних жирних кислот, що накопичуються в підшлунковій залозі завдяки ліполітичній дії ТНФа [3].

Сьогодні більшість досліджень свідчать про те, що інсулінорезистентність є головною причиною формування метаболічного синдрому і цукрового діабету 2 типу.

Жирова тканина хворих на цукровий діабет містить значну кількість великих інсулінорезистентних адипоцитів. У результаті збільшення в плазмі крові вільних жирних кислот відбувається накопичення ліпідів у м'язах, печінці й β -клітинах. Це явище набуває постійного характеру і призводить до стимуляції глюконеогенезу, втрати чутливості до інсуліну в м'язах і печінці та пригнічення секреції інсуліну β -клітинами острівців Лангерганса.

Встановлено, що однією з причин такого порушення є дисфункція жирової тканини, яка прогресивно розвивається в міру збільшення ступеня ожиріння. Ця дисфункція характеризується не лише змінами в диференціюванні жирових клітин, але й порушеннями синтезу цими клітинами адипоцитокінів.

Значну увагу у цьому відношенні привертають до себе цитокіни, що продукуються жировими клітинами [4,5]. Системне підвищення рівня прозапальних цитокінів у крові хворих на вперше виявлений цукровий діабет 2-го типу та їх роль у формуванні метаболічних зсувів є свідченням того, що дана патологія перебігає на тлі хронічного запального процесу.

Таким чином, крім того, що за цукрового діабету прозапальні цитокіни відіграють значну роль щодо втрати бета-клітинами інсулінопродукуючої функції, вони причетні і до формування інсулінорезистентності периферичних тканин [6]. Слід також зазначити, що синтез прозапальних цитокінів за цукрового діабету 2-го типу пов'язаний з дисфункцією жирової тканини або з патологією вродженого імунітету [7,8].

Таким чином, у патогенезі цукрового діабету 2-го типу запальні цитокіни можуть відігравати значну роль, проте на сьогодні є недостатньо з'ясованим конкретний механізм їх дії. Тому метою наших досліджень було визначення вмісту прозапальних цитокінів (інтерлейкін-6 та інтерлейкін-1 β) у сироватці крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 2-го типу.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проводили на білих нелінійних щурах обох статей масою 230-250 г. Піддослідних тварин було поділено на дві групи: перша – контрольна (n=8), друга – група, у якій моделювали експериментальний

цукровий діабет 2-го типу (n=8). Експериментальний ЦД 2-го типу викликали одноразовим внутрішньочеревним введенням новонародженим 1-2 добовим щурят розчину стрептозотоцину з розрахунку 80 мг на 1 кг маси тіла [9]. Контрольну групу склали щури, яким у тому ж віці внутрішньочеревно вводили 10 мМ цитратний буфер (рН=4,5), який використовували для розведення стрептозотоцину.

Рівень прозапальних цитокінів інтерлейкіну-1 β та інтерлейкіну-6 у сироватці крові піддослідних тварин визначали через 3 місяці після народження 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 Стюдента. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Інтерлейкін-1 β , ендогенний біологічний активний медіатор неспецифічної дії [10], один із перших залучається до захисної реакції організму при вірусній інфекції. Інтерлейкін-1 β відіграє важливу роль в активації системи гемостазу. Цей цитокін призводить до зростання рівня білків, що впливають на судинно-тромбоцитарний гемостаз — фібриногену, С-реактивного протеїну, тромбопластину. Він призводить до зменшення в ендотеліоцитах рівня тромбомодуліна та стимулює синтез фактора активації тромбоцитів та простагландинів [11].

Інтерлейкін-1 β володіє плейотропною функцією — він є збудником активації гіпоталамо-гіпофізарно-наднирничкової осі, викликає процеси ліполізу, відповідальний за розвиток дисліпідемії, активацію згортання крові та блокаду інсулін-сигнальної системи.

