

DOI: 10.21802/artm.2022.4.24.53
УДК 616.24+616.092.9+616.379-008.64

ОСОБЛИВОСТІ ЦИТОКІНОВОГО ПРОФІЛЮ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНОМУ ДІАБЕТИ

Л.М. Заяць, Ю.В. Федорченко

*Івано-Франківський національний медичний університет,
кафедра патофізіології, м. Івано-Франківськ, Україна,
ORCID ID: 0000-0003-3265-1273,
ORCID ID: 0000-0002-5042-1191,
e-mail: juliakozubash@gmail.com*

Резюме. Мета: вивчити в динаміці вміст фактору некрозу пухлин альфа (TNF- α), інтерлейкіну-1 β (IL-1 β), інтерлейкіну-6 (IL-6) в сироватці крові щурів при стрептозотоцин-індукованому діабеті.

Матеріали і методи. Модель цукрового діабету відтворювали шляхом внутрішньоочеревинного введення білим щурам стрептозотоцину фірми «Sigma» (США), розведеного в 0,1 М цитратному буфері з рН 4,5, з розрахунку 60 мг/кг маси тіла. Контрольній групі тварин внутрішньоочеревинно вводили еквівалентну дозу 0,1 М цитратного буферного розчину з рН 4,5. У сироватці крові визначали вміст TNF- α , IL-1 β , IL-6 за методом імуноферментного аналізу з використанням наборів Rat ELISA Kits (США) через 14, 28, 42 і 70 діб після ін'єкції стрептозотоцину.

Результати. Проведені біохімічні дослідження сироватки крові показали, що у тварин з цукровим діабетом відзначається підвищення концентрації прозапальних цитокінів на всіх етапах експерименту. Зокрема, TNF- α зріс через 14 діб на 11,8%, через 28 діб на 34,4%, через 42 доби на 59,1% і через 70 діб на 80,1%. Водночас у сироватці крові спостерігається збільшення рівня IL-1 β . Через 14 діб вміст цього цитокіну був підвищений на 22,5 %, через 28 діб на 40,2%, через 42 доби на 72,8%, через 70 діб на 107,2%. Поряд з цим, визначається також збільшення активності IL-6. Через 14 діб концентрація IL-6 у сироватці крові була підвищена на 17,5%, через 28 діб на 33,2%, через 42 доби на 60,6% і через 70 діб на 94,9% порівняно з показниками контрольної групи тварин.

Висновки. Проведені дослідження показали, що в патогенезі цукрового діабету провідна роль належить прозапальним цитокінам TNF- α , IL-1 β , IL-6, на що вказує достовірне підвищення у сироватці крові концентрації цих цитокінів на всіх етапах експерименту. Найбільш виражені зміни показників прозапальних цитокінів відзначаються на 70-у добу експерименту.

Ключові слова: стрептозотоцин-індукований діабет, прозапальні цитокіни: TNF- α , IL-1 β , IL-6.

Вступ і обґрунтування дослідження. Сьогодні захворюваність і поширеність цукрового діабету (ЦД) має стійку динаміку до зростання у всьому світі [1].

За оцінками Міжнародної Діабетичної Федерації (IDF), майже 425 мільйонів людей мали ЦД у 2017 році, очікується, що до 2045 року їх кількість зросте до 629 мільйонів [2].

Згідно з сучасними даними у патогенезі багатьох захворювань, зокрема й при ЦД, вагому роль відіграють цитокіни [3, 4, 5]. Відомо, що цитокіни є регуляторами міжклітинної і міжсистемної взаємодії, забезпечують узгодженість дій ендокринної, імунної, нервової систем, як в нормальних умовах, так і у відповіді на патогенетичні чинники, беруть участь у розвитку аутоімунних процесів [6, 7, 8].

