

УРОВЕНЬ СЕКРЕЦИИ НЕКОТОРЫХ ЭНДОГЕННЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ И ОТДЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2-ГО ТИПА

Гюльнара Ибрагим кызы Азизова, Шаиман Ибрагим кызы Гасанова,
Наида Камал кызы Ниязова, Арзу Рамиз кызы Дадашова, Ульвия Гаджибала кызы Азизова*

Азербайджанский медицинский университет, г. Баку

Реферат

Цель. Оценка уровня антимикробных пептидов (дефензина и эндотоксина) и некоторых цитокинов (интерлейкина-8, фактора некроза опухоли α и трансформирующего фактора роста β) в плазме крови при сахарном диабете 2-го типа.

Методы. Исследована кровь 87 больных сахарным диабетом 2-го типа. В зависимости от уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови выделено три группы: компенсация — 36 человек, субкомпенсация — 34 человека, декомпенсация — 17 пациентов. В плазме крови определяли содержание эндогенных пептидов — дефензина (HNP) и эндотоксина. С помощью иммуноферментного анализа определяли уровень цитокинов (набор «Bender Medsystems», Австрия) и антимикробных пептидов (набор «Hycult Biotech»).

Результаты. В первой группе (сахарный диабет 2-го типа, стадия компенсации) концентрация дефензина составила $120,0 \pm 0,9$ нг/мл, что на 17,6% выше показателя контрольной группы. Во второй группе (стадия субкомпенсации) выявлено 4-кратное повышение уровня дефензина по сравнению с контролем, в третьей группе (стадия декомпенсации) повышение уровня дефензина составило 1443,1%, или 14,4 раза по сравнению с контролем. Концентрация эндотоксина в первой группе была $1,18 \pm 0,05$ нг/мл, во второй группе — $1,57 \pm 0,14$ нг/мл, в третьей — $18,2 \pm 0,09$ нг/мл против $0,33 \pm 0,12$ нг/мл в контрольной группе. У пациентов с субкомпенсированным и декомпенсированным сахарным диабетом наблюдалось статистически значимое повышение в плазме крови уровня интерлейкина-8, фактора некроза опухоли α и трансформирующего фактора роста β по сравнению с контролем.

Вывод. Установлена взаимосвязь между секрецией антимикробных пептидов и цитокинов — интерлейкина-8, фактора некроза опухоли α и трансформирующего фактора роста β ; концентрация антимикробных пептидов и цитокинов отражает стадию развития сахарного диабета 2-го типа.

Ключевые слова: сахарный диабет, иммунитет, цитокины, эндогенные антимикробные пептиды, дефензин, эндотоксин.

SECRETION LEVEL OF SOME ENDOGENOUS ANTIMICROBIAL PEPTIDES AND CERTAIN CYTOKINES IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS

G.I. Azizova, Sh.I. Gasanova, N.K. Niyazova, A.R. Dadashova, U.G. Azizova

Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

Aim. To assess plasma levels of antimicrobial peptides (defensin and endotoxin) and some cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor α and transforming growth factor β) in type 2 diabetes mellitus.

Methods. Blood samples of 87 patients with type 2 diabetes mellitus were examined. All patients were assigned to three groups depending on blood glucose and glycosylated hemoglobin levels: compensation — 36 subjects, sub-compensation — 34 subjects, decompensation — 17 patients. Plasma levels of endogenous peptides — defensin (HNP) and endotoxin — were measured. Enzyme-linked immunosorbent assay test was used to measure the levels of cytokines («Bender Medsystems» kits, Austria) and antimicrobial peptides (set «Hycult Biotech»).

