

## УРОВЕНЬ ЭНДОТОКСЕМИИ И ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА И НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПЕЧЕНИ

<sup>1</sup>Литвиненко Е.А., <sup>1</sup>Боднар П.Н., <sup>2</sup>Лисяний Н.И., <sup>2</sup>Бельська Л.Н.

<sup>1</sup>Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, Киев, Украина

<sup>2</sup>ГУ «Институт нейрохирургии им. академика А.П. Ромоданова НАМН Украины»

*В статье изложены результаты изучения уровней провоспалительных цитокинов и эндотоксемии у пациентов СД2 и НАЖБП. У пациентов СД2 и НАЖБП или при их сочетании отмечается увеличение сыровоточной концентрации ФНО- $\alpha$ , ИНФ- $\gamma$ , ИЛ-6 и ИЛ-8. Наибольшее увеличение содержания провоспалительных цитокинов и С-реактивного белка у пациентов СД2 и НАЖБП по сравнению с пациентами с СД2 или НАЖБП свидетельствует о более выраженной воспалительной и иммунопатологической реакции. Установлено повышение уровня антител IgG к ЛПС и МСМ у пациентов СД2 с НАЖБП и выявлена корреляция с уровнями провоспалительных цитокинов, что свидетельствует о патогенетической роли эндотоксинов грамотрицательной микрофлоры кишечника в индукции системного воспаления у этих пациентов.*

**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 СД2 вдвое увеличивает риск гепатоцеллюлярной карциномы и цирроза печени [1].

Центральную роль в механизме развития НАЖБП играет инсулинорезистентность, активация глюконогенеза и жировая инфильтрация гепатоцитов. Определенная роль в развитии стеатогепатита принадлежит индукции оксидативного стресса [2]. В результате перекисного окисления липидов ПОЛ вырабатывается значительное количество свободных радикалов, которые стимулируют повышенный синтез провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), интерлейкины (ИЛ) 1 $\beta$ , 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 СД2 остаются до конца не изученными.

**Цель работы** – изучить уровни провоспалительных цитокинов и эндотоксемии у пациентов с СД2 и НАЖБП.

**Материалы и методы.** Под наблюдением находились 118 пациентов, среди которых: 64 пациента с СД-2 типа и НАЖБП (I группа), 26 пациентов – с СД-2 (II группа) и 28 пациентов с НАЖБП (III группа). Контрольную группу составили 25 здоровых лиц.

Оценку эндогенной интоксикации в сыровотке крови проводили по спектру молекул средней массы (МСМ) с помощью метода [6]. Принцип метода основан: на освобождении сыровотки крови от высокомолекулярных пептидов и белков с использованием трихлоруксусной кислоты; на количественном определении полученной после центрифугирования

надосадочной жидкости; определении уровня МСМ по поглощению в монохроматическом световом потоке при длине волн 254 и 280 нм. Выделяли две 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, соответственно, E254 и E 280; кроме того, вычислили коэффициент распределения  $KP=E 280/E 254$ .

Концентрацию цитокинов (интерлейкин 6,8, ИНФ- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ ) и СРБ (С-реактивный белок) определяли в сыровотке 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 иммобилизованными в лунках специфическими против определенного цитокина антителами. Имеющийся в образцах цитокин связывается с иммобилизованными антителами, затем связавшийся цитокин взаимодействует с 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 сыровотке периферической крови проводили по методу [7], который основывается на селективной преципитации комплексов антиген-антитело в 3,75% полиэтиленгликоле с последующим фотометрическим определением плотности преципитации.

Определение уровня антител к липополисахаридам (ЛПС). В основу метода положен метод ИФА. К иммобилизованному ЛПС добавляли сыровотки и после инкубации и удаления несвязавшихся компонентов выявляли иммунные комплексы с помощью меченых пероксидазой хрена антител против Ig G человека ЗАО «Вектор-Бест», Россия. Индикаторная система в ИФА АТ к ЛПС грамотрицательных энтеробактерий состояла из H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и ортофенилдиамина. Результаты регистрировали на спектрофотометре Immunochem при длине волны 540 нм.