Згідно з літературними даними, прозапальні цитокіни порушують метаболізм ліпідів, сприяють підвищенню вмісту ліпопротеїдів дуже низької густини, мають здатність посилювати експресію адгезивних молекул, стимулюють продукцію прокоагулянтів, посилюють фагоцитоз та антитілозалежну цитотоксичність нейтрофілів [9, 10]. У ряді робіт показано, що прозапальні цитокіни, а саме TNF- α , IL-1 β , IL-6 відіграють значну роль щодо втрати β клітинами острівців Лангерганса інсулінопродукуючої функції, а

також їх причетність до формування інсулінорезистентності периферичних тканин [11, 12].

Мета дослідження: вивчити в динаміці вміст прозапальних цитокінів TNF- α , IL-1 β , IL-6 в сироватці крові при стрептозотоцин-індукованому діабеті.

Матеріали і методи. Експерименти виконані на 88-и білих щурах-самцях лінії Вістар масою 170-210 г, яких утримували на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до води. Тварини були розділені на три групи: 1 – інтактна (n=10); 2 – контрольна (n=40); 3 – експериментальна (n=38) з моделлю цукрового діабету, який відтворювали шляхом внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину фірми «Sigma» (США), розведеного в 0,1 М цитратному буфері з рН 4,5, з розрахунку 60 мг/кг маси тіла. Контрольній групі тварин внутрішньоочеревинно вводили еквівалентну дозу 0,1 М цитратного буферного розчину з рН 4,5.

Утримання тварин та дослідження проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених

П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Усі дослідження здійснювались під тіопентал-натрієвим знеболенням із розрахунку 60 мг/кг ваги. Забір крові для біохімічного дослідження проводили через 14, 28, 42 і 70 діб після ін'єкції стрептозотоцину. Вміст TNF- α , IL-1 β , IL-6 у сироватці крові визначали імуноферментним методом з використанням наборів Rat ELISA Kits (Elabsceince, США) згідно з інструкцією фірми-виробника.

При проведенні статистичної обробки отриманих результатів була використана програма STATISTICA 10. З допомогою можливостей описової статистики усі отримані в дослідженні кількісні дані спочатку перевірили на тип їх розподілу за тестом Шапіро-Уїлка. Оскільки абсолютна більшість цих даних відповідала нормальному закону Гауса, для описання центральної тенденції обрано середнє

арифметичне \pm стандартна похибка ($M \pm m$), а для оцінки достовірності відмінностей отриманих результатів у групах порівняння (дослідна і контрольна) та перевірки нульової гіпотези – параметричний t-тест (критерій Стьюдента). Для оцінки достовірності змін даних у динаміці (14, 28, 42, 70 діб) всередині кожної з груп порівняння застосували непараметричний метод для трьох і більше груп порівняння – дисперсійний аналіз Фрідмана та коефіцієнт конкордантності Кендала (Friedman ANOVA and Kenall Coef. of Concordance).

Результати дослідження та їх обговорення.

Проведені нами дослідження показали, що у тварин із стрептозотоцин-індукованим діабетом відзначається підвищення у сироватці крові рівня прозапального цитокіну TNF- α у порівнянні з аналогічними показниками контрольної групи тварин, на всіх етапах експерименту (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст TNF- α (пг/мл) у сироватці крові білих щурів при експериментальному цукровому діабеті

Група	14 діб		28 діб		42 доби		70 діб		p ₂
	M	$\pm m$	M	$\pm m$	M	$\pm m$	M	$\pm m$	
Дослід	216,2*	0,86	261,5*	1,74	308,9*	0,73	348,7*	0,95	<0,001
Контроль	193,3	1,63	194,6	1,84	194,1	1,65	193,6	1,67	>0,05
Інтактні	195,6	1,72							
p ₁	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		x

Примітка: 1. p₁ – достовірність різниці даних дослідної і контрольної груп;
2. p₂ – достовірність даних всередині групи в динаміці;
3. * – достовірність різниці даних у порівнянні із інтактними.

