

DOI 10.29254/2077-4214-2021-4-162-99-102

УДК 616.12-008.1+616.092-18+616-092.4

Бондарєва О. О., Федоров С. В.

**МАРКЕРИ АКТИВАЦІЇ МОНОЦИТІВ У ХВОРИХ НА ГОСТРИЙ КОРОНАРНИЙ СИНДРОМ ТА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 2 ТИПУ**

Івано-Франківський національний медичний університет (м. Івано-Франківськ, Україна)

serfed@i.ua

Метою даного дослідження було визначення активності моноцитів/макрофагів у хворих на ГКС та супутній ЦД 2 типу шляхом оцінки спонтанної продукції ними ряду цитокінів. Було обстежено 53 хворих на гострий коронарний синдром: 29 пацієнтів із супутнім ЦД 2 типу та 24 пацієнтів – без ЦД. Контрольну групу склали 15 практично здорових осіб, відповідних за віком та статтю хворим на ГКС. Проводили виділення моноцитів периферійної крові за методом H.Recalde та визначення спонтанної продукції інтерлейкіну (ІЛ) 1 $\beta$ , фактору некрозу пухлин (ФНП- $\alpha$ ) та ІЛ-10 методом ІФА. У відповідності до результатів проведеного дослідження було встановлено, що спонтанна продукція моноцитами прозапальних цитокінів (ІЛ-1 $\beta$  та ФНП- $\alpha$ ) була найвищою в хворих на ГКС та супутній ЦД 2 типу. Відмічений дефіцит екскреції протизапального цитокіну ІЛ-10 у хворих на ГКС, без вірогідної різниці в обох групах. Таким чином, було виявлено, що моноцити в хворих на гострий коронарний синдром перебувають у стані хронічної активації, свідченням чого є надмірна спонтанна продукція прозапальних цитокінів ІЛ-1 $\beta$  та ФНП- $\alpha$  на тлі дефіциту протизапального ІЛ-10.

**Ключові слова:** гострий коронарний синдром, цукровий діабет, цитокіни, моноцити.

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Дана робота є фрагментом НДР «Структурні та функціональні зміни внутрішніх органів при хронічних неінфекційних захворюваннях: можливості медикаментозної корекції», номер державної реєстрації 0121U108893.

**Вступ.** За даними міжнародної діабетологічної федерації (IDF), понад 415 млн. осіб у світі хворіють на цукровий діабет (ЦД), 91% з яких мають ЦД 2 типу. Відмічено, що поширення ЦД 2 типу постійно зростає. Хворі на ЦД складають 8,8% населення планети, а до 2040 року кількість таких пацієнтів прогнозовано зросте до 642 млн [1].

Серцево-судинні захворювання (ССЗ) – головна причина смерті та інвалідності серед хворих на ЦД. Відмічено, що такі пацієнти перебувають у вищому ризику розвитку ССЗ, ніж особи без діабету. Більше того, ризик ССЗ зростає зі збільшенням рівня плазмової глюкози [2].

Один із останніх мета-аналізів та систематизований огляд клінічних досліджень показав, що в 32,2% хворих на ЦД 2 типу наявні супутні ССЗ, головним чином, – ішемічна хвороба серця (ІХС) та інсульт, які обумовлюють близько половини всіх смертей [1].

Відмічено, що пацієнти з ЦД частіше хворіють на гострі коронарні синдроми (ГКС), у них швидше

розвивається синдром серцевої недостатності (СН) та виникає кардіоваскулярна смерть. Нещодавно проведене дослідження Acute Coronary Syndrome Quality Improvement in Kerala trial показало, що хворі на ГКС із супутнім ЦД характеризуються вищим ризиком внутрішньобітальної смерті (aOR=1,46; 95% CI 1,12-1,89), повторного інфаркту міокарда (ІМ) (aOR 1,52; 95% CI 1,15-2,02), вищим ризиком розвитку головних небажаних кардіальних подій у термін 30 днів – MACE (aOR, 1,33; 95% CI 1,14-1,55) та 30-денною смертністю (aOR 1,40; 95% CI 1,16-1,69) [3].

Макрофаги, які утворюються з моноцитів, відіграють важливу роль у патогенезі атеросклерозу. Субпопуляції циркулюючих класичних, проміжних та некласичних моноцитів володіють різними функціями та беруть участь у різних ланках атерогенезу [4].