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере 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 оценивалась как слабая, от 0,31-0,5 – умеренная, выше 0,5 – значительная.

**Результаты и обсуждение.** Содержание цитокинов ФНО- $\alpha$  и ИНФ- $\gamma$ , ИЛ-6, ИЛ-8 было повышено у пациентов с СД2, НАЖБП, а также при их сочетании (табл. 1). У пациентов с СД2 выявлено двукратное повышение ФНО- $\alpha$  и ИНФ- $\gamma$ . Концентрации цитокинов в группе пациентов с НАЖБП составили (2,19 $\pm$ 0,49) пг/мл для ФНО- $\alpha$  и (4,45 $\pm$ 0,42) пг/мл для ИНФ- $\gamma$ , что статистически достоверно ( $p < 0,001$ ) превышало контрольные показатели.

**Таблица 1** – Содержание цитокинов (пг/мл) и СРБ (мг/мл) в сыворотке крови у обследованных пациентов

Показатели	Группы, количество обследованных			
	НАЖБП+СД2 (n=64)	НАЖБП (n=28)	СД2 (n=26)	контроль (n=25)
ФНО- $\alpha$	4,21 $\pm$ 0,60 <sup>*&amp;</sup>	2,19 $\pm$ 0,49 <sup>**</sup>	1,37 $\pm$ 0,45 <sup>**</sup>	0,56 $\pm$ 0,047
ИЛ-6	5,02 $\pm$ 0,48 <sup>*&amp;</sup>	3,96 $\pm$ 0,26 <sup>*</sup>	2,76 $\pm$ 0,44 <sup>#</sup>	1,98 $\pm$ 0,15
ИЛ-8	4,55 $\pm$ 0,49 <sup>*&amp;</sup>	3,66 $\pm$ 0,31 <sup>*</sup>	2,55 $\pm$ 0,39 <sup>#</sup>	1,90 $\pm$ 0,13
ИНФ- $\gamma$	4,82 $\pm$ 0,37 <sup>**</sup>	4,45 $\pm$ 0,42 <sup>*</sup>	1,97 $\pm$ 0,25 <sup>#</sup>	0,84 $\pm$ 0,06
СРБ	17,38 $\pm$ 1,68 <sup>*&amp;</sup>	12,11 $\pm$ 1,09 <sup>*&amp;</sup>	7,66 $\pm$ 2,72 <sup>**</sup>	3,43 $\pm$ 0,17

Примечание: \* –  $p < 0,001$  – достоверность различий с аналогичными показателями контроля; # –  $p < 0,05$  – достоверность различий группы СД2 и НАЖБП с аналогичными показателями группы СД2; & –  $p < 0,05$  – достоверность различий группы СД2 и НАЖБП с аналогичными показателями группы НАЖБП

У пациентов с СД2 и НАЖБП выявлено наибольшее повышение содержания ФНО- $\alpha$  и ИНФ- $\gamma$  в сыворотке крови. Среди пациентов данной группы в 65,6% случаев мы выявили значительное повышение уровней ФНО- $\alpha$  и ИНФ- $\gamma$  (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 пациентов с НАЖБП значительное повышение содержания ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови (в 4-5 раз) отмечено только в 35,7% случаев, ИНФ- $\gamma$  – у 28,6% исследуемых.

Средний уровень других цитокинов, в частности ИЛ-6 и ИЛ-8, был повышен в 1,5 раза у пациентов с СД2 и в среднем в 2 раза у пациентов с НАЖБП по сравнению с контрольной группой. При сочетании данных патологий (СД2+НАЖБП) уровень данных цитокинов превышал контрольные показатели в 3 раза, что, по-видимому, свидетельствует о более интенсивной воспалительной реакции в организме у пациентов этой группы.

