

УДК 616-018:616-008]-092.9
© Ганчева О.В., 2009

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Ганчева О.В.

Запорожский государственный медицинский университет

Широкая распространенность в мире метаболических нарушений, способствующих возникновению большого количества клинических осложнений, составляет от 45% до 60% населения [1, 2]. Сложность проблемы метаболических нарушений лежит в том, что количество людей, которые имеют ту или иную степень проявления метаболических расстройств неуклонно, год от года, возрастает. Это связано не только с генетическими факторами (дефект генов *ob*, *db* и др.) [2, 3], но и с образом жизни, питания, стрессорными воздействиями, влиянием средовых факторов [3]. При этом важно отметить, что метаболические нарушения, в основе патогенеза которых лежит нарушение жирового и углеводного обменов, становятся предрасполагающим фактором к развитию в начале инсулинорезистентности, а в последствии сахарного диабета 1 и 2 типа, артериальной гипертензии, атеросклероза, ожирения, метаболического X-синдрома [4]. До сих пор нет четкой концепции в этиологии возникновения метаболических нарушений. Однако, не последнюю роль в их формировании играет нарушение в системе цитокинов, которая представляет собой универсальную, полиморфную регуляторную сеть медиаторов, предназначенных для контроля процессов пролиферации, дифференцировки, апоптоза и функциональной активности клеточных элементов в кроветворной, иммунной и других гомеостатических системах организма [4,5].

В последнее время в ряде независимых исследований четко продемонстрировали увеличение уровня ФНО-альфа в крови при ожирении и синдроме инсулинорезистентности [6, 7]. Кроме того, было установлено, что другой провоспалительный цитокин - ИЛ-6 влияет на уровень сывороточных липидов и индуцирует гипертриглицеридемию у крыс [8].

В ходе проведенных нами исследований было установлено, что у потомков самок крыс с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД) с возрастом развивается гипергликемия, прогрессирует гиперинсулинемия на фоне гипертриглицеридемии и гиперхолестеринемии [9]. При дополнительном проведении теста толерантности к глюкозе уже у 6-ти месячных животных было выявлено его нарушение [10].

Приведенные данные литературы и результаты собственных, ранее проведенных исследований, наталкивают нас на мысль о роли цитокинового дисбаланса в патогенезе метаболических нарушений.

Целью работы было изучить зависимость изменения уровня цитокинов у мужского потомства самок с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД) и показателей метаболизма в возрастном аспекте.

Методы исследования. Исследование проводилось на 80 крысах-самцах линии Вистар, из которых было сформировано 8 групп по 10 живот-

ных в каждой. В экспериментальные группы вошли крысы-самцы, потомки самок с ЭГД, возрастом 2, 4, 6 и 18 месяцев. ЭГД моделировали путем однократного внутривентриального введения стрептозотоцина (40 мг/кг) беременным самкам на 14-15-й день беременности [11]. Контрольные группы соответствующего возраста и количества были сформированы из мужского потомства самок крыс, с нормально протекающей беременностью, которым на 14-15-е сутки беременности внутривентриально вводили цитратный буфер [11].

В экспериментальных и контрольных группах крыс оценивали состояние углеводного (определяли концентрацию глюкозы глюкозооксидазным методом, концентрацию инсулина - иммуноферментным методом с использованием наборов фирмы DRG Instruments GmbH (Germany), жирового обменов (определяли содержание липидов (ЛП), триглицеридов (ТГ), холестерина (ХС), в плазме крови с помощью стандартных наборов). Иммуноферментным методом с использованием наборов фирмы DRG Instruments GmbH (Germany) определяли концентрацию лептина. Концентрацию ИЛ-4, ИЛ-6, ФНО-альфа в плазме крови животных определяли иммуноферментным методом с использованием наборов фирмы Diaclone (France).

Полученные экспериментальные данные обрабатывали параметрической *t* статистикой Стьюдента, считая достоверными отличия в сравниваемых группах при $p_{st} < 0,05$. Для оценки статистической взаимосвязи изучаемых показателей использовали корреляционный анализ из программного пакета Excel (Microsoft Corp. США). При этом наличие значимой корреляционной зависимости между параметрами считали, если коэффициент был больше, чем 0,5 [12].