Results. In the first group (diabetes mellitus type 2, compensation), defensin level was 120.0 ± 0.9 ng/ml, which is 17.6% higher than in the control group. The second group (sub-compensation) showed a 4-fold increase in defensin level compared to the control, the third group (decompensation), defensin level was 1443.1%, or 14.4-fold compared to the control. Endotoxin level was 1.18 ± 0.05 ng/ml in the first group, 1.57 ± 0.14 ng/ml in the second group, and 18.2 ± 0.09 ng/ml in the third group compared to 0.33 ± 0.12 ng/ml in the control group. Patients with decompensated and sub-compensated diabetes showed statistically significant increase in plasma levels of interleukin-8, tumor necrosis factor α and transforming growth factor β compared to the controls.

Conclusion. There was an interrelation revealed between the secretion of antimicrobial peptides and cytokines — interleukin-8, tumor necrosis factor α and transforming growth factor β ; concentration of antimicrobial peptides and cytokines reflects the stage of development of type 2 diabetes mellitus.

Keywords: diabetes mellitus, immunity, cytokines, endogenous antimicrobial peptides, defensin, endotoxin.

Экспертная оценка распространённости сахарного диабета (СД) позволяет считать, что в 2010 г. в мире насчитывалось более 230 млн, а к 2025 г. будет 300 млн больных СД, из которых 80–90% составят больные СД 2-го типа [13].

Несмотря на всестороннее изучение механизмов развития СД, некоторые аспекты

недостаточно изучены, в частности неясны механизмы развития осложнений, сопровождающихся воспалительными процессами. Есть сообщения, что в патогенезе СД 2-го типа ведущую роль играют различные виды цитокинов и антимикробных пептидов (АМП) [7]. Известно, что в развитии воспалительного процесса включается каскадный механизм, основные компоненты которого — цитокины и АМП. Помимо это-

го, в литературе существуют данные о взаимосвязи между функционированием цитокинной системы и АМП [2].

В настоящее время известно 200 видов АМП, из которых особый интерес представляют дефензины, эндотоксины, бактерицидный белок, увеличивающий проницаемость клеточной мембраны. В целях исследования из АМП нами были выбраны дефензин и эндотоксин, функции и секреция которых заметно влияют на уровень про- и противовоспалительных цитокинов.

Целью данной работы было исследование уровня АМП (дефензина и эндо-

Таблица 1

Уровень гликемии и гликозилированного гемоглобина (HbA_{1c}) у больных сахарным диабетом 2-го типа

Группа	Средняя суточная гликемия, ммоль/л	HbA _{1c} , %
Компенсация (n=36)	6,04±0,16*	6,20±0,18*
Субкомпенсация (n=34)	8,10±0,27*	7,50±0,12*
Декомпенсация (n=17)	9,20±0,17*	10,30±0,24*
Контроль (n=10)	4,01±0,15	5,50±0,08

Примечание. Статистическая значимость различий с контрольной группой: p < 0,001.

Таблица 2

Биохимические показатели плазмы крови больных сахарным диабетом 2-го типа

Группа	Общий белок, г/л	Альбумин, г/л	Креатинин, мкмоль/л	Мочевина, ммоль/л	Кальций, ммоль/л
Компенсация (n=36)	75,80±1,38	48,20±0,80	90,30±0,62*	5,97±0,09**	2,00±0,03
Субкомпенсация (n=34)	76,00±0,73	41,20±0,67*	117,50±5,12*	9,60±0,16*	1,89±0,03**
Декомпенсация (n=17)	50,70±0,73*	35,20±0,95*	371,00±5,94*	12,70±0,3*	1,68±0,06*
Контроль (n=10)	75,60±0,96	46,40±1,01	74,10±1,65	6,50±0,16	2,06±0,06

Примечание. Статистическая значимость различий с контрольной группой: *p < 0,001; **p < 0,05.

токсина) и некоторых цитокинов (интерлейкина-8, фактора некроза опухоли α и трансформирующего фактора роста β) в плазме крови при СД 2-го типа.

Работа выполнена при поддержке Фонда развития науки при Президенте Азербайджанской Республики в рамках гранта №EIF-2010-1(1)-03/015.

