

УДК 617.735-002-02:616.379-008.64-085-092.9

DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.12510270>

ДОСЛІДЖЕННЯ ДИНАМІКИ ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ У ЩУРІВ ЗІ ЗМОДЕЛЬОВАНОЮ ДІАБЕТИЧНОЮ РЕТИНОПАТІЄЮ

Прейс Н.І., Савицький І.В.

ПЗВО «Міжнародна академія екології та медицини», м. Київ

STUDY OF THE DYNAMICS OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN RATS WITH SIMULATED DIABETIC RETINOPATHY

Preys N. I., Savytskyi I. V.

PZVO "International Academy of Ecology and Medicine", Kiev

Summary/Резюме

The article presents the results of the study of pro-inflammatory cytokines in rats with simulated diabetic retinopathy on the 60th and 120th day in blood serum and at the local level. It was established that the hyperproduction of the investigated pro-inflammatory cytokines in the blood serum of rats with experimental diabetic retinopathy reflects the activation of inflammatory reactions, leukocyte-endothelial interactions. In the future, these mechanisms contribute to the destruction of tight contacts between endothelial cells, loss of competence of the hemoretinal barrier. Pathogenetic links of diabetic retinopathy - neoangiogenesis and inflammation - are closely related, which is confirmed by a positive correlation between the levels of growth factors. It was found that on the 60th day, the level of TNF- α increased by 1.3 times ($p < 0.05$), TGF- β – in 1.8 times ($p < 0.05$), IL-6 – in 4 times ($p < 0.05$), IL-1 β – in 1.3 times ($p < 0.05$), IL – in 2.2 times ($p < 0.05$) compared to intact animals. On the 120th day of observation, a significant increase in the level of all pro-inflammatory cytokines was also noted: the level of TNF- α increased in 1.7 times ($p < 0.05$), TGF- β – in 1.5 times ($p < 0.05$), IL-6 – in 3.2 times ($p < 0.05$), IL-1 β – in 1.8 times ($p < 0.05$), IL – in 5 times ($p < 0.05$), respectively.

Key words: *diabetic retinopathy, inflammation, cytokines, pathogenesis.*

В статті представлені результати дослідження прозапальних цитокінів у щурів зі змодельованою діабетичною ретинопатією на 60-у та 120-у добу в сироватці крові та на локальному рівні. Встановлено, що гіперпродукція досліджуваних прозапальних цитокінів в сироватці крові щурів з експериментальною діабетичною ретинопатією відображає активацію запальних реакцій, лейкоцитарно-ендотеліальних взаємодій. В подальшому ці механізми сприяють руйнуванню щільних контактів між ендотеліальними клітинами, втраті компетентності гематоретинального бар'єру. Патогенетичні ланки діабетичною ретинопатією – неоангіогенез та запалення – тісно пов'язані між собою, що підтверджується позитивним кореляційним зв'язком між рівнями ростових факторів. Встановлено, що на 60-у добу рівень ФНП-а підвищувався в 1,3 рази ($p < 0,05$), ТФР- β – в 1,8 разів ($p < 0,05$), ІЛ-6 – в 4 рази ($p < 0,05$), ІЛ-1 β – в 1,3 рази ($p < 0,05$), ІЛ – в 2,2 рази ($p < 0,05$) порівняно із інтактними тваринами. На 120-у добу спостереження також відзначали достовірні підвищення рівня всіх прозапальних цитокінів: рівень ФНП-а підвищувався в 1,7 разів ($p < 0,05$), ТФР- β – в 1,5 разів ($p < 0,05$), ІЛ-6 – в 3,2 рази ($p < 0,05$), ІЛ-1 β – в 1,8 разів ($p < 0,05$), ІЛ – в 5 разів ($p < 0,05$) відносно.

