

Влияние метформина на продукцию провоспалительных цитокинов и инсулинорезистентность (NF-κB-сигнальный путь)

А.В. ЛАВРЕНКО, к.м.н. Н.Л. КУЦЕНКО, к.с.-х.н. Л.А. КУЦЕНКО, к.б.н. Т.В. МАМОНТОВА, д.м.н. И.П. КАЙДАШЕВ*

The action of metformin on the production of pro-inflammatory cytokines and insulin resistance (NF-κB signal pathway)

A.V. LAVRENKO, N.L. KUTSENKO, L.A. KUTSENKO, T.V. MAMONTOVA, I.P. KAIIDASHEV

НИИ генетических и иммунологических основ развития патологии и фармакогенетики Украинской медицинской стоматологической академии, Полтава

Цель данного исследования — оценка роли NF-κB-сигнального пути в реализации противовоспалительного и инсулинорезистентного действия метформина у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) на фоне метаболического синдрома (МС). Включение ежемесячного курса метформина в комплексную терапию ИБС снижало продукцию провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО-α и уменьшало концентрацию С-пептида в сыворотке, действуя на NF-κB-сигнальный путь. Включение метформина в комплексную терапию ИБС при МС препятствует активации NF-κB под действием эндогенных провоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: метформин, ишемическая болезнь сердца, метаболический синдром, инсулинорезистентность, NF-κB-сигнальные пути.

The objective of the present study was to estimate the role of the NF-κB signal pathway in the realization of the anti-inflammatory and insulin-synthesizing activities of metformin in the patients presenting with coronary heart disease (CHD) associated with metabolic syndrome (MS). It was shown that the introduction of a one-month course of metformin therapy in the combined treatment of CHD resulted in the decreased production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1-beta, IL-6, IL-8, and TNF-alpha. Simultaneously, the serum C-peptide level decreased. These effects of metformin were mediated through the NF-κB-signal pathway. It is concluded that the inclusion of metformin in the combined treatment of coronary heart disease in the patients with metabolic syndrome prevent activation of NF-κB under the influence of endogeneous pro-inflammatory cytokines.

Key words: metformin, coronary heart disease, metabolic syndrome, insulin resistance, F-κB-signal pathway.

Инсулинорезистентность является основным признаком сахарного диабета 2-го типа (СД2) и ассоциируется с рядом метаболических и сердечно-сосудистых нарушений (дислипидемия, гипертония, ожирение, особенно висцеральное, эндотелиальная дисфункция), каждое из которых является независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний. Молекулярной основой развития инсулинорезистентности является нарушение проведения сигнала от инсулинового рецептора по фосфоинозитол-3-киназному пути с сохранением передачи сигнала по MAP-киназному [1]. MAP-киназный путь активирует NF-κB, обладающий многими провоспалительными эффектами. Кроме того, через NF-κB реализуется липотоксичность неэстерифицированных жирных кислот, внутриклеточных CoA-жирных кислот, некоторые эффекты ангиотензина II [2].

Таким образом, NF-κB-сигнальный путь является одним из ключевых пунктов внутриклеточной сигнализации, ответственных за развитие инсулинорезистентности, СД2, атеросклероза и артериальной гипертензии. В этой связи актуален поиск лекарственных препаратов, способных блокировать

NF-κB-сигнализацию, особенно среди веществ, обладающих противовоспалительным и инсулинорезистентным эффектами. Одним из таких препаратов является метформин [3].

Цель данного исследования — оценка роли NF-κB-сигнального пути в реализации противовоспалительного и инсулинорезистентного действия метформина у больных с метаболическим синдромом (МС) и ишемической болезнью сердца (ИБС).

Материал и методы

В исследование включены 18 мужчин в возрасте 45—65 лет, которые страдали ИБС на фоне МС. Исследование проводилось с 2008 по 2010 г. на базе 1-й городской клинической больницы Полтавы и Научно-исследовательского института генетических и иммунологических основ развития патологии и фармакогенетики Украинской медицинской стоматологической академии. Перед началом исследования было получено одобрение комиссии по биоэтике этого учреждения. Включение пациентов мужского пола объяснялось необходимостью устранения влияния различных гормональных изменений.

ИБС диагностировали по общепринятым критериям, а наличие МС устанавливали по критериям ВОЗ [4].