Цукровий діабет 2-го типу характеризується прогресуючим погіршенням функції підшлункової залози, внаслідок чого інтенсифікується β -клітинний апоптоз. Відомо, що інтерлейкін-1 β може бути посередником апоптозу β -клітин. Інтерлейкін-1 β зв'язується зі ІЛ-1 рецептором на поверхні цих клітин, що призводить до активації проапоптичних транскрипційних чинників NF- κ B, фрагментації ДНК, і втрати функціональної активності [12]. Інтерлейкін-1 β активує І κ B β -кінази і тим самим може викликати резистентність до інсуліну [13, 14].

Таким чином, інтерлейкін-1 β може бути одним із чинників, які диференційно впливають на характер функціонування β -клітин підшлункової залози — від стимуляції до інактивації, що є характерним для динаміки розвитку цукрового діабету. Водночас, метаболічні зсуви, які супроводжують це захворювання, зокрема гіперглікемія, є причиною

довготривалого збереження підвищеної активності цитокін-продукуючих клітин і тим самим сприяють прогресуванню хвороби.

Нами було досліджено рівень інтерлейкіну-1 β у сироватці крові контрольних та дослідних тварин. (рис. 1).

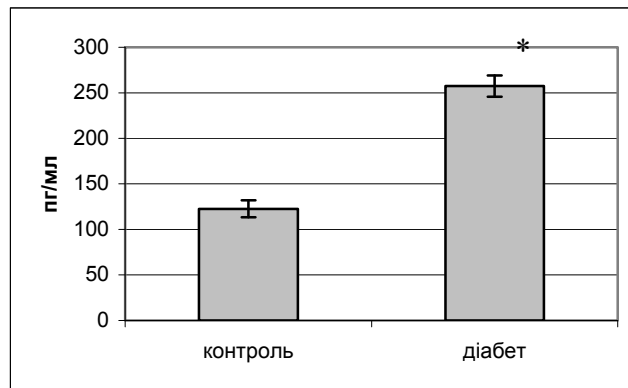


Рис. 1. Концентрація ІЛ-1 β , пг/мл у сироватці крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 2 типу, ($M \pm m$, n=8); * — $p < 0,05$ порівняно з контролем.

У результаті досліджень встановлено, що за умов експериментального цукрового діабету 2 типу рівень інтерлейкіну-1 β у сироватці крові щурів зростає у 2 рази порівняно зі значеннями в контрольній групі.

Отримані дані можуть свідчити про активацію макрофагів, а також про можливість пригнічення функціональної спроможності β -клітин. Інтерлейкін-1 β активує різноманітні клітини, наприклад, Т- і В-лімфоцити, посилює їх цитотоксичні властивості, ініціює синтез ТНФа. Крім того, інтерлейкін-1 β ініціює синтез іншого прозапального цитокіну — інтерлейкіну-6 [15].

Інтерлейкін-6 належить до плейотропних протизапальних цитокінів, секретується багатьма типами клітин. Його біологічна активність проявляється при зв'язуванні з відповідним рецептором. У процесі взаємодії відбувається гомодимеризація комплексу ліганд-рецептор та подальша активація Jak1 і Jak2 кіназ. Під дією цих кіназ відбувається зв'язане з приєднанням цитокіну фосфорилування різних сигнальних білків, включаючи переносники сигналу та активатори транскрипції STAT1 та STAT3, та активується процес диференціації макрофагів [16].

Ефекторні функції інтерлейкіну-6 визначаються типом клітин, з якими він взаємодіє. Інтерлейкін-6 стимулює диференціювання моноцитів у макрофаги [17], сприяє посиленню синтезу ТНФа макрофагами при дії ліпополісахаридів [18], активує експресію генів, відповідальних за синтез білків гострої фази у гепатоцитах та макрофагах [19], індукуює проліферацію гладеньком'язових волокон судин [20], експресію на їх поверхні адгезивних молекул ICAM-1 [21], регулює розвиток гіпофізу, секрецію гормонів та механізми зворотного контролю функціонування гіпоталамо-гіпофізарно-наднирничкової вісі [22].