Ключові слова: *діабетична ретинопатія, запалення, цитокіни, патогенез.*

Вступ

За умов тривалої гіперглікемії (цукрового діабету – ЦД) порушується більшість метаболічних процесів, що призводить до зростання ризику уражень тканин організму, а в перспективі може викликати серйозні діабетичні вторинні ускладнення [1, 5]. У зв'язку з відсутністю своєчасного звернення пацієнтів та пізньою діагностикою ЦД 2-го типу, на час встановлення діагнозу 50 % хворих вже мають ускладнення, пов'язані з розвитком мікро-та макроангіопатій, серед яких досить часто зустрічається діабетична ретинопатія (ДР). Відомо, що запальні та імунні реакції, як в нормі, так і за умов патології, є результатом регуляторних взаємодій численних систем організму, які пов'язані цитокінами. Володіючи як прозапальною, так і протизапальною дією, цитокіни є регуляторами не лише імунної системи, але і забезпечують багатокomпонентні зв'язки з нервовою і ендокринною системами організму [2, 3, 5].

Важлива роль у розвитку та прогресуванні хронічних неінфекційних захворювань, таких як кардіоваскулярна патологія, хронічна обструктивна хвороба легень, цукровий діабет 2-го типу, ожиріння, відводиться хронічному запаленню, при цьому цитокіни виступають як ефекторні елементи, що опосередковують стереотипні та специфічні запальні зміни в органах та тканинах [1, 4, 5]. Тому доцільним було вивчення змін цитокинового профілю за умов експериментальної ДР.

Тому **метою нашого дослідження** було вивчення пулу прозапальних цитокинів у щурів за умов змодельованої ДР.

Матеріали та методи дослідження

Експериментальне дослідження проведено на нелінійних щурах масою тіла 180,0–200,0 г. Контролем слугували інтактні щури, які внутрішньошлунково отримували дистильовану воду. Для відтворення ЦД 2-го типу використовували стрептозотоцинову модель. Дана

модель дозволяє відтворити головні патогенетичні ланки ЦД 2-го типу у людини – порушення секреції та дії інсуліну і характеризується розвитком інтолерантності до вуглеводів, відносною недостатністю секреції інсуліну у відповідь на підвищений рівень глюкози та збереженням секреторної реакції на неглюкозні секретогени. З цією метою щурам одноразово внутрішньовенно вводили стрептозотозин («SigmaAldrich Chemie GmbH», Німеччина) дозою 65 мг/кг. Розчин стрептозотозину готували в 0,1 М цитратному буфері (рН 4,5). З метою зниження діабетогенної дії стрептозотозину за 15 хвилин до його введення, внутрішньоочеревинно вводили нікотинамід («Afton Pharma», Індія) дозою 230 мг/кг, який дозволяє зберегти до 40 % запасів панкреатичного інсуліну у дослідних щурів, за рахунок чого у тварин розвивається стабільна базальна гіперглікемія [6].

Дослідження цитокинового профілю проводили за співвідношенням про- та протизапальних цитокинів. Їх рівень вивчали як в сироватці крові, так і локально – в сітківці ока [7].

Фактор некрозу пухлини (ФНП-б) характеризували за набором «MyBioSource» ELISA Kits (США). Набір призначений для кількісного визначення ФНП-б в біологічних рідинах та гомогенатах органів лабораторних тварин, який базується на твердофазному «сендвіч» – варіанті імуноферментного аналізу із застосуванням моно- та поліклональних антитіл до ФНП-б. ТРФ-1в (ТФР-1в) визначали за набором реагентів «MyBioSource» ELISA Kits (США) для імуноферментного визначення концентрації ТФР-1в в біологічних рідинах і гомогенатах органів. Рівень інтерлейкіну-2 (IL-2) встановлювали за набором реагентів «MyBioSource» ELISA Kits (США) для кількісного визначення IL-2 в біологічних рідинах в інтервалі концентрацій 15,6–1000 пг/мл. Інтерлейкін-6 (IL-6) та інтерлейкін-1в (IL-1в) вивчали за набором реагентів «MyBioSource» ELISA Kits (США) для кількісного визначення в біо-

логічних рідинах. Вивчення рівнів цитокінів проводили згідно з інструкціям до кожного із наборів реагентів [7].