Результаты и их обсуждение. У контрольных животных, независимо от возраста, изученные показатели жирового и углеводного обменов находились в пределах референтных значений [9, 10]. При этом наблюдалась возрастное увеличение концентрации триглицеридов и холестерина в крови (табл. 1). У экспериментальных животных до 6-ти месячного возраста концентрация глюкозы в крови находилась в эугликемическом диапазоне. С 6-ти месячного возраста формировалась стойкая гипергликемия (см. табл.1). Показатели жирового обмена во все возрастные периоды превышали значения контроля, при этом сохранялась динамика увеличения исследуемых показателей к старости животных (18 месяцев) (см. табл.1).

Концентрации инсулина и лептина у контрольных животных с возрастом изменялись неоднозначно. Так уровень инсулина на протяжении всей жизни самцов оставался стабильным, и только у старых крыс было отмечено его достоверное снижение практически на треть.

Таблиця 1. Біохімічні показателі в експериментальних групах (M±m).

	Контроль				Експериментальні тварини			
	2 міс	4 міс	6 міс	18 міс	2 міс	4 міс	6 міс	18 міс
глюкоза, мМ/л	4,5±0,1	4,02±0,1 ^a	4,7±0,1 ^a	4,2±0,2 ^a	4,1±0,2	4,8±0,2 ^{b,c}	6,2±0,1 ^{b,c}	8,2±0,1 ^{b,c}
тригліцериди, мМ/л	1,1±0,2	1,2±0,1	1,3±0,1	1,6±0,1 ^a	2,1±0,4 ^c	2,5±0,2 ^c	2,0±0,1 ^c	3,0±0,2 ^{b,c}
ліпиди, г/л	3,5±0,44	3,32±0,3	3,4±0,4	4,1±0,2	6,1±0,3 ^c	6,5±0,5 ^c	6,6±0,5 ^c	7,6±0,3 ^c
холестерин, мМ/л	4,7±0,1	5,3±0,2 ^a	4,9±0,2	5,6±0,2 ^a	7,6±0,4 ^c	8,1±0,4 ^c	6,7±0,2 ^{b,c}	9,8±0,5 ^{b,c}
інсулін, мкЕД/мл	1,3±0,1	1,5±0,2	1,4±0,1	1,1±0,1 ^a	2,3±0,1 ^c	5,4±0,4 ^{b,c}	4,9±0,3 ^c	2,3±0,1 ^{b,c}
лептин, нг/мл	6,7±0,3	9,5±0,3 ^a	7,6±0,2 ^a	8,8±0,5 ^a	10,5±0,4 ^c	12,3±0,5 ^{b,c}	9,8±0,7 ^{b,c}	10,6±0,7
ІЛ-4, пг/мл	36,2±4,6	29,1±3,5	28,6±4,2	17,9±2,5 ^a	14,7±1,5 ^c	13,8±2,8 ^c	14,3±2,1 ^c	8,3±1,9 ^{b,c}
ІЛ-6, пг/мл	0,9±0,04	1,1±0,1	0,8±0,04	0,8±0,03	1,2±0,1 ^c	2,6±0,3 ^{b,c}	1,9±0,2 ^c	0,7±0,03 ^b
ФНО-альфа, пг/мл	13,9±1,3	16,7±2,3	17,6±2,8	38,1±6,5 ^a	41,9±5,6 ^c	58,9±9,8 ^c	110,3±9,2 ^{b,c}	189,2±21,1 ^{b,c}

Примечания: 1. ^a –достовірні ($p_{st}<0,05$) відміння в групі контрольних тваринних по відношенню до групи контролю попереднього віку; 2. ^b –достовірні ($p_{st}<0,05$) відміння в групі експериментальних тваринних по відношенню до групи експериментальних тваринних попереднього віку; 3. ^c –достовірні ($p_{st}<0,05$) відміння в групі експериментальних тваринних по відношенню до групи контролю відповідного віку

Динаміка зміни концентрації лептину характеризувалась фазністю, максимальні значення спостерігалися у тваринних в період статевого дозрівання – 4 місяці життя, к 6-ти місяцям відзначалось зниження на 25% з збільшенням концентрації гормону у старих тваринних на 23% (см. табл.1).