До включения в исследование все больные получали общепринятое лечение. Затем применялся стандартный комплекс медикаментозной терапии: изосорбида динитрат 20 мг 2 раза в день, ацетилсалициловая кислота 75 мг 1 раз в день на ночь, амлодипин 10 мг 1 раз в день, метапролол 25 мг 1 раз в день, аторвастатин 10 мг 1 раз в день утром, больные получали также рекомендации относительно диеты и образа жизни. Общепринятое лечение больные получали не менее 1 мес (до достижения стабильных показателей).

В 1-й день у всех пациентов брали пробы крови и проводили клиническое обследование. Затем в комплексную терапию 8 пациентов был включен метформин в дозе 500 мг 2 раза в день, т.е. впервые назначали пероральный сахарснижающий препарат (группа наблюдения). Повторное обследование выполнялось через 1 мес. Остальные 10 пациентов продолжали стандартное медикаментозное лечение (контрольная группа). Обследование включало: общий анализ крови, общий анализ мочи, определение глюкозы в крови и моче, биохимический анализ крови, определение общего холестерина, α -холестерина, триглицеридов, β -липопротеинов, общих липидов, УЗИ почек, УЗИ сердца, ЭКГ. Все методы были рутинными и использовались для верификации и установления тяжести основного заболевания, а также выявления сопутствующей патологии. Определяли концентрацию глюкозы и гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) в крови («Био-Ла-Тест», Чехия) и проводили глюкозотолерантный тест (ГТТ). Концентрацию С-пептида в сыворотке определяли иммуноферментным методом («DRG International, Inc.», США). Регистрировали антропометрические показатели — рост (см), массу тела (кг), рассчитывали индекс массы тела (ИМТ, $кг/м^2$).

Воспалительную реакцию оценивали по концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α , определяемой иммуноферментным методом (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Для определения экспрессии NF- κ B CD40⁺ клетками суспензию мононуклеаров периферической крови инкубировали с моноклональными антителами (мкАТ) к поверхностным антигенам CD40. К 50 мкл суспензии (10⁵ клеток) добавляли 5 мкл мкАТ, меченых FITC, против CD40 («Caltag», США) и инкубировали 20 мин при 4 °С. Затем клетки отмывали, центрифугируя с 1 мл ФСБ при 1500 об/мин в течение 5 мин. Ресуспендированные клетки фиксировали раствором («Caltag», США) 20 мин при 4 °С. Пермеабиллизацию проводили в присутствии мкАТ против субъединицы p65 молекулы NF- κ B («BD Biosciences Pharmingen», США) в течение 40 мин при 4 °С. После однократного от-

мывания к ресуспендированным клеткам добавляли вторые мкАТ, меченные PE («Caltag», США). После 20-минутной инкубации клетки отмывали и добавляли 0,5 мл ФСБ. Исследования выполнены на проточном цитофлюориметре EPIC LX-MCL («Beckman Coulter», США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программы STATISTICA 6.0 («StatSoft», США) с расчетом выборочного среднего, выборочного стандартного отклонения, вероятности полученных результатов для попарно связанных величин (t). Данные приведены в виде выборочного среднего (M), выборочного стандартного отклонения (S/D), нижней и верхней квартили. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

У всех 18 пациентов имело место нарушение толерантности к глюкозе, ИМТ превышал 30 $кг/м^2$ и регистрировался один из дополнительных критериев МС (артериальная гипертензия, повышение уровня триглицеридов >1,7 ммоль/л или уровень холестерина ЛПВП <0,9 ммоль/л). Из общей группы больных с МС и ИБС были отобраны 8 пациентов с четкими признаками ожирения (ИМТ=34,12 \pm 5,12 $кг/м^2$), нарушения углеводного обмена и инсулинорезистентностью (уровень С-пептида =15,97 \pm 2,59 нг/мл, HbA_{1c} 6,54 \pm 2,19 ммоль фруктозы/г Hb) и системного воспаления (повышение концентраций ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-8 и ФНО- α в сыворотке в 2–3 раза).

В то же время исходные уровни ИМТ, HbA_{1c} , С-пептида и исследованных цитокинов в группе наблюдения не отличались от таковых в контрольной группе ($p>0,05$) (рис. 1, 2).