Робота з тваринами проводилася відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджується з положенням «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальними та іншими науковими цілями» (Страсбург, 1986 р.), Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження», Наказу Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України № 249 від 01.03.2012 р. «Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах», Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 440-IX від 14.01.2020 р. [8].

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою програми «Statistica 10.0». Вірогідність відмінностей між показниками контрольної та дослідних груп визначали за критеріями Стюдента та Фішера. Рівень достовірності приймали при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

На 60-у добу експерименту відмічали наступні достовірні зміни рівня прозапальних цитокінів (рис. 1): рівень ФНП-а підвищувався в 1,3 рази ($p < 0,05$) ($243,3 \pm 3,2$ пг/мл проти $182,7 \pm 2,7$ пг/мл), ТФР- β – в 1,8 разів ($p < 0,05$) ($277,4 \pm 4,2$ пг/мл проти $157,8 \pm 2,8$ пг/мл) порівняно із інтактними тваринами. На 120-у добу концентрація ФНП-а достовірно підвищувалася в 1,7 разів ($p < 0,05$) порівняно із інтактними тваринами ($318,5 \pm 3,4$ нг/мл проти $182,7 \pm 2,7$ пг/мл) та в 1,3 рази ($p < 0,05$) відносно даних, одержаних на 60-у добу ($318,5 \pm 3,4$ нг/мл проти $243,3 \pm 3,2$ пг/мл). Тобто, відмічалася тенденція до достовірного росту даного цитокіну.

На 120-у добу експерименту зміни рівня ТФР- β дещо відрізнялися від ФНП-а, бо його рівень знижувався в 1,1 рази порівняно із 60-ю добою ($243,9 \pm 3,7$ пг/мл проти $277,4 \pm 4,2$ пг/мл) та був вище в 1,5 рази ($p < 0,05$) даних інтактних тварин ($243,9 \pm 3,7$ пг/мл проти $157,8 \pm 2,8$ пг/мл).

Одержані результати вказують на те, що експериментальна ДР у лабораторних тварин викликає розвиток вторинного імунodefіциту, в основі якого лежить різке пригнічення імунорегулюючих функцій цитокінів, які відповідають як за розвиток запального процесу, так і обумовлюють його тяжкість.

Таке порушення каскадного процесу регулюючої властивості цитокінів, дія яких направлена на інтеграцію нервових, ендокринних та імунологічних механізмів запалення, безумовно, вказує на вираженість та тяжкість даного патологічного процесу, а також його

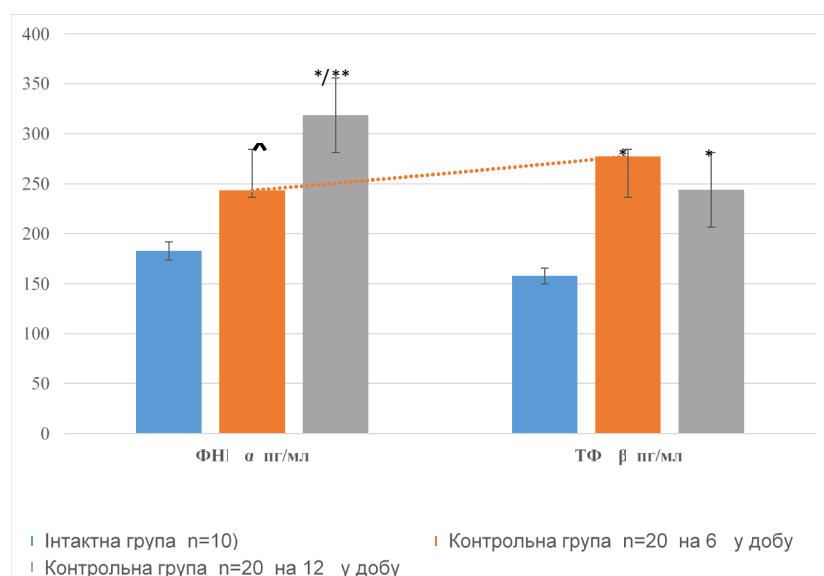


Рис. 1. Вивчення динаміки деяких прозапальних цитокінів в сироватці крові щурів з експериментальною діабетичною ретинопатією ($X \pm Sx$)