О более выраженном системном воспалительном процессе при сочетании СД2+НАЖБП свидетельствует статистически достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение уровня сывороточного СРБ не только по сравнению с контролем, но и по сравнению с соответствующими показателями у пациентов только с СД2 или только с НАЖБП (см. табл. 1).

Значительное повышение уровней ФНО- $\alpha$ , ИНФ- $\gamma$ , ИЛ-6, ИЛ-8 у пациентов с СД2+НАЖБП отражает прогрессирующий характер воспаления и свидетельствует о роли цитокинов в патогенезе данной патологии. Активация макрофагов под влиянием ФНО- $\alpha$  сопровождается выработкой избыточных количеств реактивных форм кислорода и оксида азота, обладающих прямым цитотоксическим эффектом на гепатоциты. ФНО- $\alpha$  также активирует внутриклеточ-

ные сигнальные молекулы, в том числе стресс-киназы и ингибитор каппа-киназы-бета, что делает клетки устойчивыми к действию инсулина и нарушает его связи с рецептором. Воздействие ФНО- $\alpha$  на инсулиновый рецептор типа 1 проявляется в его фосфорилировании, уменьшении средства к инсулину, снижении количества транспортного белка ГЛЮТ4, уменьшении захвата и утилизации глюкозы клетками, нарастании гипергликемии, повреждении сосудов и развитии СД2 [8]. С другой стороны, ФНО- $\alpha$  стимулирует синтез жирных кислот в печени, повышает уровень сывороточных триглицеридов [9], стимулирует продукцию липопротеидов очень низкой плотности. ФНО- $\alpha$  при участии ИНФ- $\gamma$  оказывает прямое цитотоксическое действие на гепатоциты и участвует в патогенезе фиброза печени [10].

Индукторами повышенной секреции провоспалительных цитокинов – ФНО- $\alpha$ , ИНФ- $\gamma$ , 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 пациентов уровня антител IgG к ЛПС и содержания МСМ как показателя эндогенной интоксикации. Мы обнаружили двукратное повышение уровня антител Ig класса G к ЛПС у пациентов с СД2 и 3-4-кратное его повышение у 35,7% пациентов с НАЖБП. При сочетании СД2+НАЖБП уровень антител IgG к ЛПС статистически достоверно ( $p < 0,05$ ) превышал контрольные значения. У 67,2% исследуемых нами выявлено значительное (в 6-7 раз) повышение данного показателя (таблица 2).

**Таблица 2** – Содержание молекул средней массы и антител к ЛПС в сыворотке крови у обследованных пациентов

Показатели	Группы, количество обследованных			
	НАЖБП+СД2 (n=64)	НАЖБП (n=28)	СД2 (n=26)	Контроль (n=25)
МСМ <sub>254</sub> (усл. ед.)	0,272 $\pm$ 0,02 <sup>*&amp;</sup>	0,220 $\pm$ 0,017	0,224 $\pm$ 0,016 <sup>*</sup>	0,134 $\pm$ 0,011
МСМ <sub>200</sub> (усл. ед.)	0,466 $\pm$ 0,029 <sup>*&amp;</sup>	0,311 $\pm$ 0,015 <sup>*</sup>	0,366 $\pm$ 0,019 <sup>**</sup>	0,219 $\pm$ 0,017
280/254	1,72 $\pm$ 0,12	1,42 $\pm$ 0,11	1,63 $\pm$ 0,09	1,63 $\pm$ 0,079
IgG к ЛПС (усл. ед. опт. плотн.)	0,668 $\pm$ 0,179 <sup>**</sup> (0,39-1,080)	0,437 $\pm$ 0,101 <sup>*</sup> (0,190-0,720)	0,240 $\pm$ 0,056 <sup>*</sup> (0,170-0,427)	0,156 $\pm$ 0,007