Исследована кровь 87 больных СД 2-го типа в возрасте от 42 до 65 лет. В зависимости от степени компенсации углеводного обмена (уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови) выделили три группы: компенсация — 36 человек, субкомпенсация — 34 человека, декомпенсация — 17 пациентов. Продолжительность болезни колебалась от 2 мес до 23 лет. В контрольную группу входили 10 здоровых добровольцев, возраст которых находился в интервале 33–45 лет.

Из цитокинов нами были проанализированы уровни интерлейкина-8 (ИЛ-8), фактора некроза опухоли α (ФНО α) и трансформирующего фактора роста β 1 (ТРФ β 1).

Уровень цитокинов в плазме крови, включая ИЛ-8, ФНО α и ТРФ β 1, определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора «Bender Medsystems» (Австрия). Концентрацию эндогенных АМП (дефензина, эндотоксина) также определяли с помощью иммуноферментного анализа (набор «Ну-

cult Biotech»). Анализ во всех случаях проводили с помощью микропланшета-ридера «Mindray MR-96A».

Кроме того, были исследованы некоторые биохимические показатели (содержание общего белка, альбумина, креатинина, кальция), а также уровень гликемии и гликозилированного гемоглобина на разных стадиях СД 2-го типа. Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазным методом с помощью готового набора реактивов, содержание гликозилированного гемоглобина HbA_{1c} — по методу Ю.А. Князева и соавт. [3]. Количество общего белка устанавливали биуретовым методом, альбумина — бром-крезолом. Содержание кальция исследовали с помощью набора реактивов «Human» (Германия), уровень креатинина и мочевины — с помощью набора реактивов «Lachema» (Чехия).

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 6.0. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка (SE). U-критерий Манна-Уитни был использован для сравнения различий между контрольной группой и группами пациентов. В качестве критерия статистической значимости различий принимали значение p < 0,05.

В табл. 1 и 2 приведены биохимические показатели по каждой из трёх групп больных.

Таблица 3

Уровень цитокинов и эндогенных антимикробных пептидов в плазме крови у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа в зависимости от степени компенсации углеводного обмена

Параметры	Контроль (n=10)	Компенсация (n=36)	Субкомпенсация (n=34)	Декомпенсация (n=17)
ИЛ-8, пг/мл	13,27±0,93	12,48±0,41	25,04±1,76*	249,54±38,99*
ФНОα, пг/мл	1,14±0,19	1,08±0,08	2,01±0,08**	6,19±0,34*
ТРФβ1, нг/мл	2,0±0,23	2,43±0,22	5,56±0,66*	8,24±3,42*
Дефензин (HNP), нг/мл	102,0±0,7	120,0±0,9*	409,0±7,07*	1472,0±142,2*
Эндотоксин, нг/мл	0,33±0,12	1,18±0,05*	1,57±0,14*	18,2±0,09*

Примечание. Статистическая значимость различий по сравнению с контролем: *p < 0,001; **p = 0,001783. ИЛ-8 – интерлейкин-8, ФНОα – фактор некроза опухоли α, ТРФβ1 – трансформирующий фактор роста β1.

При длительном и стойком нарушении углеводного обмена, то есть при декомпенсации СД и отсутствии адекватной коррекции заболевания, уровень $\text{HbA}_{1\text{C}}$ нарастал (см. табл. 1).

Параллельно с гемоглобином неэнзиматическому гликозилированию подвергаются и другие белки организма при СД [6]. Однако на стадиях компенсации и субкомпенсации в биохимических показателях (см. табл. 2) не было заметных изменений. В то же время у пациентов с декомпенсированным СД уровень креатинина и мочевины заметно повышался, а содержание кальция снижалось, что обусловлено диабетической нефропатией.

Как показано в табл. 3, во второй и третьей группах происходило увеличение плазменного уровня цитокинов (ИЛ-8, ФНОα и ТРФβ1) по сравнению с контролем. У пациентов первой группы статистически значимых различий не выявлено. Изменения изучаемых показателей были наиболее выражены у пациентов с декомпенсацией СД.