Примітки:

1. * — $p < 0,05$ порівняно із інтактною групою тварин;
2. ** — $p < 0,05$ відносно показників, одержаних на 60-у добу;
3. n — кількість тварин у групі.

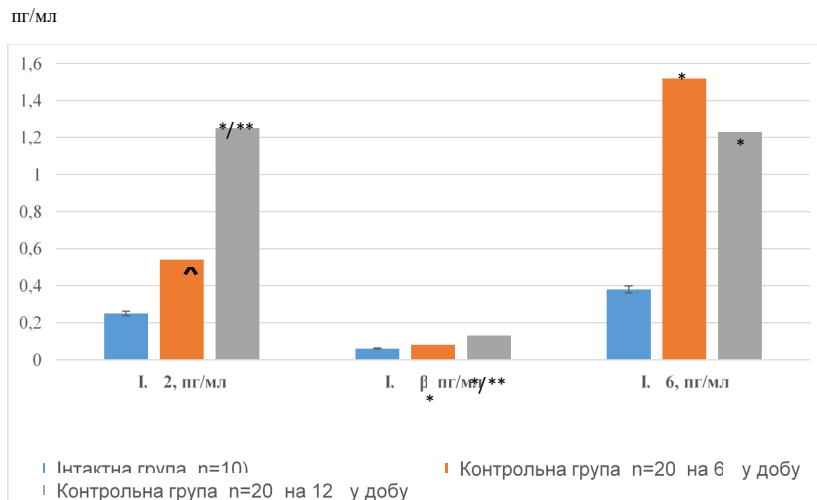


Рис. 2. Вивчення динаміки деяких прозапальних цитокінів в сироватці крові щурів з експериментальною діабетичною ретинопатією ($X \pm Sx$)

Примітки:

1. * — $p < 0,05$ порівняно із інтактною групою тварин;
2. ** — $p < 0,05$ відносно показників, одержаних на 60-у добу;
3. n — кількість тварин у групі.

деструктивний характер [9]. Про це свідчить також підвищення вміст ФНП-а, який є потужним фактором надлишкової проліферації та посилення апоптозу, а також індуктором розвитку не лише місцевого, але і системного запалення, сприяючи синтезу цілого ряду прозапальних цитокінів, які посилюють пошкодження тканин, тромбоз мікроциркуляторних судин та затримку евакуації тканинної рідини в капілярне русло [9].

В свою чергу, ТФР- β – поліфункціональний цитокін, властивості якого значною мірою залежать від взаємодії з іншими цитокінами та біологічно активними сполуками в певних тканинах і органах. Знижена концентрація ТФР- β сприяє проліферації та міграції ендотеліальних клітин, однак при його підвищенні концентрації він обумовлює інгібуючий ефект на дані процеси. Отже, можна стверджувати, що ріст його концентрації на 60-у добу вказує на пригнічення проліферації та неоваскуляризації, на 120-у добу, навпаки, – про різке підвищення даних процесів [10].

Крім цього ТФР- β тісно взаємодіє з VEGF, проявляє проангіогенні властивості, сприяючи подовженню періоду аваскулярних зон сітківки, а наступна од-

нонаправленість змін його концентрації зі змінами рівня VEGF може вказувати на синергічний характер участі даних ростових факторів в патогенезі патологічної вазопроліферації при ДР. Сигнальний каскад, який запускає синтез ТФР- β в ендотеліальних клітинах і перицитах, може бути основою потовщення базальних пластин капілярів при ДР, а блокування його синтезу може в подальшому бути використане при розробці нових

підходів до корекції даної патології [11].