Включение в комплекс терапии метформина и лечение приводило через 1 мес к снижению ИМТ до 33,16 \pm 4,77 $кг/м^2$ ($p=0,00049$) и концентрации С-пептида 12,7 \pm 4,1 нг/мл ($p=0,006$); уровень HbA_{1c} уменьшился слабо (до 5,44 \pm 1,93 ммоль фруктозы/г Hb, $p>0,05$). Отчетливо снизилась концентрация провоспалительных цитокинов в сыворотке: ИЛ-1 β — 2,11 \pm 0,68 пг/мл ($p=0,00005$), ИЛ-6 — 16,57 \pm 16,65 пг/мл ($p=0,000$), ИЛ-8 — 7,97 \pm 11,4 пг/мл ($p=0,00104$) и ФНО- α — 5,7 \pm 3,8 пг/мл ($p=0,00467$) (рис. 3).

В контрольной группе, пациенты которой не принимали метформин, не отмечалось достоверных изменений изученных показателей.

В группе наблюдения до включения в терапию метформина концентрация общего холестерина составляла 6,5 \pm 1,12 ммоль/л, холестерина ЛПВП — 1,27 \pm 0,16 ммоль/л, общих липидов — 4,67 \pm 0,97 г/л, триглицеридов — 1,76 \pm 0,59 ммоль/л, β -липопротеидов — 2,29 \pm 0,57 г/л. Через 1 мес терапии с включением метформина уровни всех этих по-

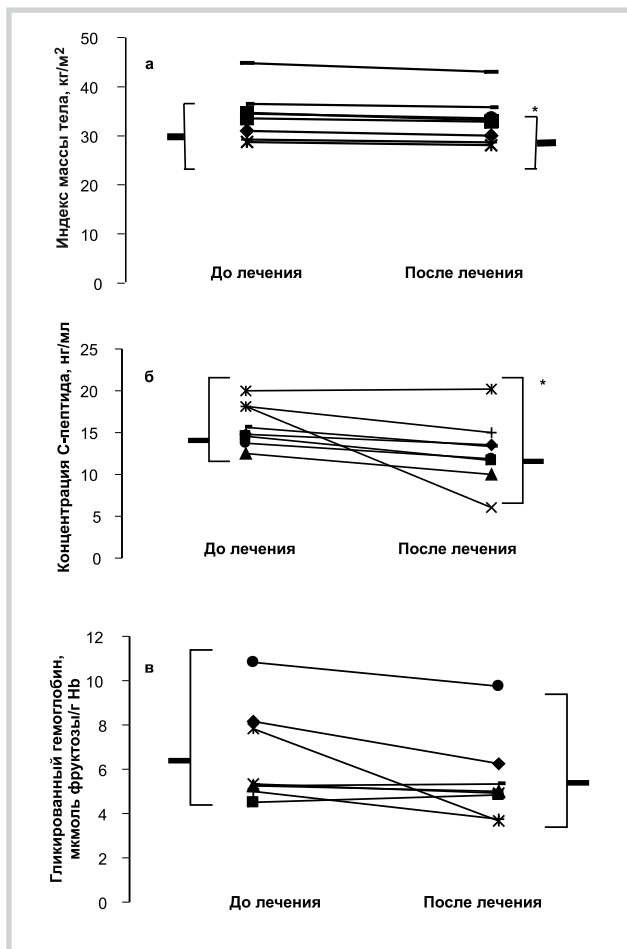


Рис. 1. Влияние метформина на антропометрические показатели (а), концентрацию С-пептида (б) и гликированного гемоглобина (в) больных с ИБС и МС (n=8).

Примечание. Здесь и на рис. 2 и 3: данные приведены в виде индивидуальных значений, среднего (жирная линия) и стандартного отклонения (скобка); $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.

казателей изменились незначительно ($p > 0,05$). Аналогичные недостоверные сдвиги наблюдались нами и в контрольной группе.

Содержание внутриклеточного NF- κ B определяли в CD40⁺-клетках. Молекула CD40 экспрессируется В-клетками различной степени зрелости, моноцитами и дендритными клетками. Взаимодействия CD40/CD40L играют важную роль в поражении сосудистой стенки при атеросклерозе [5, 6].