Аналізуючи показателі рівня досліджуваних гормонів у тваринних експериментальних груп, являються потомками самок з ЕГД, важливо відзначити, що во всі вікові періоди концентрації інсуліну і лептину перевищали значення контрольних груп крыс. При цьому концентрація інсуліну в крові достовірно перевищала показателі контролю в середньому в 2-3,5 рази, а лептина на 15-30%. Рівні гормонів досягали максимальних значень з 4-го по 6-й місяць життя тваринних (см. табл. 1). К старості у тваринних концентрація інсуліну знижалась більше ніж в 2 рази, по порівнянню со значеннями експериментальних тваринних попереднього віку, в той час як у контролю аналогічне зниження плазменного інсуліну складало не більше 30% (см. табл.1).

При вивченні в віковому аспекті показателів цитокінового статусу у контрольних тваринних звертає на себе увагу той факт, що в період з 2-х до 6-ти місяців життя концентрації в крові ІЛ-4, ІЛ-6 і ФНО-альфа були практично стабільні. К 18-ти місяцям відбувалось зниження на 60% рівня ІЛ-4 на фоні підвищення концентрації ФНО-альфа більше ніж в 2 рази (см. табл. 1). Порівнюючи

в 2 рази (см. табл. 1). Порівнюючи вікову динаміку зміни цитокінового статусу у контрольних і експериментальних тваринних було встановлено, що рівень ІЛ-4 був нижче значень контролю в 2-2,5 рази. Також відзначались незначні зміни концентрацій ІЛ-6 і ФНО-альфа. У 4х і 6-ти місячних експериментальних тваринних рівень цитокінів, по порівнянню с попереднім терміном, вірстувал, приче ІЛ-6 в 2 рази, а ФНО-альфа - на 30%. К 18-ти місяцям ріст концентрації ФНО-альфа продовжувався (більше ніж на 70% по порівнянню с попереднім терміном), но при цьому відбувалось двукратне зменшення концентрації ІЛ-6 і на 70% - ІЛ-4 (см. табл. 1).

Установлені в ході дослідження у потомків самок з ЕГД вікові порушення динаміки стану цитокінового статусу на фоні формуються метаболічних і гормональних змін дозволили нам передположити патогенетичку зв'язь виявлених змін рівня цитокінів і розвиваючоїся ендокринної патологією. Для підтвердження нашої передположення був проведений кореляційний аналіз зв'язей між досліджуваними показателями вуглеводного/жирового обміну і концентраціями цитокінів. При цьому у експериментальних тваринних було відзначено формування нових, не існуючих в контролі кореляційних зв'язей між концентраціями глюкози і ІЛ-4/ФНО-альфа ($r=-0,89$ і $r=+0,99$, відповідно) (табл. 2).

Таблиця 2. Вікова кореляційна залежність показателів вуглеводного/жирового обміну і концентрації гормонів/цитокінів у експериментальних тваринних (2-18 місяців).

Показателі	контроль			Потомки самок з ЕГД		
	ІЛ-4	ІЛ-6	ФНО-альфа	ІЛ-4	ІЛ-6	ФНО-альфа
ІЛ-6	+0,32	-	-0,5	+0,62	-	-0,46
ФНО-альфа	-0,94	-	-	-0,83	-	-
Глюкоза	+0,28	-0,65	-0,25	-0,89	-0,5	+0,99
інсулін	+0,03	+0,95	-0,26	+0,4	+0,97	-0,26
Лептин	-0,92	-0,005	+0,87	-0,95	-0,33	+0,78
Тригліцериди	-0,99	+0,44	+0,95	-0,94	-0,43	+0,65
Холестерин	-0,92	-0,62	+0,99	-0,91	-0,56	+0,53
Общ. Ліпиди	-0,75	-0,64	+0,92	-0,97	-0,49	+0,93

Таким образом, в ході проведеного дослідження ми підтвердили свої передположення о можливій патогенетичкой ролі цитокінового дисбалансу в формуванні метаболічних порушень у потомства самок з експериментальним гестаційним діабетом. Исходя из

вышеприведенного можно сделать следующие выводы, что – 1) хроническая гипергликемия плода, развивающаяся при гестационном диабете, способствует формированию у потомства нарушения цитокінового статусу; 2) метаболіческие нарушения, прогрессирующие с возрас-