**Метою даного дослідження** було визначення активності моноцитів/макрофагів у хворих на ГКС та супутній ЦД 2 типу шляхом оцінки спонтанної продукції ними ряду цитокінів.

**Об'єкт і методи дослідження.** Було обстежено 53 хворих на гострий коронарний синдром: 29 пацієнтів із супутнім ЦД 2 типу та 24 пацієнтів – без ЦД. Контрольну групу склали 15 практично здорових осіб, відповідних за віком та статтю хворим на ГКС.

Діагноз ГКС верифікований відповідно до Настанов Європейського кардіологічного товариства (2017 та 2020 років) [5, 6]; діагноз ЦД 2 типу виставляли відповідно до Настанов Американської діабетологічної асоціації (2020 рік) [7]. Дослідження проводилося згідно з принципами Гельсінської декларації Світової медичної асоціації «Етичні засади медичних досліджень, що стосуються людських суб'єктів» (змінена в жовтні 2013 року). Письмова інформована згода була отримана від усіх хворих, які брали участь у дослідженні.

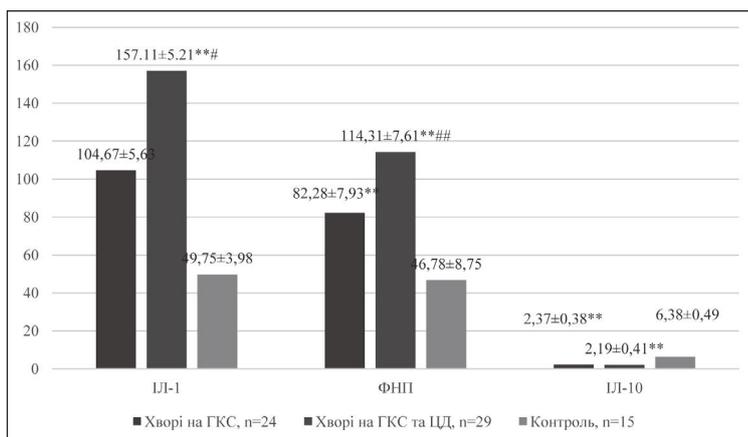
Із метою оцінки функціонального стану моноцитів/макрофагів периферійної крові проводили їхнє виділення за методом H. Recalde [8]. Життєздатність клітин у суспензії була підтверджена тестом із трипановим синім і складала 89-93%. Після перерахунку та розподілу ( $1 \times 10^6$  клітин на лунку) проводили інкубацію моноцитів у середовищі 199, яке містило 30% аутосерватку крові, інактивовану в термостаті при температурі 56°C упродовж 2-х годин, 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 10 мкг/мл фунгізону (Gibco, Grand Island, NY, USA) у 24-лункових пластикових кластерах для тканинних культур (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) протягом доби при температурі 37°C. Після інкубації суперна-

**Таблиця – Клініко-демографічні характеристики обстежених хворих на ГКС**

Показник	Хворі на ГКС та ЦД, n=29	Хворі на ГКС, n=23	p
Вік, років	66,3±10,4	68,6±11,1	>0,05
Чоловіча стать	17 (58,6%)	13 (56,2%)	>0,05
STEMI	25 (86,2%)	19 (82,6%)	>0,05
nSTEMI	4 (13,8%)	4 (17,4%)	>0,05

тант заморожували при температурі -20°C до наступного визначення базальної продукції цитокінів.

Вміст цитокінів (інтерлейкіну-1β (ІЛ-1β), інтерлейкіну -10 (ІЛ-10) та фактору некрозу пухлин альфа (ФНП-α)) у супернатанті культури моноцитів визначали методом імуноферментного аналізу.



**Рисунки – Продукція цитокінів моноцитами.**

**Примітки:** \*\* p<0,001 – вірогідність різниці, порівняно з контролем; # p<0,01; ### p<0,001- вірогідність різниці між групами хворих на ГКС.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили з використанням пакету програм Statistica 12. Різницю вважали вірогідною при p<0,05.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Середній вік обстежених пацієнтів із ГКС склав: (67,5±11,7) років; 31 осіб (58,5%) були чоловічої статі. Гострий інфаркт міокарда з стійкою елевацією ST (STEMI) верифікований у 43 (81,1%) обстежених хворих. Не було вірогідної різниці в клініко-демографічних показниках обох обстежених груп пацієнтів (табл.).