Как видно из данных, представленных на рис. 3, а, число CD40⁺-клеток, экспрессирующих NF- κ B у пациентов с МС и ИБС до начала лечения и применения метформина, составило $72,43 \pm 17,09$ (нижний квартиль — 57,5; верхний — 86,95). Применение метформина привело к увеличению числа клеток, экспрессирующих NF- κ B, до $92,17 \pm 4,48$ ($p = 0,00000$). При этом наблюдалось не только увеличение относительного числа клеток, но и снижение дисперсии результатов (нижний квартиль — 88,45; верхний — 94,9). В контрольной группе от-

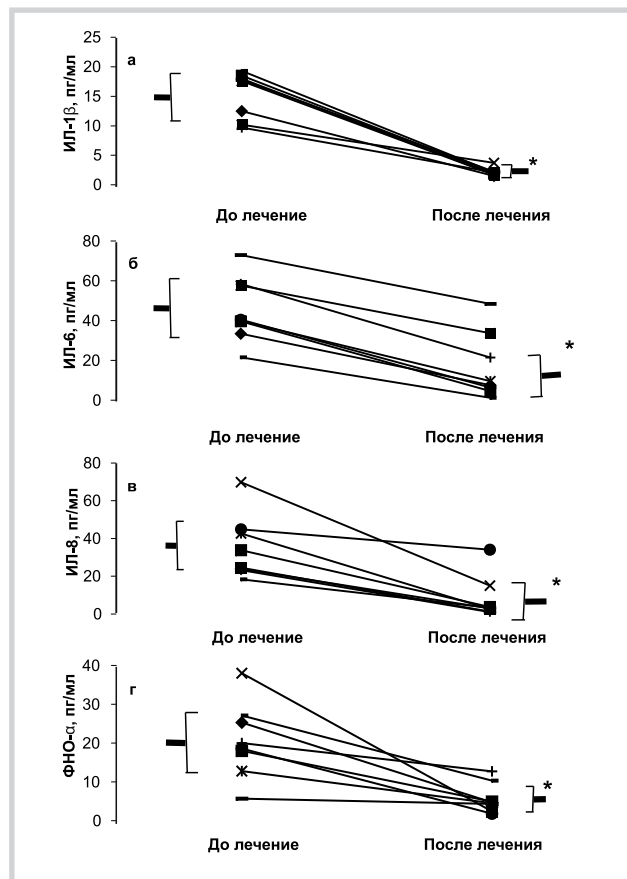


Рис. 2. Влияние метформина на уровень ИЛ-1 β (а), ИЛ-6 (б), ИЛ-8 (в) и ФНО- α (г) в сыворотке больных с ИБС и МС (n=8).

носительное число клеток, экспрессирующих NF- κ B, до начала периода наблюдения не отличалось от показателей группы наблюдения. Через 1 мес комплексной медикаментозной терапии без включения метформина не отмечали достоверные изменения числа этих клеток, отсутствовали NF- κ B (рис. 3, б).

NF- κ B-комплекс состоит из субъединиц p50 (NF- κ B1) и p65 (REL-A). Субъединица p65 содержит область из 300 аминокислот, гомологичную протоонкогенному продукту Rel (RH-домен). RH-домен включает мотивы для димеризации, перемещения в ядро и присоединения к специфическим последовательностям ДНК. Кроме того, субъединица p65 содержит трансактивационный домен, ответственный за взаимодействие с ингибитором I κ B, в котором присутствуют участки фосфорилирования. Образование комплекса NF- κ B/I κ B предотвращает ядерную транслокацию и активность NF- κ B. В ответ на такие стимулы, как цитокины, липополисахариды, повреждение ДНК и вирусные инфекции, I κ B фосфорилируется по критическим остаткам, что вызывает диссоциацию комплекса, позволяя свободным гетеродимерам NF- κ B поступать в ядро клеток. Оптимальная активация NF- κ B требует фосфорилирования и трансактивационного домена

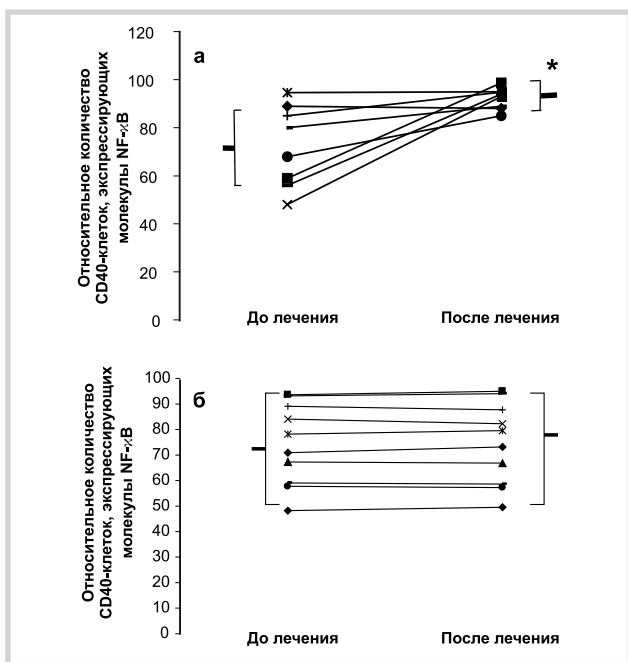


Рис. 3. Влияние метформина на относительное количество CD40-клеток, экспрессирующих молекулы NF-κB, у больных ИБС и МС.