Роль інтерлейкіну-6 у формуванні інсулінової резистентності не визначена. Перші дослідження показали, що цей цитокін змінює метаболізм глюкози в печінці [23]. Додавання інтерлейкіну-6 до культури гепатоцитів стимулювало активність глікоген-фосфорилази та супроводжувалося вивільненням глюкози [24, 25]. Збільшення продукції глюкози клітинами печінки поєднане з пригніченням тирозинового фосфорилування субстрату-1 інсулінового рецептора IRS-1 та зменшенням активності фосфатидилінозитол 3-кінази в ізольованих гепатоцитах [26]. Подібний механізм інсулінової резистентності може мати місце й у скелетних м'язах. Крім того, інтерлейкін-6-індукована резистентність до інсуліну в скелетних м'язах зумовлена накопиченням у клітинах метаболітів жирних кислот, а також порушенням передачі сигналу від інсулінового рецептора до генетичного апарату клітини. Встановлено, що концентрація цього цитокіну в плазмі прямо пропорційна ступеням ожиріння та втрати чутливості тканин до інсуліну. Підвищений вміст у крові інтерлейкіну-6 є також прогностичним маркером розвитку цукрового діабету 2-го типу, а в подальшому і виникнення інфаркту міокарда.

Нами було досліджено рівень інтерлейкіну-6 у сироватці крові контрольних та дослідних тварин (рис. 2).

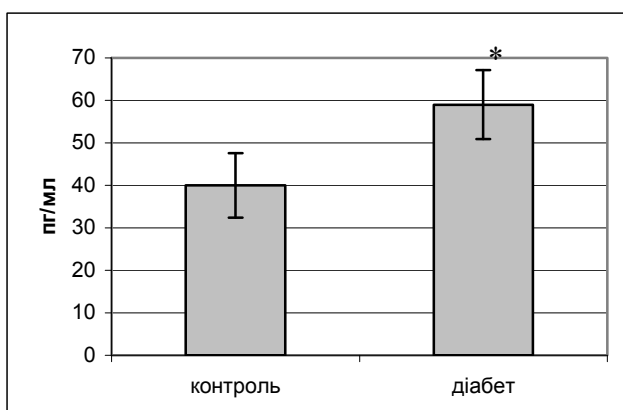


Рис. 2. Концентрація інтерлейкіну-6 у сироватці крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 2 типу, ($M \pm m$, $n=8$); * – $p < 0,05$ порівняно з контролем.

У результаті досліджень встановлено, що за умов експериментального цукрового діабету 2-го типу рівень інтерлейкіну-6 у сироватці крові щурів зростав у 1,4 раза порівняно зі значеннями контрольної групи.

Інтерлейкін-6 поряд із ТНФа та інтерлейкіном-1 β має відношення до формування різних проявів цукрового діабету 2 типу і метаболічного синдрому. Ці цитокіни функціонують як медіатори відповіді гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи на стрес і запалення [27], викликаючи активацію цієї системи на рівні гіпоталамуса, гіпофіза та наднирників, що проявляється зростанням вмісту глюкокортикоїдних гормонів у крові [28], характерним для цукрового діабету.

Комбіноване підвищення рівня інтерлейкіну-6 та інтерлейкіну-1 β приблизно втричі збільшує ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу [29], оскільки цитокіни сприяють виділенню з клітин печінки білків гострої фази, атеросклеротичних факторів ризику, таких як фібриноген, вивільненню лептину з жирової тканини, впливають на процес викиду адренокортикотропного гормону у кров і таким чином, підвищують рівень кортизолу. Наслідком хронічно підвищеного рівня кортизолу є ожиріння, гіпертонія і резистентність до інсуліну.