В первой группе (пациенты с СД 2-го типа на стадии компенсации) концентрация дефензина составила $120,0 \pm 0,9$ нг/мл, что на 17,6% выше показателя контрольной группы. Во второй группе (больные СД 2-го типа на стадии субкомпенсации) выявлено 4-кратное повышение уровня дефензина по сравнению с контролем. Минимальный уровень дефензина, наблюдаемый в данной группе, – 320 нг/мл, максимальный – 1022 нг/мл. Вариабельность количества дефензина, по-видимому, отражает степень активации нейтрофилов. В третьей группе, в которую входили пациенты с СД 2-го типа на стадии декомпенсации, повышение уровня дефензина составило 1443,1%, или 14,4 раза по сравнению с контролем. Среднее наблюдаемое значение было $1472,0 \pm 142,2$ нг/мл с минимальным значением в данной группе

1147 нг/мл и максимальным 2836 нг/мл.

Концентрация эндотоксина в первой группе составила $1,18 \pm 0,05$ нг/мл, во второй группе – $1,57 \pm 0,14$, в третьей группе – $18,2 \pm 0,09$ против $0,33 \pm 0,12$ нг/мл в контрольной группе.

Дефензин играет роль эффективного фактора «каскадного» усилителя воспалительной реакции путём стимуляции синтеза и секреции ИЛ-8 и ФНОα на фоне подавления прогнатовоспалительных цитокинов [9]. Полученные нами данные подтверждают данный факт: во всех трёх группах больных зарегистрировано повышение уровня дефензина в 2, 4 и 14 раз соответственно. Данная картина повышения соответствовала динамике изменения содержания ИЛ-8, ФНОα и ТРФβ1.

ФНОα служит индуктором ИЛ-8 – важного цитокина, участвующего в воспалительном процессе. Изначально предполагали, что ИЛ-8 подавляет активацию полиморфноядерных нейтрофилов. Однако позже некоторые авторы заметили, что ИЛ-8 является сильным стимулятором полиморфноядерных нейтрофилов. Наблюдаемая активация этих нейтрофилов у больных СД становится важным звеном патогенеза при осложнениях заболевания [8].

В отношении ИЛ-8 было высказано предположение, что данный цитокин участвует в патогенезе диабетической ретинопатии, поскольку в стекловидном теле пациентов с диабетической ретинопатией наблюдалось увеличение концентрации ИЛ-8 [11]. Также ИЛ-8 может играть атерогенную роль [12].

Бактериальный эндотоксин – постоянный структурный компонент наружной клеточной стенки грамотрицательных бактерий, он высвобождается при их разрушении. Первичное высвобождение эндотоксина приводит к цитокиновому каскаду, который, вероятно, направлен на усиление местной воспалительной реакции и увели-

чивает клиренс инфекции [1, 4, 5]. Кроме этого, сами макрофаги являются альтернативным источником кислородных радикалов, протеаз, метаболитов арахидоновой кислоты, фактора активации тромбоцитов и цитокинов, усиливающих воспаление [10].

ВЫВОДЫ

1. Дефензин и эндотоксин наряду с антимикробными функциями выступают в качестве фактора усиления системных и местных воспалительных процессов.

2. Выявлена чёткая взаимосвязь между секрецией антимикробных пептидов и цитокинов — интерлейкина-8, фактора некроза опухоли α и трансформирующего фактора роста $\beta 1$.