При аналізі отриманих результатів було встановлено, що рівень TNF- α у сироватці крові через 14 діб в умовах змодельованого цукрового діабету зріс на 11,8% ($p < 0,001$) порівняно із тваринами контрольної групи. На 28-у добу дослідження вміст прозапального цитокіну TNF- α у сироватці крові був на 34,4% вищий ($p < 0,001$) за контрольні величини. Через 42 доби експерименту величина TNF- α перевищувала аналогічний показник контрольної групи тварин на 59,1%

($p < 0,001$). Зі збільшенням терміну дослідження (70 діб) вміст у сироватці крові TNF- α збільшився на 80,1% ($p < 0,001$) порівняно з контрольною групою тварин.

Вивчення вмісту в сироватці крові прозапального цитокіну IL-1 β через 14 діб після моделювання ЦД показало перевищення його величини у порівнянні з аналогічними показниками контрольної групи тварин на 22,5% ($p < 0,001$) (табл. 2).

Таблиця 2

Вміст IL-1 β (пг/мл) у сироватці крові білих щурів при експериментальному цукровому діабеті

Група	14 діб		28 діб		42 доби		70 діб		p ₂
	M	$\pm m$	M	$\pm m$	M	$\pm m$	M	$\pm m$	
Дослід	115,9*	0,63	130,5*	0,58	164,5*	1,40	194,4*	1,05	<0,001
Контроль	94,6	0,68	93,1	0,63	94,8	0,63	93,6	0,64	>0,05
p ₁	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		x
Інтактні	94,8 \pm 0,70								

Примітка: 1. p₁ – достовірність різниці даних дослідної і контрольної груп;
2. p₂ – достовірність даних всередині групи в динаміці;
3. * – достовірність різниці даних порівняно з інтактними.

Зі збільшенням терміну дослідження (28 діб) виявляється підвищення в сироватці крові прозапального цитокіну IL-1 β на 40,2% ($p < 0,001$) порівняно з показником контрольної групи тварин. Через 42 доби експерименту визначалося подальше збільшення рівня IL-1 β у сироватці крові. Було встановлено, що величина IL-1 β у сироватці крові перевищувала аналогічний показник контрольної групи тварин на 72,8% ($p < 0,001$). Вивчення вмісту IL-1 β у сироватці крові

через 70 діб в умовах змодельованого ЦД показало подальше зростання цього показника. Зокрема, було встановлено, що рівень IL-1 β у сироватці крові на цей період дослідження перевищував аналогічний показник контрольної групи тварин на 107,2% ($p < 0,001$).

Через 14 діб після моделювання ЦД відзначається також перевищення у сироватці крові рівня IL-6 щодо показників контрольної групи тварин на 17,5% ($p < 0,001$) (табл. 3, рис. 1).

Таблиця 3

Група	14 діб		28 діб		42 доби		70 діб		P ₂
	М	±m	М	±m	М	±m	М	±m	
Дослід	200,4*	2,08	230,7*	1,14	276,8*	2,35	336,0*	1,83	<0,001
Контроль	170,6	1,18	173,2	1,24	172,4	1,08	172,4	1,12	>0,05
p ₁	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		x
Інтактні	171,1±1,21								

Примітка: 1. p₁ – достовірність різниці даних дослідної і контрольної груп;

2. p₂ – достовірність даних всередині групи в динаміці;

3. * – достовірність різниці даних порівняно з інтактною групою.