Спонтанна продукція моноцитами прозапальних цитокінів (ІЛ-1β та ФНП-α) була найвищою в хворих на ГКС та супутній ЦД 2 типу (рис.). Так, вміст ІЛ-1β у культуральному середовищі був (157,11±5,21) пг/10<sup>6</sup> клітин, що в 1,5 раза перевищувало показник в групі

хворих на ГКС без ЦД ((104,67±5,63) пг/10<sup>6</sup> клітин; p<0,01) та в 3,16 раза – показник контрольної групи ((49,75±3,98) пг/10<sup>6</sup> клітин; p<0,001).

Показник спонтанної продукції ФНП-α моноцитами, виділеними в хворих на ГКС та супутній ЦД 2 типу, у 2,44 раза перевищував контрольні значення ((114,31±7,61) пг/10<sup>6</sup> клітин, проти (46,78±8,75) пг/10<sup>6</sup> клітин; p<0,001) та в 1,4 раза – подібний показник в групі хворих на ГКС без ЦД ((82,28±7,93) пг/10<sup>6</sup> клітин; p<0,001).

Відмічений дефіцит екскреції протизапального цитокіну ІЛ-10 у хворих на ГКС, без вірогідної різниці в обох групах. Так, даний показник у хворих на ГКС та ЦД був нижчим у 2,91 раза від показника контрольної групи ((2,19±0,41) пг/10<sup>6</sup> клітин, проти (6,38±0,49) пг/10<sup>6</sup> клітин; p<0,001), а в хворих на ГКС без супутнього ЦД – у 2,69 раза ((2,37±0,38) пг/10<sup>6</sup> клітин; p<0,001).

Отримані дані свідчать про надмірну активацію моноцитів у хворих на ГКС, більш виражену при супутньому ЦД 2 типу. Відомо, що ІЛ-1 відіграє ключову роль у стимуляції постінфарктної запальної відповіді та залучений у процеси ремоделювання серцевого м'язу; є ключовим цитокіном у розвитку серцевої недостатності та ряду порушень ритму [9]. Родина ФНП відіграє ключову роль у дестабілізації атеросклеротичної бляшки, залучена до двобічної взаємодії між тромбоцитами та ендотеліоцитами/моноцитами, активації гладком'язових клітин судинної стінки, а також стимулює Т-лімфоцити. Це призводить до запуску запалення, деградації матриксу, формування тромбу та посилення процесів апоптозу. Залежні від ФНП шляхи призводять до тривалого перебігу запального процесу, дестабілізації атеросклеротичної бляшки та розвитку ГКС [10].

ІЛ-10 володіє численними протизапальними ефектами. У клінічних та експериментальних дослідженнях відмічена протективна роль згаданого цитокіну, що обумовлює стабільність атеросклеротичної бляшки [11].

**Висновки.** Моноцити в хворих на гострий коронарний синдром перебувають у стані хронічної активації, свідченням чого є надмірна спонтанна продукція прозапальних цитокінів ІЛ-1β та ФНП-α на тлі дефіциту протизапального ІЛ-10.

**Перспективи подальших досліджень.** Оптимізація терапії хворих на ГКС із урахуванням цитокінового дисбалансу та надмірної активації моноцитів.

## Література

- Einerson TR, Acs A, Ludwig C, Panton UH. Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17:83 DOI: <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0728-6>.
- Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Angelantonio D, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *emerging risk factors collaboration.* *Lancet.* 2010;375:2215-2222.
- Alfaddagh A, Khraishah H, Kassab M, McMillan Z, Albaghdadi M. Cardiovascular Outcomes Among Patients With Acute Coronary Syndromes and Diabetes in India: Results From ACS QUIK Trial. *Circulation.* 2021;144:A14544.
- Justo-Junior AS, Villarejos LM, Lima XTV, Nadruz W, Sposito AC, Mamoni R, et al. Monocytes of patients with unstable angina express high levels of chemokine and pattern-recognition receptors. *Cytokine.* 2019;113:61-67 DOI: [doi.org/10.1016/j.cyt.2018.06.008](https://doi.org/10.1016/j.cyt.2018.06.008).
- Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2018 Jan 7;39(2):119-177.
- Collet JP, Thiele H, Barabato E, Barthélémy O, Bauersachs J, Bhat DL, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J.* 2021 Apr 7;42(14):1289-1367.