3. Концентрация антимикробных пептидов и цитокинов (интерлейкина-8, фактора некроза опухоли α и трансформирующего фактора роста $\beta 1$) отражает стадию развития сахарного диабета 2-го типа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алёшина Г.М., Шамова О.В., Перекрест С.В. и др. Эндотоксин-нейтрализующее действие антимикробных пептидов // Цитокины и воспаление. — 2013. — №1-2. — С. 72-77. [Aleshina G.M., Shamova O.V., Perekrast S.V. et al. Endotoxin-neutralizing effect of antimicrobial peptides. *Tsitokiny i vospalenie*. 2013; 1-2: 72-77. (In Russ.)]
2. Будихина А.С., Пинегин Б.В. Дефензины — мультифункциональные катионные пептиды человека // Иммунопатол., аллергол., инфектол. — 2008. — №2. — С. 31-40. [Budikhina A.S., Pinegin B.V. Defensins — multifunctional cations peptides of human. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2008; 2: 31-40. (In Russ.)]
3. Князев Ю.А., Вахрушева Л.Л., Сергеев Н.А. и др. Значение определения гликолизированного гемоглобина и лактата плазмы для характеристики состояния детей и подростков, больных сахарным диабетом //

Педиатрия. — 1987. — №9. — С. 62-64. [Knyazev Yu.A., Vakhrusheva L.L., Sergeev N.A. et al. The value of detecting glycosylated hemoglobin and serum lactate for defining the condition of children and adolescents with diabetes mellitus. *Pediatriya*. 1987; 9: 62-64. (In Russ.)]

4. Томин М.С. Определение эндотоксемии при грамотрицательных инфекциях // *Medicus Amicus*. — 2001. — №1. — С. 10-13. [Tomin M.S. Defining endotoxemia at Gram-negative infections. *Medicus Amicus*. 2001; 1: 10-13. (In Russ.)]

5. Чалый Ю.В., Войтенко Н.Н., Котлинский К.В., Шолух А.М. Изучение закономерностей индукции синтеза интерлейкина-8 под действием нейтрофильных дефензинов *in vitro* // Мед. иммунол. — 2005. — Т. 7, №5-6. — С. 579-582. [Chaly Y.V., Kotlinsky K.V., Sholukh A.M., Voitenok N.N. The study of regularities of induction of IL-8 synthesis by neutrophil defensins *in vitro*. *Meditsinskaya immunologiya*. 2005; 7 (5-6): 579-582. (In Russ.)]

6. Ahia C.L., Holt E.W., Krousel-Wood M. Diabetes care and its association with glycosylated hemoglobin level // *Am. J. Med. Sci.* — 2014. — Vol. 347, N 3. — P. 245-247.

7. Chen S.J., Yu C.T., Cheng Y.L. et al. Effects of hyperbaric oxygen therapy on circulating interleukin-8, nitric oxide, and insulin-like growth factors in patients with type 2 diabetes mellitus // *Clin. Biochem.* — 2007. — Vol. 40, N 1-2. — P. 30-36.

8. Hickey F.B., Martin F. Diabetic kidney disease and immune modulation // *Curr. Opin. Pharmacol.* — 2013. — Vol. 13, N 4. — P. 602-612.

9. Lehrer R.I., Lu W. α -Defensins in human innate immunity // *Immunol. Rev.* — 2012. — Vol. 245, N 1. — P. 84-112.

10. Macisaac R.J., Ekinci E.I., Jerums G. Markers of and risk factors for the development and progression of diabetic kidney disease // *Am. J. Kidney Dis.* — 2014. — Vol. 63, N 2, suppl. 2. — P. 39-62.

11. Mocan M.C., Kadayifcilar S., Eldem B. Elevated intravitreal interleukin-6 levels in patients with proliferative diabetic retinopathy // *Can. J. Ophthalmol.* — 2006. — Vol. 41. — P. 747-752.

12. Wang N., Tabas I., Winchester R. et al. Interleukin-8 is induced by cholesterol loading of macrophages and expressed by macrophage foam cells in human atheroma // *J. Biol. Chem.* — 1996. — Vol. 271. — P. 8837-8842.

13. Wild S., Roglic G., Green A. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030 // *Diabet. Care.* — 2004. — Vol. 27. — P. 1047-1053.