ВИСНОВКИ

Таким чином, нами показано зростання концентрації протизапальних цитокінів інтерлейкіну-1 β та інтерлейкіну-6 у сироватці щурів з експериментальним цукровим діабетом 2-го типу і підтверджено їх залучення у патогенез даного захворювання.

За цукрового діабету 2-го типу формується новий рівень регуляторних взаємозв'язків, де важливу роль відіграють зміни у синтезі цитокінів макрофагального походження. Результати роботи дозволяють вважати, що формування цукрового діабету 2-го типу тісно пов'язане з порушеннями неспецифічної ланки імунітету, що дає підстави вважати необхідним розробляти принципово нові підходи щодо лікування даної патології. Це обумовлює доцільність використання в клінічній практиці не лише цукрознижувальних препаратів, але й комплексної терапії, спрямованої на пригнічення запалення та синтезу прозапальних цитокінів.

Література

1. *Gerich J.E.* The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity // 1998. - Vol.19. - P.491-503.
2. *Kwon G., Xu G., Marshall C.A. et al.* Tumor necrosis factor α -induced pancreatic β -cell insulin resistance is mediated by nitric oxide and prevented by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and aminoguanidine: a role for peroxisome proliferator-activated receptor γ activation and iNOS expression // *J.Biol.Chem.* – 1999. - Vol.274. - P.18702–18708.
3. *Unger R.H.* How obesity causes diabetes in Zucker diabetic fatty rats // *Trends in Endocrinol. Metab.* – 1997. - Vol.7. - P.276-282.
4. *Peraldi P., Spiegelman B.* TNF-alpha and insulin resistance: summary and future prospects // *Mol Cell Biochem.* – 1998. – Vol.182. – P.169-175.
5. *Fasshauer M., Paschke R.* Regulation of adipocytokines and insulin resistance // *Diabetologia.* – 2003. - Vol.46. - P.1594–1603.
6. *Greenberg A.S., McDaniel M.L.* Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes // *Europ.J.Clin.Invest.* – 2002. - Vol.32. - Suppl.3. - P.24-34.