Про тяжкість та вираженість системного запального процесу свідчить і підйом рівня ІЛ-6, який є «цитокіном пошкодження» та продукується не тільки моноцитами, але і Т-клітинами, макрофагами, фібробластами і ендотеліальними клітинами. Синтез цього цитокіну розпочинається на ранніх етапах запалення під дією медіаторів, а на пізніх етапах він впливає на диференціацію лімфоцитів, утворення плазматичних клітин та антитіл.

Встановлено, що на 60-у добу спостереження рівень ІЛ-6 достовірно підвищувався в 4 рази ($p < 0,05$) ($1,52 \pm 0,12$ пг/мл проти $0,38 \pm 0,06$ пг/мл), а на 120-у добу – в 3,2 рази ($p < 0,05$) ($1,23 \pm 0,08$ пг/мл проти $0,38 \pm 0,06$ пг/мл) порівняно із інтактними тваринами (рис. 2).

Впливаючи на ендотеліальні клітини, ІЛ-6 бере участь в підвищенні судинної проникності, стимулює ангіосинтез безпосередньо та опосередковано за рахунок посилення експресії VEGF клітинами-продуцентами. Різке підвищення рівня ІЛ-6 корелює із тяжкістю ДР – розвитком макулярного набряку та переходом непроліферативної ДР (початкова стадія) в проліферативну стадію (пізню стадію). Тому,

ІЛ-6 є одним із специфічних цитокінів, здатних відігравати роль індикатора локального запалення за умов ДР.

В сироватці крові рівень ІЛ-1b на 60-у добу, як і на 120-у добу експерименту достовірно підвищувався в 1,3 рази ($p < 0,05$) ($0,08 \pm 0,02$ пг/мл проти $0,06 \pm 0,01$ пг/мл) та в 1,8 разів ($p < 0,05$) ($0,13 \pm 0,03$ пг/мл проти $0,06 \pm 0,01$ пг/мл) відносно групи інтактних тварин. Також встановлено достовірні відмінності між даними одержаними на 60-у та 120-у добу спостереження ($0,08 \pm 0,02$ пг/мл проти $0,13 \pm 0,03$ пг/мл).

Також ми відмічали зміни концентрації ІЛ-2 в сироватці крові: на 60-у добу його рівень підвищувався в 2,2 рази ($p < 0,05$) ($0,54 \pm 0,04$ пг/мл проти $0,25 \pm 0,04$ пг/мл), на 120-у добу – в 5 разів ($p < 0,05$) ($1,25 \pm 0,08$ пг/мл проти $0,25 \pm 0,04$ пг/мл) відносно групи інтактних тварин.

Наступним етапом нашого дослідження було вивчення змін цитокінового пулу прозапальних ІЛ на локальному рівні – в сітківці ока – за умов змодельованої ДР (табл. 1).

Встановлено, що на локальному рівні вже на 60-у добу експерименту спостерігаються достовірні зміни всіх прозапальних цитокінів. Зокрема, рівень ІЛ-2 підвищувався в 2,7 разів ($p < 0,05$) порівняно із інтактними тваринами ($4,3 \pm 0,5$ пг/мг білка проти $1,6 \pm 0,4$ пг/мг білка); рівень ІЛ-6 – в 1,1 рази ($10,4 \pm 0,7$ пг/мг білка проти $9,8 \pm 0,8$ пг/мг білка); рівень ФНП-а – в 2,3 рази ($p < 0,05$) ($4,6 \pm 0,6$ пг/мг білка проти $2,0 \pm 0,05$ пг/мг білка); рівень ТФР-б – в 2,9 рази ($p < 0,05$) ($22,3 \pm 1,9$ пг/мг білка проти $7,7 \pm 0,6$ пг/мг білка); рівень ІЛ-1b – в 1,9 разів ($p < 0,05$) відповідно ($1,48 \pm 0,1$ пг/мг білка проти $0,8 \pm 0,03$ пг/мг білка).