7. ADA. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes – 2021. *Diabetes Care*. 2021;44(1):S15-S33.
8. Recalde HR. A simple method of obtaining monocytes in suspension. *J. Immunol. Meth.* 1984;69:71-77.
9. Szekeley Y, Arbel Y. A Review of Interleukin-1 in Heart Disease: Where Do We Stand Today? *Cardiol Ther.* 2018;7:25-44. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40119-018-0104-3>.
10. Aukrust P, Sandberg WJ, Otterdal K, Vinge LE, Gullestad L, Yndestad A, et al. Tumor necrosis factor superfamily molecules in acute coronary syndromes. *Annals of Medicine*. 2011;43:90-103 DOI: 10.3109/07853890.2010.523711.
11. Pinderski Oslund LJ, Hedrick CC, Olvera T, Hagenbaugh A, Territo M, Berliner JA, et al. Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(12):2847-53. DOI: 10.1161/01.atv.19.12.2847.

### МАРКЕРИ АКТИВАЦІЇ МОНОЦИТІВ У ХВОРИХ НА ГОСТРИЙ КОРОНАРНИЙ СИНДРОМ ТА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 2 ТИПУ

**Бондарєва О. О., Федоров С. В.**

**Резюме.** Вступ. За даними міжнародної федерації діабету 415 млн дорослого населення світу хворіє на цукровий діабет (ЦД), із них – 91% хворіють на ЦД 2 типу. Поширення ЦД зростає з часом. Особи з діабетом складають 8,8% популяції планети; прогнозовано даний показник зростає до 642 млн осіб у 2040 році. Серцево-судинні захворювання (ССЗ) складають головну причину смертності та інвалідизації в хворих на ЦД. Глобально ССЗ охоплюють 32,2% хворих на ЦД. Половину смертей при ЦД пов'язують із ССЗ. Хворі на ЦД частіше хворіють на гострий інфаркт міокарда (ІМ), серцеву недостатність чи помирають унаслідок ССЗ, порівняно з особами без діабету. Макрофаги, які утворюються з моноцитів, відіграють важливу роль в прогресуванні атеросклерозу. Субпопуляції циркулюючих класичних, проміжних та некласичних моноцитів відрізняються за фенотипом та функцією, а також беруть участь у прогресуванні атеросклерозу. Метою дослідження було визначення активності моноцитів/макрофагів у хворих на ГКС та супутній ЦД 2 типу шляхом оцінки спонтанної продукції ними ряду цитокінів. *Об'єкт і методи дослідження.* Обстежено 53 хворих на гострий коронарний синдром (ГКС): 29 пацієнтів із супутнім ЦД 2 типу та 24 пацієнтів – без ЦД. Контрольну групу склали 15 практично здорових осіб, відповідних за віком та статтю хворим на ГКС. Діагноз ГКС верифікований відповідно до Настанов Європейського кардіологічного товариства (2017 та 2020 років); діагноз ЦД 2 типу виставляли відповідно до Настанов Американської діабетологічної асоціації (2020 рік). Моноцити виділяли з крові за методом Н. Recalde. Спонтанну продукцію ними цитокінів (інтерлейкіну -1 $\beta$  (ІЛ-1 $\beta$ ), інтерлейкіну -10 (ІЛ-10) та фактору некрозу пухлин альфа (ФНП- $\alpha$ )) визначали методом імуноферментного аналізу.

*Результати дослідження.* Спонтанна продукція моноцитами прозапальних цитокінів (ІЛ-1 $\beta$  та ФНП- $\alpha$ ) була найвищою в хворих на ГКС та супутній ЦД 2 типу. Вміст ІЛ-1 $\beta$  у культуральному середовищі 1,5 раза перевищував показник в групі хворих на ГКС без та в 3,16 раза – показник контрольної групи ( $p < 0,001$ ). Показник спонтанної продукції ФНП- $\alpha$  моноцитами, виділеними в хворих на ГКС та супутній ЦД 2 типу, у 2,44 раза перевищував контрольні значення ( $p < 0,001$ ) та в 1,4 раза – подібний показник в групі хворих на ГКС без ЦД ( $p < 0,001$ ). Відмічений дефіцит екскреції протизапального цитокіну ІЛ-10 у хворих на ГКС, без вірогідної різниці в обох групах. Так, даний показник у хворих на ГКС та ЦД був нижчим у 2,91 раза від показника контрольної групи, а в хворих на ГКС без супутнього ЦД – у 2,69 раза ( $p < 0,001$ ).