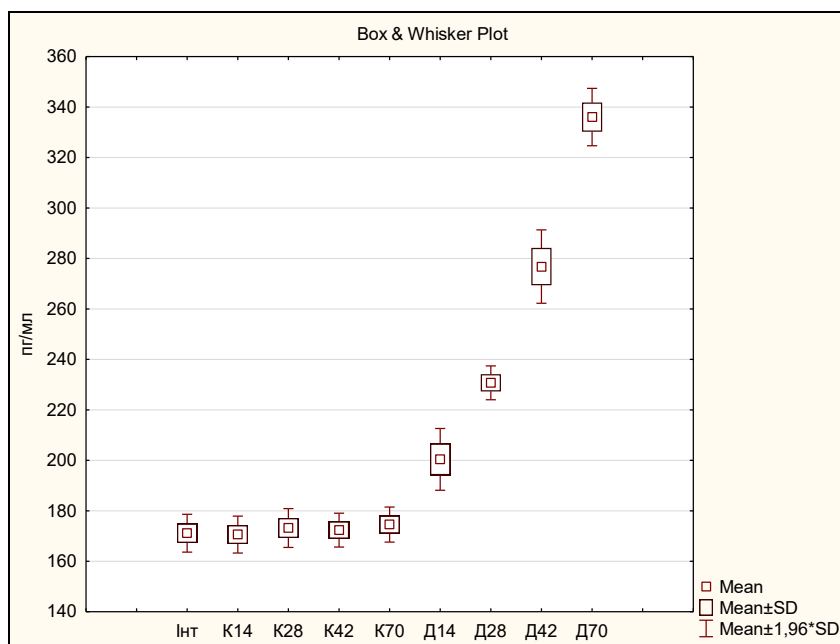


Рис. 1. Динаміка вмісту ІЛ- 6 (пг/мл) у сироватці крові білих щурів при експериментальному цукровому діабеті.

Примітка: групи тварин: Інт – інтактна; К – контрольна; Д – дослідна. 14, 28, 42, 70 – доби експерименту.

Через 28 діб вміст ІЛ-6 у сироватці крові збільшився на 33,2 % ($p < 0,001$) порівняно з аналогічними показниками контрольної групи. Зі збільшенням терміну експерименту (42 доби) вміст цього цитокіну у сироватці крові зріс на 60,6 % ($p < 0,001$). Максимальне підвищення у сироватці крові ІЛ-6 спостерігається на 70-у добу дослідження. При цьому вміст у сироватці крові ІЛ-6 став на 94,9 % ($p < 0,001$) більшим, ніж у контрольній групі тварин.

Проведений нами аналіз динаміки вмісту у сироватці крові прозапальних цитокінів TNF- α , ІЛ-1 β , ІЛ-6 в умовах змодельованого ЦД, вказує на їх однонаправлені зміни. Встановлено, що у міру прогресування стрептозототин-індукованого діабету спостерігається цитокінемія, яка особливо виражена на 70-у добу дослідження. Гіперпродукція прозапальних цитокінів сприяє посиленню запальних явищ, ушкоджуючи тканини підшлункової залози, що свідчить про участь TNF- α , ІЛ-1 β , ІЛ-6 у механізмах розвитку експериментального цукрового діабету. Аналогічне підвищення у сироватці крові прозапальних цитокінів відзначають і ряд інших дослідників при різних патологічних станах [13, 14, 15].

Висновки. Проведені дослідження показали, що в патогенезі цукрового діабету провідна роль

належить прозапальним цитокінам: TNF- α , ІЛ-1 β , ІЛ-6, на що вказує достовірне підвищення у сироватці крові концентрації цих цитокінів на всіх етапах експерименту. Найбільш виражені зміни показників прозапальних цитокінів відзначаються на 70-у добу експерименту.

References:

- Zheng H-L, Xing Y, Li F, Ding W, Ye S-D. Effect of short-term intensive insulin therapy on α -cell function in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Medicine*. 2020; 99:14. <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000019685>.
- Kuziemski K, Slominski W, Jassem E. Impact of diabetes mellitus on functional exercise capacity and pulmonary functions in patients with diabetes and healthy. *BMC Endocrine disorders*. 2019; 19:2. DOI: 10.1186/s12902-018-0328-1.
- Zhan L, Zhang Y, Su W, Zhang Q, Chen R, Zhao B, et al. The Roles of Autophagy in Acute Lung Injury Induced by Myocardial Ischemia Reperfusion in Diabetic Rats. *Journal of Diabetes Research*. 2018; Article ID 5047526,9 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/5047526>.