Примечание: \* –  $p < 0,05$  – достоверность различий с аналогичными показателями контроля; # –  $p < 0,05$  – достоверность различий группы НАЖБП+СД2 с аналогичными показателями группы только СД2; & –  $p < 0,05$  – достоверность различий группы СД2 и НАЖБП с аналогичными показателями группы НАЖБП

Анализ уровней изучаемых цитокинов позволил выявить прямую корреляцию между уровнем ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и уровнем антител IgG к ЛПС у пациентов с НАЖБП (ФНО- $\alpha$  и уровень антител IgG к ЛПС,  $R=0,68$ ; ИЛ-6 и уровень антител IgG к ЛПС,  $R=0,63$ ), и у пациентов с сочетанной патологией СД2+НАЖБП (ФНО- $\alpha$  и уровень антител IgG к ЛПС,  $R=0,64$ ; ИЛ-6 и уровень антител IgG к ЛПС,  $R=0,52$ ) что, по-видимому, свидетельствует о роли эндотоксинов грамотрицательной микрофлоры в индукции системного воспаления при данных патологиях.

Исследование уровней МСМ в сыворотке у пациентов всех групп выявило повышение содержания молекул средней массы как токсической, так и ароматической фракции по сравнению с показателями контроля.

Содержание токсической фракции МСМ254 в сыворотке у пациентов СД2 и НАЖБП составило 0,272 $\pm$ 0,026 усл. ед. при контроле 0,134 $\pm$ 0,011

усл. ед., при этом показатели МСМ254 у пациентов только с СД2 или только с НАЖБП были несколько ниже –  $0,224 \pm 0,016$  усл. ед. и  $0,220 \pm 0,017$  усл. ед., соответственно. Содержание ароматической фракции МСМ280 в 1,5 раза превышали показатели контроля у пациентов с СД2 или НАЖБП и более чем в 2 раза при сочетании данных патологий. Значительное повышение концентрации молекул средней массы отражало повышенный уровень эндотоксемии как при СД2, так и при НАЖБП.

Таким образом, мы установили, что сочетание СД2+НАЖБП сопровождается повышением уровня провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИНФ- $\gamma$ , ИЛ-6 и 8) и увеличением уровня СРБ в сыворотке крови по сравнению с пациентами только с СД2 или НАЖБП, что свидетельствует о более выраженном воспалительном процессе в печени. Повышение уровней антител IgG к ЛПС и МСМ у пациентов с СД2 и НАЖБП и их корреляция с уровнями провоспалительных цитокинов свидетельствует о патогенетической роли эндотоксинов грамотрицательной микрофлоры ки-

шечника в индукции системного воспаления, что необходимо учитывать при разработке патогенетически обоснованных подходов к лечению данной патологии.

### Выводы

1. У пациентов с СД2 и НАЖБП или при их сочетании отмечается увеличение сывороточной концентрации ФНО- $\alpha$ , ИНФ- $\gamma$ , ИЛ-6 и ИЛ-8.

2. Наибольшее увеличение содержания провоспалительных цитокинов и С-реактивного белка у пациентов с СД2 и НАЖБП по сравнению с пациентами с СД2 или НАЖБП свидетельствует о более выраженной воспалительной и иммунопатологической реакции.

3. Установлено повышение уровня антител IgG к ЛПС и МСМ у пациентов с СД2 с НАЖБП и выявлена корреляция с уровнями провоспалительных цитокинов, что свидетельствует о патогенетической роли эндотоксинов грамотрицательной микрофлоры кишечника в индукции системного воспаления у данных пациентов.

### Литература

1. Боднар П.М., Михальчишин Г.П., Кобыляк 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., Богомоллов П.О. Цитокиновая система при неалкогольном стеатогепатите // *РЖГГН*. - 2007. - №4. - с.35-39.
4. Кляритьська І.Л., Стіліді О.І. Система цитокінів при неалкогольному стеатогепатиті // *Архів клінічної та експериментальної медицини*. - 2010 -Т.19.- №2. - с.167-192
5. MiceabilityleL., ValenzaV., LaTorreG. Increasedintestinal alpermeabilityandtightjunctionalterationsinnonalcoholicfatty liverdisease. // *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., Муренец 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.