7. *Pickup J.C., Crook M.A.* Is type II diabetes a disease of the innate immune system? // *Diabetologia*. – 1998. - Vol.41. - P.1241-1248.
8. *Felber J.P., Golay A.* Pathways from obesity to diabetes // *Int.J.Obes.* – 2002. - Vol.26.(Suppl 2). - S.39-45.
9. *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. – Vol.32. – P.905-919.
10. *Braquet, P., Paubert-Braquet, M., Bourgain, R.H., Bussolino, F., and Hosford, D.* // *J.Lipid.Mediators.* – 1989. – Vol.1. – P.75-112.
11. *Лішневська В.Ю.* Роль внутрішньосудинного запалення у розвитку ендотеліальної дисфункції у хворих на шемічну хворобу серця старших вікових груп // *Одеський медичний журнал.* — 2003. — N 5. — С. 124–128.
12. *Maedler K. et al.* Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets // *J.Clin.Invest.* – 2002. – Vol.110. – P.851–860.
13. *Greenbaum C. J., Palmer J. P.* Autoantibodies and the Disease Process of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Diabetes Mellitus Ed. by D.LeRoith, S.I.Taylor, J.M.Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. - 1996. - P.307-314.
14. *Martin S., Wolf-Eichbaum D., Duinkereken G. et al.* Development of type 1 diabetes despite sever hereditary B-lymphocyte deficiency // *N. Engl. J. Med.*- 2001.- № 345.- P.1036-1040
15. *Braquet P., Paubert-Braquet M., Bourgain R.H., Bussolino F.* PAF/cytokine auto-generated feedback networks in microvascular immune injury: consequences in shock, ischemia and graft rejection // *J Lipid Mediators.* – 1989. - Vol.1. – P.75-112.
16. *Yamanaka Y, Nakajima K, Fukada T, Hibi M, Hirano T.* Differentiation and growth arrest signals are generated through the cytoplasmic region of gp130 that is essential for Stat3 activation // *EMBO J.* – 1996. – Vol.15. – P.1557-1565.
17. *Chomarat P., Banchereau J., Davoust J., Palucka A.K.* IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages // *Nature Immunol.* – 2000. – Vol.1. – P.510-514.
18. *Cochran, F.R., Finch-Arietta, M.B.* Interleukin-6 can prime THP-1 macrophages for enhanced production of tumor necrosis factor-alpha in response to LPS // *Immunopharmacology.* – 1992. – Vol.23. – P.97-103.
19. *Perlmutter D.H., May L.T., Sehgal P.B.* INF beta 2/IL-6 modulates synthesis of alpha 1-antitrypsin in human mononuclear phagocytes and in human hepatoma cells // *J. Clin. Invest.* - 1989. – Vol.84. – P.138–144.
20. *Ikeda U., Ikeda M., Seino Y. et al.* Expression of intracellular adhesion molecule 1 in rat vascular smooth muscle cells by proinflammatory cytokines // *Atherosclerosis.* – 1993. - Vol.104. – P.61-68.
21. *Ikeda U., Ikeda M., Oohara T., et al.* Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner // *Am J Physiol.* – 1991. – Vol.260. – H1713-H1717.
22. *Chesnokova V., Melmed S.* Neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules // *Endocrinology.* – 2002. – Vol.143. – P.1571-1574.
23. *В.О. Малижєв* Дисфункція жирової тканини як вирішальний чинник розвитку цукрового діабету 2 типу // *Здоров'я України* – 2007. – Т.22. - №1. – С.73-78.
24. *Ritchie D.G.* Interleukin-6 stimulates hepatic glucose release from prelabeled glycogen pools // *Am.J.Physiol.* – 1990. – Vol.258. – E.57-E.64.
25. *Kanemaki T., Kitade H., Kaibori M.* Interleukin 1 β and interleukin 6, but not tumor necrosis factor α , inhibit insulin-stimulated glycogen synthesis in rat hepatocytes // *Hepatology.* – 1998. – Vol.27. – P.1296-1303.
26. *Senn J.J., Klover P.J., Nowak I.A. et al.* Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes // *Diabetes.* – 2002. – Vol.51. – P.3391-3399.
27. *Turnbull A.V., Rivier C.L.* Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Cytokines: Actions and Mechanisms of Action *Physiol. Rev.* – 1999. - Vol. 79 - P 1-71.
28. *Карабун П.М., Анастасій Л.В., Малижєв В.О., Сакало О.А.* Стан регуляції вуглеводного обміну у хворих на цукровий діабет 2 типу при застосуванні репаглініду // *Ендокринологія.* - 2002. - Т.7. - №1. - С.13-20
29. *Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K et al.* Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study // *Diabetes.* – 2003. – Vol.52. – P.812–817.

УРОВЕНЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 β И ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

Конопельнюк В.В., Галенова Т.И., Богданова О.В., Остапченко Л.И.

В статье приведены результаты исследования уровня интерлейкина-1 β и интерлейкина-6 в сыворотке крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа. Показан рост уровня данных провоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, интерлейкин-1 β , интерлейкин-6.

THE LEVEL OF INTERLEUKIN 1 β AND INTERLEUKIN 6 IN SERUM OF RATS UNDER EXPERIMENTAL CONDITION OF TYPE 2 DIABETES MELITUS

Konopelnjuk V.V., Galenova T.I., Bogdanova O.V., Ostapchenko L.I.

The article presents the results of the study the level of interleukin-1 β and interleukin-6 in serum of rats with experimental diabetes mellitus type 2. The increased level of data pro-inflammatory cytokines was shown in animals.

Key words: type 2 diabetes mellitus, interleukin 1 β , interleukin 6.