*Висновки.* Моноцити в хворих на гострий коронарний синдром перебувають у стані хронічної активації, свідченням чого є надмірна спонтанна продукція прозапальних цитокінів ІЛ-1 $\beta$  та ФНП- $\alpha$  на тлі дефіциту протизапального ІЛ-10.

**Ключові слова:** гострий коронарний синдром, цукровий діабет, запалення, цитокіни, моноцити.

### THE MARKERS OF MONOCYTES ACTIVATION IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME AND 2 TYPE DIABETES MELLITUS

**Bondareva O. O., Fedorov S. V.**

**Abstract. Introduction.** The International Diabetes Federation (IDF) estimates that worldwide, 415 million people have diabetes, 91% of whom have type 2 diabetes mellitus (T2DM). The prevalence of T2DM has been steadily increasing over time. People with diabetes comprise 8.8% of the world's population, and IDF predicts that the number of cases of diabetes will rise to 642 million by 2040. Cardiovascular disease (CVD) is a major cause of death and disability among people with diabetes. Globally, overall CVD affects approximately 32.2% of all persons with T2DM. CVD is a major cause of mortality among people with T2DM, accounting for approximately half of all deaths over the study period. Patients with diabetes are more likely to experience an acute myocardial infarction, heart failure, or death from cardiovascular causes than patients without diabetes. Macrophages derived from monocytes play an important role in atherosclerosis progression. Subpopulations of circulating classical, intermediate, and non-classical monocytes possess distinct functions and phenotypes, and participate in the pathogenesis of disease.

**The aim of this study** was investigation of monocyte/macrophage activity in patients with acute coronary syndrome (ACS) and DM by evaluation of their spontaneous production of some cytokines.

**Material and methods.** We observed of 53 patients with ACS: 29 patients with concomitant 2 type DM and 24 patients without DM. 15 practically healthy persons were included into control group. The diagnosis of ACS was verified by laboratory and instrumental methods according to European Society of Cardiology guidelines (2017, 2020) The diagnosis of DM was verified by laboratory and instrumental methods according to American Diabetes Association guidelines (2020). Monocyte from blood were extracted by H. Recalde method. Spontaneous secretion of interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and IL-10 by monocytes was detected by ELISE method. The study was performed in accordance with the Good Clinical Practice Guideline and Helsinki Declaration. The p value of  $< 0.05$  was considered statistically significant. Analyses were performed with Statistica system software, version 12.0.

**Results.** The average age of observed patients with ACS was: (67.5±11.7) years; 31 persons (58.5%) among them were males. Acute MI with ST elevation (STEMI) was verified in 43 (81.1%) persons. No significant difference between clinical and demography parameters was observed in both groups with ACS. The spontaneous production by monocytes of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) was higher in patients with ACS and co-existing DM. The excretion of IL-1 $\beta$  was higher for 1.5 times versus patient with ACS without DM ( $p<0.01$ ) and for 3.16 times compare with control group ( $p<0.001$ ). The spontaneous production by monocytes of TNF- $\alpha$  in patients with ACS and DM was higher for 2.44 times, compare with control ( $p<0.001$ ), and for 1.4 times, compare with ACS patients without DM ( $p<0.001$ ). The decline of IL-10 excretion was observed in both groups of patients with ACS, compare with control group.

**Conclusion.** The monocytes of patients with ACS have pro-activation status, which characterized of high spontaneous production of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and down-secretion of anti-inflammatory IL-10.

**Key words:** acute coronary syndrome, diabetes mellitus, inflammation, cytokines, monocytes

**ORCID кожного автора та їх внесок до статті:**

Bondareva O. O.: 0000-0002-7749-3873 <sup>ABCD</sup>

Fedorov S. V.: 0000-0002-2202-4279 <sup>EF</sup>

**Конфлікт інтересів:**

Автори статті підтверджують відсутність конфлікту інтересів.

---

Адреса для кореспонденції

Федоров Сергій Валерійович

Івано-Франківський національний медичний університет

Адреса: Україна, 76008, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька 2

Тел.: +380668019504

E-mail: serfed@i.ua

---

**A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

*Рецензент – проф. Катеренчук І. П.*

*Стаття надійшла 02.05.2021 року*

*Стаття прийнята до друку 03.11.2021 року*