том у потомства самок с ЭГД, развиваются параллельно с изменением уровня цитокинов; 3) выраженный цитокиновый дисбаланс у живот-

ных 4-6 месячного возраста необходимо рассматривать как важное патогенетическое звено формирования метаболических нарушений.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Wang Y. Bariatric Surgery to Correct Morbid Obesity Also Ameliorates Atherosclerosis in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus / [Zhang C., Wang Y.] – Am. J. Biomed. Sci. – 2009- V. 1, N1. – P. 56-69.
2. Tominaga K. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in children and relationship to metabolic syndrome, insulin resistance, and waist circumference / [Tominaga K., Fujimoto E., Suzuki K. et al.] - Environ Health. Prev. Med., - 2009. - V. 14, [2]. – P. 142-149.
3. Perez-Martin A. Insulin resistance and associated metabolic abnormalities in muscle: effects of exercise / [Perez-Martin A., Raynaud E., Mertier J.] – J. Obesity Rev., 2001. – V.2, [1]. – P. 47-59.
4. Roos B. Attenuation of inflammation and cellular stress-related pathways maintains insulin sensitivity in obese type I interleukin-1 receptor knockout mice on a high-fat diet / [Roos B., Rungapamestry V., Ross K. et al.] - Proteomics, 2009.- V.27, [9]. P. 3244-3256
5. González F. Evidence of proatherogenic inflammation in polycystic ovary syndrome / [González F., Rote N.S., Minium J., Kirwan J.P.] - Metabolism, 2009.- V. 58.[7]. P. 954-962.
6. Hotamisligil G.S. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte / G.S. Hotamisligil. – Int. J. Obesity, 2000. – m V. 4, [4]. – P. 23-27.
7. The role of IL-6, IL-10, TNF-alpha and its receptors TNFR1 and TNFR2 in the local regulatory system of normal and impaired human spermatogenesis / (Białas M., Fiszer D., Rozwadowska N. et al.). – Am. J. Reprod. Immunol., 2009. – V. 62, [1]. P. 51-59.
8. Lack of relationship between 174G_C promoter polymorphism of the IL-6 gene and indices of metabolic syndrome in non-obese healthy subjects / (Tworowska-Bardzińska U., Kubička E., Slezak R. et al.). – Endokrynol. Pol., 2009. – V.60, [3]. P. 172-179.
9. Колесник Ю.М. Гендерные особенности регуляции метаболизма у крыс линии Вистар в возрастном аспекте / Колесник Ю.М., Ганчева О.В., Абрамов А.В. - Патология, 2008.- Т.5, [4].- с.50-52.
10. Дисфункция β-клеток панкреатических островков у мужского потомства самок крыс с экспериментальным гестационным диабетом / [Колесник Ю.М., Ганчева О.В., Абрамов А.В., Камышний А.М.] - Запорожский медицинский журнал., 2007.- Т.41, [2].- с. 5-9.
11. Деклараційний патент України № 17281 «Спосіб моделювання гестаційного діабету у щурів лінії Вистар для вивчення його наслідків для нащадків»// Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Бєленічев І.Ф., Ганчева О.В., Камішний А.М., Грекова Т.А. // Опубл. 15.09.2006 в Бюл. №9.
12. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: «Статистика», 1976. -598с.

Ганчева О.В. Особливості цитокинового статусу при формуванні метаболических порушень у експериментальних тварин // Український медичний альманах. – 2009. – Том 12, №6. – С. 51-53.