### Literatura

1. Bodnar P.M., Mixal'chishin G.P., Kobilyak N.M. Nealkogol'na zhirova xvoroba pechinki u xvorix na cukrovij diabet tipu 2: patogenez, diagnostika ta likuvannya. // *Endokrinologiya*. - 2012. - Т.17, №1. - с.94-101.
2. Xvorostinka V.M., Lavrinenko O.V., Zhuravl'ov Patogenetichni aspekti zhirovoi distrofii pechinki pri cukrovomu diabeti 2 tipu // *Suchasna gastroenterologiya* – 2009. - №3. - с. 91-97.
3. Mammaev S.N., Bagomedova N.V., Bogomolov P.O. Citokinovaya sistema pri nealkogol'nom steatogepatite // *RZhGGN*. - 2007. - №4.- с. 35-39.
4. Klyarits'ka I.L., Stilidi O.I. Sistema citokiniv pri nealkogol'nomu steatogepatiti // *Arxiv klinichnoi ta eksperimental'noi medicini*. - 2010 -Т.19.- №2. - с. 167-192
5. MiceabilityleL., ValenzaV., LaTorreG. Increasedintestinal alpermeabilityandtightjunctionalterationsinnonalcoholicfatty liverdisease. // *Hepatology*. - 2009. - V. 49. - p. 1877-1887.
6. Gromoshevskaya L.L. Srednie molekuly' kak odin iz pokazatelej «metabolicheskoy intoksikacii» v organizme // *Lab. diagnostika*. - 1997. - № 1.-с. 11-16.
7. Gashkova V., Mate N. // *Chexoslovackaya medicina*. - 1978. - № 2. – с. 117.
8. Bueverov A.O., Maevskaya M.V. Nekotory'e patogeneticheskie i klinicheskie voprosy' nealkogol'nogo steatogepatita // *Klin. persp. gastroe'nterolog. i gepatol.* - 2008. - № 3. - с. 2-9.
9. Orlovs'kij V.F., Murenec' N.O. Xronichne zapalennya pri nealkogol'nij zhirovij xvorobi pechinki // *Patologiya*. – 2010 - Т. 7. - № 3. - с. 99-102.
10. Kornijchuk I.Yu. Osoblivosti citokinovoi regulyacii ta kooperacii pri nealkogol'nij zhirovij xvorobi pechinki na foni ozhirinnya. // *Bukovins'kij medichnij visnik*. - 2011. - Т.15. - № 2. - с. 214-216.
11. Beloglazov V.A., Gordienko A.I., Il'chenko F.N. Rol' e'ndotoksina gramotricatel'noj mikroflory' kishchnika v patogeneze sistemnogo xronicheskogo vospaleniya u bol'ny'x pri ozhirenii, metabolicheskom sindrome i saxarnom diabete 2 tipa // *Klinicheskaya xirurgiya*. – 2012 - № 8. - С.4-5.

**LEVEL OF ENDOTOXEMIA AND STATUS OF CYTOKINES IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES AND NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE**<sup>1</sup>Lytvynenko E.A., <sup>1</sup>Bodnar P.N., <sup>2</sup>Lysianuy N.I., <sup>2</sup>L.N. Belska<sup>1</sup>Educational Establishment "Bohomolets National Medical University", Kiev, Ukraine<sup>2</sup>State Institution "Institute of neurosurgery named after A.P. Romodanov of the Academy of Medical Sciences of Ukraine"

---

*The article presents the 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- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , 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.

---

Адрес для корреспонденции: kondratiuk\_valentina@mail.ru

Поступила 16.10.2014