а — группа наблюдения (n=8); б — группа контроля (n=10).

рб5. В ядре активированный NF-κB присоединяется к κB сайтам промоторов и энхансеров и функционирует, стимулируя транскрипцию генов [7].

Недавно показано, что метформин в концентрации 100—1000 мкмоль/л ингибирует фосфорилирование IκB-киназы и деградацию IκBα в эндотелиальных клетках пупочной вены человека. Этот эффект связан со способностью метформина увеличивать фосфорилирование АМР-активированной киназы с участием PI3-киназы [8, 9]. Такая способность метформина ставит его в ряд препаратов с потенциальной противоопухолевой активностью, в частности при раке молочной железы [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. De Fronzo R.A. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 2009; 58: 773—795.
2. De Fronzo R.A. Insulin resistase, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia*. 2010; 53: 1270—1287.
3. Bulcao C., Ribeiro-Filho F.F., Sanudo A. Roberta Ferreira S.G. Effects of simvastatin and metformin on inflammation and insulin resistance in individuals with mild metabolic syndrome. *Am J Cardiovasc Drugs* 2007; 7: 3: 219—224.
4. Alberti K.G., Zimmet P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Prevocational report of WHO consultation*. *Diabet Med* 1998; 15: 539—553.
5. Juan M., Ohishi M., Wang L. et al. Association between serum levels of soluble CD40/CD40L ligand and organ damage in hypertensive patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; 37: 8: 848—851.
6. Lutgens E., Levens D., Beckers L. et al. CD40 and its ligand in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17: 4: 118—123.
7. Lawrens T. The nuclear factor NF-κB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1: 6: a001651.
8. Hattori Y., Suzuki K., Hattori S., Kasal K. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappa B activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension* 2006. 47: 6: 1183—1186.
9. Huang N.L., Chiang S.H., Hsueh C.H. et al. Metformin inhibits TNF-alpha-induced I kappa B kinase phosphorylation, I kappa B alpha degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3-dependent AMPK phosphorylation. *Int J Cardiol* 2009; 134: 2: 169—175.
10. Wysocki P.J., Wluzsz-Wysocka B. Obesity, hyperinsulinemia and breast cancer: novel targets and a novel role for metformin. *Exp Rev Mol Diagn* 2010; 10: 4: 509—519.

Таким образом, у пациентов с МС и ИБС наряду с повышением массы тела и инсулинорезистентностью наблюдается увеличение продукции провоспалительных цитокинов, которые реализуют свои эффекты с участием NF-κB-сигнального пути. При этом формируется «порочный круг»: инсулинорезистентность — ожирение — системное воспаление — ремоделирование тканей — артериальная гипертензия — гиперинсулинемия — липотоксичность; компоненты этого круга могут взаимодействовать в различных последовательностях, приводя к активации NF-κB.

Такое состояние мы предлагаем называть пре-кондиционированием NF-κB-сигнального пути, приводящим к развитию и поддержанию метаболического синдрома.

Заключение

Включение метформина в комплексную терапию больных МС и ИБС приводит к блокаде активации NF-κB под действием эндогенных провоспалительных цитокинов (на примере CD40⁺-моноклеаров периферической крови) путем стабилизации комплексов NF-κB/IκB за счет ингибирования фосфорилирования IκB-киназы. Этот эффект метформина прерывает порочный круг, воздействуя на его ключевое звено — активацию NF-κB.

Участие авторов

Концепция и дизайн исследования: И.П. Кайдашев.

Сбор и обработка материала: И.П. Кайдашев, А.В. Лавренко, Н.Л. Куценко, Л.А. Куценко, Т.В. Мамонтова.

Статистическая обработка данных: Т.В. Мамонтова.

Написание текста: А.В. Лавренко, И.П. Кайдашев.

Редактирование: И.П. Кайдашев