4. Shapoval SD, Savon IL, Trybushnyi OV, Maksymova OO, Sofilkanych MM. Tsytokinovy status u khvorykh na sepsys. Zaporizkyi medychnyi zhurnal. 2020; 4(121):515-519. doi: 10.14739/2310-1210.2020.4.208375. [in Ukrainian].
5. Li L, Peng X, Guo L, Zhao Y, Cheng Q. Sepsis causes heart injury through endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis signaling pathway. Int J Clin Exp Pathol. 2020; 13(5):964-971. www.ijcep.com/ISSN:1936-2625/IJCEP0109906.
6. Song J, Park DW, Moon S, Cho HJ, Park JH, Seok H, et al. Diagnostic and prognostic value of interleukin-6, pentraxin 3, and procalcitonin levels among sepsis and septic shock patients: a prospective controlled study according to the Sepsis-3 definitions. BMC infectious diseases. 2019; 19(1):968. https://doi.org/10.1186/s12879-019-4618-7.
7. Prasad PA, Fang MC, Abe-Jones Y, Calfee CS, Matthay MA, Kangelaris KN. Time to Recognition of Sepsis in the Emergency Department Using Electronic Health Record Data: A Comparative Analysis of Systemic Inflammatory Response Syndrome, Sequential Organ Failure Assessment, and Quick Sequential Organ Failure Assessment. Critical care medicine. 2020; 48(2):200-209. https://doi.org/10.1097/CCM.00000000000004132.
8. Zuo Y, Liu J, Xu H, Li Y, Tao R, Zhang Z. Pirfenidone inhibits cell fibrosis in connective tissue disease-associated interstitial lung disease by targeting the TNF- α /STAT3/ KL6 pathway. J Thorac Dis. 2022; 14(6):2089-2102. https://dx.doi.org/10.21037/jtd-22-41.
9. Zuravliova LV, Pyliov DI. Znachennia spivvidnoshennia faktorov nekrozu pukhlyn- α ta Vaspinu v rozvytku insulinorezystentnosti. Problemy Endokrynnoi Patolohii. 2019; 3:113-120. doi: 10.21856/j-PEP.2019.3.15 [in Ukrainian].
10. Herasymets II, Fira LS, Medvid II. Aktyvnist zapalnykh protsesiv u shchuriv pry eksperymentalnomu kantserohenezi ta vplyv na nykh hustoho ekstraktu z hrybiv maitake. Zdobutky klinichnoi i eksperymentalnoi medytsyny. 2022; 1:57-62. doi 10.11603/1811-2471.2022.v.i1.12987. [in Ukrainian].
11. Bulboaca AE, Boarescu PM, Bolboaca SD, Blidaru M, Festila D, Dogaru G, et al. Comparative Effect Of Curcumin Versus Liposomal Curcumin On Systemic Pro-Inflammatory Cytokines Profile, MCP-1 And RANTES In Experimental Diabetes Mellitus. Int J Nanomedicine. 2019 Nov 18; 14:8961-8972. doi: 10.2147/IJN.S226790. PMID: 31819412; PMCID: PMC6873975.
12. Pang H, Luo S, Huang G, Xia Y, Xie Z, Zhou Z. Advances in knowledge of candidate genes acting at the beta-cell level in the pathogenesis of T1DM. Front Endocrinol. 2020; 11:119. doi: 10.3389/fendo.2020.00119
13. Kachur OI, Fira LC, Lykhatskyi PH. Otsinka rivnia zapalnykh protsesiv u shchuriv pry eksperymentalnomu kantserohenezi ta vplyv na nykh enterosorbtsii. Medychna ta klinichna khimii. 2019; 2(21):24-29. doi 10.11603/mcch.2410-681X.2019.v.i2.10290. [in Ukrainian].
14. Roseti L, Desando G, Cavallo C, Petretta M, Grigolo B. Articular cartilage regeneration in osteoarthritis. Cells. 2019; 8:1305. doi: 10.3390/cells8111305.
15. Nosivets DS. Faktor nekrozu pukhlyn, yak marker vyznachennia farmakolohichnoi aktyvnosti nesteroidnykh protyzapalnykh zasobiv ta parasetamolu pry hipotyreozi ta osteoartrozi. Ukrainskyi zhurnal medytsyny, biolohii ta sportu. 2020; 3(25):129-134. Doi: 10.26693/jmbs05.03.129. [in Ukrainian].