В ході проведеного дослідження у самок крыс, потомков самок с ЭГД, були виявлені суттєві зміни в динаміці рівня цитокинів (ІЛ-4, ІЛ-6, ФНО-альфа) по порівнянню з контрольними групами тварин. Було встановлено, що в групах порівняння з 2-х до 6-ти місяців життя концентрації в крові досліджуваних інтерлейкінів характеризуються стабільністю, а к старості спостерігається зниження на 60% рівня ІЛ-4 на фоні підвищення концентрації ФНО-альфа більш ніж в 2 рази. В експериментальних групах стабільність концентрацій цитокинів зберігається тільки по відношенню к ІЛ-4, но при этом его уровень ниже значений контроля в 2-2,5 рази. Пікові концентрації ІЛ-6 і ФНО-альфа відзначаються в експериментальних групах 4-х і 6-ти місячного віку. Важно відзначити, що для цього вікового періоду характерно формування у тварин метаболических порушень, супроводжуваних гіперінсулінемією, гіперлептинемією, гіперглікемією, гіпертригліцеридемією, порушенням тесту толерантності к глюкозі по діабетическому типу. Т.о., установленні у потомков самок с ЭГД зміни жирового і углеводного обміну на фоні зміненої динаміки цитокинового статусу свідчать про патогенетическу роль порушення концентрації інтерлейкінів в розвитку метаболических порушень і формуванні ендокринної патології.

Ключевые слова: інсулінорезистентність, цитокини ІЛ-4, ІЛ-6, ФНО-альфа, експериментальний гестаційний діабет

Ганчева О.В. Особливості цитокинового статусу при формуванні метаболических порушень у експериментальних тварин // Український медичний альманах. – 2009. – Том 12, №6. – С. 51-53.

При проведенні дослідження у самок щурів, нащадків самок з експериментальним гестаційним діабетом, були встановлені значні зміни в динаміці рівня цитокинів (ІЛ-4, ІЛ-6, ФНО-альфа) у порівнянні із контрольними групами тварин. Було встановлено, що в групах порівняння із 2-х до 6-ти місяців життя концентрації в крові досліджуваних інтерлейкінів характеризуються стабільністю. У старих тварин спостерігається зниження на 60% рівня ІЛ-4 на тлі підвищення концентрації ФНО-альфа більш ніж в 2 рази. В експериментальних групах стабільність концентрацій цитокинів була присутня тільки відносно ІЛ-4, але при цьому його рівень був нижче показників контролю в 2-2,5 рази. Максимальні концентрації ІЛ-6 і ФНО-альфа відмічалися у тварин 4-х та 6-ти місячного віку. Слід зауважити, що для цього вікового періоду характерно формування в експериментальних групах тварин метаболических порушень, які супроводжувалися гіперінсулінемією, гіперлептинемією, гіперглікемією, гіпертригліцеридемією, порушенням тесту толерантності до глюкози. Таким чином, встановлені у нащадків самок з ЭГД порушення жирового та углеводного обміну на тлі зміненої динаміки цитокинового статусу свідчать про патогенетичну роль порушення концентрації інтерлейкінів в розвитку метаболических порушень та формуванні ендокринної патології.

Ключові слова: інсулінорезистентність, цитокини ІЛ-4, ІЛ-6, ФНО-альфа, експериментальний гестаційний діабет

Gancheva O.V. Regularities of cytokine's profile in the formation of disorders to metabolism development in experimental animals // Український медичний альманах. – 2009. – Том 12, №6. – С. 51-53.

In the course of experimental research which was held on male rats offspring's of female rats with EGD, significant alterations of age-related cytokines (IL-4, IL-6, TNF-alpha) levels dynamics in comparison with control group of animals were observed. It was established that in comparable groups of animals from 2 to 6 months of life the concentration of the above mentioned cytokines is stable, but in elder age the level of IL-4 was decreased by 60% and TNF alpha concentration was increased more than two times. In the experimental groups the stability of cytokines concentration is true only relatively to IL-4 but for all that its level is lower than control values in 2- 2,5 times. The highest concentrations of IL-6 and TNF-alpha are observed in the experimental groups of 4- and 6-months old animals. It is important to mention that this age period is characterized by the development of metabolism disturbances in animals, which are accompanied by hyperinsulinemia, hyperleptinemia, hyperglycemia, hypertriglyceridemia, alteration of glucose tolerance test to the diabetic pattern. In that way alterations of carbohydrate and lipid metabolism in the offsprings of female rats with EGD are the evidence of pathogenetic role of cytokines concentrations alterations in the insulin-resistance and endocrine pathology development.

Key words: insulin-resistance, cytokines IL-4, IL-6, TNF-alpha, experimental gestational diabetes, carbohydrate and lipid metabolism.

Надійшла 22.10.2009 р.
Рецензент: проф. В.В.Фелеганова