мг білка проти $2,0 \pm 0,05$ пг/мг білка); рівень ТФР-б – в 2,9 рази ($p < 0,05$) ($16,8 \pm 1,4$ пг/мг білка проти $5,8 \pm 0,5$ пг/мг білка); рівень ІЛ-1b – в 1,6 разів ($p < 0,05$) відповідно ($1,25 \pm 0,06$ пг/мг білка проти $0,8 \pm 0,03$ пг/мг білка). Як видно із наведених результатів, найбільш виражені зміни на 60-у добу відмічали наступних прозапальних цитокінів – ТФР-б та ФНП.

На 120-у добу експерименту за умов ДР (проліферативна стадія) спостерігали подальший ріст прозапальних цитокінів: рівень ІЛ-2 підвищувався в 3,6 разів ($p < 0,05$) порівняно із інтактною групою тварин ($5,7 \pm 0,8$ пг/мг білка проти $1,6 \pm 0,4$ пг/мг білка); рівень ІЛ-6 – в 1,5 разів ($p < 0,05$) ($14,3 \pm 1,3$ пг/мг білка проти $9,8 \pm 0,8$ пг/мг білка); рівень ФНП-а – в 3,2 рази ($p < 0,05$) ($6,3 \pm 0,8$ пг/мг білка проти $2,0 \pm 0,05$ пг/мг білка); рівень ТФР-б – в 3,8 разів ($p < 0,05$) ($22,3 \pm 1,9$ пг/мг білка проти $5,8 \pm 0,5$ пг/мг білка); рівень ІЛ-1b – в 1,9 разів ($p < 0,05$) відповідно ($1,48 \pm 0,1$ пг/мг білка проти $0,8 \pm 0,03$ пг/мг білка).

Також встановлено достовірні відмінності рівнів ІЛ-6, ФНП-а, ТФР-б на 60-у та 120-у добу експериментального дослідження: їх концентрація зросла в 1,4 рази ($p < 0,05$), 1,4 рази ($p < 0,05$) та в 1,3 рази ($p < 0,05$) відповідно. Одержані результати вказують на більш виражену залученість даних цитокінів у процес прогресування ДР на тлі тривалої гіперглікемії.

Отже, одержані високі рівня прозапальних цитокінів, зокрема ІЛ-6, ІЛ-1b та ІЛ-2 вказують на те, що дані цитокіни беруть участь в про-

Таблиця 1

Вивчення активності прозапальних цитокінів в сітківці ока щурів за умов експериментальної діабетичної ретинопатії ($\bar{X} \pm Sx$)

Показник	Інтактна група (n=10)	Контрольна група (n=20)	
		на 60-у добу	на 120-у добу
ІЛ-2, пг/мг білка	$1,6 \pm 0,4$	$4,3 \pm 0,5^*$	$5,7 \pm 0,8^{**}$
ІЛ-6, пг/мг білка	$9,8 \pm 0,8$	$10,4 \pm 0,7$	$14,3 \pm 1,3^{**}$
ФНП-а, пг/мг білка	$2,0 \pm 0,05$	$4,6 \pm 0,6^*$	$6,3 \pm 0,8^{**}$
ТФР-б, пг/мг білка	$5,8 \pm 0,5$	$16,8 \pm 1,4^*$	$22,3 \pm 1,9^{**}$
ІЛ-1b, пг/мг білка	$0,8 \pm 0,03$	$1,25 \pm 0,06^*$	$1,48 \pm 0,1^*$

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ порівняно із інтактною групою тварин;

2. ** – $p < 0,05$ відносно показників, одержаних на 60-у добу;

3. n – кількість тварин у групі.

ють участь в протіканні запальної відповіді та активації процесів проліферації, однак їх участь в патогенезі ДР є менш вираженою, ніж ФНП-б та ТФР-б як на локальному, так і на системному рівнях.