UDC 616.24+616.092.9+616.379-008.64

FEATURES OF CYTOKINE PROFILE OF BLOOD IN RATS WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES

L.M. Zaiats, Yu.V. Fedorchenko

*Ivano-Frankivsk National Medical University,
Department of Pathophysiology,
Ivano-Frankivsk, Ukraine,
ORCID ID: 0000-0003-3265-1273,
ORCID ID: 0000-0002-5042-1191,
e-mail: juliakozubash@gmail.com*

Abstract. In the pathogenesis of many diseases, including diabetes mellitus, cytokines play a crucial role. It is known that cytokines are the regulators of intercellular and intersystem interactions, ensuring the consistency of the actions of the endocrine, immune, and nervous systems under standard conditions and in response to pathogenetic factors, and are involved in the development of autoimmune processes. It was established that proinflammatory cytokines, namely tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 β , and interleukin-6 play a significant role in the loss of insulin-producing function by beta cells of the islets of Langerhans, as well as are implicated in the formation of insulin resistance in peripheral tissues.

The aim is to study the dynamics of the content of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) in the blood serum of rats with streptozotocin-induced diabetes.

Materials and methods. The experiments were performed on 88 white male Wistar rats weighing 170–210 g, which were kept on a standard diet with free access to water. Animals were divided into three groups: 1 – intact (n=10); 2 – control (n=40); 3 – experimental (n=38) with a model of diabetes mellitus, which was reproduced by intraperitoneal injection of streptozotocin by "Sigma" company (USA), diluted in 0.1 M citrate buffer with a pH of 4.5, at a rate of 60 mg/kg body weight. The control group of animals received an intraperitoneal injection with an equivalent dose of 0.1 M citrate buffer solution with a pH of 4.5. Serum levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 were determined by rat enzyme-linked immunosorbent assay Rat ELISA Kits (Elabscience, USA) according to the manufacturer's instructions 14, 28, 42 and 70 days after streptozotocin injection. To assess the reliability of data changes in dynamics (14, 28, 42, 70 days) within each of the comparison groups, a non-parametric method was used (for three or more comparison groups) - Friedman's analysis of variance and Kendall's coefficient of concordance (Friedman ANOVA and Kendall's W).

Results. Conducted biochemical studies of blood serum showed that in animals with streptozotocin-induced diabetes, there was an increase in the content of proinflammatory cytokines at all stages of the experiment. In particular, TNF- α increased by 11.8% in 14 days, 34.4% in 28 days, 59.1% in 42 days and 80.1% in 70 days after the start of the experiment. An increase in the level of IL-1 β was observed in the blood serum at the same time. In 14 days, the content of this cytokine increased by 22.5%, in 28 days increased by 40.2%, in 42 days increased by 72.8%, in 70 days increased by 107.2%. Along with this, we also observed an increase in the activity of IL-6 levels. In 14 days, in the blood serum, the IL-6 level was increased by 17.5%, in 28 days by 33.2%, in 42 days by 60.6% and after 70 days by 94.9% compared to the control group of animals.

The analysis of the dynamics of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in blood serum under conditions of experimental diabetes indicates their unidirectional changes.

Conclusions. The conducted studies showed that pro-inflammatory cytokines play a leading role in the pathogenesis of diabetes mellitus: TNF- α , IL-1 β , and IL-6, which is indicated by a significant increase in the levels of such cytokines in blood serum at all stages of the experiment. The most pronounced changes in pro-inflammatory cytokines levels are observed at 70-day.

Keywords: Streptozotocin-induced diabetes, proinflammatory cytokines: TNF- α , IL-1 β , IL-6.

Стаття надійшла в редакцію 26.10.2022 р.
Стаття прийнята до друку 23.12.2022 р.