Висновки

1. Гіперпродукція досліджуваних прозапальних цитокінів в сироватці крові щурів з експериментальною ДР відображає активацію запальних реакцій, лейкоцитарно-ендотеліальних взаємодій. В подальшому ці механізми сприяють руйнуванню щільних контактів між ендотеліальними клітинами, втраті компетентності гематоретинального бар'єру. Патогенетичні ланки ДР – неоангіогенез та запалення – тісно пов'язані між собою, що підтверджується позитивним кореляційним зв'язком між рівнями ростових факторів.
2. Встановлено, що на 60-у добу рівень ФНП-а підвищувався в 1,3 рази ($p<0,05$), ТФР- β – в 1,8 разів ($p<0,05$), ІЛ-6 – в 4 рази ($p<0,05$), ІЛ-1 β – в 1,3 рази ($p<0,05$), ІЛ – в 2,2 рази ($p<0,05$) порівняно із інтактними тваринами.
3. На 120-у добу спостереження також відзначали достовірні підвищення рівня всіх прозапальних цитокінів: рівень ФНП-а підвищувався в 1,7 разів ($p<0,05$), ТФР- β – в 1,5 разів ($p<0,05$), ІЛ-6 – в 3,2 рази ($p<0,05$), ІЛ-1 β – в 1,8 разів ($p<0,05$), ІЛ – в 5 разів ($p<0,05$) відповідно.

Reference/Література:

1. An evidence map of clinical practice guideline recommendations and quality on diabetic retinopathy / Y. Sun, Y. T. Cai, J. Chen et al. *Eye (London, England)*. 2020. Vol. 34 (11). P. 1989–2000.
2. Comparison of inflammatory cytokines levels in the aqueous humor with diabetic retinopathy / H. Zhang, L. Liang, R. Huang, P. Wu et al. *International ophthalmology*. 2020. Vol. 40 (10). P. 2763–2769.
3. Danek D., Larsen B., Anderson-Nelson S. Non-proliferative diabetic retinopathy. *Disease-a-month : DM*. 2021. Vol. 67 (5). e101139.

4. Diabetic Retinopathy - Incidence and Risk Factors in A Community Setting- A Longitudinal Study / M. Shani, T. Eviatar, D. Komaneshter, S. Vinker. *Scand. J. Prim. Health Care*. 2018. Vol. 36. P. 237–241.
5. Diabetic retinopathy: an overview on mechanisms, pathophysiology, and pharmacotherapy / P. Ansari et al. *Diabetology*. 2022. Vol. 3 (1). P. 159–175.
6. Animal models of diabetes mellitus for islet transplantation / N. Sakata, G. Yoshimatsu, H. Tsuchiya et al. *Experimental diabetes research*. 2012. Vol. 2012. e256707.
7. Клінічна лабораторна діагностика: навчальний посібник / Б. Д. Луцик, Л. Є. Лаповець, Г. Б. Лебедь та ін.; під ред. Б. Д. Луцика. – 2-е вид. К.: Медицина, 2018. 288 с.
8. Резніков О. Г., Соловйов А. І., Стефанов О. В. Біотична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: метод. рекомендації. *Вісник фармакології і фармації*. 2006. № 7. С. 47–61. Reznikov O. G., Solovyov A. I., Stefanov O. V. Biotic examination of preclinical and other scientific studies performed on animals: method. recommendations Herald of pharmacology and pharmacy. 2006. No. 7. P. 47–61.
9. Adiponectin, TNF- β and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis / C. Liu, X. Feng, Q. Li Q et al. *Cytokine*. 2016. Vol. 86. P. 100–109.
10. Cytokines associated with hemorrhage in proliferative diabetic retinopathy / H. Ra, A. Lee, J. Lee et al. *International ophthalmology*. 2021. Vol. 41 (5). P. 1845–1853.
11. Kany S., Vollrath J. T., Relja B. Cytokines in inflammatory disease. *International journal of molecular sciences*. 2019. Vol. 20 (23). e6008.

Вперше надійшла до редакції 11.04.2024 р.
Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування