

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России)

На правах рукописи

**Осихов Иван Анатольевич**

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ  
ВИСЦЕРАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ В ПАТОГЕНЕЗЕ  
ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ**

14.03.03 – патологическая физиология  
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук,  
профессор Н.В. Рязанцева

доктор медицинских наук,  
профессор, академик РАН,  
Заслуженный деятель науки РФ  
В.В. Новицкий

Томск – 2016г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ .....	2
ВВЕДЕНИЕ .....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Определение, классификация и эпидемиология метаболического синдрома .	11
1.1.2. Роль метаболического синдрома в развитии социально значимых заболеваний .....	17
1.2. Абдоминальное ожирение – основной компонент метаболического синдрома .....	19
1.2.1. Гормональная активность жировой ткани при абдоминальном ожирении ..	20
1.2.2. Феномен воспаления жировой ткани: связь с абдоминальным ожирением .	23
1.2.3. Цитокины и их роль в развитии воспаления жировой ткани при метаболическом синдроме .....	24
1.3. Механизмы нарушения межклеточных взаимодействий в патогенезе воспаления жировой ткани .....	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	33
2.1. Объект исследования .....	33
2.2. Материал исследования .....	37
2.3. Методы исследования .....	38
2.3.1. Клинические методы исследования .....	38
2.3.2. Лабораторные методы исследования .....	41
2.3.2.1. Оценка нарушений углеводного обмена .....	41
2.3.2.2. Оценка нарушений липидного обмена.....	43
2.3.2.3. Оценка выраженности воспалительного процесса .....	46
2.3.2.4. Оценка структурно-функциональных свойств жировой ткани .....	48
2.3.2.4.1. Выделение и культивирование клеток жировой ткани .....	48
2.3.2.4.2. Гистологическое исследование жировой ткани.....	50
2.3.2.4.3. Оценка экспрессии CD-маркёров клетками жировой ткани .....	52

2.3.2.4.4. Оценка продукции активных форм кислорода клетками жировой ткани .....	55
2.3.2.4.5. Определение содержания цитокинов в супернатантах культуры жировой ткани .....	56
2.3.2.4.6. Оценка гормональной активности жировой ткани .....	57
2.3.2.4.7. Оценка уровня экспрессии матричной РНК клеток жировой ткани .....	60
2.3. Статистический анализ данных исследования .....	65
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ</b> .....	<b>67</b>
3.1. Клинико-патогенетические закономерности активности воспалительного процесса у пациентов с метаболическим синдромом .....	67
3.1.1. Взаимосвязь маркёров воспаления и нарушений метаболизма .....	67
3.1.2. Взаимосвязь гормональной активности жировой ткани, метаболических нарушений и активности воспаления у пациентов с метаболическим синдромом .....	71
3.2. Структурно-функциональные особенности жировой ткани у больных с метаболическим синдромом .....	77
3.2.1. Морфологические свойства висцеральной жировой ткани у больных с метаболическим синдромом .....	77
3.2.2. Особенности экспрессии CD-маркёров клетками жировой ткани у пациентов с метаболическим синдромом .....	85
3.2.3. Особенности спонтанной продукции активных форм кислорода клетками жировой ткани у пациентов с метаболическим синдромом .....	94
3.2.4. Особенности спонтанной продукции цитокинов клетками жировой ткани у пациентов с метаболическим синдромом .....	97
3.2.5. Особенности экспрессии мРНК адипоцитокинов клетками жировой ткани .....	106
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	<b>109</b>
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	<b>115</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	<b>116</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>118</b>

## ВВЕДЕНИЕ

В последнее время большое внимание исследователей привлекает проблема метаболического синдрома (МС) [Коваль С.Н., Снегурская И.А., 2013]. Согласно современным представлениям, МС – это комплекс метаболических и гормональных нарушений, являющийся предиктором развития и осложняющий течение сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета 2 типа (СД 2 типа) и других болезней, имеющих разные механизмы развития, прогноз и исход [Маколкин В.И., 2010; Cipolletta D. et al., 2011; Пинхасов Б.Б. и соавт., 2012; Kalurahana N. S. et al., 2012; Lumeng C. N., 2013].

По мнению ряда авторов, основным и обязательным компонентом МС является абдоминальное ожирение [Шишкин А.Н. и соавт., 2009; Park S. E. et al., 2012]. Представления о роли жировой ткани в организме в последнее время существенно изменились. Было показано, что жировая ткань весьма активна в метаболическом аспекте и не является инертным органом, служащим для накопления и хранения энергетических субстратов [Чубриева С.Ю. и соавт., 2008]. В жировой ткани синтезируется ряд пептидных гормонов – адипокинов, цитокинов, факторов роста и других соединений, обладающих эндокринным, паракринным и аутокринным действием [Шварц В.Я., 2009; Ивашкин В.Т., 2010].

Одним из патологических процессов, объединяющих абдоминальное ожирение и инсулинорезистентность, является хроническое субклиническое воспаление. Экспериментальные и клинические исследования, проведенные за последние годы, выявили, что нарушения секреции адипокинов и их метаболизма при абдоминальном ожирении приводят к воспалению жировой ткани [Ковалева О.Н. и соавт., 2009]. При этом основное внимание уделяется феномену развития воспаления в жировой ткани у людей при ожирении. В их организме адипокины вносят существенный вклад в развитие «тлеющего» хронического воспалительного процесса в жировой ткани [Кондаков И.К. и соавт., 2010]. Подтверждением воспаления жировой ткани является её клеточная инфильтрация с накоплением нейтрофилов, лимфоцитов и макрофагов, которые являются источниками провоспалительных цитокинов. Воспалительный процесс, главным

образом, влияет на метаболическую и секреторную функции жировой ткани и играет ведущую роль в развитии заболеваний, сопровождающихся ожирением: атеросклероза, МС, СД 2 типа [Шварц В.Я., 2009; Sun K. et al., 2011].

В настоящее время одним из наиболее развивающихся направлений биомедицинских исследований является изучение молекулярных механизмов нарушения кооперативных взаимодействий эффекторных клеток в развитии различных заболеваний. Предполагается, что межклеточная кооперация, осуществляя ключевую роль в регуляции гомеостаза клеток, определяет направление их дифференцировки, а также реализацию многих эффекторных клеточных функций [Lolmede K. et al., 2011].

Важную роль в становлении и стабилизации контактов между взаимодействующими клетками макроорганизма играет цитокин-рецепторная сеть. Жировая ткань представлена несколькими клеточными популяциями (адипоциты, мезенхимальные стромальные клетки и мононуклеарные лейкоциты), каждая из которых обладает цитокинсекретирующей активностью. Посредством цитокинов, синтезируемых и секретируемых клетками жировой ткани, осуществляются лиганд-рецепторные взаимодействия за счет связывания растворимых веществ с аффинным рецептором на клеточной поверхности [Toyoda T. et al., 2008; Иванов В.В. и соавт., 2013]. Дизрегуляция функционирования компонентов, составляющих основу межклеточной кооперации жировой ткани, может обуславливать возникновение в ней воспалительного процесса.

В целом, обзор литературы последних лет свидетельствует о том, что, несмотря на повышенный интерес исследователей к данной проблеме, молекулярные и клеточные механизмы развития воспаления жировой ткани при МС до настоящего времени остаются недостаточно изученными, а имеющиеся данные носят, порой, противоречивый характер.

### **Цель исследования**

Установить роль структурно-функциональных нарушений висцеральной жировой ткани в патогенезе воспаления при метаболическом синдроме.

### **Задачи исследования**

1. Установить роль нарушений гормональной активности висцеральной жировой ткани в патогенезе воспаления при метаболическом синдроме.
2. Дать комплексную оценку морфофункциональных свойств висцеральной жировой ткани у пациентов с метаболическим синдромом.
3. Установить взаимосвязь уровня продукции провоспалительных цитокинов, активных форм кислорода адипоцитами и мезенхимальными стромальными клетками с показателями гормональной активности висцеральной жировой ткани и маркерами воспаления в крови у пациентов с метаболическим синдромом.

### **Научная новизна**

Впервые установлено, что метаболические нарушения и сопровождающий их воспалительный процесс у пациентов с метаболическим синдромом тесно взаимосвязаны с гормональной активностью жировой ткани. При этом для женщин в этой взаимосвязи определяющее значение имеет гиперлептинемия, для мужчин – гипoadипонектинемия.

Впервые проведено комплексное исследование структурно-функциональных нарушений висцеральной жировой ткани и установлена их роль в патогенезе метаболического синдрома и сопряженного с ним воспаления. Обосновано, что структурные изменения висцеральной жировой ткани при метаболическом синдроме представлены не только увеличением размеров и объемной плотности адипоцитов, но и количества и объемной плотности инфильтратов, что характеризует воспаление жировой ткани при абдоминальном ожирении. Показано также, что в образовании клеточных инфильтратов в висцеральной жировой ткани принимают участие CD3+лимфоциты, CD36+ и CD68+ макрофаги.

Приоритетную новизну имеют данные о взаимосвязи диаметра адипоцитов и степени инфильтративных изменений в жировой ткани с клинико-

лабораторными показателями метаболического синдрома у пациентов с разным уровнем лептина в крови.

Впервые произведена оценка функциональной активности висцеральной жировой ткани (продукция провоспалительных цитокинов и содержание в адипоцитах и мезенхимальных стромальных клетках активных форм кислорода) и определена ее роль в патогенезе воспаления при метаболическом синдроме. Обосновано, что способность висцеральной жировой ткани к повышенной продукции провоспалительных цитокинов (интерлейкинов (IL) IL-1 $\beta$ , IL-8, MCP-1) и взаимосвязь ее как с компонентами метаболического синдрома, так и маркерами воспаления характеризует вклад жировой ткани в воспалительный ответ на системном уровне. Впервые установлено, что повышенный уровень активных форм кислорода в адипоцитах и мезенхимальных стромальных клетках и тесная его взаимосвязь с компонентами метаболического синдрома, включая уровень адипокинов и белков острой фазы в крови, объясняют роль свободнорадикального окисления в жировой ткани в патогенезе воспаления при данном симптомокомплексе.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Результаты проведенного исследования дополняют существующие на сегодняшний день фундаментальные представления о патогенезе метаболического синдрома и раскрывают роль структурно-функциональных нарушений висцеральной жировой ткани в механизмах воспаления, ассоциированного с данным симптомокомплексом.

Определена панель диагностически значимых маркеров воспаления при метаболическом синдроме, включающая морфологические характеристики (увеличение количества и объемной плотности инфильтратов) и показатели функциональной активности жировой ткани (повышение спонтанной продукции цитокинов и содержания активных форм кислорода). Обосновано, что в качестве диагностически значимого маркера воспаления жировой ткани при

метаболическом синдроме, определяемого в клинических условиях, может служить концентрация неоптерина в крови.

### **Методология и методы исследования**

Экспериментальный блок исследования выполнен с использованием висцеральной жировой ткани и венозной крови у пациентов с признаками метаболического синдрома. Для реализации поставленных задач были выбраны высокоинформативные методы исследований, которые проводились на базе Научно-образовательного центра (НОЦ) «Молекулярной медицины» и НОЦ «Инновационные технологии в медицине» ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России. Были использованы следующие методы исследования:

1. Оценка концентрации белков острой фазы (С-реактивный белок, фибриноген, неоптерин, гомоцистеин) и гормонов жировой ткани (адипонектин, висфатин, лептин, резистин) в сыворотке крови.
2. Морфометрия структурных элементов жировой ткани.
3. Культивирование клеток жировой ткани.
4. Определение концентрации цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1) в супернатантах жировой ткани.
5. Оценка экспрессии CD-маркеров (CD3, CD20, CD25, CD31, CD34, CD36, CD68, Vimentin, TGF  $\beta$ ) клетками жировой ткани методом иммуногистохимии и проточной цитофлуориметрии.
6. Оценка продукции активных форм кислорода клетками жировой ткани.
7. Оценка уровня экспрессии матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) цитокинов и гормонов жировой ткани методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).
8. Статистический анализ результатов исследования.



### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Воспалительный процесс при метаболическом синдроме характеризуется тесной взаимосвязью с метаболическими нарушениями (степень абдоминального ожирения, нарушения углеводного, липидного и пуринового обменов) и гормональной активностью висцеральной жировой ткани в виде гиперлептинемии и гипопродукции адипонектина.

2. Структурные изменения жировой ткани при метаболическом синдроме представлены увеличением размеров и объемной плотности адипоцитов, а также увеличением объемной плотности и количества инфильтратов, состоящих из CD3+, CD36+, CD68+ клеток.

3. Функциональная активность висцеральной жировой ткани при метаболическом синдроме характеризуется не только дисбалансом выделяемых ею адипокинов, но и повышенной продукцией провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-8, MCP-1), а также повышенным содержанием в адипоцитах и мезенхимальных стромальных клетках активных форм кислорода.

### **Степень достоверности и апробация работы**

Полученные результаты имеют высокую степень достоверности, которая подтверждается достаточным объемом материала для исследования, использованием современных и высокоинформативных методов исследования (иммуноферментный анализ, проточная цитофлуориметрия, иммуногистохимия, морфометрия, культивирование клеток), высокотехнологичного оборудования, надлежащих методик для статической обработки результатов.

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на VI Всероссийском конгрессе эндокринологов (Москва, 2012), III, IV, V и VI международном конгрессе «Кардиология на перекрестке наук» (Тюмень, 2012-2015), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Сахарный диабет, метаболический синдром и сердечно-сосудистые заболевания: современные подходы к диагностике и лечению» (Томск, 2012), Всероссийской научно-технической конференции «Энергетика: эффективность,

надежность, безопасность» (Томск, 2012-2014), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Эндокринология: пробелы, инновации, решения» (Томск, 2013), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 85-летию профессора Е.Н. Дормидонтова (Ярославль, 2013).

Исследование выполнено в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы (проект «Роль нарушений межклеточной кооперации в патогенезе воспаления жировой ткани при метаболическом синдроме», соглашение № 8601) и при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (научный проект «Идентификация молекулярных маркеров воспаления при метаболическом синдроме» № 13-04-01225).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликованы 42 работы, из которых – 14 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России; были получены 2 патента на изобретения.

### **Объем и структура диссертации**

Работа изложена на 136 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение собственных исследований», заключения, выводов, списка принятых в диссертации сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 21 рисунком и содержит 35 таблиц. Список источников цитируемой литературы включает в себя 183 работы, из которых 44 отечественных и 139 – зарубежных авторов. Автор работы принимал непосредственное участие в планировании исследования, разработке методических основ, анализе литературы. Автором были проведены исследования, проанализированы данные, представлены выводы и положения.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Определение, классификация и эпидемиология метаболического синдрома

В настоящее время метаболический синдром (МС) рассматривается как комплекс гормональных и метаболических нарушений, являющийся показателем развития, тяжелого течения и осложнений сердечно-сосудистых заболеваний, а также сахарного диабета (СД) 2 типа. Указанный комплекс включает гипергликемию, повышенное артериальное давление (АД), высокий уровень триацилглицеролов (ТАГ), низкий уровень холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), а также ожирение (особенно, центрального типа). В основе МС лежит инсулинорезистентность (ИР) и компенсаторная гиперинсулинемия [Симоненко В.Б. и соавт., 2011; Schipper H.S. et al., 2012; Terra X. et al., 2012; Zeyda M. et al., 2012; Blogowski W. et al., 2013].

Первое формальное определение МС было предложено в 1998 году консультативной группой ВОЗ по определению, классификации и диагностике сахарного диабета 2 типа [Alberti K.G. et al, 2009]. В этом определении ИР подчеркнута как основной фактор риска (доказательство наличия этого симптома было необходимым для установления диагноза МС). Диагноз МС на основе классификации ВОЗ (1998) базировался на нескольких маркерах ИР и двух дополнительных факторах риска, включающих ожирение, артериальную гипертензию, высокий уровень ТАГ, микроальбуминурию, сниженный уровень холестерина ЛПВП (табл. 1). Больные СД 2 типа не были исключены из диагноза МС.

Таблица 1

#### Критерии МС в соответствии с критериями ВОЗ (1998) [Alberti K.G. 1998]

Инсулинорезистентность, установленная одним из указанных признаков	<ul style="list-style-type: none"> <li>– СД 2-го типа;</li> <li>– измененный уровень глюкозы натощак;</li> <li>– нарушение толерантности к глюкозе;</li> <li>– или те пациенты с нормальным уровнем глюкозы (&lt;110 мг/дл), захват глюкозы у которых менее нижнего квартиля для основной популяции при исследовании в условиях гиперинсулинемии, эугликемии.</li> </ul>
--	--

С наличием 2-х любых дополнительных факторов из перечисленных	<ul style="list-style-type: none"> <li>– прием антигипертензивных препаратов и/или повышенный уровень АД (<math>\geq 140</math> мм рт. ст. систолическое или <math>\geq 90</math> мм рт. ст. диастолическое);</li> <li>– концентрация триацилглицеролов в плазме крови <math>\geq 150</math> мг/дл (<math>\geq 1,7</math> ммоль/л);</li> <li>– уровень холестерина ЛПВП <math>&lt; 35</math> мг/дл (<math>&lt; 0,9</math> ммоль/л) у мужчин или <math>&lt; 39</math> мг/дл (<math>&lt; 1,0</math> ммоль/л) – у женщин;</li> <li>– индекс массы тела (ИМТ) <math>&gt; 30</math> кг/м<sup>2</sup> поверхности тела и/или отношение окружности талии/бедра <math>&gt; 0,90</math> у мужчин, <math>&gt; 0,85</math> – у женщин;</li> <li>– экскреция альбумина с мочой <math>\geq 20</math> мкг/мин или соотношение альбумин/креатинин <math>\geq 30</math> мг/ч.</li> </ul>
---	--

Затем, в 2001 году были предложены критерии, сформулированные в III Докладе о лечении взрослых (АТР III (Adult Treatment Panel III, 2002)) [Alberti K.G. et al., 2005]. Критерии АТР III не требовали доказательства наличия инсулинорезистентности. Более того, в них не было ни одного фактора, наличие которого было бы обязательным, требовалось наличие любых 3-х из 5-ти факторов: абдоминальное ожирение (четко коррелирует с инсулинорезистентностью), повышенный уровень триацилглицеролов, сниженный уровень холестерина ЛПВП, повышенный уровень АД и повышенная концентрация глюкозы в крови натощак (измененный уровень глюкозы натощак или СД 2 типа) (табл. 2) [Кайдашев И.П., 2011].

Таблица 2

**Критерии МС в соответствии с АТР III (2001)**  
**[Alberti K.G. et al., 2005; Grundy S.M. et al., 2005]**

Фактор риска	Определяющий уровень
Абдоминальное ожирение*, представленное как окружность талии	$> 102$ см у мужчин $> 88$ см у женщин
Триацилглицеролы	$\geq 150$ мг/дл
Холестерин ЛПВП	$< 40$ мг/дл у мужчин $< 50$ мг/дл у женщин

## Продолжение таблицы 2

Фактор риска	Определяющий уровень
АД	$\geq 130/\geq 85$ мм рт. ст.
Уровень глюкозы натощак**	$\geq 110$ мг/дл

Примечание:\* – избыточная масса тела и ожирение ассоциированы с инсулинорезистентностью и МС. Наличие абдоминального ожирения более четко коррелирует с метаболическими факторами риска, чем повышенный ИМТ. Отдельные пациенты мужского пола могут демонстрировать метаболические факторы риска даже при пограничном увеличении окружности талии (94–102 см); \*\* - американская диабетическая ассоциация (American Diabetes Association – ADA) установила пограничное значение  $\geq 110$  мг/дл, - показатель, выше которого позволяет определить предиабет или диабет.

В 2005 году Международная федерация диабета (IDF) и Американская ассоциация сердца (AHA) совместно с Национальным институтом сердца, легких и крови (National Heart, Lung and Blood Institute – AHA/NHLBI) приняли новые критерии для клинической диагностики МС [Alberti K.G. et al., 2005; Grundy S.M. et al., 2005]. В этих критериях имеются отличающиеся рекомендации относительно окружности талии. Международная федерация диабета исключила требования ВОЗ (1998), касающиеся инсулинорезистентности, но сделала абдоминальное ожирение одним из необходимых факторов из пяти критериев для установления диагноза с особым акцентом на измерении окружности талии как простого метода скрининга; остальные критерии были идентичны таковым в соответствии АТР III.

Американская ассоциация сердца совместно с Национальным институтом сердца, легких и крови несколько модифицировали критерии III Доклада о лечении взрослых, но не выдвинули абдоминальное ожирение в качестве необходимого фактора риска. Более того, отсутствовало согласованное определение самого понятия «абдоминальное ожирение» между научными организациями (IDF и AHA/NHLBI). Так, если Международная федерация диабета рекомендовала порог для окружности талии как признак абдоминального ожирения для жителей Европы  $>94$  см для мужчин и  $>80$  см – для женщин; то эксперты Американской ассоциации сердца совместно с Национальным институтом сердца, крови и легких предложили совсем другие значения –  $>102$  см

и >88 см, соответственно [Grundy et al., 2004]. Последние показатели соответствуют определению абдоминального ожирения «Руководства по ожирению» Национальных институтов здоровья (National Institutes of Health – NIH) США. В настоящее время дискуссия между IDF и АНА/NHLBI по вопросу различий в определениях МС продолжается. Стороны сходятся во мнении о том, что абдоминальное ожирение не должно быть определяющим в установлении диагноза, а приниматься во внимание лишь в количестве одного из пяти критериев. Наличие же 3-х из 5-ти факторов является достаточным для диагностики МС (табл. 3).

Таблица 3

**Критерии МС в соответствии с IDF и АНА/NHLBI  
(2005 г, с модификацией 2009 г) [Alberti K.G. et al., 2009]**

Фактор риска	Определяющий уровень
Увеличение окружности талии	Определяется специфически для страны
Сниженный уровень холестерина ЛПВП (альтернативно применению препаратов для нормализации уровня холестерина ЛПВП*)	<40 мг/дл (1,0 ммоль/л) у мужчин <50 мг/дл (1,3 ммоль/л) у женщин
Повышенный уровень АД (альтернативно – применение антигипертензивных препаратов)	≥130 мм рт. ст. – систолическое и/или ≥85 – мм рт. ст. диастолическое
Повышение уровня глюкозы натощак (альтернативно – применение сахароснижающих препаратов**)	≥110 мг/дл

Примечание:\* - наиболее широко применяемыми препаратами для нормализации повышенного уровня триглицеролов и сниженной концентрации холестерина ЛПВП являются фибраты и никотиновая кислота. Применение ≥3 жирных кислот в высоких дозах предполагает высокий уровень триглицеролов; \*\* - у большинства пациентов с СД 2-го типа согласно предложенному критерию выявляют также наличие МС

Как видно из таблицы 3, для определения пороговых значений критериев МС необходимо учитывать следующие показатели: сниженный уровень холестерина ЛПВП, повышенный уровень АД, повышение уровня глюкозы натощак. Несколько авторитетных международных организаций предложили такие значения для людей разных этнических групп и стран (табл. 4) [Alberti K.G. et al., 2009].

**Современные рекомендации пороговых значений окружности талии  
для определения абдоминального ожирения  
[Alberti K.G. et al., 2009; Thaman R.G., Arora G.P., 2013]**

Популяция	Экспертная группа	Рекомендованное пороговое значение окружности талии для определения абдоминального ожирения, см	
		мужчины	женщины
Европеоиды	IDF (2005)	≥94	≥80
Народы Кавказа	ВОЗ (2000)	≥94 (повышенный риск) ≥102 (высокий риск)	≥80 (повышенный риск) ≥88 (высокий риск)
США	АНА/NHLBI (АТР III) (1998)*	≥102	≥88
США	АНА/NHLBI (2009)	>94	>80
Канада	Health Canada (2003; 2006)	≥102	≥88
Европейцы	Европейские сердечно-сосудистые общества (2007)	≥102	≥88
Азия (включая Японию)	IDF (2005)	≥90	≥80
Азия	ВОЗ (2006)	≥90	≥80
Японцы	Японское общество по изучению ожирения (Japan Society for the Study of Obesity – JASSO) (2008)	≥85	≥90
Ближний Восток, Средиземноморье	IDF (2005)	≥94	≥80

Примечание:\* - в 2009 г. АНА/NHLBI определило для установления диагноза МС и риска развития сердечно-сосудистых заболеваний окружность талии ≥94 см у мужчин и ≥80 см – у женщин [по данным Alberti K.G. et al., 2009]

Таким образом, выше были представлены наиболее часто используемые критерии, предложенные Международной федерацией диабета и Американской ассоциации сердца совместно с Национальным институтом сердца, легких и крови для установления диагноза МС в 2009 году. В рамках обсуждаемой проблемы важно подчеркнуть необходимость одинаковых подходов к выявлению этиологии МС, установлению диагноза с согласованными пороговыми значениями критериев синдрома для каждой этнической группы. Однако в

современном мире в большой степени проживают люди смешанной национальности, что еще более затрудняет установление пороговых значений для определения распространенности МС в странах и популяциях [Thaman R.G., Aroga G.P., 2013].

В течение последних десяти лет были проведены широкомасштабные эпидемиологические исследования по изучению распространенности МС в развитых странах, в Азии и в странах Ближнего Востока. Из-за применения различных критериев определения МС получение данных на основании сравнительного анализа затруднено. Согласно метаанализу, проведенному американским ученым S. Grundy, метаболическим синдромом страдают 15-25% взрослого населения земного шара [Alberti R. et al., 2009; Kassi E. et al., 2011]. Такие параметры, как возраст, поведенческие факторы, пол, расовая принадлежность, а также социальный статус, играют важную роль в развитии МС (рис. 1). По прогнозу экспертов ВОЗ, в ближайшие 20 лет ожидается увеличение числа пациентов с признаками МС на 50% [Майданник В.Г., 2014].

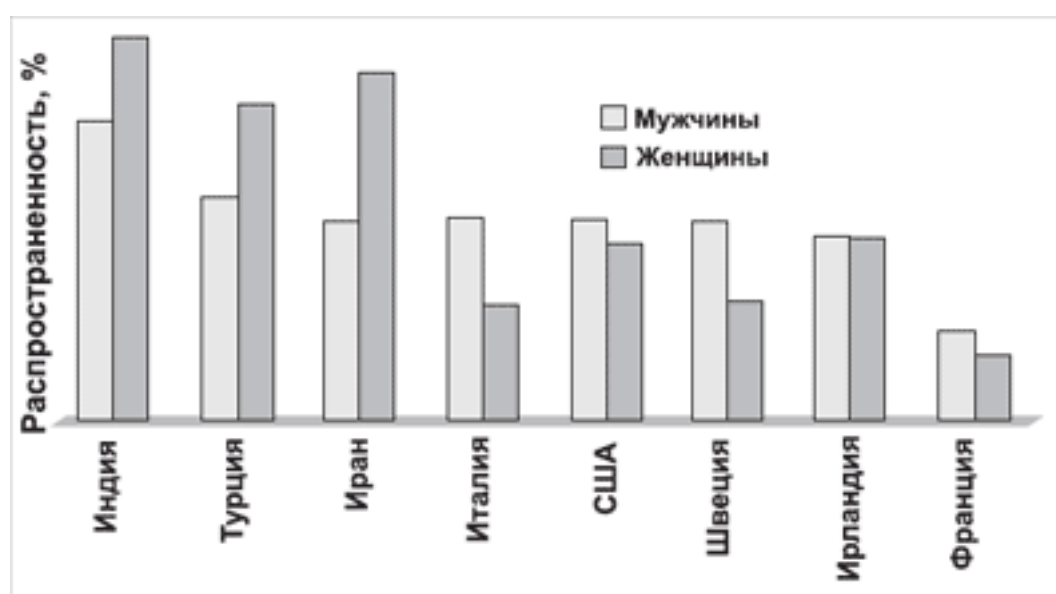


Рис. 1. Метаанализ эпидемиологических исследований [по данным S. Grundy et al., 2004]

При этом критерии постановки диагноза МС должны иметь особенности в различных популяциях. Прогностическое развитие изучаемого синдрома, как



самостоятельного фактора риска осложнений, также до сих остается не вполне ясным и служит предметом научных дискуссий. В ряде популяций, в том числе и в России, распространенность МС и его критерии известны не полностью [Sidorenkov O. et al., 2010]. В настоящее время показано, что распространенность МС существенно варьирует в различных популяциях и в большей степени зависит от используемых критериев диагностики, которые до настоящего времени четко не определены. Таким образом, изучение эпидемиологии МС остается актуальной проблемой для современной медицины.

### **1.1.2. Роль метаболического синдрома в развитии социально значимых заболеваний**

Одним из важных параметров в изучении МС является его участие в развитии сердечно-сосудистых осложнений. На основании данных скандинавского исследования «Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factors Study», длившегося 11 лет, среди больных с МС риск развития ИБС в 3-4 раза выше, а смертность от ИБС и других причин в 2-3 раза выше, по сравнению с соответствующими показателями у пациентов без метаболических нарушений [Красильникова Е.И., 2011]. По данным, полученных в проспективном исследовании «Botnia study», была показана роль отдельных факторов риска и МС в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, обусловленных атеросклерозом. Так, у пациентов с МС риск развития ИБС, инфаркта миокарда и инсульта головного мозга оказался в два раза выше, по сравнению с лицами с отдельными факторами риска (они же являются компонентами МС). Связь МС с инсультом головного мозга подтверждается и в исследовании «ARIC study». Было показано, что у пациентов с МС инциденты развития ишемического инсульта оказались в 2 раза выше, чем у лиц без МС [Tsai A.G., 2008].

Наряду с сердечно-сосудистыми заболеваниями, СД 2 типа также рассматривается как осложнение МС. Американский ученый S. Haffner провел метаанализ трех проспективных исследований (IRAS, MCDC и SAHS), продолжительностью 5,0–7,5 лет, в которых отслеживались инциденты развития

СД 2 типа у пациентов различных клинических групп с метаболическими нарушениями и (в том числе) с нарушением толерантности к глюкозе (НТГ). Было показано, что у пациентов с МС и нарушением толерантности к глюкозе риск развития сахарного диабета был в 2,5 раза выше, по сравнению с лицами с нарушением толерантности к глюкозе и без метаболического синдрома (рис. 2) [Alshehri A.M., 2010].

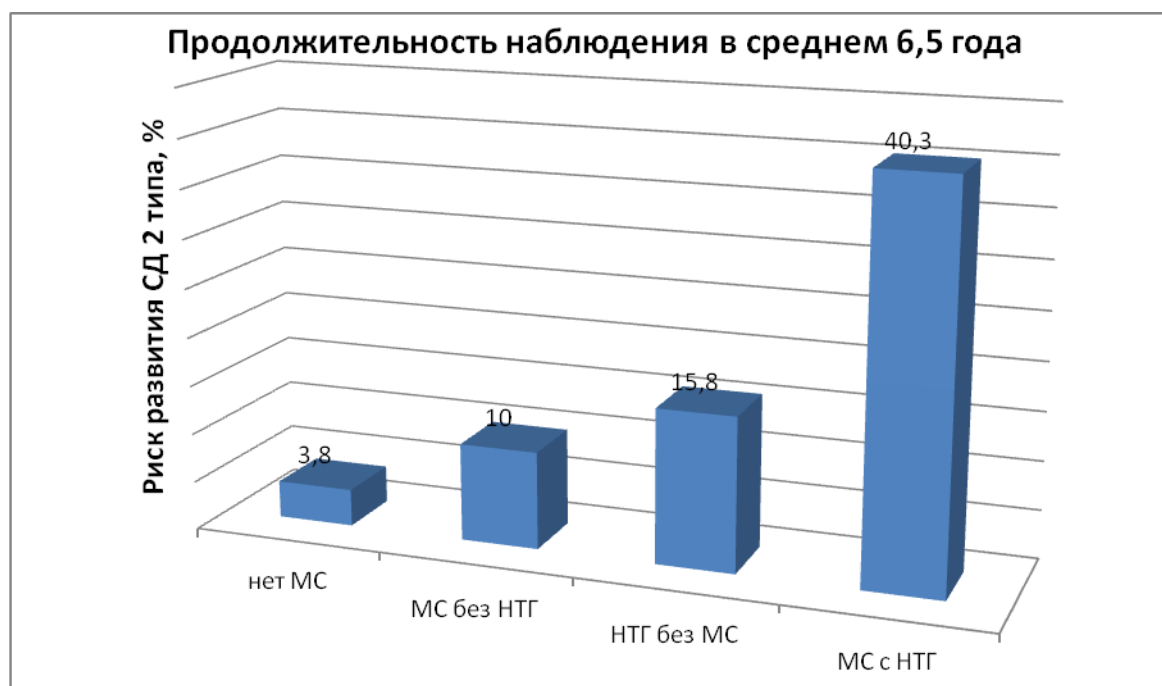


Рис. 2. Метаанализ трех проспективных исследований (IRAS, MCDC и SAHS): развитие сахарного диабета у больных с МС [по данным S.M. Haffner, 2006]

Таким образом, результаты эпидемиологических исследований свидетельствуют о чрезвычайно высокой распространенности МС: признаки МС обнаруживаются, по меньшей мере, у каждого пятого жителя планеты, при этом число людей из группы риска непрерывно растет. Большинство пациентов с МС – это лица трудоспособного возраста, наиболее продуктивная и значимая для общества популяция. Эксперты ВОЗ считают, что это может оказаться демографической катастрофой для развитых и развивающихся стран. В связи с этим данная проблематика остается чрезвычайно актуальной и требует дальнейших исследований.

## 1.2. Абдоминальное ожирение – основной компонент метаболического синдрома

Абдоминальное (висцеральное, центральное) ожирение играет значимую роль в патогенезе метаболического синдрома. Согласно определениям Международной диабетической федерации и Всероссийского научного общества кардиологов, абдоминальное ожирение является основным компонентом метаболического синдрома [Маколкин В.И., 2010; Мычка В.Б., 2010; Mottillo S. et al., 2010]. Известно, что при абдоминальном ожирении в кровоток выбрасывается значительное количество неэстерифицированных (свободных) жирных кислот (НЭЖК), которые по портальной вене коротким путем поступают в печень. Здесь они утилизируются двумя путями: или превращаются в глюкозу через процессы глюконеогенеза, или используются для синтеза триацилглицеролов (ТАГ). В результате этих процессов в кровоток поступает избыточное количество глюкозы, вслед за чем развиваются гиперинсулинемия и инсулинорезистентность тканей [Lattimer J.M., Haub M.D., 2010]. Повышенный синтез ТАГ в печени влечет за собой активацию синтеза основного белка липопротеинов низкой и очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП) – аполипопротеина (апо) В и увеличение секреции в кровоток ЛПОНП. Развивается гипертриацилглицеролемиа, которая при активном процессе липопротеинлиполиза ЛОНП может сопровождаться нарастанием и уровня ЛПНП, особенно подфракции мелких плотных частиц [Despres J-P., Lemieux I., 2006]. Такие мелкие плотные ЛПНП обладают повышенной атерогенностью, так как в большей степени подвержены окислению и активному захвату макрофагами.

Выделение абдоминального ожирения в качестве обязательного компонента метаболического синдрома имеет большое практическое значение, поскольку выраженность абдоминального ожирения можно легко контролировать, достаточно лишь измерить ряд антропометрических показателей таких как окружность талии (ОТ) и отношение окружность талии/окружность бедер (ОТ/ОБ) [Бурков С.Г., Ивлева А.Я., 2010].

В настоящее время абдоминальное ожирение является одним из наиболее распространенных хронических заболеваний и может приводить к ранней инвалидизации и летальности больных трудоспособного возраста. Разработка и дальнейшее изучение новых комплексных подходов, противодействующих нарушениям регуляции энергетического обмена у больных с абдоминальным ожирением, будут являться одним из приоритетных направлений современной медицины.

### **1.2.1. Гормональная активность жировой ткани при абдоминальном ожирении**

Жировая ткань представляет собой многофункциональный орган, отвечающий не только за депонирование жира, но и за выработку многочисленных биологически активных молекул, к числу которых относятся, прежде всего, адипонектин, лептин, резистин и висфатин [Ronti T. et al., 2006].

Продукт гена *Adipoq* (адипонектин) – гормон, который синтезируется и секретируется жировой тканью (преимущественно адипоцитами подкожной жировой ткани). При ожирении отмечается снижение активности и количества адипонектина в крови [Fain J.N. et al., 2004; Косыгина А.В. и соавт., 2010]. Показано, что адипонектин тормозит дифференцировку преадипоцитов, что подтверждает его возможное влияние на регуляцию жировой ткани. Уровень адипонектина в плазме крови обратно пропорционален массе жировой ткани и показателю ОТ/ОБ (объем талии к объему бедер). Адипонектин регулирует энергетический гомеостаз и оказывает противовоспалительный и антиатерогенный эффекты [Fernandes-Real J.M., Ricard W., 2003]. Уровень адипонектина снижается при ожирении; предполагается, что развитие СД 2 типа может быть связано с нарушением регуляции секреции адипонектина [Xiaonan L. et al., 2008]. Группой учёных из США под руководством Y. Takemura удалось исследовать молекулярные механизмы действия адипонектина на иммунокомпетентные клетки при воспалении [Takemura Y. et al., 2007]. Установлено, что адипонектин

стимулирует эффективное очищение очага воспаления от погибших клеток, благодаря действию на поверхностные белки макрофагов. Среди этих белков ведущую роль играет кальретикулин. В результате такого действия макрофаги усиливают свою функцию и начинают активно фагоцитировать всегда появляющиеся при воспалении погибшие клетки и их фрагменты в жировой ткани. Очаг воспаления быстро очищается, и воспалительный процесс не переходит в хроническую форму [Ghigliotti G. et al., 2014].

В настоящее время гормон жировой ткани лептин активно изучается с позиций различных состояний, ассоциированных с инсулинорезистентностью. Он представляет собой специфический адипоцитокин, который синтезируется только в адипоцитах. Открытие лептина существенно изменило взгляд на роль жировой ткани в патогенезе ряда заболеваний, включая МС [Potenza M.V., Mechanick J.I., 2009; Martins M.C. et al., 2012]. Ведущими биологическими функциями лептина являются: регуляция гомеостаза жирных кислот, энергетического гомеостаза, контроль действия инсулина на глюконеогенез, транспорт глюкозы. Установлено, что при МС развивается относительная лептинорезистентность с компенсаторным повышением содержания лептина в крови – гиперлептинемией [Yadav A. et al., 2013]. Состояние инсулинорезистентности способствует снижению концентрации лептиновых рецепторов и повышению уровня лептина в крови. В таких условиях развивается трансформация эффектов лептина: он приобретает свойства активировать воспаление, стимулировать кальцификацию сосудов, инициировать окислительный стресс, повышать тонус симпатической нервной системы, изменять цитокиновую регуляцию, что играет важную роль в патогенезе воспалительных поражений [Клебанова Е.М., Балаболкина М.И., 2010]. Высокая концентрация лептина в плазме крови нередко сопровождается эндотелиальной дисфункцией, окислительным стрессом, провоспалительной и противовоспалительной цитокинемией. Лептин структурно гомологичен с TNF- $\alpha$ , IL-6 и другими семействами цитокинов, вследствие чего он считается цитокиноподобной субстанцией [Ozcelik F. et al., 2013].

Участие резистина в стимуляции механизмов воспаления, активации эндотелия и пролиферации клеток гладкой мускулатуры сосудов дает возможность рассматривать его как маркер или, даже, этиологический фактор развития заболеваний. Он влияет на жировой обмен по принципу обратной связи: с одной стороны, его концентрация повышается при дифференцировке адипоцитов, с другой, – резистин подавляет адипогенез. Резистин, как причина инсулинорезистентности, может быть связующим звеном между ожирением и развитием сахарного диабета, а также гипертонической болезни [Pang S.S., Le Y.Y., 2006; Qatanani M. et al., 2009]. На современном этапе биологические эффекты резистина в организме человека до конца не выяснены [Redinger R.N., 2007; Park H-K. et al., 2011; Makni E. et al., 2013].

В последнее время идентифицирован еще один гормон жировой ткани – висфатин, ген которого экспрессируется в висцеральном жире и способствует его дальнейшему накоплению [Terra X. et al., 2012; Al-Suhaimi E.A., Shehzad A., 2013]. Не исключено, что висфатин оказывает свое биологическое действие не только через специфические, но и через инсулиновые рецепторы. мРНК висфатина определяется в мононуклеарах крови у больных СД 2 типа, и ее количество в несколько раз выше у больных СД 2 типа, по сравнению с таковым у пациентов с диабетом, имеющими дефицит веса, или практически здоровыми лицами. Уровень висфатина в циркулирующих клетках крови напрямую коррелирует с индексом массы тела, окружностью талии и индексом инсулиновой резистентности. Считается, что висфатин участвует в патогенезе сосудистых осложнений диабета и атерогенезе [Школьник В.В., Андреева А.А., 2009; Kadoglou N.P. et al., 2010; Драпкина О.М. и соавт., 2011]. Висфатин обладает иммуностропным действием и является фактором роста для ранних В-клеток. Секреция висфатина осуществляется макрофагами жировой ткани, продуцирующими медиаторы воспаления. Отмечено дозозависимое влияние висфатина на продукцию про – и противовоспалительных цитокинов (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ). Это обстоятельство, а также положительная корреляция с концентрацией С-реактивного белка позволяет рассматривать нарушения его секреции и функции

в качестве одного из патогенетических факторов системного воспаления при МС [Кузьмина-Крутецкая С.Р., Репина М.А., 2011].

Адекватная коррекция секреции гормонов жировой ткани, участвующих в повышении степени выраженности инсулиновой резистентности, или восстановление до нормальных значений содержания адипонектина в сыворотке крови будут способствовать компенсации нарушений углеводного обмена при сахарном диабете и профилактике развития сосудистых осложнений. Таким образом, изучение особенностей гормонального статуса пациентов с МС является актуальным направлением при изучении патогенеза воспаления жировой ткани, ассоциированным с метаболическим синдромом.

### **1.2.2. Феномен воспаления жировой ткани: связь с абдоминальным ожирением**

Одним из наиболее обсуждаемых в последние годы процессов, объединяющих инсулинорезистентность и абдоминальное ожирение, является хроническое вялотекущее воспаление [Чукаева И. И., 2010; Dallmeier D., 2012]. Воспалительный процесс в жировой ткани характеризуется изменениями, характерными для воспаления другой локализации и природы. При этом механизмы его разнообразны и реализуются на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях [Nishimura S., 2009].

Экспериментальные и клинические зарубежные исследования последних лет выявили феномен сопровождения висцерального ожирения воспалением жировой ткани. При этом воспалительный процесс в жировой ткани характеризуется инфильтрацией нейтрофилами и лимфоцитами, несколько позже макрофагами, которые преобладают количественно и определяют дальнейшее развитие воспалительного процесса. Секретирующиеся клетками жировой ткани адгезивные молекулы и хемокины вызывают воспалительную клеточную инфильтрацию. Воспаление жировой ткани – это процесс самоподдерживающийся, способствующий дальнейшему развитию и прогрессированию как воспаления, так и ожирения. Поскольку воспалительный

процесс в жировой ткани подчиняется общепатологическим закономерностям, ожирение характеризуют как хроническое воспалительное заболевание [Wimalawansa S.J., 2013].

Отличием воспаления в жировой ткани от воспалительного процесса другой локализации является то, что оно реализуется в ткани, доля которой может составлять 50% массы тела и более, вследствие чего следует ожидать значительных системных последствий. Висцеральная жировая ткань, вовлекаясь в процесс воспаления, способна синтезировать и выделять в кровь высокоактивные вещества – адипокины, в том числе и провоспалительные цитокины, поддерживая таким образом системный воспалительный ответ. Источником провоспалительных цитокинов являются не только адипоциты, но и макрофаги, образующиеся из моноцитов, внедрившихся из крови в жировую ткань, а также лимфоциты [Monteiro R., Azevedo I., 2010; Zhao D., Liu H., 2013].

Таким образом, воспалительная реакция в жировой ткани опосредуется сложными межклеточными взаимодействиями с вовлечением молекул цитокиновой сети и активных форм кислорода. Лечение и профилактика ожирения, МС и ассоциированных с ним заболеваний в настоящее время проводится без учета воспаления жировой ткани, что объясняется отсутствием полного понимания механизмов этого явления.

### **1.2.3. Цитокины и их роль в развитии воспаления жировой ткани при метаболическом синдроме**

Открытие феномена воспаления жировой ткани явилось основанием для целого направления фундаментальных исследований, касающихся изучения его патогенеза и роли в развитии сопровождающих ожирение патологических состояний. Свидетельством этого является описанная в литературе инфильтрация жировой ткани иммунокомпетентными клетками (макрофагами и лейкоцитами) [Nishimura S. et al., 2008; Lumeng C.N. et al., 2009; Kiefer F. W et al., 2010]. Клетки иммунной системы – основной источник биологически активных веществ



(цитокины и хемокины) в организме, которые, взаимодействуя посредством цитокиновой сети с другими клеточными популяциями, определяют локальный провоспалительный статус жировой ткани, названной рядом авторов, органом иммунной системы [Шварц В., 2009].

Цитокины представляют собой регуляторные белки, под контролем которых протекают все клеточные события в организме. Это эндогенные медиаторы, которые могут синтезироваться практически всеми ядродержащими клетками организма. Все они имеют ряд общих биохимических характеристик, к важнейшим из которых относятся плеiotропность и взаимозаменяемость биологического действия, отсутствие антигенной специфичности, проведение сигнала путем взаимодействия со специфическими клеточными рецепторами, формирование цитокиновой сети. Нормальное функционирование иммунной системы характеризуется физиологическим балансом продукции клетками цитокинов разных функций, образующих цитокиновую сеть и регулирующих не только интенсивность иммунных реакций, процессы пролиферации и дифференцировки клеток, но и особенности клеточных коммуникаций [Tilg H., Moschen A.R., 2008; Makki K. et al., 2013].

Цитокины, секретируемые клеткой, действуют преимущественно локально. Их влияние распространяется паракринно (на клетки окружения), аутокринно (на клетки-продуценты) и, в меньшей степени, эндокринно (на клетки удаленных органов) [Hotamisligil G.S., 2006]. В связи с этим более целесообразно измерять концентрацию цитокинов в соответствующих тканях (клетках). Из данных литературы известно, что межклеточная кооперация играет ключевую роль в регуляции клеточного гомеостаза. При этом наиболее удобной моделью для изучения этого механизма является иммунная система [Guilherme A. et al., 2008].

Известно, что клетки жировой ткани при ожирении также секретируют различные воспалительные цитокины – интерлейкин-6 (IL-6), фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) и др. [Nardo D.D., Latz E., 2011]. Полагают, что нарушенная регуляция с повышением продукции этих провоспалительных медиаторов над противовоспалительными адипокинами (адипонектин) является основным

механизмом, лежащим в основе неблагоприятных метаболических и сердечно-сосудистых последствий МС. Активация провоспалительных метаболических путей в адипоцитах ослабляется при накоплении триацилглицеролов и увеличивает высвобождение свободных жирных кислот, избыток которых вызывает инсулинорезистентность в мышцах и в печени [Gustafson. В., 2010]. Таким образом, хроническое воспаление, по-видимому, является клинически важным изменением, развивающимся в жировой ткани, когда наступает ожирение [Gillum M.P., 2011].

Жировую ткань, как орган, состоящий из нескольких клеточных популяций, и ее воспаление при ожирении с таких позиций стали изучать совсем недавно, главным образом зарубежные исследователи [Sun S. et al., 2012]. Однако различия в дизайне и используемых методах исследования затрудняют сопоставление результатов, и имеющиеся на сегодня данные носят неоднозначный, а порой даже противоречивый характер.

### **1.3. Механизмы нарушения межклеточных взаимодействий в патогенезе воспаления жировой ткани**

Жировая ткань представлена несколькими клеточными популяциями. Известно, что только на 50% она состоит из зрелых адипоцитов, остальные 50% клеток представлены стромальными клетками, к числу которых относятся преадипоциты, фибробласты, макрофаги и лимфоциты [Nishimura S. et al., 2007; Шварц 2009]. Каждая из этих клеточных популяций обладает цитокинсекретирующей способностью (табл. 5).

Адипоциты – это клетки, в которых при нормальных условиях происходит синтез липидов, накопление и секреция противовоспалительных молекул; в этих клетках может быть также индуцирована секреция множества провоспалительных факторов, таких как MCP-1, IL-6 и др. [Lucas S., et al., 2009; Roubicek T. et al., 2009]. Действуя как трансмиттеры эндокринных или паракринных сигналов, секретированные адипокины могут выступать в роли пусковых факторов как воспаления, так и инсулинорезистентности. Масса жировой ткани при ожирении

может зависеть как от числа, так и от размера адипоцитов. Количество адипоцитов устанавливается в молодом возрасте; изменения массы жировой ткани взаимосвязаны с изменением размеров жировых клеток [Trauhurn P., Wood I.S, 2005]. Обнаружено, что большинство случаев ожирения, формирующегося у взрослых людей, связано с увеличением объема адипоцитов; увеличенные адипоциты – это фактор ожирения, имеющий тесную взаимосвязь с инсулинорезистентностью. Увеличенные адипоциты в висцеральной жировой ткани характеризуются состоянием повышенного липолиза и резистентностью к эффектам инсулина. Изначально считалось, что адипоциты являются основным источником медиаторов воспаления, полученных из жировой ткани [Ye J., 2009; Yin J., et al., 2009].

В последнее время обнаружено, что жировая ткань при ожирении инфильтрирована макрофагами и другими клетками, находящимися в строме, которые также участвуют в регуляции продукции медиаторов, в частности, воспалительных цитокинов [Tilg H., Moschen A.R.. 2008].

Таблица 5

**Биологически активные вещества, синтезируемые клетками жировой ткани**

Тип клеток в жировой ткани	Адипокины, цитокины	Авторы
Адипоциты	Адипонектин	Esteve E. et al., 2009 Maury E., Brichard S.M., 2009
	Лептин	Galic S. et al., 2010 Matarese G., et al., 2010 Falcao-Pires I., et al., 2012
	Резистин	Gonzalez-Periz and Claria J., 2010 Piya M.K., et al., 2013

Тип клеток в жировой ткани	Адипокины, цитокины	Авторы
	Апелин	Kunduzova O. et al., 2008 Dray C. et al., 2010
	MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)	Kamei N., 2006 Kanda H., 2006 Vachharajani V., Granger D.N., 2009 Lucas S. et al., 2009
	Ингибитор активатора плазминогена - 1	Rasouli N., Kern P.A., 2008
Адипоциты	Компоненты ренин-ангиотензиновой системы	Carroll W.X. et al., 2013 Jing F. et al., 2013
	Адипсин и стимулирующий ацилирование протеин	Blogowski W. et al., 2013
Макрофаги	Висфатин	Terra X., et al., 2012 Mattu H.S., Randeve H.S. et al., 2013
	ФНО- $\alpha$	Шварц В., 2009 Suganami T., Ogawa Y., 2010
	ИЛ-6	Tulig H., 2008 Шварц В., 2009

В настоящее время мало известно о механизмах инфильтрации макрофагами жировой ткани. Кроме макрофагов, в жировой ткани в небольших количествах обнаруживаются лимфоциты, в частности натуральные киллеры (NK-клетки) [Cipolletta D. et al., 2012; Schipper H.S., 2012], которые также могут способствовать воспалению жировой ткани. Известно, что при ожирении циркулирующие иммунокомпетентные клетки обладают провоспалительной активностью и принимают участие в развитии эндотелиальной дисфункции. Хемотаксис моноцитов крови в жировую ткань – это достаточно сложный процесс, требующий экспрессии молекул адгезии как на моноцитах, так и на эндотелиальных клетках, к которым они прикрепляются [Lumeng C.N., 2007].

Необходимым фактором активации иммунокомпетентных клеток и их проникновения в жировую ткань является образование и секреция адипоцитами хемокинов. Наиболее значимыми из них являются MCP-1 и его рецептор CCR2 (С-С рецептор хемокина 2). Хемокины способствуют адгезии моноцитов и их проникновению через стенку сосудов в жировую ткань с последующим преобразованием их в макрофаги [Maury E., Brichard S.M., 2010].

Считается, что инфильтрация жировой ткани макрофагами является обязательным звеном в механизмах нарушения обмена веществ. Появляется все больше доказательств того, что активация макрофагов играет существенную роль в нарушении метаболизма. Установление роли макрофагов в патогенезе МС и абдоминального ожирения может помочь в разработке технологических основ иммунометаболической терапии заболеваний, связанных с нарушением обмена [Wu D., 2011].

При этом феномен инфильтрации макрофагами жировой ткани был описан как у лабораторных животных, так и у людей [Michaud A. et al., 2013; Sorisky A. et al., 2013]. Установлена прямая взаимосвязь степени ожирения и количества макрофагов в жировой ткани [Cancello R., Clement K., 2006]. У лиц с выраженным ожирением макрофаги могут составлять до 40% от общего числа клеток жировой ткани. Обнаружено, что инфильтрация макрофагами происходит в период накопления жира с быстрым повышением массы тела и провоцируется острой и хронической перегрузкой липидами. Снижение массы тела способствует уменьшению активности воспаления в жировой ткани и взаимосвязано с уменьшением инфильтрации макрофагами; при этом инсулинорезистентность и метаболический дисбаланс становятся менее выраженными. Имеется точка зрения, что макрофаги являются ключевыми эффекторными клетками, участвующими в воспалении жировой ткани [Murano I. et al., 2008].

При детальной оценке иммунных реакций в различных органах и тканях выявлены два фенотипа макрофагов: M1 – провоспалительные и M2 – противовоспалительные [Winer S., 2009]. При ожирении определяются оба типа клеток. Изменения соотношения M1- и M2- макрофагов характеризуют

провоспалительный статус жировой ткани при ожирении. При морфометрии жировой ткани было установлено, что 90% макрофагов сосредотачиваются вокруг гипертрофированных или погибших адипоцитов; большая часть этих клеток относится к провоспалительному фенотипу M1. Этот факт является основанием для предположения, что участие в индукции апоптоза измененных адипоцитов является одной из функций макрофагов при ожирении. При этом обнаружена прямая взаимосвязь между апоптозом и размерами адипоцитов, а также высказано предположение, что гибель адипоцитов облегчает запуск макрофагальной инфильтрации [Cinti S. et al., 2005].

Макрофаги жировой ткани считаются основным источником провоспалительных цитокинов, играющих важную роль в развитии воспаления в жировой ткани при ожирении. Паракринная активность адипоцитов и макрофагов была обнаружена на модели культуры клеток. Было установлено, что паракринный цикл с участием свободных жирных кислот и провоспалительных цитокинов создает порочный круг между макрофагами и адипоцитами [Nguyen M. T. et al., 2007]. Свободные жирные кислоты, уровень которых повышен при усилении липолиза в адипоцитах, способствуют активации воспалительных киназ в ядрах клеток, которые, в свою очередь, стимулируют экспрессию ряда провоспалительных цитокинов (MCP-1, TNF $\alpha$  и IL-6) [Kim J.Y. et al., 2007].

В результате взаимодействия между адипоцитами и макрофагами возникает цитокиновый дисбаланс (повышенная продукция провоспалительных и значительно сниженная продукция противовоспалительных адипоцитокинов), который лежит в основе развития ряда патологических процессов и заболеваний, ассоциированных с ожирением (атеросклероз, СД 2 типа, стеатоз печени). Воспаление жировой ткани при ожирении сопровождается повышением секреции адипсина, лептина, резистина и других провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6), а также хемокинов. При этом секреция таких адипокинов, как адипонектин и висфатин обычно снижена (рис. 3) [Kedika D. et al., 2010; Yang H. et al., 2010; Gerner R.R. et al., 2013]. С другой стороны, повышенная продукция MCP-1 стимулирует инфильтрацию макрофагами жировой ткани и вызывает

инсулинорезистентность в скелетных мышцах и в печени [Kolattukudy P.E., Niu J., 2012].

Таким образом, патогенез воспаления жировой ткани с позиций оценки структурно-функциональных нарушений висцеральной жировой ткани является до конца неизученным. Дальнейшие исследования данного вопроса помогут лучше понять вклад жировой ткани в системный воспалительный ответ.

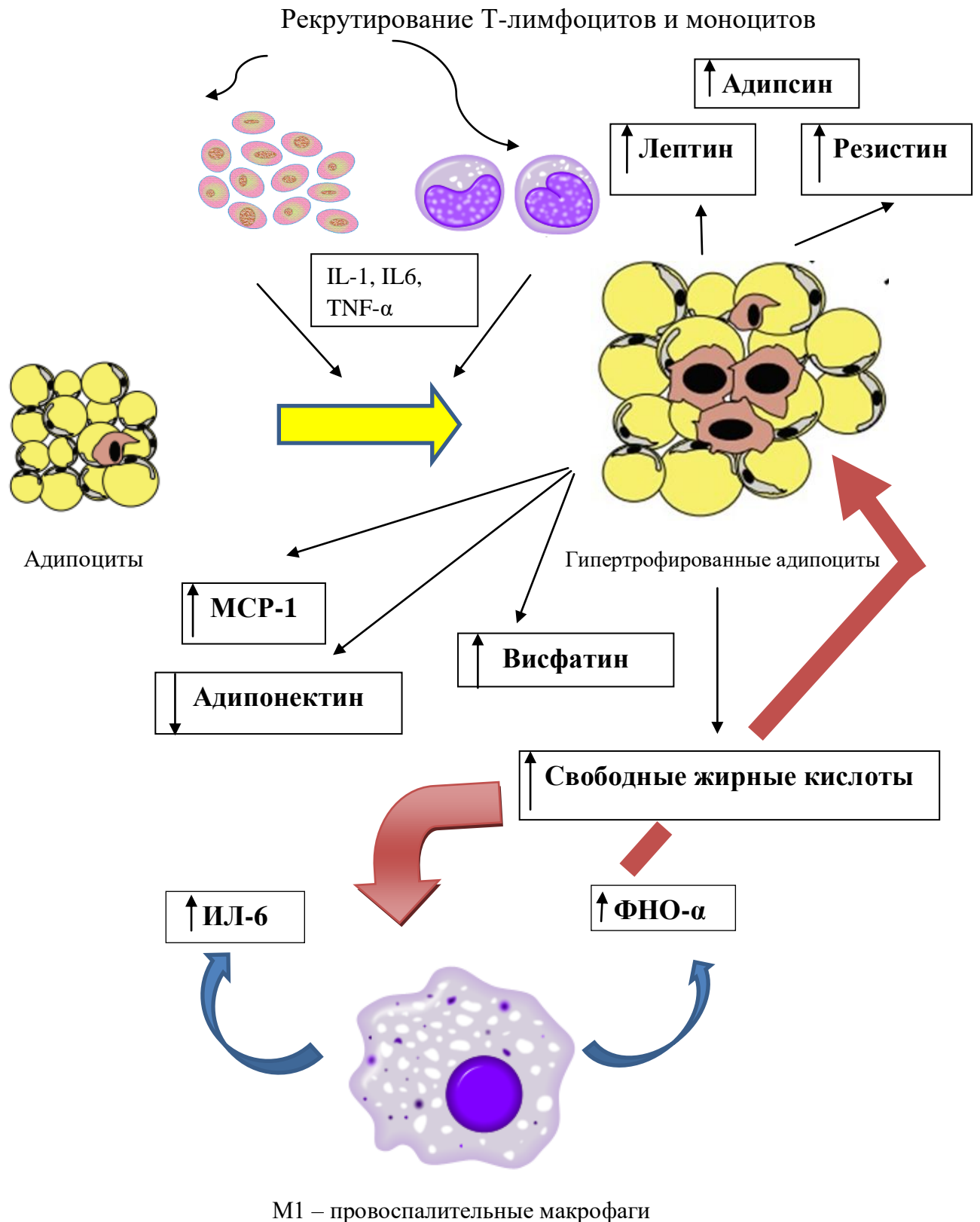


Рис. 3. Схема межклеточного взаимодействия при воспалении жировой ткани [по данным S. Lucas et al., 2009; T. Suganami, Y. Ogawa, 2010; M. Itoch et al., 2011]



## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на базе кафедры патофизиологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, заведующий кафедрой – заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, проф., академик РАН В.В. Новицкий), в НОЦ молекулярной медицины Ведущей научной школы РФ академика РАН В.В. Новицкого ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (руководитель – канд. мед. наук Е.В. Шахристова), а также на базе учреждений здравоохранения: ОГАУЗ «Томская центральная районная больница» (главный врач – канд. мед. наук Н.Н. Николаева) и хирургического отделения ОГАУЗ «Городская клиническая больница №3» г. Томска (заведующий отделением – врач-хирург высшей категории, канд. мед. наук И.Ю. Клиновицкий).

### 2.1. Объект исследования

В исследование были включены 114 человек в возрасте от 41 до 70 лет (средний возраст (56 (51;63) лет), 57 из которых были обследованы в амбулаторных условиях с патологией сердечно-сосудистой системы (ИБС, ГБ, АГ), 39 – в период стационарного лечения (33 пациента с МС и 6 без МС), 18 – практически здоровые лица. Обследование и отбор стационарных больных происходил в хирургическом отделении ОГАУЗ «Городская клиническая больница №3» г. Томска.

Все обследуемые (n=114) были разделены на две группы: основная группа (n=90) – пациенты с метаболическим синдромом и группа сравнения (n=24) без признаков метаболического синдрома и здоровые доноры. Весь объем клинических и параклинических методов исследования проводился в стандартных условиях утром натощак до лекарственной терапии и инструментальных методов исследования. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (регистрационный № 2862 от 28.11.2011 г.).

Критерии включения пациентов в исследование (для основной группы):

- пациенты с метаболическим синдромом, диагностированным согласно критериям Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК). Основным признаком – абдоминальное ожирение, при котором окружность талии  $> 80$  см у женщин и  $> 94$  см – у мужчин. Дополнительные признаки: артериальная гипертензия (АГ) (артериальное давление ((АД)  $\geq 140/90$  мм рт. ст.), повышение концентрации холестерина (ХС) ЛПНП ( $> 3,0$  ммоль/л), снижение концентрации холестерина (ХС) ЛПВП ( $< 1,2$  ммоль/л), повышение уровня триацилглицеролов (ТАГ) ( $\geq 1,7$  ммоль/л), гипергликемия натощак (концентрация глюкозы в плазме крови натощак  $\geq 6,1$  ммоль/л), нарушение толерантности к глюкозе (концентрация глюкозы в плазме крови через 2 ч после нагрузки глюкозой в пределах  $\geq 7,8$  и  $< 11,1$  ммоль/л). Критерием отбора являлось наличие у пациентов абдоминального ожирения и 2-х из дополнительных компонентов [Ройтберг Г.Е., 2007; Маколкин В.И., 2010; Мычка В.Б., 2010]:

- отсутствие осложнений и тяжелого течения заболеваний, ассоциированных с метаболическим синдромом (СД 2 типа и ИБС в момент исследования и в анамнезе);

- наличие информированного согласия на участие в исследовании;

- возраст – от 20 до 70 лет;

- отсутствие острых и обострения хронических воспалительных процессов другой локализации;

- отсутствие активных заболеваний печени и почек;

- отсутствие системных заболеваний соединительной ткани;

- отсутствие злокачественных образований.

Критерии исключения:

- возраст – менее 20 и более 70 лет;

- наличие острых и обострения хронических воспалительных сопутствующих заболеваний, злокачественных новообразований, системных заболеваний соединительной ткани;

- беременность и кормление грудью;

- приём гормональных препаратов.

Группу сравнения составили практически здоровые доноры (n=18) и 6 пациентов хирургического отделения, не имевших признаков МС и сопоставимые по полу и возрасту с основной группой пациентов с нормальной массой тела (индекс массы тела (ИМТ)  $> 18$  и  $< 25$  кг/м<sup>2</sup>), окружность талии у женщин -  $< 80$  см, у мужчин -  $< 94$  см, АД -  $< 140/90$  мм рт. ст., ХС ЛПНП  $< 3,0$  ммоль/л, ХС ЛПВП  $> 1,2$  ммоль/л, ТАГ  $< 1,7$  ммоль/л, содержание глюкозы в плазме крови натощак  $< 6,1$  ммоль/л). Клиническая характеристика пациентов с метаболическим синдромом представлена в таблице 6.

Таблица 6

**Клиническая характеристика пациентов  
с метаболическим синдромом**

Признак	n	%
АГ или установленный диагноз ГБ	90	100
АО	90	100
Дислипидемия		
- Гипертриацилглицеролемиа	39	43,3
- Повышение концентрации ЛПНП	59	65,5
- Снижение концентрации ЛПВП	22	24,4
Гипергликемия	24	26,6
СД 2	29	32,2
ИБС	24	26,6
ЖКБ	33	36,6

Примечание: АГ – артериальная гипертензия, ГБ – гипертоническая болезнь, АО – абдоминальное ожирение, СД 2 – сахарный диабет 2 типа, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ЖКБ – желчнокаменная болезнь

Из таблицы 6 видно, что артериальная гипертензия и абдоминальное ожирение были диагностированы у всех пациентов с метаболическим синдромом, у половины обследуемых выявлялась дислипидемия; гипергликемия натощак и

ИБС обнаруживались у четверти исследуемых. Желчнокаменная болезнь и СД 2 типа были выявлены в 36,6 и 32,2% случаев соответственно.

Распределение пациентов с метаболическим синдромом и группы сравнения в соответствии с использованными методами исследования представлено в таблицах 7 и 8.

Таблица 7

**Распределение больных с метаболическим синдромом и обследованных лиц без метаболического синдрома в соответствии с использованными методами исследования**

Методы исследования	Здоровые доноры (n)	Лица без метаболического синдрома (n)	Больные с метаболическим синдромом (n)
Оценка метаболических нарушений (углеводного, липидного, пуринового обменов)	18	6	90
Определение концентрации белков острой фазы (СРБ, фибриногена, неоптерина, гомоцистеина) в сыворотке крови	14	6	80
Определение концентрации адипокинов (адипонектина, висфатина, лептина, резистина) в сыворотке крови	12	5	52

Примечание: СРБ – С-реактивный белок

**Распределение больных с метаболическим синдромом и его отсутствием в соответствии с использованными методами исследования жировой ткани**

Методы исследования	Лица без метаболического синдрома (n)	Больные с метаболическим синдромом (n)
Морфометрия структурных элементов ЖТ	6	29
Культивирование клеток ЖТ	6	33
Определение концентрации цитокинов в супернатантах ЖТ	6	30
Оценка экспрессии CD-маркеров клетками ЖТ методом иммуногистохимии и проточной цитофлуориметрии	6	29
Оценка уровня экспрессии мРНК цитокинов и гормонов ЖТ методом ПЦР	6	14

Примечание: ЖТ – жировая ткань, ПЦР – полимеразная цепная реакция, мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

## 2.2. Материал исследования

Материалом для исследования служили венозная кровь, цитратная плазма и висцеральная жировая ткань. Забор венозной крови у пациентов осуществляли из локтевой вены утром строго натощак до приёма или введения лекарственных препаратов. Взятие крови производили после тщательной обработки участка кожи над пунктируемой веной ватным тампоном с 70° этиловым спиртом (пункцию выполняли после испарения дезинфицирующего средства с поверхности кожи) одноразовой иглой с широким просветом самотеком (или при незначительном разрежении) в вакуумные пробирки объемом 9 мл без добавления антикоагулянтов («Improve», Китай).

Висцеральную жировую ткань в объеме 2 см<sup>3</sup> получали из большого сальника пациентов в ходе эндоскопической плановой холецистэктомии, проводимой по показаниям. Один фрагмент жировой ткани (1 см<sup>3</sup>) помещали в емкость с формалином (для гистологического и иммуногистохимического исследования), другой фрагмент такой же величины – в стерильный флакон с холодным физиологическим раствором и антибиотиком широкого спектра (гентамицин) действия для культуральных методов исследования.

## **2.3. Методы исследования**

### **2.3.1. Клинические методы исследования**

Клиническое обследование включало расспрос и использование анализов клинических карт пациентов.

Расспрос включал в себя сбор жалоб и анамнеза. Анамнез учитывал стаж основного заболевания, наличие сопутствующих заболеваний, ассоциированных с МС (гипертоническая болезнь, СД 2, ИБС, ожирение и желчнокаменная болезнь), и факторов риска развития и тяжелого течения заболеваний, ассоциированных с МС: наследственная предрасположенность и факторы образа жизни (гиподинамия, нарушение питания, курение, злоупотребление алкоголем).

Клиническое обследование было направлено на выявление критериев включения и исключения пациентов в исследование. Для этого оценивался ряд параметров: общее состояние, цвет кожных покровов и слизистых, особенности распределения и выраженность подкожно-жировой клетчатки, наличие отеков, физические свойства лимфатических узлов, щитовидной железы, физическое состояние опорно-двигательного аппарата, легких, сердца, сосудов, органов брюшной полости и почек.

Объективное исследование, кроме методов, принятых в терапевтической практике для больных кардиологического профиля, включало специальное антропометрическое исследование.

Для оценки степени ожирения и особенностей распределения жировой ткани провели измерения следующих антропометрических параметров: масса тела, рост, окружность талии (ОТ), окружность бедер (ОБ), сагиттальный абдоминальный диаметр (СД)).

Массу тела (кг) измеряли с помощью медицинских весов «РП – 150 МГ» (Россия), рост (м) – с помощью механического ростомера РП (Россия). Окружность талии (ОТ, см) определяли по линии, находящейся на середине расстояния между нижним краем реберной дуги и гребнем подвздошной кости с помощью сантиметровой ленты, плотно облегающей тело дважды в конце выдоха, учитывали среднее значение. Пациент при этом находился в вертикальном положении. Окружность бедер (ОБ, см) определяли на уровне вертелов бедренных костей. Сагиттальный абдоминальный диаметр (СД, см) измеряли в горизонтальном положении пациента. Затем рассчитывали следующие показатели: индекс массы тела (ИМТ) ( $\text{кг}/\text{м}^2$ ), отношение ОТ/БО, объем общей жировой ткани (ООЖТ, л =  $1,36 \times \text{масса тела} / \text{рост} - 42$ ), объем висцеральной жировой ткани (ОВЖТ, л =  $0,731 \times \text{СД} - 11,5$ ), объем подкожной жировой ткани (ОПЖТ, л =  $\text{ООЖТ} - \text{ОВЖТ}$ ) [Sjostrom C.D., 1997; Бекезин В.В., 2004].

Клиническое обследование больных желчнокаменной болезнью (n=39) хирургического отделения ОГАУЗ «Городская клиническая больница №3» г. Томска проводили по специально разработанному алгоритму, направленному на выявление активности воспалительного процесса в желчном пузыре, и расчету интегрального клинического показателя. Для этого при расспросе и объективном обследовании больных выделяли и анализировали параметры, в большей степени отражавшие степень активности местного и общего воспалительного процесса, а также тяжесть обострения заболевания (хронического холецистита) (табл. 9).

**Диагностическая значимость клинических симптомов при  
желчнокаменной болезни**

Признаки	Градация признака	Диагностический коэффициент
<b>Болевой синдром</b>		
Локализация боли	Нет	1
	Правое подреберье	2
	Правое и левое подреберье	3
	По всему животу	4
Интенсивность боли	Нет	1
	Слабая	2
	Умеренная	3
	Сильная	4
	Нестерпимая	5
Частота болевых ощущений	Нет	1
	Очень редко	2
	После погрешностей в диете	3
	Постоянная	4
Болезненность при пальпации	Нет	1
	Умеренная	2
	Выраженная	3
	Резко выраженная	4
<b>Синдром биллиарной диспепсии</b>		
Тошнота	Нет	1
	Редко	2
	После погрешностей в диете	3
	По утрам	4
	Постоянная	5
Горечь во рту	Нет	1
	По утрам	2
	Постоянная	3
Рвота	Нет	1
	Редко	2
	Каждый день	3
<b>Синдром общей воспалительной реакции</b>		
Слабость	Нет	1
	Есть	2
Потливость	Нет	1
	Есть	2
Температура тела	Нормальная (до 37 <sup>0</sup> С)	1
	Субфебрильная (37 <sup>0</sup> С - 38 <sup>0</sup> С)	2
	Фебрильная (выше 38 <sup>0</sup> С)	3



К ним были отнесены: выраженность симптомов болевого синдрома, симптомов билиарной диспепсии, симптомов синдрома общей воспалительной реакции. Каждый симптом оценивали в баллах. Затем рассчитывали удельный вес каждого диагностического коэффициента по формуле: уд. вес =  $x/n$ , где  $n$  – количество градаций признака,  $x$  – диагностический коэффициент, выбранный из таблицы для пациента; определяли индекс воспаления клинический, равный сумме удельного веса диагностических коэффициентов всех определенных симптомов. При значении индекса воспаления клинический до 5,4 определяли минимальную, при значении от – 5,4 и до 7,5 – среднюю, а при значении более 7,5 – выраженную степень воспаления (патент на изобретение «Способ клинической оценки активности воспаления при хроническом калькулезном холецистите» № 2503400 от 10.01.2014 г.). Из исследования исключались пациенты с выраженной степенью воспаления.

### **2.3.2. Лабораторные методы исследования**

Значения ряда биохимических показателей определялись в биохимической лаборатории ОГАУЗ «Томская районная больница» (заведующая – Л.В. Бровченко). Гистологическое и иммуногистохимическое исследования жировой ткани проводили на базе НОЦ «Инновационные технологии в морфологии» ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (руководитель – канд. мед. наук, доцент А.Н. Дзюман). Остальные лабораторные исследования проводили на базе НОЦ молекулярной медицины Ведущей научной школы РФ академика РАН В.В. Новицкого ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (руководитель – канд. мед. наук Е.В. Шахристова).

#### **2.3.2.1. Оценка нарушений углеводного обмена**

Биохимическое исследование проводили на автоматическом биохимическом анализаторе закрытого типа «HORIBA ABX Pentra 400» (Франция) в сыворотке крови, полученной после центрифугирования цельной

крови при скорости 1,5 тысяч оборотов в течение 10 мин. Использовали наборы реагентов «ABX Pentra 400» (Франция), готовые к применению.

### **Определение концентрации глюкозы**

Концентрацию глюкозы в сыворотке крови определяли высокоспецифичным гексокиназным методом с помощью набора реагентов «ABX Pentra Glucose НК СР» (Франция), готовых к использованию. Определение концентрации глюкозы выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе закрытого типа «HORIBA ABX Pentra 400» (Франция). Результаты выражали в ммоль/л.

### **Определение концентрации лактата**

Концентрацию лактата в сыворотке крови определяли ферментативным колориметрическим методом. Измерение основано на использовании метода Триндера. Лактат является одним из промежуточных метаболитов гликолиза, включая систему поддержания рН крови. Лактатоксидаза вызывает выделение пероксида водорода, который реагирует с 4-аминоантипирином и ЭСПАС в присутствии пероксидазы с образованием окрашенного комплекса. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации лактата в образце. Использовали набор реагентов «ABX Pentra Lactic Acid СР», готовых к применению. Определение концентрации лактата выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе закрытого типа «HORIBA ABX Pentra 400» (Франция). Результаты выражали в ммоль/л.

### **Определение концентрации инсулина**

Концентрацию инсулина в сыворотке крови определяли с помощью твердофазного иммуноферментного "сэндвичевого" метода (ELISA) набором производства «Monobind Inc. Insulin Test System» (США) согласно рекомендации производителя тест-системы.

В соответствующие лунки микропланшета вносили по 50 мкл растворов контроля, стандартов и исследуемых образцов. Добавляли в каждую ячейку по 100 мкл ферментного конъюгата. После осторожного перемешивания в течение 20-30 сек планшет закрывали и инкубировали в течение 120 мин при температуре 20-27°C. После трех циклов промывки и полной аспирации оставшейся в ячейках жидкости во все лунки вносили по 100 мкл рабочего раствора субстрата и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 50 мкл стоп-реагента.

Через 30 мин проводили измерение оптической плотности с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм.

Концентрацию инсулина в сыворотке крови рассчитывали по калибровочной кривой. Результаты выражали в мкЕд/мл.

### **Оценка инсулинорезистентности**

Для диагностики инсулинорезистентности использовали малую модель гомеостаза (Homeostasis Model Assesment – НОМА).

Индекс НОМА рассчитывали по формуле:

$$\text{НОМА-IR} = \text{глюкоза натощак (ммоль/л)} \times \text{инсулин} / 22,5.$$

Значения индекса НОМА-IR более 2,77 соответствовали инсулинорезистентности.

### **2.3.2.2. Оценка нарушений липидного обмена**

#### **Определение концентрации общего холестерина**

Концентрацию общего холестерина определяли с помощью ферментативного фотометрического теста «CHOD-PAР» (содержание холестерина оценивали после ферментативного гидролиза и окисления). В качестве индикатора окраски применяли хинонимин, образующийся из фенола и 4-аминоантипирина при действии перекиси водорода в условиях каталитического воздействия пероксидазы (реакция Триндера). Использовали набор реагентов

«ABX Pentra Cholesterol CP», готовый к использованию. Определение концентрации общего холестерина выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе закрытого типа «HORIBA ABX Pentra 400» (Франция). Результаты выражали в ммоль/л.

### **Определение концентрации триацилглицеролов**

Концентрацию триацилглицеролов определяли ферментативным методом. Для этого использовали набор реагентов «ABX Pentra Triglycerides CP», готовый к использованию. Определение концентрации триацилглицеролов выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе закрытого типа «HORIBA ABX Pentra 400» (Франция). Результаты выражали в ммоль/л.

### **Определение концентрации липопротеинов низкой плотности**

Метод с использованием набора «ABX Pentra LDL Direct CP» является прямым методом измерения концентрации липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в сыворотке, не требует какой-либо дополнительной обработки образца и не включает стадию центрифугирования.

Концентрацию ЛПНП определяли с помощью двухреагентной методики, основанной на свойствах уникального детергента. Детергент, входящий в состав реагента R1, растворяет все липопротеины, кроме ЛПНП. Высвобождающийся при этом холестерин расщепляется посредством холинэстеразы и холестериноксидазы и не формирует окрашенных соединений. Второй реагент растворяет оставшиеся частицы ЛПНП, которые связываются с хромогенным веществом для формирования цветной реакции. Ферментативная реакция с ЛПНП, связанным с хромогенным веществом, дает окрашенный раствор; при этом степень окраски пропорциональна содержанию ЛПНП в образце. Определение концентрации ЛПНП выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе закрытого типа «HORIBA ABX Pentra 400» (Франция) с использованием набора «ABX Pentra LDL Direct CP», готовый к использованию. Результаты выражали в ммоль/л.

### **Определение концентрации липопротеинов высокой плотности**

Метод с использованием набора «ABX Pentra HDL Direct CP» является прямым методом измерения концентрации липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в сыворотке, минуя стадии преципитации и центрифугирования. Метод основан на свойствах уникального детергента, а также на усилении реакции холестериноксидазы с не-ЛПВП неэстерифицированным холестерином при растворении ЛПВП с помощью детергента. При добавлении первого реагента происходит ферментативная реакция не-ЛПВП холестерина с образованием пероксида. Пероксид поглощается в пероксидазной реакции с DSBmT с образованием бесцветного продукта. Второй реагент содержит детергент, растворяющий ЛПВП, холестеринэстеразу и хромогенное вещество, обеспечивающее реакции цветность. Определение концентрации ЛПВП выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе закрытого типа «HORIBA ABX Pentra 400» (Франция). Регистрацию результатов осуществляли с использованием набора «ABX Pentra HDL Direct CP», готовый к использованию. Результаты выражали в ммоль/л.

### **Определение концентрации неэстерифицированных жирных кислот**

Для количественного определения *in vitro* неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в сыворотке крови использовали биохимический метод. Процедуру выполнения анализа проводили согласно инструкции, предлагаемой производителем тест-системы («Randox Laboratories Limited», Великобритания).

Метод основан на том, что НЭЖК в присутствии ацетил СоА синтетазы вступает в реакцию с АТФ и СоА с образованием ацетил СоА и АМФ. Далее, при действии фермента пероксидазы перекись и продукты промежуточной реакции разлагаются до пурпурно окрашенного раствора и воды.

Для оценки содержания НЭЖК микропипеткой вносили по 50 мкл «0 дозы» контролей, стандартов с известными концентрациями в соответствующие кюветы. В остальные кюветы вносили исследуемые образцы сыворотки в объеме 50 мкл. Далее добавляли во все кюветы раствор R1 (смесь поставляемого в наборе

фосфатного буфера и Ацетил Коэнзим А синтетазы, аскорбат оксидазы, коэнзим А, 4-аминоантипирин) в количестве 1,0 мл. Смешивали и инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Затем добавляли 2,0 мл раствора R2 (смесь энзима дилуэнта и малеимида с энзим реактивом: ацетил коэнзим А оксидазой, пероксидазой, N-этил-N-(2гидрокси-3-сульфопроприл)-m-толуидин (TOOS)). Смешивали и инкубировали 37°C в течение 10 мин.

Измерение оптической плотности проводили с помощью спектрофотометра («СФ-2000-20», ЗАО «ОКБ Спектр», Россия) при длине волны 550 нм. Концентрацию НЭЖК в сыворотке крови вычисляли по калибровочной кривой. Результаты выражали в ммоль/л.

### **2.3.2.3. Оценка выраженности воспалительного процесса**

#### **Определение концентрации С-реактивного белка**

Концентрацию С-реактивного белка (СРБ) определяли с помощью высокочувствительного латексного иммунотурбидиметрического теста. Этот метод основан на реакции агглютинации между СРБ и антителами к СРБ, связанными латексными частицами. Изменение абсорбции в ходе реакции пропорционально количеству СРБ в образце. Концентрацию СРБ рассчитывали на основании калибровки. Использовали набор реагентов «ABX Pentra CRP CR» (Франция), готовых к применению. Определение концентрации СРБ выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе закрытого типа «HORIBA ABX Pentra 400» (Франция). Результаты выражали в мг/л.

#### **Определение концентрации фибриногена**

Концентрацию фибриногена определяли хронометрическим методом по Clauss на коагулометре (ООО «ТЕХНОЛОГИЯ-СТАНДАРТ», Барнаул). Принцип метода заключается в определении времени свертывания разбавленной цитратной плазмы избытком тромбина. Время свертывания при этом было пропорционально

концентрации фибриногена, которую определяли по калибровочному графику. Результаты выражали в г/л.

### **Определение концентрации неоптерина**

Концентрацию неоптерина в сыворотке крови определяли с помощью твердофазного иммуноферментного "сэндвичевого" метода (ELISA) набором «Neopterin ELISA» («IBL International GMBH» Германия) согласно рекомендации производителя тест-системы.

В соответствующие лунки микропланшета вносили по 20 мкл контролей, стандартов и исследуемых образцов. В каждую ячейку добавляли по 100 мкл ферментного конъюгата, а затем вносили в каждую лунку 50 мкл антисыворотки к неоптерину. Закрывали планшет черной адгезивной пленкой и инкубировали в течение 90 мин при комнатной температуре. После четырех циклов промывки и полной аспирации оставшейся в ячейках жидкости во все лунки вносили по 150 мкл ТМБ-субстрата и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 150 мкл стоп-реагента.

В течение 15 мин проводили измерение оптической плотности с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм.

Концентрацию неоптерина в сыворотке крови рассчитывали по калибровочной кривой. Результаты выражали в нмоль/л.

### **Определение концентрации гомоцистеина**

Концентрацию гомоцистеина в сыворотке крови определяли с помощью твердофазного иммуноферментного "сэндвичевого" метода (ELISA) с использованием набора производства «AXIS-SHIELD» (Шотландия) (согласно рекомендации производителя тест-системы).

В соответствующие лунки микропланшета вносили по 25 мкл разведенных калибраторов, контролей и исследуемых образцов. После этого в каждую ячейку

добавляли по 200 мкл моноклональных мышинных антител и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. После трех циклов промывки и полной аспирации оставшейся в ячейках жидкости во все лунки вносили по 100 мкл ферментного конъюгата с кроличьими антимышиными антителами и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем вновь проводили три цикла промывки и полную аспирацию оставшейся в ячейках жидкости, после чего во все лунки вносили по 100 мкл ТМБ-субстрата и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 100 мкл 0,8 М серной кислоты.

В течение 15 мин проводили измерение оптической плотности исследуемой жидкости с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм.

Концентрацию гомоцистеина в сыворотке крови рассчитывали по калибровочной кривой. Результаты выражали в мкмоль/л.

#### **2.3.2.4. Оценка структурно-функциональных свойств жировой ткани**

##### **2.3.2.4.1. Выделение и культивирование клеток жировой ткани**

Процедуру выделения клеток жировой ткани (адипоциты, мезенхимальные стромальные клетки) осуществляли в стерильных условиях в ламинарном шкафу II-го класса защиты (БОВ-001-АМС).

Фрагмент жировой ткани объемом 0,4 мл помещали в стерильные пенициллиновые флаконы, заливали 5 мл полной питательной среды ДМЕМ («Биолот», Россия), содержащей 10% инактивированной при 56°C эмбриональной телячьей сыворотки, НЕРЕС буфер, 2% L-глутамин с добавлением 0,2% амфотерицина В («Биолот», Россия) и 0,5% пенициллина-стрептомицина («Биолот», Россия). Культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе MCO-5AC («Sanyo», Китай) при температуре 37°C в течение 24 ч.

Для выделения адипоцитов и мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в оставшиеся фрагменты жировой ткани добавляли теплый раствор коллагеназы I



типа («ПанЭко», Россия) (на 1 мг сухого вещества – 1 мл буфера Кребса-Рингера) и измельчали их в чашках Петри (d=40 мм) («Медполимер», Россия). Смесь инкубировали в течение 40 мин при температуре 37°C и постоянном мягком перемешивании через каждые 5 мин. Для нейтрализации коллагеназы добавляли полную питательную среду ДМЕМ в соотношении 1:1. Клеточную суспензию профильтровывали через нейлоновый фильтр («Модитех», Россия) в стерильные пластмассовые центрифужные пробирки («МиниМед», Россия), затем центрифугировали в течение 5 мин при скорости 400 об/мин. Адипоциты при этом всплывали, а другие клеточные популяции (и мезенхимальные стромальные клетки в том числе) осаждались. Верхний слой супернатанта с адипоцитами переливали в другую стерильную пластиковую пробирку, а оставшуюся взвесь с мезенхимальными стромальными клетками центрифугировали при скорости 2000 об/мин в течение 10 мин. Адипоциты три раза промывали теплым фосфатным буфером Кребса-Рингера с центрифугированием при скорости 400 об/мин. Жидкую часть содержимого пробирки удаляли, оставляя 1 мл клеточной взвеси адипоцитов [Данченко О.Е., 2001]. Количество адипоцитов подсчитывали в камере Горяева с использованием световой микроскопии (микроскоп «Axiostar plus», «Carl Zeiss», Германия) аналогично методу подсчета клеток крови в камере Горяева [Гольдберг Е.Д., 1989].

После центрифугирования из пробирок с мезенхимальными стромальными клетками удаляли надосажок, оставляя 0,5 мл взвеси, после чего добавляли лизирующий буфер («Qiagen», США) для удаления эритроцитов, ресуспендировали и центрифугировали в течение 10 мин при скорости 1200 об/мин. Затем удаляли надосажок, оставляли 1 мл клеточной взвеси МСК, ресуспендировали и промывали полной питательной средой ДМЕМ с центрифугированием при скорости 1000 об/мин в течение 10 мин. Надосажок удаляли, оставляя 1 мл клеточной взвеси [Jones G.E., 1996]. Клеточность также подсчитывали в камере Горяева с использованием световой микроскопии (микроскоп «Axiostar plus», «Carl Zeiss», Германия), аналогично методу подсчета клеток крови в камере Горяева [Гольдберг Е.Д., 1989].

Для культивирования адипоцитов использовали культуральные стерильные флаконы (матрасы) площадью 12,5 см<sup>2</sup> с необработанной поверхностью («Jet Biofil», Канада-Китай). Клеточную взвесь адипоцитов в количестве 1 мл ресуспендировали в 5 мл полной питательной среды ДМЕМ. 1 мл клеточной взвеси МСК ресуспендировали в 5 мл питательной среды ДМЕМ, для чего использовали чашки Петри. Клеточную взвесь культивировали в течение 24 ч при 5% CO<sub>2</sub> и при температуре 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе «МСО-5АС» («Sanyo», Китай).

Супернатанты из цельного фрагмента жировой ткани собирали на следующий день после предварительного центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 мин. Из середины объема супернатанта забирали 4 мл и раскапывали по 600 мкл в шесть микропробирок «Эппендорф» («FL medical s.r.l.», Италия) на каждый образец.

Супернатанты адипоцитов собирали на следующий день с матрасов после предварительного центрифугирования при 400 об/мин в течение 5 мин и раскапывали по 600 мкл в шесть микропробирок «Эппендорф» на каждый образец.

Супернатанты мезенхимальных стромальных клеток собирали на следующий день после предварительного центрифугирования при скорости 1500 об/мин в течение 10 мин и раскапывали по 600 мкл в шесть микропробирок «Эппендорф» на каждый образец.

Хранение полученных супернатантов жировой ткани, адипоцитов и мезенхимальных стромальных клеток осуществляли в морозильной камере при температуре -70°C.

#### **2.3.2.4.2. Гистологическое исследование жировой ткани**

Кусочки жировой ткани объёмом около 1 см<sup>3</sup> фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине («Biovitrum», Россия), обезвоживали в изопропиловом спирте – раствор «IsoPrep» («Biovitrum», Россия), заливали в парафин («Histomix», Россия) по методике Ю.А. Криволапова и Е.Е. Леенмана [Криволапов Ю.А., Леенман Е.Е., 2006].

На микротоме («МЗП-01 Техном», Россия) изготавливали парафиновые срезы толщиной 5-7 мкм, которые затем монтировали на предметные стекла и после депарафинизации окрашивали гематоксилином Гарриса («Biovitrum», Россия) и эозином («Biovitrum», Россия) по общепринятой методике [Саркисов Д.С., 1996]. Микропрепараты просматривали в проходящем свете на микроскопе «Axioskop 40» («Carl Zeiss», Германия) на малом (x50, x100 и x200) и большом (x400, x630) увеличении.

Для количественной оценки структурных изменений проводили морфометрическое исследование. С помощью цифровой фотокамеры «Canon Power Shot G10» (Япония) производили съемку гистологических препаратов (10 случайных полей зрения для каждого среза). Цифровые фотографии подвергали компьютерной морфометрии. Диаметр жировых клеток измеряли в программе «AxioVision 4.8» («Carl Zeiss», Германия), остальные параметры определяли с использованием компьютерной программы «ImageJ 1.46» (режим доступа <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). С помощью метода точечного счета [Автандилов Г.Г., 1990] с использованием Plugins «Grid» и «Cell Counter» определяли объемную плотность следующих структур: адипоцитов, сосудов, междольковой соединительной ткани, клеток инфильтрата (при наличии). Полученные значения выражали в  $\text{мм}^3/\text{мм}^3$ . Протокол морфометрического исследования отражен в таблице 10.

Таблица 10

### Протокол гистологического исследования жировой ткани

Параметры	Ед. измерения
Объемная плотность адипоцитов	$\text{мм}^3/\text{мм}^3$
Объемная плотность сосудов	$\text{мм}^3/\text{мм}^3$
Объемная плотность соединительной ткани	$\text{мм}^3/\text{мм}^3$
Объемная плотность лейкоцитов	$\text{мм}^3/\text{мм}^3$
Инфильтрат (количество иммунокомпетентных клеток)	шт/ $1 \text{ мм}^2$
Диаметр адипоцитов	мкм

### 2.3.2.4.3. Оценка экспрессии CD-маркёров клетками жировой ткани

#### Оценка экспрессии CD-маркёров клетками жировой ткани методом иммуногистохимии

Иммуногистохимическое исследование постоперационного материала жировой ткани большого сальника осуществляли по методике Ю.А. Криволапова [Криволапов Ю.А. и др., 2006]. Из готовых парафиновых блоков на микротоме «Accu-Cut®SRM<sup>TM</sup>200b» («Sakura», Япония) изготавливали срезы толщиной 4-5 мкм и монтировали на предметные стекла с L-полилизинным покрытием («Menzel», Германия).

Депарафинизированные срезы проводили по трем порциям этанола (96°), промывали в течение 5 мин в дистиллированной воде, помещали стекла со срезами в пластиковый держатель и погружали в 0,01 М цитратный буфер pH=6,0, после чего осуществляли высокотемпературную демаскировку антигенов в микроволновой печи.

Демаскировку проводили в два этапа: при мощности P=600Вт в течение 1 мин; после остывания при открытой дверце – 7 мин при мощности P=400Вт (выходная мощность микроволновой печи 800 Вт). После демаскировки оставляли емкость со стеклами остывать при комнатной температуре на 20 мин и промывали в двух порциях фосфатного буфера по 5 мин, наносили блокирующий эндогенную пероксидазу реагент «Peroxidase Blocking Reagent», («Thermo Scientific», США) на 5 мин, после – промывали в дистиллированной воде в течение 5 мин, и в фосфатном буфере также в течение 5 мин. Затем наносили на 5 мин блокирующую сыворотку «blocking serum» («NovoCastra», Великобритания) и промывали в двух сменах фосфатного буфера по 5 мин. Далее наносили первичные антитела и инкубировали срезы при температуре 25°C в течение 60 мин. Первичные антитела предварительно разводили «UltraAb Diluent Plus» («Thermo Scientific», США). После инкубации срезы промывали в фосфатном буфере и наносили на срезы вторичные биотинилированные антитела на 30 мин, промывали в буфере и наносили стрептавидин-пероксидазный комплекс также на 30 мин, затем вновь промывали в фосфатном буфере. Для выявления продуктов

иммунной реакции на срезы наносили раствор диаминобензидина (DAB, «NovoCastra», Великобритания) на 5 мин. Срезы докрасивали гематоксилином Майера, проводили через этанол и ксилол, после чего заключали в канадский бальзам.

Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа «Leica» (Германия) под увеличением  $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$ . Для всех маркёров оценивали локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана). Количество положительных клеток оценивали в зонах, содержащих их максимальное количество. Для оценки специфичности параллельно ставили реакцию без добавления первичных антител – «отрицательный» контроль. Используемые в работе первичные антитела и их разведения представлены в таблице 11.

Таблица 11

#### Панель использованных антител

Специфичность	Клон	Производитель	Разведение
Первичные антитела			
CD3	PS1	Novocastra	RTU
CD20	L-26	Thermo Scientific	1:250
CD25	4C9	Novocastra	1:200
CD31	1A10	Novocastra	1:100
CD34	QBEnd/10	Novocastra	RTU
CD36	D-2712	Novus Biological	1:250
CD68	514H12	Novocastra	RTU
TGF- $\beta$	8A11	Novocastra	1:50
Vimentin	SRL33	Novocastra	1:400

Примечание: RTU – ready to use – готовый к использованию

Встречаемость позитивных клеток определяли на основе оценки всего предметного стекла, устанавливали объемную плотность (ОП) CD-позитивных клеток. Популяционная принадлежность изучаемых CD-маркеров: CD 3 – мультипротеиновый комплекс на поверхности Т-лимфоцитов, CD 20 – корцептор на поверхности В-лимфоцитов, CD 25 –  $\alpha$ -цепь низкоаффинного ИЛ2-рецептора

имеется на активированных Т - и В-лимфоцитах и макрофагах, CD 31 (PECAM-1) относится к классу молекул клеточной адгезии, CD 34 – маркер стволовых клеток, CD 36 экспрессируется на макрофагах, В-клетках, моноцитах, тромбоцитах, эндотелиальных клетках, CD 68 экспрессируется на поверхности макрофагов и моноцитов, TGF- $\beta$  – ростовой фактор, Vimentin – белок промежуточных филаментов соединительной ткани.

### **Оценка экспрессии CD36 адипоцитами и мезенхимальными стромальными клетками жировой ткани методом проточной цитофлуориметрии\***

Регистрацию количества адипоцитов и МСК, презентующих CD36-рецепторы, проводили методом, основанным на взаимодействии соответствующих моноклональных антител (МКАТ) с мембранными CD-рецепторами в соответствии с инструкцией производителя МКАТ непосредственно в день выделения.

После выделения клетки промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (рН=7,4) 100 мкл клеточной суспензии переносили в пробирки для проточного цитометра и добавляли 10 мкл стандартных антител к рецепторам CD36-FITC («BD biosciences», США). Инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в условиях полной изоляции от света. Готовые пробы анализировали на лазерном проточном цитофлуориметре «FacsCanto II» («Becton Dickinson», США), определяя процентное содержание клеток (МСК и адипоцитов) положительных к CD36-FITC на FL1канале.

---

\* Настоящий раздел исследования выполнен совместно с докторантом кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава, канд. мед. наук И.Д. Беспаловой и аспирантом кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава Б.Ю. Мурашевым.

#### 2.3.2.4.4. Оценка продукции активных форм кислорода клетками жировой ткани\*

Уровень активных форм кислорода (АФК) в клетках определяли с помощью красителя с заблокированной флуоресценцией – дихлорфлуоресцеина диацетата (ДХФ-ДА) («Sigma Aldrich», США). Проникая внутрь клетки, ДХФ-ДА расщепляется эстеразами, в результате чего образуемый метаболит ДХФ-ДА способен связываться с АФК, испуская при этом свечение в зеленой области спектра, регистрируемое на проточном цитофлуориметре.

Выделенные и промытые адипоциты и МСК в концентрации  $1 \times 10^6$  кл/мл (90 мкл суспензии клеток) переносили в пробирку для проточного цитофлуориметра и добавляли 10 мкл рабочего раствора ДХФ-ДА.

Через 20 мин инкубации при 37°C клетки центрифугировали 1 мин при скорости 1500 об/мин и удаляли надосадочную жидкость. Затем клетки однократно отмывали 200 мкл холодным ФСБ.

Готовые пробы анализировали на FL1 канале проточного цитофлуориметра «FacsCanto II» («Becton Dickinson», США), регистрируя флуоресценцию меченых клеток при  $E_{emis}=530$  нм [Model M.A. et al., 1997; Дамбаева С.В. и соавт., 2001]. Для оценки специфичности параллельно ставили реакцию без добавления первичных антител – «отрицательный» контроль. «Положительный» контроль ставили с раствором  $H_2O_2$  в концентрации 100 мкмоль/л. Уровень АФК в клетке рассчитывали как отношение суммарной интенсивности свечения к количеству клеток. Полученные результаты выражали в условных единицах.

---

\* Настоящий раздел исследования выполнен совместно с докторантом кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава, канд. мед. наук И.Д. Беспаловой и аспирантом кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава Б.Ю. Мурашевым.

### 2.3.2.4.5. Определение содержания цитокинов в супернатантах культуры жировой ткани\*

Для определения содержания цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИНФ- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , МСР-1) в супернатантах (адипоциты, мезенхимальные стволовые клетки, цельный кусочек ткани) жировой ткани использовали твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) согласно инструкциям, предлагаемым производителем соответствующих тест-систем («Вектор-Бест», Россия).

Для оценки содержания ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИНФ- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , МСР-1 в супернатантах культуры жировой ткани во все лунки микропланшета вносили по 100 мкл раствора для разведения образцов. В лунки А1- $F$ 1 добавляли по 100 мкл разведений калибровочных образцов с известными концентрациями цитокинов (ИЛ-4 – 0-100 пг/мл, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, ФНО- $\alpha$  – 0-250 пг/мл, ИЛ-6 – 0-300 пг/мл, ИЛ-2, ИЛ-10 – 0-500 пг/мл, ИФН- $\gamma$  – 0-1000 пг/мл, МСР-1 – 0-2000 пг/мл), в лунку G1 – 100 мкл контрольного образца.

В остальные лунки вносили супернатанты в объеме 100 мкл. Через 2 ч инкубации при 37 $^{\circ}$ C (для определения концентраций ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИНФ- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , МСР-1) и при 18-25 $^{\circ}$ C (для определения концентраций ИЛ-2, ИЛ-4) в условиях непрерывного встряхивания удаляли жидкость из ячеек, пять раз промыв их буфером. Затем проводили полную аспирацию оставшейся жидкости. Далее в каждую лунку микропланшета добавляли по 100 мкл рабочего раствора конъюгата № 1 (биотинилированные антитела) и инкубировали при 37 $^{\circ}$ C (для определения ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИНФ- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , МСР-1) и при 18-25 $^{\circ}$ C (для определения ИЛ-2, ИЛ-4) при непрерывном встряхивании. После пяти

---

\*Настоящий раздел исследования выполнен совместно с докторантом кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава, канд. мед. наук И.Д. Беспаловой и аспирантом кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава Б.Ю. Мурашевым.



циклов промывки микропланшета и полной аспирации оставшейся в ячейках жидкости в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата № 2 (стрептавидин с пероксидазой хрена) и инкубировали 30 мин при 37°C (для определения ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИНФ- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , MCP-1) и при 18-25°C (для определения ИЛ-2, ИЛ-4) в условиях непрерывного встряхивания. По окончании инкубации, микропланшет промывали пять раз, проводили полную аспирацию оставшейся жидкости. Далее в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата с красителем (тетраметилбензидин). Инкубировали полученные пробы 25 мин при 20°C в защищенном от прямых солнечных лучей месте. Для остановки реакции в каждую лунку вносили по 100 мкл стоп-реагента (0,5 М серная кислота).

Измерение оптической плотности для учёта интенсивности окраски проводили с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм.

Концентрацию цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИНФ- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , MCP-1) в супернатантах культуры жировой ткани вычисляли по калибровочной кривой. Полученные результаты выражали в пг/мл.

#### **2.3.2.4.6. Оценка гормональной активности жировой ткани**

##### **Определение концентрации адипонектина в сыворотке крови**

Концентрацию адипонектина в сыворотке крови определяли с помощью иммуноферментного анализа с использованием сэндвич-метода (ELISA) с набором производства «AssayMax Human Adiponectin ELISA Kit» (США) согласно рекомендации производителя тест-системы.

В соответствующие лунки микропланшета вносили по 50 мкл контролей, стандартов с известными концентрациями (0-50 нг/мл) и исследуемых образцов, затем закрывали адгезивной пленкой и инкубировали в течение 1 ч. После пяти циклов промывки и полной аспирации оставшейся в ячейках жидкости во все лунки вносили по 50 мкл биотинилированных антител и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем вновь промывали и вносили в каждую

лунку по 50 мкл конъюгата стрептовидин-пероксидазы и инкубировали в течение 30 мин. После повторной промывки вносили 50 мкл хромогенного субстрата и инкубировали 10 мин до оптимального окрашивания, а затем добавляли в каждую лунку по 50 мкл стоп-реактанта; при этом голубое окрашивание сменялось на желтое. Инкубировали в шейкере в течение 10-15 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 50 мкл стоп-реактанта.

Сразу же проводили измерение оптической плотности с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм.

Концентрацию адипонектина в сыворотке крови рассчитывали по калибровочной кривой. Результаты выражали в нг/мл.

### **Определение концентрации висфатина в сыворотке крови**

Концентрацию резистина в сыворотке крови определяли методом конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием набора производства «ReyBio® Visfatin Enzyme Immunoassay Kit» (США) согласно рекомендации производителя тест-системы.

В каждую лунку микропланшета вносили 100 мкл антител к висфатину и инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Затем вновь в каждую лунку добавляли по 100 мкл стандартов пептида с известной концентрацией (0 пг/мл – 1000 нг/мл) и образцов, смешанных с биотинилированным висфатином. Инкубировали в течение 2,5 ч при комнатной температуре. Вносили по 100 мкл приготовленного раствора стрептавидина и инкубировали 45 мин при комнатной температуре. Добавляли 100 мкл раствора ТМБ и инкубировали еще 30 мин в тех же условиях. После внесения 50 мкл стоп-реактанта в каждую ячейку производили измерение оптической плотности с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм.

Концентрацию висфатина в сыворотке крови рассчитывали по калибровочной кривой. Результаты выражали в нг/мл.

### **Определение концентрации лептина в сыворотке крови**

Концентрацию лептина в сыворотке крови определяли с помощью иммуноферментного анализа с использованием двухшагового сэндвич-метода (ELISA) с набором производства «Diagnostics Biochem Canada Inc. Leptin ELISA» (Канада) согласно рекомендации производителя тест-системы.

В соответствующие лунки микропланшета вносили по 20 мкл контролей, стандартов (0-100 нг/мл) и исследуемых образцов в дублях. Добавляли в каждую ячейку по 80 мкл моноклональных антител к лептину. Инкубировали 1 ч при комнатной температуре на шейкере (200 об/мин). После трех циклов промывки и полной аспирации оставшейся в ячейках жидкости во все лунки вносили по 100 мкл раствора конъюгата стрептовидин/HRP, инкубировали в шейкере в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем вновь трижды промывали и вносили в каждую лунку по 100 мкл субстрата ТМБ. Инкубировали в шейкере 10-15 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 50 мкл стоп-реагента.

В течение 20 мин проводили измерение оптической плотности с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм.

Концентрацию лептина в сыворотке крови рассчитывали по калибровочной кривой. Результаты выражали в нг/мл.

### **Определение концентрации резистина в сыворотке крови**

Концентрацию резистина в сыворотке крови определяли с помощью иммуноферментного анализа с использованием сэндвич-метода (ELISA) с набором производства «Bio Vender Human Resistin ELISA Kit» (США) согласно рекомендации производителя тест-системы.

В соответствующие лунки микропланшета вносили по 100 мкл контролей, стандартов с известными концентрациями (0,02-1 нг/мл) и исследуемых образцов. Инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в шейкере. После трех циклов промывки добавляли по 100 мкл биотинилированных антирезистин

антител в каждую лунку. Затем вновь инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в шейкере при скорости 300 об/мин. После трех циклов промывки и полной аспирации оставшейся в ячейках жидкости во все лунки вносили по 100 мкл раствора конъюгата стрептовидин/HRP, инкубировали в шейкере (300 об/мин) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем трижды промывали и добавляли по 100 мкл раствора субстрата, накрывали планшет алюминиевой фольгой и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, после чего реакцию останавливали добавлением по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку.

В течение 5-10 мин проводили измерение оптической плотности с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм.

Концентрацию резистина в сыворотке крови рассчитывали по калибровочной кривой. Результаты выражали в нг/мл.

#### **2.3.2.4.7. Оценка уровня экспрессии матричной РНК клеток жировой ткани**

##### **Выделение общей РНК из жировой ткани**

Выделение общей РНК из жировой ткани проводили с использованием набора для выделения общей РНК «Qiagen RNeasy Mini Kit Lipid Tissue» («QIAGEN», США) по инструкции производителя.

Лизирующий буфер RLT (содержит гуанидин тиоционат) брали из расчета 350 мкл RLT буфера на количество клеток  $<10^6$ . Непосредственно перед выделением добавляли 10 мкл бета-меркаптоэтанола на каждый мл лизирующего буфера RLT. Затем центрифугировали клеточную суспензию при 5000 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Добавляли к осадку 350 мкл буфера RLT, содержащего бета-меркаптоэтанол, на количество клеток  $<10^6$ , затем гомогенизировали не менее десяти раз. Добавляли 350 мкл 70% этанола. Тщательно перемешивали лизат на вортексе. Переносили 700 мкл лизата в разделительные колонки, помещенные в пробирки на 2 мл (разделительные колонки и пробирки входят в набор для выделения «QIAGEN») и

центрифугировали при 8000 g в течение 30 сек. Удаляли жидкость, профильтрованную через разделительные колонки. Добавляли 700 мкл RW1 буфера, содержащего этанол, в разделительные колонки, помещенные в 2 мл пробирки, и центрифугировали при 8000 g в течение 30 сек. Переносили разделительные колонки в новые 2 мл пробирки, после чего добавляли 500 мкл буфера RPE, содержащего этанол, в разделительные колонки, помещенные в 2 мл пробирки, и центрифугировали при 8000 g в течение 30 сек. Удаляли жидкость, профильтрованную через разделительные колонки, добавляли 500 мкл буфера RPE в разделительные колонки, помещенные в 2 мл пробирки, и центрифугировали при 8000 g в течение 2 мин.

Переносили разделительные колонки в новые 2 мл пробирки, центрифугировали 2 мин при 13000 g. Переносили разделительные колонки в 1,5 мл пробирки (включены в набор для выделения) и добавляли 33 мкл раствора для элюции РНК (free water, «QIAGEN»). Центрифугировали разделительные колонки, помещенные в 1,5 мл пробирки, при 8000 g в течение одной минуты, удаляли колонки. Получали раствор в 1,5 мл пробирках, содержащий общую РНК. Хранили при температуре -80°C.

### **Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией**

Синтез комплементарной ДНК (кДНК) проводили с использованием реактивов фирмы «Медиген», Россия). Основным компонентом для синтеза кДНК является обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей Молони (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, M-MLV RT) («Медиген», Россия).

В микропробах на 200 мкл готовили смесь 1 из расчета на один образец: 13 мкл общей РНК, выделенной из клеток с помощью набора «Qiagen RNeasy Mini kit Lipid Tissue» («QIAGEN», США), 2 мкл праймеров (обратные праймеры («Биосинтез» Россия), концентрация 252,5 мкмоль) (табл. 12). Общий объем реакционной смеси составлял 15 мкл. В эппендорфы на 200 мкл вносили по 15 мкл смеси 1, перемешивали на вортексе («Biosan», Латвия), после чего помещали эппендорфы в программируемый ДНК-амплификатор («Терцик», Россия).

Амплификатор был запрограммирован следующим образом: 5 мин при температуре 70°C, 10 сек при 4°C.

После завершения программы доставали эппендорфы, добавляли в них по 25 мкл смеси 2, которую готовили следующим образом (из расчета на один образец): 8 мкл буфера M-MLV RT; 1,25 мкл (5 мМ) дезоксинуклеотидтрифосфаты (дНТФ) («Медиген», Россия); 0,5 мкл обратной транскриптазы (10000 е.а., «Медиген», Россия); 15,25 мкл дистиллированной воды. Перемешивали на вортексе.

Помещали эппендорфы, содержащие смеси 1 и 2 (общий объем – 40 мкл) в программируемый ДНК-амплификатор («Терцик», Россия). Программа: 60 мин при 37°C, затем – 15 мин при 70°C, останавливали реакцию на 4°C). Хранили кДНК при – 20°C.

### **Полимеразная цепная реакция в реальном времени**

Принцип метода: амплификация (умножение) определенного участка ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов с одновременным измерением количества данной молекулы ДНК после каждого цикла амплификации [Pocher C. et al., 1992]. Для количественного определения используют интеркалирующие агенты: флуоресценция бромистого этидия и SYBR Green I значительно возрастает при их внедрении в двухцепочечные молекулы ДНК. Таким способом можно наблюдать за накоплением продуктов амплификации. Изучение полученных ампликонов проводят с помощью построения "кривых плавления" (melting curves). Для этого после окончания ПЦР реакционную смесь нагревают и непрерывно измеряют флуоресценцию. По достижении температуры плавления продукта амплификации флуоресценция резко снижается. Каждое резкое уменьшение флуоресценции на графике соответствует числу полосок, получаемых на электрофорезе, то есть числу разных типов ампликонов. Затем проводят дифференциальный анализ кривой плавления.

В проведенном нами исследовании использовали следующую методику. В эппендорфах на 200 мкл готовили трехкратные разведения комплементарной ДНК

(кДНК): к 10 мкл образца ДНК добавляли 20 мкл воды. Для построения калибровочной кривой готовили разведения образца контрольной кДНК  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  в эппендорфах на 200 мкл. Разведения готовили следующим образом: брали 1 мкл кДНК, разведенный в 3 раза, добавляли 9 мкл воды, перемешивали на вортексе, осаждали. Получали разведение  $10^{-1}$ . Затем брали 1 мкл данного разведения и добавляли 9 мкл воды, получали разведение  $10^{-2}$  и т.д.

В эппендорфах на 1,5 мл готовили смесь 1 для каждого вида праймеров IL-1, IL-6, IL-8, TNF, ADIPOQ, LEP, NAMPT,  $\beta$ -actin. Из расчета на один образец к 4 мкл смеси прямого и обратного праймеров (10 пкмоль/мкл, «Биосинтез», Россия) добавляли 2 мкл деионизованной воды. Калибровку проводили по гену бета - актина с добавлением образца контрольной ДНК в разведениях  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ . Раскапывали по 6 мкл смеси 1 в соответствующие генам лунки планшеты, добавляли по 1 мкл кДНК.

Все праймеры были специально подобраны при помощи программы PrimerQuest, доступной на сайте Integrated DNA Technologies ([www.eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index](http://www.eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index)). В дальнейшем все праймеры были проанализированы с помощью программы OligoAnalyzer 3.1 ([www.eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/](http://www.eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/)) с целью характеристики формирования гомо- и гетеродимеров и самозамыкающихся структур (табл. 12).

Таблица 12

**Праймеры для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени**

Название гена	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина ПЦР фрагмента, п.о.
IL1B interleukin 1, beta	5'-ATG-GAC-AAG-CTG-AGG-AAG-ATG-3'Tm=62	5'-CCC-ATG-TGT-CGA-AGA-AGA-TAG-G-3'Tm=62	115
IL6 interleukin 6 (interferon, beta 2)	5'-GAC-AGC-CAC-TCA-CCT-CTT-C-3'Tm=62	5'-GTG-CCT-CTT-TGC-TGC-TTT-C-3'Tm=62	123

Название гена	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина ПЦР фрагмента, п.о.
IL8 interleukin 8	5'-GGA-CAA-GAG- CCA-GGA-AGA-AA- 3'Tm=62	5'-GGG-TGG-AAA- GGT-TTG-GAG- TAT-3'Tm=62	190
TNF tumor necrosis factor	5'-CAG-GCA-GTC- AGA-TCA-TCT- TCT-C-3'Tm=62	5'-CTG-GTT-ATC- TCT-CAG-CTC-CAC -3'Tm=61	147
ADIPOQ adiponectin, C1Q and collagen domain containing	5'-CAT-CTC-CTC- CTC-ACT-TCC-ATT- C-3'Tm=62	5'-GTC-GTG-GTT- TCC-TGG-TCA-T- 3'Tm=62	182
LEP leptin	5'-AAG-CTG-TGC- CCA-TCC-AAA- 3'Tm=62	5'-GTC-CAA-ACC- GGT-GAC-TTT-CT- 3'Tm=62	125
RETN resistin	5'-AAT-GAG-AGG- ATC-CAG-GAG-GT- 3'Tm=62	5'-CTG-GCA-GTG- ACA-TGT-GGT- 3'Tm=62	192
NAMPT nicotinamide phosphoribosyltransferase, visfatin	5'- GTG-GAG-GTT- TGC-TAC-AGA- AGT-3'Tm=62	5'- TGG-GTC-CTT- GAA-GAC-GTT- AAT-C -3'Tm=62	104
$\beta$ -actin	5'-CTG-GCA-CCC- AGC-ACA-ATG-3'	5'-AGC-GAG-GCC- AGG-ATG-GA -3'	72

Смесь 2 готовили в пробирках на 2 мл. Для этого брали (из расчета на один образец) 2,5 мкл 10-кратного буфера (содержит 500 мМ KCl, 150 мМ трис HCl pH 8,8, 0,5% глицерол, 0,1% Tween 20, интеркалирующий краситель SYBR Green I) («Медиген», Россия), 2,5 мкл дНТФ (5 мМ, «Медиген», Россия), 2,5 мкл MgCl<sub>2</sub> (25 мМ, «Медиген», Россия), 0,5 мкл Tag ДНК-полимеразу (5 Еа/мкл с ингибирующими активностью фермента антителами, «Медиген», Россия), 10 мкл деионизованной воды. Общий объем смеси – 18 мкл.

Добавляли по 18 мкл смеси 2 в лунки плашки, содержащих по 6 мкл смеси 1 и 1 мкл ДНК. Общий объем реакционной смеси в каждой лунке – 25 мкл. Все образцы ставили в дублях. Заклеивали планшет защитной пленкой. Откручивали



на мини-центрифуге «MiniSpin» («Eppendorf», Латвия). ПЦР проводили в детектирующем термоциклере (MiniOpticon «Biorad», США), который настраивали на следующую смену температурных режимов: вначале – 2 мин при 50°C, 2 мин при 93°C; далее – 45 циклов (15 сек при 93°C, 1 мин при 61°C); 99 циклов по одной минуте при 90°C; после завершения всех циклов прибор переходил в режим сохранения данных при 10°C.

В программе на амплификаторе заполняли протокол с указанием гена, номера образца ДНК, типа пробирки (образец или стандарт), для стандарта указывали концентрацию образца ДНК: 10000 для разведения 1, 1000 – для разведения  $10^{-1}$ , 100 - для  $10^{-2}$ , 10 - для  $10^{-3}$ , 1 для  $10^{-4}$ .

Количество ДНК того или иного гена в пробах отображалось в виде процентов от количества бета - актина (сравнительный  $C_t$ -метод).

Для подсчета результатов ПЦР в реальном времени брали абсолютные значения концентрации (копий на мл), полученные по прибору. Вычисляли средние значения для дублей по бета-актину, отдельно для каждого образца ДНК. Затем значения концентраций по каждому гену для данного образца делили на среднее значение для дублей по бета-актину для этого образца и умножали на 100%. По полученным процентным значениям вычисляли средние для дублей и оперировали этими данными в дальнейшем.

### **2.3. Статический анализ данных исследования**

При оценке полученных данных были использованы методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез. Статистическую обработку полученных результатов проводили путем создания единой электронной базы данных с использованием пакета «Microsoft Office Access 2007» и последующей обработкой на компьютере с применением пакета программ «STATISTICA 10.0» («StatSoft, Inc.», USA). Количественные данные представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей – Me (LQ; UQ), качественные признаки – в виде n, % (число больных с данным признаком,

процент от их количества в группе). Проверку нормальности распределения вариант в выборках производили методом Шапиро-Уилка. В связи с отсутствием нормального распределения при сравнении средних групповых для количественных признаков применяли тест Манна-Уитни (U-тест). Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . Для оценки статистической взаимосвязи между показателями вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $r$ ). Для анализа связи между независимыми переменными и зависимой переменной использовали логистический регрессионный анализ (с целью приведения распределения к нормальному, применяли логарифмическое преобразование данных), определяя коэффициент корреляции ( $R$ ).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Клинико-патогенетические закономерности активности воспалительного процесса у пациентов с метаболическим синдромом

В настоящее время воспалительный процесс считают одним из наиболее значимых звеньев патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний и СД 2. Это было подтверждено результатами целого ряда исследований, описывающих повышение концентрации острофазовых белков и провоспалительных цитокинов в сыворотке крови у пациентов с заболеваниями, ассоциированными с МС.

#### 3.1.1. Взаимосвязь маркеров воспаления и нарушений метаболизма

В таблице 13 приведен сравнительный анализ клинико-лабораторных показателей, характеризующих выраженность метаболических нарушений и активность воспаления у больных с метаболическим синдромом и пациентов группы сравнения.

Таблица 13

#### Сравнительная характеристика показателей у обследованных с наличием и отсутствием метаболического синдрома Me (LQ; UQ)

Показатель	Обследованные лица без МС (n=24)	Обследованные лица с МС (n=90)
Масса тела, кг	59,1 (55,0;73,0)	89,0 (80,8;104,0)*
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	22,5 (21,2;24,4)	34,2 (30,1;38,2)*
ОТ, см	72,0 (68,0;87,5)	106,0 (94,5;113,0)*
ОБ, см	95,5 (91,5;100,0)	116,0 (109,5;124,0)*
ОТ/ОБ	0,80 (0,72;0,82)	0,89 (0,85;0,94)*
СД, см	19,0 (17,5;20,0)	27,5 (25,0;31,0)*

Показатель	Обследованные лица без МС (n=24)	Обследованные лица с МС (n=90)
ОЖТ, л	7,61 (3,17;9,13)	32,7(25,3;44,7)*
ОПЖТ, л	2,39 (1,29;3,12)	24,3(18,0;33,5)*
ОВЖТ, л	4,85 (1,14;7,27)	8,60 (6,78;11,16)*
САД, мм рт. ст.	120,0 (110,0;120,0)	140,0 (130,0;145,0)*
ДАД, мм рт. ст.	80,0 (80,0;80,0)	90,0 (80,0;90,0)*
Глюкоза, ммоль/л	4,98 (4,66;5,78)	5,41 (5,00;6,00)*
АЛТ, ед/л	19,0 (13,0;23,0)	23,0 (16,0;31,0)*
АСТ, ед/л	18,0 (17,0;26,0)	20,0 (17,0;26,0)
МК, ммоль/л	214,0 (162,0;255,0)	274,5 (228,0;358,0)*
Лактат, ммоль/л	2,86 (2,53;3,00)	2,82 (2,16;3,62)
ОХС, ммоль/л	4,24 (3,66;4,85)	5,63 (4,85;6,26)*
ТАГ, ммоль/л	0,81 (0,60;0,96)	1,54 (1,11;2,07)*
ЛПНП, ммоль/л	2,56 (2,23;2,80)	3,91 (3,20;4,57)*
ЛПВП, ммоль/л	1,36 (1,25;1,70)	1,31 (1,14;1,61)
НЭЖТ, ммоль/л	0,62 (0,41;0,76)	0,75 (0,42;0,96)
вчСРБ, мг/л	0,12 (0;1,51)	2,19 (0,48;7,05)*
Гомоцистеин, мкмоль/л	13,6 (12,6;14,7)	14,0 (12,1;16,5)
Фибриноген, г/л	2,80 (2,22;3,40)	3,50 (3,00;4,00)*
Инсулин, мкМЕД/мл	9,43 (6,98;11,7)	16,0 (11,6;21,4)*
Неоптерин, нмоль/л	3,20 (2,38;5,42)	5,10 (3,59;7,98)*
НОМА-IR	2,03 (1,48;2,69)	4,07 (2,72;5,13)*

Примечание: p – статистическая значимость межгрупповых различий,  
\* - групповые различия статистически значимы (p<0,05), ИМТ – индекс массы тела,

ОТ – окружность талии, ОБ – окружность бедер, СД – сагиттальный диаметр, ООЖТ – общий объем жировой ткани, ОВЖТ – объем висцеральной жировой ткани, САД – систолическое артериальное давление, ДАД – диастолическое артериальное давление, АЛТ – аланиаминотрансфераза, АСТ – аспартатаминотрансфераза, МК – мочевая кислота, ОХС – общий холестерол, ТАГ – триацилглицеролы, ЛПНП – липопротеины низкой плотности, ЛПВП – липопротеины высокой плотности, НЭЖК – неэстерифицированные жирные кислоты, вчСРБ – высокочувствительный С-реактивный белок, НОМА-IR – Homeostasis Model Assessment

При анализе данных, представленных в таблице 13, были обнаружены статистически значимые различия сравниваемых величин как по антропометрическим показателям (масса тела, ИМТ, ОТ, ОБ, ОТ/ОБ, СД, ООЖТ, ОПЖТ, ОВЖТ) – признакам абдоминального ожирения и уровню АД, так и по лабораторным показателям, характеризующим нарушения метаболизма: состояние углеводного (глюкоза, инсулин, НОМА-IR), липидного (ОХС, ЛПНП, ТАГ) и пуринового обменов, а также по уровню белков острой фазы (С-реактивный белок, неоптерин, фибриноген) в крови.

Для установления роли вышеперечисленных маркеров системного воспаления в механизмах МС был проведен корреляционный анализ, результаты которого представлены в таблице 14.

Таблица 14

**Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) корреляционные взаимосвязи ( $r$ ) между клиничко-лабораторными симптомами метаболического синдрома и уровнем белков острой фазы в сыворотке крови у пациентов с метаболическим синдромом**

Показатель	вчСРБ, мг/л	Неоптерин, нмоль/л	Фибриноген, г/л
Масса тела, кг	-	0,31	0,45
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	0,47	0,36	-
ОТ, см	0,50	0,47	0,24
ОБ, см	0,49	0,40	0,33

Показатель	вчСРБ, мг/л	Неоптерин, нмоль/л	Фибриноген, г/л
ОТ/ОБ	0,52	0,48	-
СД, см	0,21	0,40	0,45
ООЖТ, л	0,44	0,34	0,24
ОПЖТ, л	0,51	0,40	-
ОВЖТ, л	0,50	0,31	-
САД, мм рт. ст.	0,44	0,37	0,24
ДАД, мм рт. ст.	0,43	0,34	0,32
Глюкоза, ммоль/л	0,42	-	-
АЛТ, ед/л	0,26	-	-
ОХС, ммоль/л	-	0,28	-
ТАГ, ммоль/л	0,28	0,31	0,32
ЛПНП, ммоль/л	0,40	-	0,39
ЛПВП, ммоль/л	-0,32	-	-0,38
НЭЖТ, ммоль/л	-	0,34	-
Инсулин, мкМЕД/мл	-	-	0,38
НОМА-IR	0,45	-	-

Примечание: (-) – отсутствие статистически значимой взаимосвязи

В результате были обнаружены статистически значимые корреляционные взаимосвязи между уровнем белков острой фазы в крови (вчСРБ, фибриноген, неоптерин) и большинством клинико-лабораторных симптомов МС: антропометрическими показателями (масса тела, ИМТ, ОТ, ОБ, ОТ/ОБ, СД, ООЖТ, ОПЖТ, ОВЖТ), уровнем АД и целым рядом показателей, характеризующих метаболические нарушения (ОХС, ЛПНП, ТАГ, ЛПВП, НЭЖТ,

глюкоза, инсулин, НОМА-IR). Все это свидетельствует о том, что воспалительный процесс не только имеет место при МС, но и тесно взаимосвязан с его клинико-метаболическими проявлениями.

### **3.1.2. Взаимосвязь гормональной активности жировой ткани, метаболических нарушений и активности воспаления у пациентов с метаболическим синдромом**

В настоящее время считают, что белая жировая ткань является эндокринным органом, поскольку в ней синтезируется большое количество биологически активных веществ (БАВ) – адипокинов, которые проявляют свое системное действие, участвуя в регуляции разных процессов в организме [Ouchi N. et al., 2011; Dunmore S.J., Brown J., 2013; Kwon H., Pessin J.E., 2013]. Однако роль адипокинов в регуляции воспаления при МС до конца не изучена. Этот факт стал основанием для проведения данного этапа научного исследования.

В этой связи особый интерес для нас в данном исследовании представляла роль адипокинов (лептина, адипонектина, висфатина и резистина) в патогенезе воспаления при МС.

В таблице 15 представлен сравнительный анализ гормональной активности жировой ткани у пациентов с МС и у больных группы сравнения.

Таблица 15

#### **Сравнительный анализ уровня адипокинов в сыворотке крови у пациентов с метаболическим синдромом и группы сравнения Me (LQ; UQ)**

Показатели	Обследованные лица без МС (n=24)	Обследованные с МС (n=90)	p
Лептин, нг/мл	16,6 (8,41;22,5)	45,9 (25,4;81,0)	<0,001
Адипонектин, нг/мл	27,8(23,3;34,1)	22,2 (16,5;28,6)	<0,05
Резистин, нг/мл	4,35 (3,46;5,63)	5,19 (3,63;6,83)	>0,05
Висфатин, нг/мл	28,2 (20,7;28,5)	28,2 (21,4;28,6)	>0,05

Примечание: p – статистическая значимость межгрупповых различий

Сравнительный анализ показал, что в сыворотке крови пациентов с МС концентрация лептина оказалась статистически значимо выше, а концентрация адипонектина, напротив, ниже по сравнению с соответствующими показателями у лиц контрольной группы. Статистически значимых различий концентрации резистина и висфатина у обследованных сравниваемых групп наблюдения не обнаруживалось (табл. 15), хотя тенденция к увеличению этих показателей у пациентов с МС прослеживалась, что соответствует данным литературы [Чубриева С.Ю., 2008; Шварц В., 2009].

Для установления взаимосвязи между уровнем адипокинов в крови и выраженностью компонентов МС, включая концентрацию белков острой фазы, был проведен корреляционный анализ (табл. 16).

Таблица 16

**Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) корреляционные взаимосвязи ( $r$ ) концентрации адипокинов в сыворотке крови и уровня маркеров воспаления и клиничко-лабораторными симптомами метаболического синдрома**

Показатель	Лептин, нг/мл	Адипонектин, нг/мл	Резистин, нг/мл	Висфатин, нг/мл
Масса тела, кг	0,61	-	-	-
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	0,70	-	-	-
ОТ, см	0,59	-0,28	-	-
ОБ, см	0,66	-	-	-
ОТ/ОБ	0,30	-	-	-0,34
СД, см	0,61	-0,29	-	-
ООЖТ, л	0,67	-	-	-
ОПЖТ, л	0,64	-	-	-
ОВЖТ, л	0,61	-0,29	-	-
САД, мм рт. ст.	0,56	-	-	-
ДАД, мм рт. ст.	0,43	-	-	-



Показатель	Лептин, нг/мл	Адипонектин, нг/мл	Резистин, нг/мл	Висфатин, нг/мл
ТАГ, ммоль/л	0,42	-0,37	-	-
ЛПНП, ммоль/л	0,33	-	-	-
ЛПВП, ммоль/л	-	0,31	-	-
НЭЖТ, ммоль/л	-	-	-	-0,34
Инсулин, мкМЕД/мл	0,39	-0,36	-	-
НОМА-IR	0,39	-0,37	-	-
вчСРБ, мг/л	0,54	-0,39	-	-
Фибриноген, г/л	0,33	-	-	-0,46
Неоптерин, нмоль/л	0,38	-	-	-

Примечание: (-) – отсутствие статистически значимой взаимосвязи

Наибольшее количество положительных сильных взаимосвязей было обнаружено между клинико-лабораторными показателями МС и уровнем лептина в крови (табл. 16). Установленные нами положительные взаимосвязи уровня лептина с концентрацией маркеров системного воспаления (С-реактивный белок, неоптерин, фибриноген) свидетельствуют об описанном в литературе свойстве лептина влиять на клеточный иммунитет и продукцию провоспалительных цитокинов, которые регулируют синтез острофазовых белков печенью [Коваль С.Н., 2011].

В настоящее время известно, что адипонектин – это адипокин, который обладает выраженным противовоспалительным и антиатерогенным эффектами. Установлено, что уровень адипонектина в крови у лиц с абдоминальным ожирением снижен [Ouchi N., 2007], что также подтверждается нашими данными (табл. 15).

Результаты исследований роли висфатина и резистина в механизмах МС и связанного с ним воспалительного процесса противоречивы [Yaturu S. et al., 2012;

Abate N. et al., 2014]. Полученные нами сведения на данном этапе исследования также не позволяют однозначно установить роль вышеперечисленных адипокинов в механизмах МС, что требует дальнейшего изучения этого аспекта проблемы.

Известно, что жировая ткань у мужчин и женщин имеет разную гормональную активность, и связано это как с особенностями распределения жировой ткани, так и с влиянием половых гормонов [Quarta C. et al., 2012; You T. et al., 2012]. При этом гендерные особенности взаимосвязи гормональной активности жировой ткани и выраженности компонентов МС, включая воспаление, до настоящего времени не изучались.

В таблице 17 приведен сравнительный анализ уровня адипокинов в крови в группах больных с МС, разделенных по полу.

Таблица 17

**Анализ гормональной активности жировой ткани у больных с метаболическим синдромом в зависимости от пола Me (LQ; UQ)**

Показатели	Мужчины (n=12)	Женщины (n=40)	p
Лептин, нг/мл	15,0 (8,88;25,1)	43,4 (22,5;78,6)	<0,01
Адипонектин, нг/мл	19,2 (12,9;25,9)	26,5 (20,5;34,3)	<0,05
Резистин, нг/мл	4,31 (3,30;6,66)	4,73 (3,63;6,57)	>0,05
Висфатин, нг/мл	27,8 (20,9;28,2)	28,2 (20,7;28,6)	>0,05

Примечание: p – статистическая значимость сравниваемых показателей

Сравнительный анализ гормональной активности жировой ткани у пациентов с МС, распределенных по полу, показал, что концентрация лептина и адипонектина у женщин превышает таковую у мужчин, что согласуется с данными литературы [Lecke S.B. et al., 2011; Andreasson A.N. et al., 2012]. При этом статически значимых различий по концентрации резистина и висфатина у мужчин и женщин с МС не обнаруживалось (табл. 17).

На следующем этапе исследования нами был проведен корреляционный анализ для установления взаимосвязи клинико-лабораторных показателей МС, уровня маркеров системного воспаления и гормонов жировой ткани в крови отдельно у мужчин и женщин (табл. 18, 19).

Таблица 18

**Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) корреляционные взаимосвязи ( $r$ ) между клинико-лабораторными симптомами метаболического синдрома и концентрацией адипокинов в сыворотке у мужчин**

Показатель	Лептин, нг/мл	Адипонектин, нг/мл	Резистин, нг/мл	Висфатин, нг/мл
Возраст, лет	-	-	-	-
Масса тела, кг	0,68	-0,90	-	-
Рост, см	-	-	-0,62	-
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	0,88	-0,77	-	-
ОТ, см	0,93	-0,76	-	-
ОБ, см	0,75	-0,84	-	-
ОТ/ОБ	0,85	-0,66	-	-
СД, см	0,82	-0,64	-	-
ООЖТ, л	0,78	-0,88	-	-
ОПЖТ, л	0,78	-0,90	-	-
ОВЖТ, л	0,82	-0,64	-	-
САД, мм рт. ст.	0,77	-	-	-
ДАД, мм рт. ст.	0,73	-	-	-
ТАГ, ммоль/л	-	-0,73	-	-
ЛПНП, ммоль/л	-	-	-	-0,64
ЛПВП, ммоль/л	-	-	0,78	-
НЭЖТ, ммоль/л	-	-	-	-0,34
Лактат, ммоль/л	0,68	-	-	-
Инсулин, мкМЕД/мл	0,67	-0,65	-	-

Показатель	Лептин, нг/мл	Адипонектин, нг/мл	Резистин, нг/мл	Висфатин, нг/мл
НОМА-IR	0,72	-0,76	-	-
вчСРБ, мг/л	-	-0,86	-	-
Фибриноген, г/л	-	-	-	-0,46
Неоптерин, нмоль/л	-	-	-	-0,67

Примечание: (-) – отсутствие статистически значимой взаимосвязи

Таблица 19

**Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) корреляционные взаимосвязи ( $r$ ) между клинико-лабораторными симптомами метаболического синдрома и концентрацией адипокинов в сыворотке крови у женщин**

Показатель	Лептин, нг/мл	Адипонектин, нг/мл	Резистин, нг/мл	Висфатин, нг/мл
Возраст, лет	0,45	-	-	-
Масса тела, кг	0,81	-	-	-
Рост, см	-	-	-	0,39
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	0,79	-	-	-
ОТ, см	0,73	-	-	-
ОБ, см	0,78	-	-	-
ОТ/ОБ	0,41	-	-	-0,35
СД, см	0,76	-	-	-
ООЖТ, л	0,81	-	-	-
ОПЖТ, л	0,78	-	-	-
ОВЖТ, л	0,76	-	-	-
САД, мм рт. ст.	0,54	-	-	-
ДАД, мм рт. ст.	0,45	-	-	-
ОХС, ммоль/л	0,28			
ТАГ, ммоль/л	0,49	-0,34	-	-

Показатель	Лептин, нг/мл	Адипонектин, нг/мл	Резистин, нг/мл	Висфатин, нг/мл
ЛПНП, ммоль/л	0,38	-	-	-
ЛПВП, ммоль/л	-	-	-	-
НЭЖТ, ммоль/л	-	-	-	-0,46
МК, ммоль/л	0,39	-	-	-
Инсулин, мкМЕД/мл	0,48	-	-	-
НОМА-IR	0,48	-	-	-
вчСРБ, мг/л	0,60	-0,38	-	-
Фибриноген, г/л	0,39	-	-	-0,46
Неоптерин, нмоль/л	0,48	-	-	-

Примечание: (-) – отсутствие статистически значимой взаимосвязи

При анализе данных, представленных в таблицах 18 и 19, обращало на себя внимание наличие сильных положительных взаимосвязей концентрации лептина с большинством изучаемых показателей как у мужчин, так и у женщин с МС и наличие отрицательных взаимосвязей концентрации адипонектина с большим количеством переменных только у мужчин.

Таким образом, воспалительный процесс у пациентов с метаболическим синдромом взаимосвязан с гормональной активностью висцеральной жировой ткани. При этом гиперлептинемия играет ключевую роль в данной взаимосвязи для женщин, а гипoadипонектинемия – для мужчин.

### **3.2. Структурно-функциональные особенности жировой ткани у больных с метаболическим синдромом**

#### **3.2.1. Морфологические свойства висцеральной жировой ткани у больных с метаболическим синдромом**

Из литературных источников последнего времени известно, что ожирение является хроническим воспалительным заболеванием. Данное положение подтверждается изменениями висцеральной жировой ткани воспалительного

характера. Воспаление существенно влияет на метаболическую и секреторную функции жировой ткани и играет ведущую роль в развитии ассоциированных с ожирением патологических процессов. Основным морфологическим признаком воспаления жировой ткани при ожирении является инфильтрация ее мононуклеарными лейкоцитами, что разрешает рассматривать ее не только как эндокринный орган, но и как орган иммунной системы. Механизм и регуляция этого процесса пока еще плохо изучены.

Для определения морфологических свойств жировой ткани в настоящем исследовании было проведено гистологическое исследование фрагментов жировой ткани, взятой из большого сальника больных с МС, которое показало, что препараты были представлены белой жировой тканью как с типичным для нее строением (рис. 4), так и с выраженными нарушениями структуры (рис. 5-7).

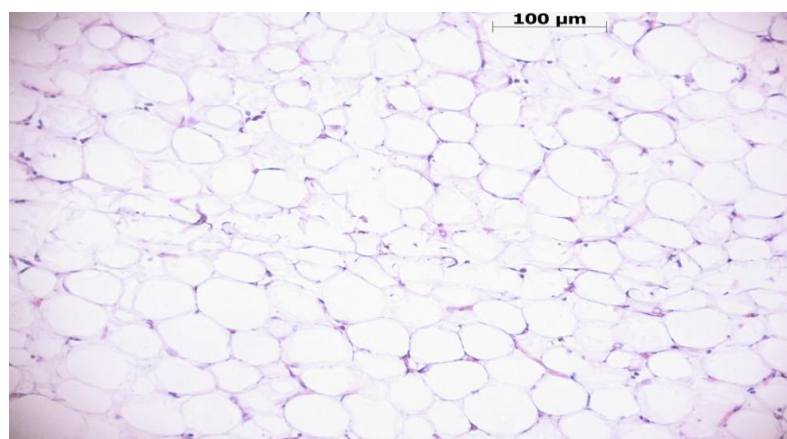


Рис. 4. Микропрепарат белой жировой ткани сальника у больной К. с отсутствием каких-либо нарушений. Окраска – гематоксилин и эозин.  
Увеличение 160

Как видно из рис. 4, во фрагментах жировой ткани представлено характерное для неё строение, жировые клетки были сгруппированы в дольки, ограниченные прослойками волокнистой рыхлой соединительной ткани, содержащей питающие кровеносные сосуды. Эти сосуды преимущественно были представлены типичными сосудами микроциркуляторного русла.

Однако практически во всех случаях на исследуемых препаратах были обнаружены изменения в виде выраженного расширения просветов венозных

сосудов, перенаполнение их кровью (венозная гиперемия), расширение капилляров, формирование в них из агрегатов эритроцитов по типу «монетных столбиков» (стаз). У части пациентов в венозных сосудах присутствовало разделение крови на компоненты (сепарация) (рис. 5).

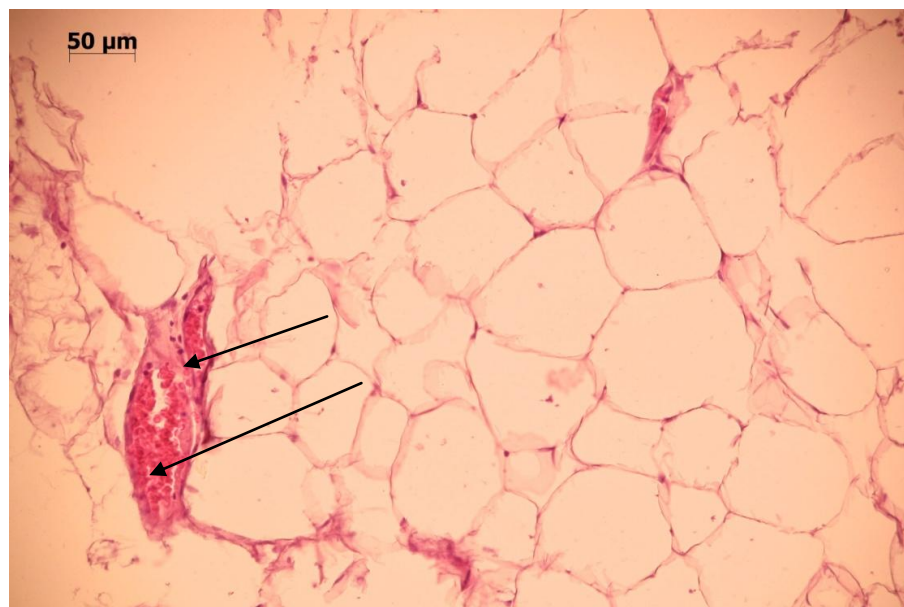


Рис. 5. Белая жировая ткань сальника у больной С. Стрелками указаны гиперемизированные венозные сосуды. Окраска – гематоксилин и эозин

В ряде препаратов в одном поле зрения обнаруживались адипоциты, существенно различающиеся по диаметру (анизоцитоз). Нередко при этом жировые клетки были сжаты и деформированы (рис. 6).

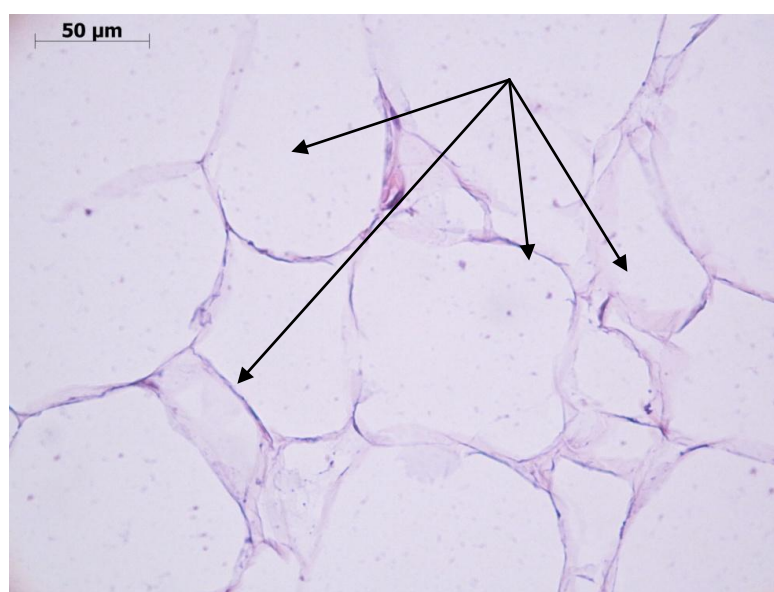


Рис. 6. Белая жировая ткань сальника у больной Т. Стрелками обозначены явления анизоцитоза адипоцитов. Окраска – гематоксилин и эозин

Гистологическое исследование показало, что объемная плотность адипоцитов, сосудов, соединительной ткани и лейкоцитов в жировой ткани у больных с МС могут значительно варьировать, при этом у части пациентов количество инфильтратов в  $1 \text{ мм}^2$  значительно превышало таковое в среднем в группе (рис. 7).

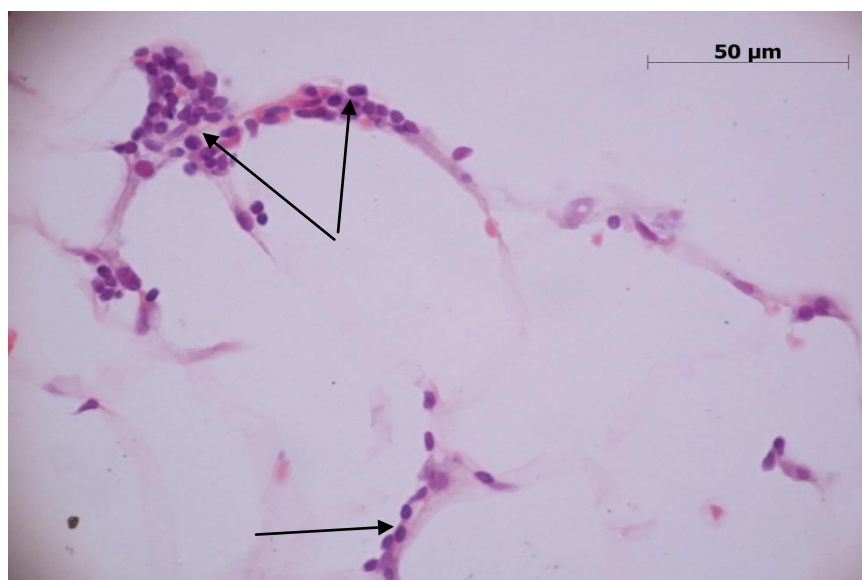


Рис. 7. Белая жировая ткань сальника у больной Б. Клеточная инфильтрация междольковой стромы (указано стрелками). Окраска – гематоксилин и эозин

Принимая во внимание тот факт, что диаметр адипоцитов у обследованных нами больных с МС имел нормальное распределение и учитывая то, что в большинстве случаев обнаруживался значительный разброс величин этого параметра (анизоцитоз), для сравнительного анализа использовали несколько описательных переменных (Me, LQ, UQ, Max, Min, M, SD). Данные проводимого морфометрического исследования представлены в таблице 20, анализ которых выявил наличие статистически значимых различий в сравниваемых группах наблюдения по диаметру и объемной плотности адипоцитов, а также по количеству инфильтратов, что подтверждает точку зрения ряда авторов, утверждающих, что ожирение сопровождается воспалением жировой ткани [Sun S. et al., 2012; Lee B-C., Lee J., 2014].



**Морфологические параметры висцеральной жировой ткани  
у больных с метаболическим синдромом и его отсутствием  
Me (LQ; UQ)**

Показатели	Обследованные больные		p
	без MC (n=6)	с MC (n=27)	
ОП адипоцитов (мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup> )	95,4 (93,6;95,9)	97,5 (96,1;98)	<0,05
ОП сосудов (мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup> )	1,60 (1,20;2,10)	1,10 (0,70;1,60)	>0,05
ОП соединительной ткани (мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup> )	2,15 (1,40;3,20)	1,20 (0,90;1,70)	>0,05
ОП инфильтратов (мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup> )	0,40 (0,20;0,70)	1,05 (0,80;2,10)	<0,05
Инфильтрат (количество клеток в 1 мм <sup>2</sup> )	29,3 (12,7;37,7)	70,0 (29,7;109,7)	<0,05
Диаметр адипоцитов (мкм)	81,6 (61,2;86,2)	88,5 (82,9;96,1)	<0,05

Примечание: ОП – объемная плотность

Из числа изученных нами гормонов жировой ткани уровень лептина в сыворотке крови, как специфического адипокина жировой ткани, отличался наибольшим числом взаимосвязей с компонентами MC (табл. 15). Поэтому нам представлялось целесообразным изучить взаимосвязь морфометрических характеристик жировой ткани с компонентами MC у пациентов с MC с разным уровнем лептина в крови, предположив, что характер данной взаимосвязи может зависеть от степени гормональной активности жировой ткани. Первую группу обследованных (1) составили пациенты (n=10) с нормальным уровнем лептина в сыворотке крови (для женщин  $\leq 27,6$  нг/мл), вторую группу (2) – с гиперлептинемией (n=17) [Миняйлова Н.Н. и соавт. 2009]. Пациенты обеих групп существенно не различались по большинству изучавшихся нами клинико-лабораторных параметров. Далее проводился корреляционный анализ, результаты которого представлены в таблицах 21 и 22.

Было обнаружено, что из всех изученных нами морфометрических показателей только значения ряда переменных диаметра адипоцитов и степени инфильтративных изменений жировой ткани коррелировали с компонентами МС.

Таблица 21

**Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) корреляционные взаимосвязи ( $r$ ) морфометрических характеристик жировой ткани и клинико-лабораторных симптомов метаболического синдрома у пациентов без гиперлептинемии ( $n=10$ )**

Показатели	М, мкм	Me, мкм	Max, мкм	ОП, мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup> инфильтратов	Количество инфильтратов в 1 мм <sup>2</sup>
Масса тела, кг	0,82	0,85	0,82	-	-
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	-	-	-	-0,78	-0,87
ОТ, см	-	-	-	-	-
ОБ, см	-	-	0,68	-	-
ОТ/ОБ	-	-	-	-	-
СД, см	-	-	-	-	-0,71
ООЖТ, л	0,68	-	0,77	-	-0,77
ОВЖТ, л	-	-	-	-	-0,71
ОПЖТ, л	-	0,67	0,73	-	-0,77
Глюкоза, ммоль/л	-	-	0,71	-	-0,70
ОХС, ммоль/л	-	-	-	-	-

Показатели	М, мкм	Ме, мкм	Мах, мкм	ОП, мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup> инфильтратов	Количество инфильтратов в 1 мм <sup>2</sup>
ЛПНП, ммоль/л	-	-	-	-	-
Лептин, нг/мл	-	-	-	-	-
Неоптерин, нмоль/л	-	-	-	-	-
Инсулин, мкМЕД/мл	-	-	-	-	-
НОМА-IR	-	-	-	-	-

Примечание: (-) – отсутствие статистически значимой взаимосвязи, ОП – объемная плотность, М – среднее арифметическое, Ме – медиана

Таблица 22

**Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) корреляционные взаимосвязи ( $r$ ) морфометрических характеристик жировой ткани и клинико-лабораторных симптомов метаболического синдрома у пациентов с гиперлептинемией ( $n=17$ )**

Показатели	М, мкм	Ме, мкм	Мах, мкм	ОП, мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup> инфильтратов	Количество инфильтратов в 1 мм <sup>2</sup>
Масса тела, кг	-	-	-	0,76	-
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	-	-	-	0,73	-
ОТ, см	-	-	-	0,72	-
ОБ, см	0,67	-	-	-	-

Показатели	М, мкм	Ме, мкм	Мах, мкм	ОП, мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup> инфильтратов	Количество инфильтратов в 1 мм <sup>2</sup>
ОТ/ОБ	-	-	-	-	-
СД, см	-	-	0,59	-	-
ООЖТ, л	-	-	-	0,75	-
ОВЖТ, л	-	-	0,59	-	-
ОПЖТ, л	-	-	-	0,82	-
Глюкоза, ммоль/л	-	-	-	-	-
ОХС, ммоль/л	-	-	0,62	-	-
ЛПНП, ммоль/л	-	-	0,78	-	-
Лептин, нг/мл	-	-	-	-	-
Неоптерин, нмоль/л	-	-	-	0,65	0,64
Инсулин, мкМЕД/мл	-	-	-	-	-
НОМА-IR	-	-	-	-	-

Примечание: (-) – отсутствие статистически значимой взаимосвязи

При сравнительном анализе фактических данных, представленных в таблицах 21 и 22 было обнаружено, что у пациентов с нормальным уровнем лептина диаметр адипоцитов имел прямую взаимосвязь с антропометрическими показателями периферического ожирения (ОБ, ООЖТ, ОПЖТ), а у пациентов с гиперлептинемией – с признаками абдоминального ожирения (ОТ, ОТ/ОБ, СД,

ОВЖТ); у пациентов с нормальным уровнем лептина отмечалась обратная взаимосвязь между степенью инфильтративных изменений и клинико-лабораторными симптомами МС, а у пациентов с гиперлептинемией, напротив, обнаруживались сильные положительные взаимосвязи морфометрических параметров, характеризующих инфильтрацию в жировой ткани и компонентов МС, включая концентрацию неоптерина (маркер системного воспаления) в сыворотке крови.

С целью установления диагностической значимости клинико-лабораторных параметров МС, в том числе белков острой фазы, при оценке выраженности инфильтрации в жировой ткани проводился логистический регрессионный анализ, который обнаружил положительную статистически значимую взаимосвязь количества инфильтратов в жировой ткани только с уровнем неоптерина ( $R=0,495$ ,  $p=0,02$ ). Уравнение логистической регрессии при этом имеет вид:  $Y = \beta_0 + \beta_1 \times X$ , то есть  $\ln(\text{количество инфильтратов в } 1 \text{ мм}^2) = 1,788 + 0,685 \times \ln(\text{концентрация неоптерина в крови})$ . В связи с этим оценку концентрации неоптерина в крови можно предложить в качестве диагностически значимого показателя воспаления жировой ткани, определяемого в условиях клиники.

### **3.2.2. Особенности экспрессии CD-маркеров клетками жировой ткани у пациентов с метаболическим синдромом**

Проведенное нами гистологическое исследование убедительно показало, что лейкоцитарная инфильтрация жировой ткани отражает воспаление при абдоминальном ожирении.

При этом фенотипический профиль клеток жировой ткани (включая иммунокомпетентные клетки) при абдоминальном ожирении остается малоизученным.

В связи с этим нами была проведена оценка экспрессии CD-маркеров клетками жировой ткани методом иммуногистохимии (рис. 8-16, табл. 23).

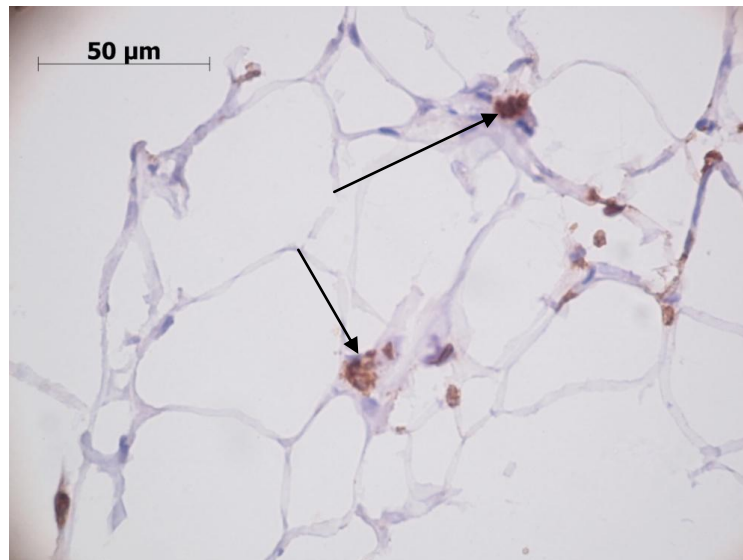


Рис. 8. Белая жировая ткань сальника у больной Л. Стрелками указаны CD3-позитивные клетки. Иммунопероксидазный метод. Окраска – диаминобензидин, гематоксилин

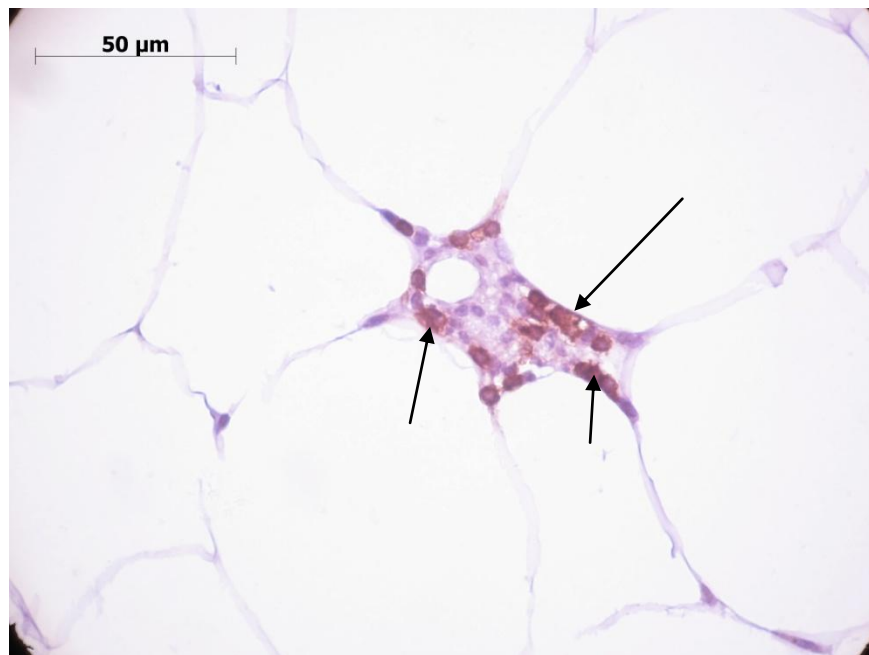


Рис. 9. Белая жировая ткань сальника у больной О. Стрелками указаны CD20-позитивные клетки. Иммунопероксидазный метод. Окраска – диаминобензидин, гематоксилин

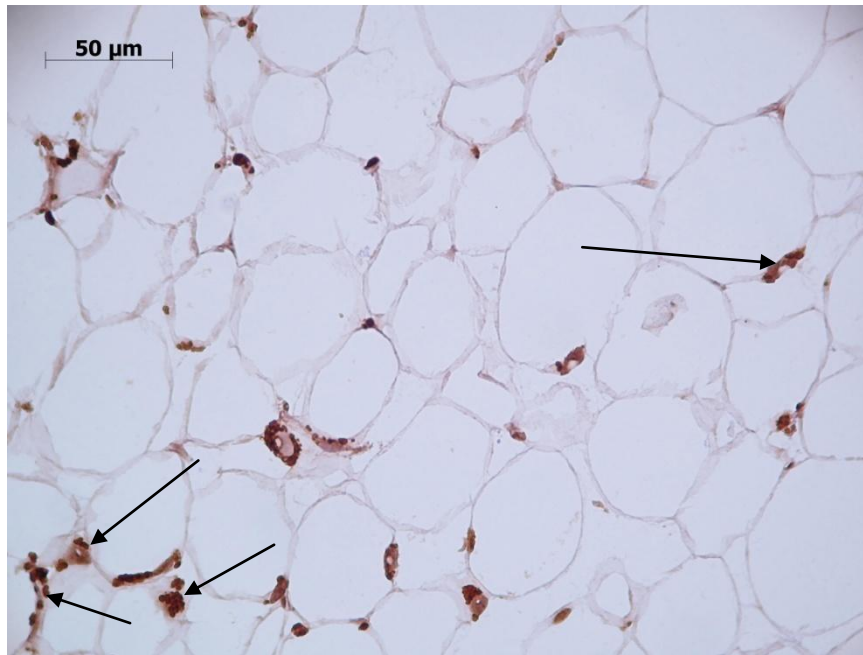


Рис. 10. Белая жировая ткань сальника у больной С. Стрелками указаны CD25-позитивные клетки. Иммунопероксидазный метод. Окраска – диаминобензидин, гематоксилин

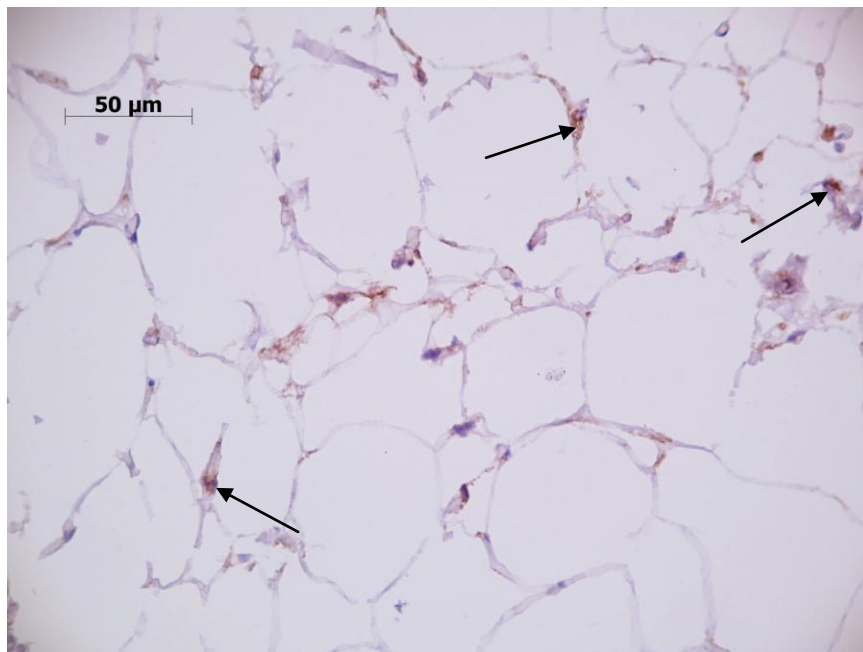


Рис. 11. Белая жировая ткань сальника у больной Н. Стрелками указаны CD31-позитивные клетки. Иммунопероксидазный метод. Окраска – диаминобензидин, гематоксилин

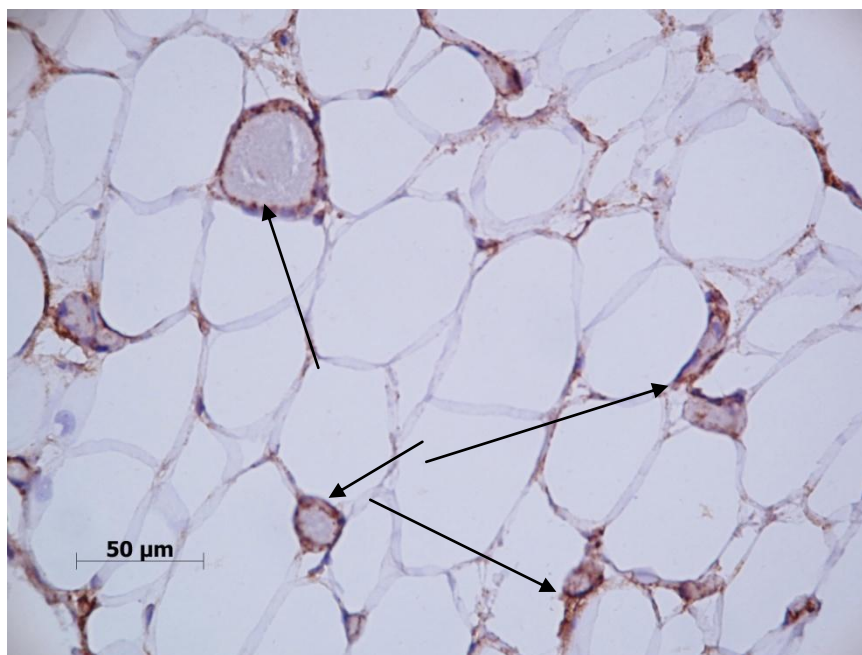


Рис. 12. Белая жировая ткань сальника у больной П. Стрелками указаны CD34-позитивные клетки. Иммунопероксидазный метод. Окраска – диаминобензидин, гематоксилин

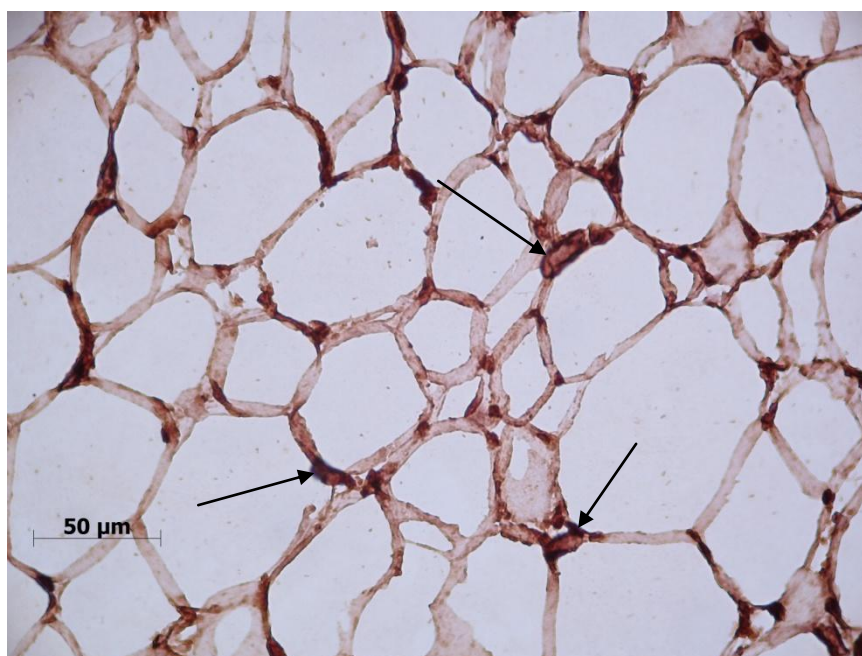


Рис. 13. Белая жировая ткань сальника у больной Д. Стрелками указаны CD36-позитивные клетки. Иммунопероксидазный метод. Окраска – диаминобензидин, гематоксилин



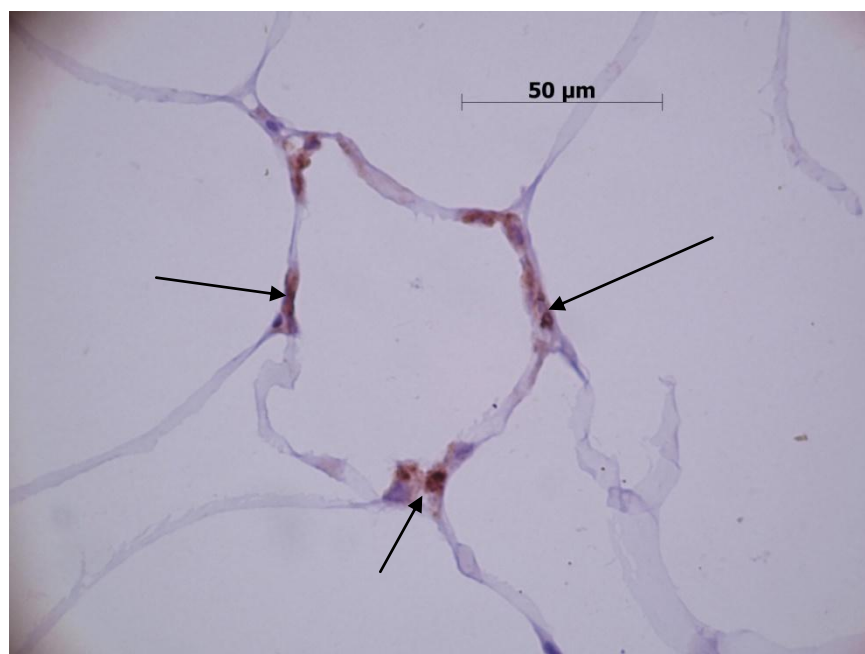


Рис. 14. Белая жировая ткань сальника у больной И. Стрелками указаны CD68-позитивные клетки. Иммунопероксидазный метод. Окраска – диаминобензидин, гематоксилин

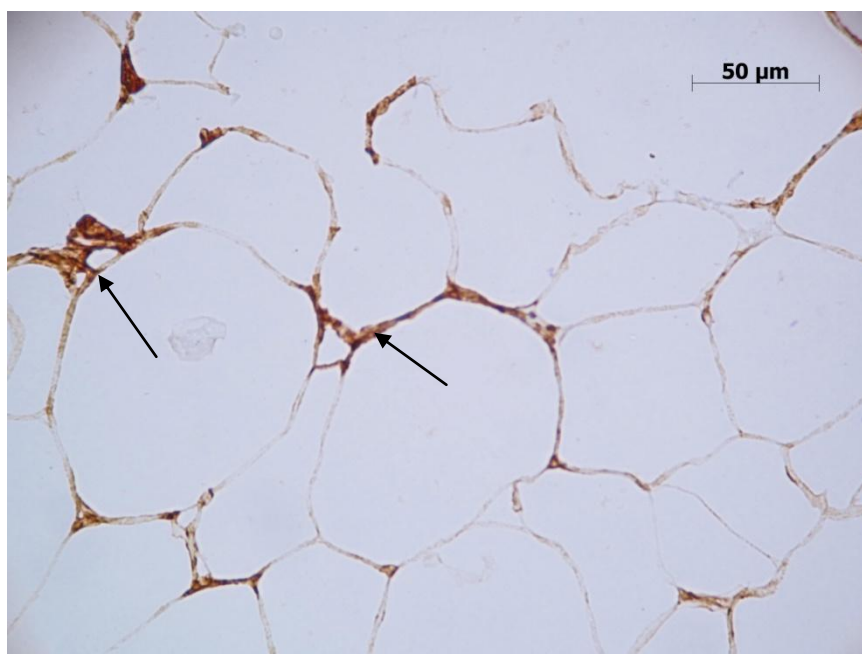


Рис. 15. Белая жировая ткань сальника у больной М. Стрелками указано наличие экспрессии Vimentin. Иммунопероксидазный метод. Окраска – диаминобензидин, гематоксилин

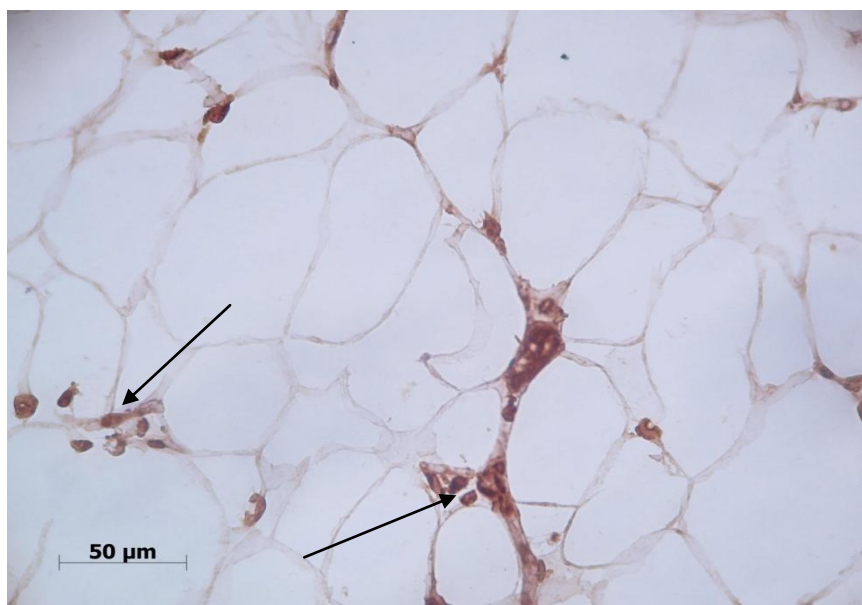


Рис. 16. Белая жировая ткань поджелудочной железы у больной Г. Стрелками указано наличие экспрессии TGFβ. Иммунопероксидазный метод. Окраска – диаминобензидин, гематоксилин

Таблица 23

**Экспрессия CD-маркеров клетками жировой ткани у больных с метаболическим синдромом и его отсутствием по данным иммуногистохимии Me (LQ; UQ)**

Показатели, условные единицы	Обследованные лица		p
	без MC (n=6)	с MC (n=31)	
CD3	0,03 (1,15;3,90)	2,90 (1,90;6,20)	>0,05
CD20	0 (0;0,15)	0 (0;0)	>0,05
CD25	12,4 (10,0;24,0)	12,4 (11,4;20,6)	>0,05
CD31	0,50 (0,20;0,90)	0,50 (0,30;1,00)	>0,05
CD34	5,50 (3,40;7,80)	3,10 (2,00;4,90)	>0,05
CD36	25,9 (19,5;34,1)	23,1 (20,6;25,3)	>0,05

Показатели, условные единицы	Обследованные лица		p
	без МС (n=6)	с МС (n=31)	
CD68	0,15 (0;0,50)	0,70 (0;1,40)	<0,05
Vimentin	12,8 (9,60;15,9)	11,6 (9,00;14,6)	>0,05
TGF β	1,10 (0,60;3,60)	1,90 (0,80;3,70)	>0,05

Примечание: p – статистическая значимость межгрупповых различий

Из таблицы 23 следует, что из всех изученных нами CD-маркеров, экспрессирующихся на поверхности клеток жировой ткани, статистически значимые различия у пациентов сравниваемых групп наблюдения были обнаружены только по уровню экспрессии CD68 (маркер макрофагов). Обращало на себя внимание также тенденция к увеличению количества CD3+клеток (маркер лимфоцитов) у пациентов с МС.

Известно, что CD36-маркер могут экспрессировать клетки разных популяций, включая клетки жировой ткани (адипоциты, моноциты, макрофаги, В-клетки, тромбоциты, эндотелиальные клетки и др.) [Moniuszko M. et al., 2006; Puig-Kroger A. et al., 2006; Helming L. et al., 2008]. В виду того, что иммуногистохимическое исследование не позволяет точно дифференцировать клеточные популяции, мы оценивали уровень экспрессии CD36 на предварительно выделенных адипоцитах и мезенхимальных стромальных клетках жировой ткани с помощью метода проточной лазерной цитофлуориметрии (табл. 24).

**Особенности экспрессии CD36 адипоцитами и мезенхимальными стромальными клетками висцеральной жировой ткани у больных с наличием и отсутствием метаболического синдрома по данным проточной цитофлуориметрии Me (LQ; UQ)**

Показатели	Обследованные больные		p
	без MC (n=6)	с MC (n=16)	
МСК (%)	12,9 (6,35;29,1)	26,45 (12,7;36,2)	>0,05
Адипоциты (%)	9,10 (5,90;10,1)	6,90 (4,40;11,8)	>0,05

Примечание: p – статистическая значимость межгрупповых различий, МСК – мезенхимальные стромальные клетки.

Из таблицы 24 следует, что адипоциты и мезенхимальные стромальные клетки висцеральной жировой ткани у больных обеих сравниваемых групп наблюдения примерно в равной степени экспрессировали на своей поверхности CD36-маркер (рис. 17, 18). По количеству CD36+клеток статистически значимые различия обнаружены не были, хотя обращала на себя внимание тенденция к увеличению удельного веса CD36+МСК у пациентов с MC (табл. 24).

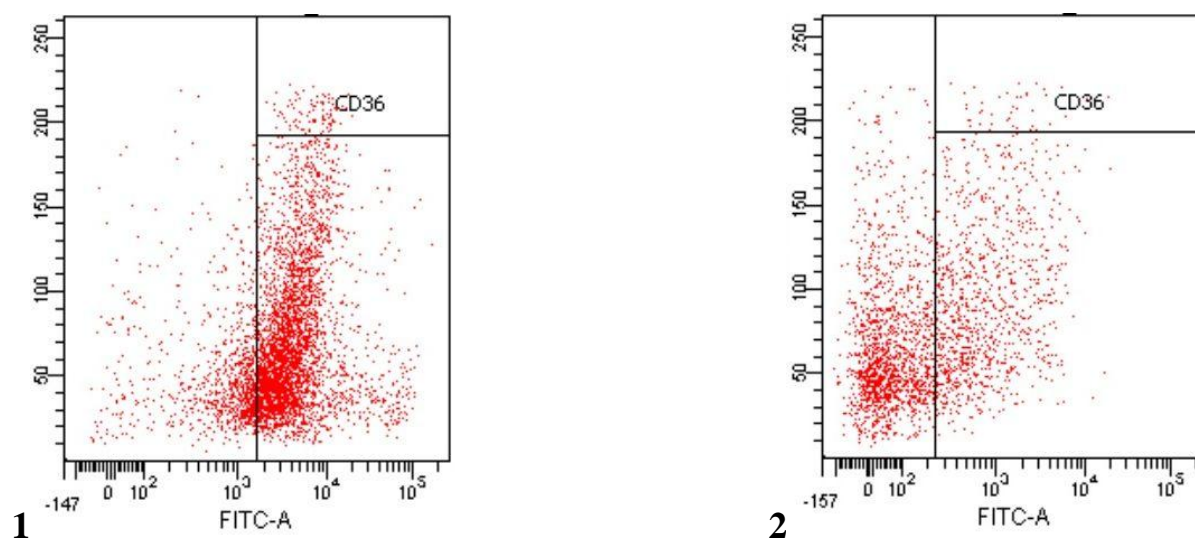


Рис. 17. Экспрессия CD36-маркера мезенхимальными стромальными клетками: 1 – больная С. с MC, 2 – больная К. без MC

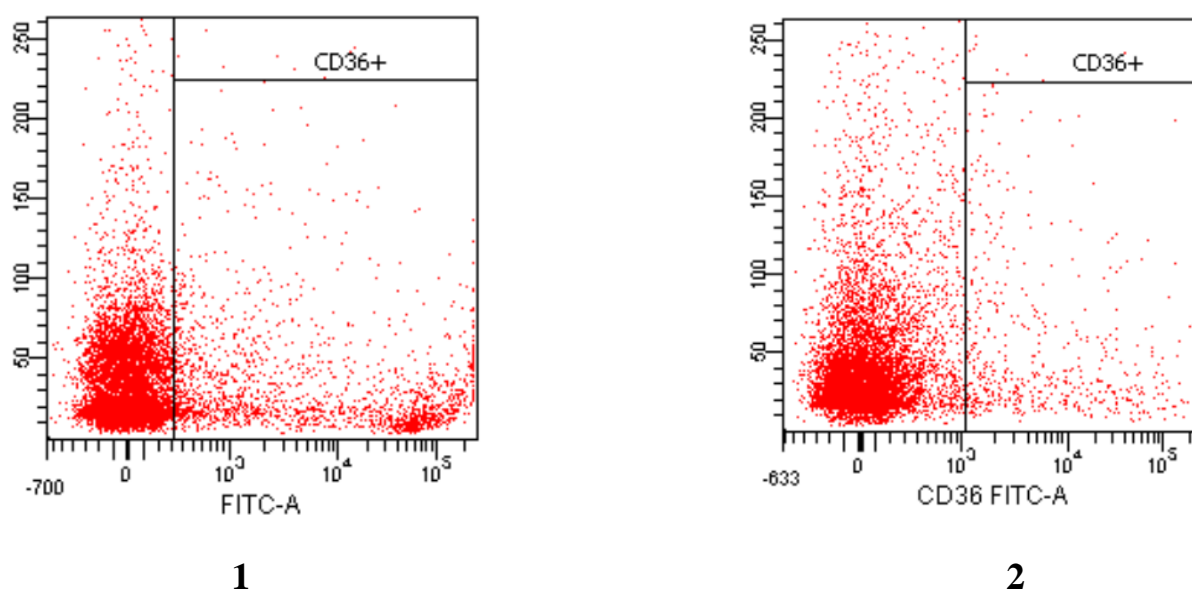


Рис. 18. Экспрессия CD36-маркера адипоцитами: 1 – больная В. с МС, 2 – больная М. без МС

Корреляционный анализ (табл. 25) позволил установить положительные взаимосвязи уровня экспрессии некоторых CD-маркеров с объемной плотностью и количеством инфильтратов в жировой ткани.

Таблица 25

**Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) корреляционные взаимосвязи ( $r$ ) между морфологическими параметрами и иммунофенотипическим составом клеток жировой ткани у больных с метаболическим синдромом и его отсутствием**

Показатели	ОП инфильтратов (мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup> )	Количество инфильтратов в 1 мм <sup>2</sup>
CD3, %	-	0,357
CD36, %	0,505	0,575
CD68, %	-	0,374

Примечание: (-) – отсутствие статистически значимой взаимосвязи, ОП – объемная плотность

Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о том, что в образовании обнаруженных при морфометрии клеточных инфильтратов висцеральной жировой ткани принимали участие CD3<sup>+</sup> лимфоциты, CD36<sup>+</sup> и

CD68+ макрофаги. При этом со степенью ожирения имел статистически значимую прямую корреляцию только уровень экспрессии CD68: с массой тела ( $r=0,342$ ,  $p<0,05$ ), с ОПЖТ ( $r=0,355$ ,  $p<0,05$ ), что также согласуется с результатами некоторых исследователей [Harman-Boehm I., et al., 2007]. Удельный вес CD36+ МСК имел сильную положительную взаимосвязь с уровнем лептина ( $r=0,986$ ,  $p<0,05$ ) и отрицательную – с уровнем адипонектина ( $r=-0,885$ ,  $p<0,05$ ) в крови, что позволяет предполагать участие гормонов жировой ткани в процессе дифференцировки клеток жировой ткани.

### 3.2.3. Особенности спонтанной продукции активных форм кислорода клетками жировой ткани у пациентов с метаболическим синдромом

Известно, что воспаление сопровождается усилением свободно-радикального окисления и увеличением выработки активных форм кислорода (АФК), принимающих участие в регуляции сигнальных систем клетки [Часовских Н.Ю. и соавт., 2009]. Для оценки функциональной активности клеток жировой ткани в настоящем исследовании определяли уровень спонтанной продукции АФК МСК и адипоцитами жировой ткани у пациентов с МС и группы сравнения (табл. 26, рис. 19, 20).

Таблица 26

#### Спонтанная продукция активных форм кислорода клетками жировой ткани у больных с метаболическим синдромом и его отсутствием Me (LQ; UQ)

Показатели	Обследованные больные		p
	без МС (n=6)	с МС (n=16)	
МСК (усл. ед.)	0,332 (0,094;0,553)	0,505 (0,218;1,065)	<0,05
Адипоциты (усл. ед.)	0,063 (0,061;0,256)	0,321 (0,135;0,495)	<0,05

Примечание: p – статистическая значимость межгрупповых различий, МСК – мезенхимальные стромальные клетки

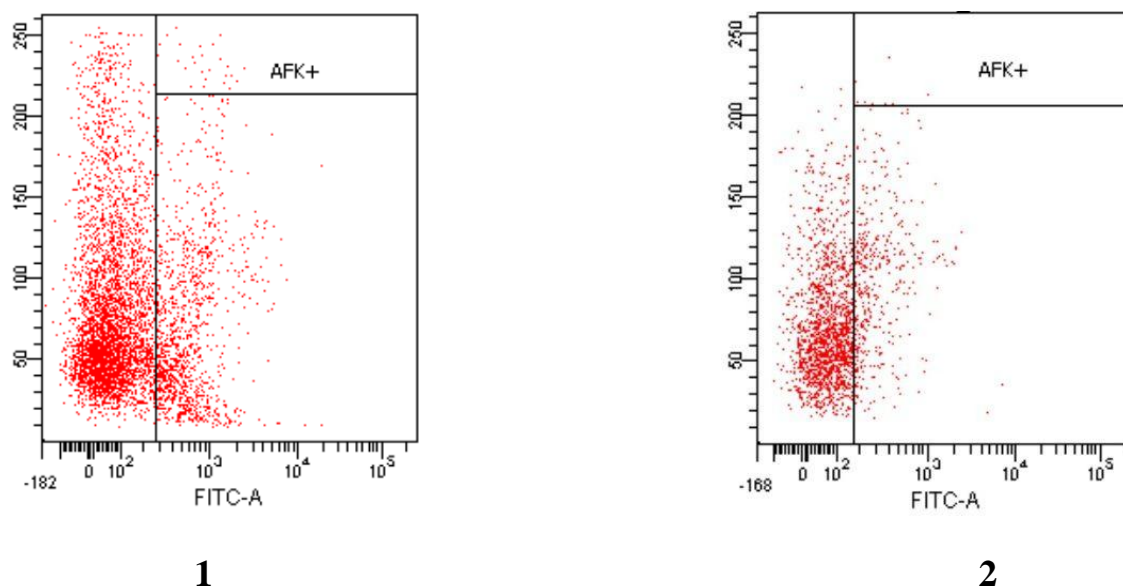


Рис. 19. Спонтанная продукция активных форм кислорода мезенхимальными стромальными клетками: 1 – больная Л. с МС, 2 – больная П. без МС

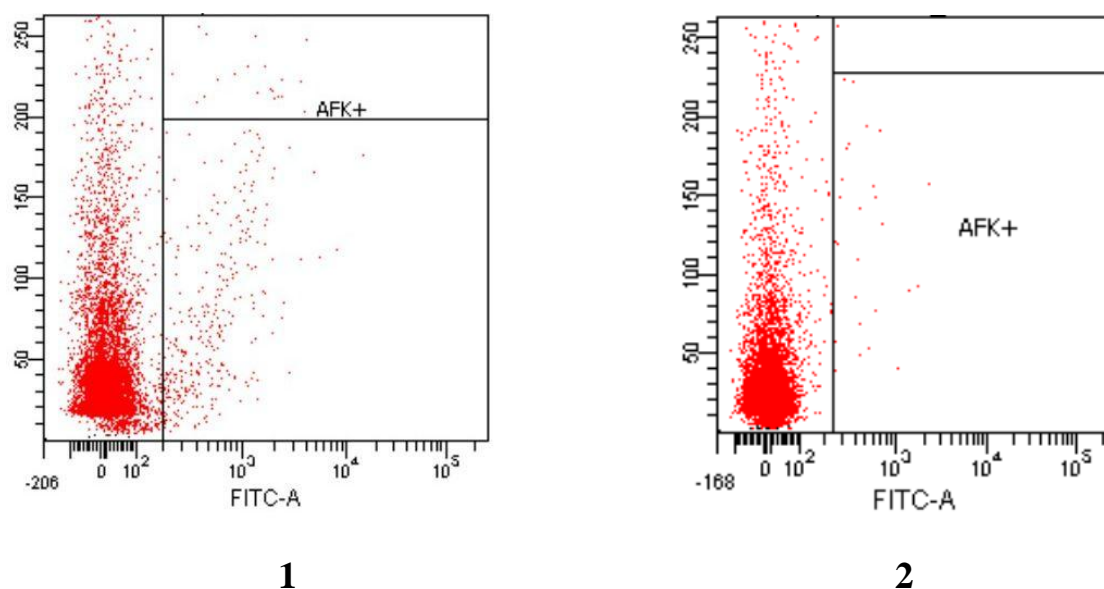


Рис. 20. Спонтанная продукция активных форм кислорода адипоцитами: 1 – больная В. с МС, 2 – больная И. без МС

Уровень АФК в клетках характеризует метаболическое состояние последних, и его изменение при МС является сигнальным механизмом для запуска в организме различных клеточных процессов, оказывающих негативное влияние [Часовских Н.Ю. и соавт., 2009]. Из рисунков 19, 20 и таблицы 26 следует, что обе клеточные популяции обладают способностью к спонтанной продукции АФК, при этом уровень ее в мезенхимальных стромальных клетках у

пациентов обеих исследуемых групп был значительно выше, чем в адипоцитах. Статистически значимое преобладание спонтанной продукции АФК и адипоцитами, и мезенхимальными стромальными клетками у пациентов с МС свидетельствует о повышении их провоспалительной активности.

На следующем этапе настоящего исследования с помощью корреляционного анализа нами была предпринята попытка установить взаимосвязь между уровнем спонтанной продукции АФК клетками жировой ткани и клинико-лабораторными показателями МС (табл. 27).

Таблица 27

**Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) корреляционные взаимосвязи ( $r$ ) между уровнем продукции АФК клетками жировой ткани и клинико-лабораторными показателями метаболического синдрома**

Показатель	Адипоциты (усл. Ед.)	Мезенхимальные стромальные клетки (усл. Ед.)
Масса тела, кг	0,51	-
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	0,58	-
ОТ, см	0,57	-
ОБ, см	0,58	-
СД, см	0,69	-
ООЖТ, л	0,56	-
ОВЖТ, л	0,69	-
ОПЖТ, л	0,49	-
ТАГ, моль/л	-	0,48
Лактат, моль/л	0,58	-



Показатель	Адиipoциты (усл. Ед.)	Мезенхимальные стромальные клетки (усл. Ед.)
вчСРБ, мг/л	0,93	-
Адипонектин, нг/мл	-0,90	-0,93
Висфатин, нг/мл	-	0,79

Примечание: (-) – отсутствие статистически значимой взаимосвязи

Результаты корреляционного анализа показали сильные прямые связи уровня спонтанной продукции АФК адипоцитами и ряда клинико-лабораторных параметров МС, включая концентрацию С-реактивного белка (неспецифический маркер воспаления), с которой положительная взаимосвязь оказалась наиболее сильной. Отрицательная взаимосвязь уровня спонтанной продукции АФК обеих популяций клеток с уровнем адипонектина в крови является свидетельством антиоксидантного и противовоспалительного действия последнего в организме [Wanders D. et al., 2013; Litvinova L. et al., 2014; Nakatsuji H. et al., 2014].

#### **3.2.4. Особенности спонтанной продукции цитокинов клетками жировой ткани у пациентов с метаболическим синдромом**

Поскольку одной из характеристик функциональной активности клеток является их способность к продукции цитокинов [Zhang J-M, An J., 2007; Lacy P., Stow J.L., 2011], нами была проведена оценка спонтанной продукции про – и противовоспалительных цитокинов клетками жировой ткани. Результаты данного фрагмента исследования представлены в таблице 28.

**Концентрация цитокинов в супернатантах биоптатов жировой ткани, адипоцитов и мезенхимальных стромальных клеток у больных с метаболическим синдромом и его отсутствием Me (LQ; UQ)**

Показатели	Обследованные больные		p
	без MC	с MC	
<b>IL-1<math>\beta</math> (пг/мл)</b>			
Биоптат ЖТ	9,84 (1,72;15,5)	32,8 (17,3;136,3)	<0,05
Адипоциты	0,10 (0;0,30)	0,18 (0,06;0,49)	>0,05
МСК	0,12 (0,04;0,30)	0,14 (0;0,54)	>0,05
<b>IL-2 (пг/мл)</b>			
Биоптат ЖТ	0 (0;0,4)	0 (0;0,13)	>0,05
Адипоциты	0 (0;0)	0 (0;0)	>0,05
МСК	0 (0;0)	0 (0;0)	>0,05
<b>IL-4 (пг/мл)</b>			
Биоптат ЖТ	2,74 (2,15;3,29)	4,62 (3,45;5,55)	>0,05
Адипоциты	2,36 (2,15;2,38)	3,77 (3,25;6,56)	>0,05
МСК	1,93 (1,63;2,36)	3,83 (3,27;5,01)	>0,05
<b>IL-6 (пг/мл)</b>			
Биоптат ЖТ	329,7 (284,3;343,9)	313,0 (284,6;329,7)	>0,05
Адипоциты	0 (0;0)	0 (0;0,26)	>0,05
МСК	0,82 (0;6,29)	0,36 (0;5,39)	>0,05
<b>IL-8 (пг/мл)</b>			
Биоптат ЖТ	212,5 (30,6;249,1)	281,5 (240,6;313,4)	<0,05
Адипоциты	2,13 (0,01;4,92)	5,42 (0,91;9,66)	>0,05
МСК	2,92 (0,43;8,63)	5,20 (2,38;38,3)	>0,05
<b>IL-10 (пг/мл)</b>			
Биоптат ЖТ	28,3 (22,3;50,9)	25,0 (8,75;40,7)	>0,05
Адипоциты	-	-	-
МСК	-	-	-
<b>IFN-<math>\gamma</math> (пг/мл)</b>			
Биоптат ЖТ	7,74 (5,83;8,20)	6,39 (2,93;8,31)	>0,05
Адипоциты	6,32 (4,34;6,97)	5,16 (4,27;8,31)	>0,05
МСК	6,20 (4,86;6,79)	5,45(3,60;6,63)	>0,05

Показатели	Обследованные больные		p
	без МС	с МС	
TNF- $\alpha$ (пг/мл)			
Биоптат ЖТ	17,5 (14,4;46,6)	17,7 (9,67;43,0)	>0,05
Адиipoциты	0 (0;1,25)	0,57 (0;8,64)	>0,05
МСК	0 (0;1,21)	3,75 (0,96;10,6)	<0,05
MCP-1 (пг/мл)			
Биоптат ЖТ	98,8 (65,9;2110,5)	1322,5 (108,4;2693,5)	<0,05
Адиipoциты	5,00 (0;5,54)	2,02 (0;5,00)	>0,05
МСК	5,11 (0;5,75)	5,00 (0;8,03)	>0,05

Примечание: p – статистическая значимость межгрупповых различий, (-) – отсутствие статистически значимой взаимосвязи, ЖТ – жировая ткань, МСК – мезенхимальные стромальные клетки

Из таблицы 28 видно, что концентрация провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-8, MCP-1 в супернатантах биоптата жировой ткани и TNF- $\alpha$  в супернатантах мезенхимальных стромальных клеток у пациентов с МС оказалась статистически значимо выше таковой у обследованных лиц сравниваемой группы. IL-8 является хемокином, который как MCP-1 стимулирует хемотаксис иммунокомпетентных клеток и способствует развитию инфильтративных изменений тканей [Bergin D.A., 2010; Henkels K.M. et al., 2013]. Повышенная продукция IL-1 $\beta$ , IL-8, MCP-1 клетками жировой ткани характеризует ее провоспалительную активность при МС.

Для установления роли цитокинпродуцирующей активности жировой ткани в патогенезе МС и связанного с ним воспаления в настоящей работе использовался корреляционный анализ (табл. 29).

**Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) корреляционные взаимосвязи ( $r$ ) между спонтанной продукцией цитокинов биоптата жировой ткани и клинико-лабораторными симптомами метаболического синдрома**

Показатель	IL-1 $\beta$ ЖТ	IL-4 ЖТ	IL-6 ЖТ	IL-8 ЖТ	IL-10 ЖТ	IFN- $\gamma$ ЖТ	MCP-1 ЖТ
Масса тела, кг	0,40	-	-	0,48	-	-	0,38
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	-	-	-0,24	-	-	-	0,32
ОТ, см	-	-	-0,27	0,49	-	-	-
ОБ, см	0,32	-	-0,20	-	-	-	-
СД, см	-	-	-0,26	-	-	-	-
ООЖТ, л	0,38	-	-0,28	0,38	-	-	-
ОВЖТ, л	-	-	-0,26	-	-	-	-
ОПЖТ, л	0,42	-	-	0,41	-	-	-
САД, мм рт. ст.	-	-	-0,47	-	-	-	-
ДАД, мм рт. ст.	-	-	-0,53	-	-	-	-
МК, ммоль/л	-	-	-	-	0,52	-	-
Лактат, ммоль/л	-	-0,52	-	-	-	-	-
Инсулин, мкМЕД/мл	-	-0,50	-0,33	-	-	-	-
НОМА-IR	-	-0,50	-0,44	-	-	-	-
НЭЖК, ммоль/л	-	-	-	-	-	0,63	-
вчСРБ, мг/л	-	-	-0,71	-	-	-	-
Фибриноген, г/л	-	-0,42	-	-	-0,43	-	-
Неоптерин, нмоль/л	-	-	-0,58	-	-	-	-
Гомоцистеин, мг/л	-	-0,34	-	-	-	0,57	-
Висфатин, нг/мл	-	-	-	-	-	-	-0,48
Резистин, нг/мл	0,50	-	-	-	0,67	-	-

Примечание: (-) – отсутствие статистически значимой взаимосвязи, ЖТ – жировая ткань



Показатель	IL-1 $\beta$ Ад.	IL-6 Ад.	IL-8 Ад.	IL-4 МСК	TNF- $\alpha$ МСК	IFN- $\gamma$ МСК	MCP-1 МСК
НОМА-IR	-	-0,50	0,33	-	-	-	0,51
НЭЖК, ммоль/л	-	0,47	-	-	-	-	-
Фибриноген, г/л	-	-	-	-	-	-	0,48
Неоптерин, нмоль/л	0,74	-	0,29	0,78	-	-	-
Гомоцистеин, мг/л	-	-0,34	-	-	-	0,59	-
Висфатин, нг/мл	-	-0,54	-	-	-	-	-0,48
Лептин, нг/мл	-	-0,54	-	-	-	-	-

Примечание: (-) – отсутствие статистически значимой взаимосвязи, Ад. – адипоциты, МСК – мезенхимальные стромальные клетки

Из литературы известно, что одной из характеристик цитокинов является их полифункциональность – способность вызывать различные, в том числе противоположные эффекты, на клетки разного типа или на клетки, находящиеся в разных фазах клеточного цикла [Щеглова М.Ю., 2005; Карзакова Л.М., 2009]. Этим свойством цитокинов можно объяснить, на наш взгляд, наличие обратных корреляций уровня спонтанной продукции IL-6 клетками жировой ткани с большим числом клинико-лабораторных симптомов МС, включая уровень лептина и белков острой фазы.

IL-6 относится к числу наиболее изученных провоспалительных цитокинов. В последнее десятилетие установлена роль этого цитокина в регуляции обмена веществ. При МС и ожирении концентрация в крови уровня IL-6 повышается [Martin-Cordero L. et al., 2011; Edalat B. et al., 2013]. Известно, что этот цитокин выполняет дуальную роль в организме человека, которая зависит от вида органов и клеток [Erta M. et al., 2012; Shachar I., Karin N., 2013].

Учитывая данные литературы и анализируя результаты проведенного нами исследования, можно предположить, что IL-6 в жировой ткани выполняет противовоспалительное действие.

Для установления взаимосвязи между уровнем продукции цитокинов клетками жировой ткани и морфометрическими показателями проводился корреляционный анализ, в результате которого была обнаружена взаимосвязь уровня IL-1 $\beta$  в супернатантах адипоцитов и стандартного отклонения (SD) их диаметра ( $r=0,407$ ;  $p<0,05$ ), уровня INF- $\gamma$  в супернатантах адипоцитов и SD их диаметра ( $r=0,395$ ;  $p<0,05$ ), а также между концентрацией IL-8 и количеством инфильтратов ( $r=0,314$ ;  $p<0,05$ ).

На основании данных результатов можно сделать заключение о том, что уровень спонтанной продукции цитокинов адипоцитами определяется изменениями структуры жировой ткани.

При изучении взаимосвязи уровня спонтанной продукции цитокинов и АФК клетками жировой ткани была обнаружена положительная взаимосвязь уровня спонтанной продукции АФК адипоцитов с концентрацией IL-8 в супернатантах жировой ткани ( $r=0,355$ ;  $p<0,05$ ), что можно объяснить способностью этого цитокина стимулировать в клетках выработку АФК [Васюкова О.В., Огороков П.А., 2012], а также отрицательная взаимосвязь с концентрацией IL-6 ( $r=-0,556$ ;  $p<0,05$ ), что подтверждает предположение об антиоксидантном и противовоспалительном действии этого интерлейкина в жировой ткани.

Из данных литературы известно, что продуцируемые клеткой цитокины в большей степени действуют локально, то есть на клетки окружения и клетки-продуценты [Stow J.L. et al., 2009; Stanley A.C., Lacy P., 2010]. Для оценки особенностей паракринной и аутокринной цитокиноопосредованной регуляции межклеточных взаимодействий в настоящем исследовании проводился корреляционный анализ.

В таблицах 31, 32 и 33 представлены корреляционные матрицы, в которых отражен ряд паракринных взаимосвязей между клетками жировой ткани

посредством преимущественно синергического, но и антагонистического взаимодействия разных пар цитокинов.

Таблица 31

**Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) корреляционные взаимосвязи ( $r$ ) концентрации цитокинов в супернатантах биоптата жировой ткани и цитокинов в супернатантах адипоцитов**

Показатель	IL-1 $\beta$ , Ад.	IL-4, Ад.	IL-8, Ад.	TNF- $\alpha$ , Ад.
IL-1 $\beta$ , (пг/мл) ЖТ	-	-	-	-
IL-4, (пг/мл) ЖТ	-	0,77	-	-
IL-6, (пг/мл) ЖТ	-0,53		-	-
IL-8, (пг/мл) ЖТ	-	-	0,53	-
IFN- $\gamma$ , (пг/мл) ЖТ	-	-	-	-
MCP-1, (пг/мл) ЖТ	-	-	-	0,52

Примечание: (-) – отсутствие статистически значимой взаимосвязи, Ад. – адипоциты, ЖТ – жировая ткань

Таблица 32

**Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) корреляционные взаимосвязи ( $r$ ) концентрации цитокинов в супернатантах биоптата жировой ткани и цитокинов в супернатантах мезенхимальных стромальных клетках**

Показатель	IL-1 $\beta$ , МСК	IL-4, МСК	IL-8, МСК	TNF- $\alpha$ , МСК	IFN- $\gamma$ , МСК
IL-1 $\beta$ , (пг/мл) ЖТ	-	-	-	0,42	-
IL-4, (пг/мл) ЖТ	-	0,60	-	-	-
IL-8, (пг/мл) ЖТ	-	-	0,42	-	-



Показатель	IL-1 $\beta$ , МСК	IL-4, МСК	IL-8, МСК	TNF- $\alpha$ , МСК	IFN- $\gamma$ , МСК
IFN- $\gamma$ , (пг/мл) ЖТ	-	-	-	-	0,52
MCP-1, (пг/мл) ЖТ	-	-	-	0,52	-

Примечание: (-) – отсутствие статистически значимой взаимосвязи, ЖТ – жировая ткань, МСК – мезенхимальные стромальные клетки

При этом следует учитывать, что концентрация цитокинов в супернатантах биоптатов жировой ткани обусловлена спонтанной продукцией цитокинов всех клеточных популяций жировой ткани, включая макрофаги и лимфоциты.

Таблица 33

**Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) корреляционные взаимосвязи ( $r$ ) концентрации цитокинов в супернатантах адипоцитов и мезенхимальных стромальных клеток**

Показатель	IL-1 $\beta$ , МСК	IL-4, МСК	IL-6, МСК	IL-8, МСК	TNF- $\alpha$ , МСК	IFN- $\gamma$ , МСК	MCP-1, МСК
IL-1 $\beta$ , (пг/мл) Ад.	0,38	-	-	-	0,42	0,35	0,42
IL-4, (пг/мл) Ад.	-	0,85	-	-	-	-	-
IL-6, (пг/мл) Ад.	-	-	0,44	-	0,48	-	-
IL-8, (пг/мл) Ад.	0,40	-	-	0,72	0,37	-	-
TNF- $\alpha$ , (пг/мл) Ад.	-	0,508	-	-	0,634	-	-0,438

Показатель	IL-1 $\beta$ , МСК	IL-4, МСК	IL-6, МСК	IL-8, МСК	TNF- $\alpha$ , МСК	IFN- $\gamma$ , МСК	MCP-1, МСК
IFN- $\gamma$ , (пг/мл) Ад.	-	-	-	-	-	0,523	-
MCP-1, (пг/мл) Ад.	-	-	-	-	0,516	-	0,361

Примечание: (-) – отсутствие статистически значимой взаимосвязи, Ад. – адипоциты, МСК – мезенхимальные стромальные клетки

В таблице 32 представлена корреляционная матрица, отражающая ряд паракринных взаимосвязей между адипоцитами и мезенхимальными стромальными клетками жировой ткани посредством синергического взаимодействия разных пар цитокинов.

### 3.2.5. Особенности экспрессии мРНК адипоцитокинов клетками жировой ткани

С целью изучения молекулярных механизмов цитокинового и адипокинового дисбаланса, участвующего в процессе воспаления при МС и установления роли генетических факторов изучалась экспрессия мРНК цитокинов и адипокинов в жировой ткани методом ПЦР.

В таблице 33 представлен сравнительный анализ уровней экспрессии мРНК ряда адипокинов и цитокинов у больных с наличием и отсутствием метаболического синдрома.

Таблица 34

### Особенности экспрессии клетками жировой ткани мРНК адипокинов и цитокинов Me (LQ; UQ)

Показатели	Обследованные больные		p
	без МС (n=6)	с МС n=14)	
IL-1, усл. ед.	0,75 (0,26;0,80)	0,37 (0,31; 0,56)	>0,05

Показатели	Обследованные больные		p
	без МС (n=6)	с МС n=14)	
IL-6, усл. ед.	1,27 (0,34;1,31)	0,66 (0,39; 2,38)	>0,05
IL-8, усл. ед.	0,05 (0,001;0,23)	0,05 (0,01;0,15)	>0,05
TNF- $\alpha$ , усл. ед.	1,94 (1,44;1,99)	1,36 (1,07;1,96)	>0,05
Leptin, усл. ед.	0,20 (0,01;0,30)	0,16 (0,05;0,31)	>0,05
Visphatin, усл. ед.	0,21 (0,16;0,22)	0,16 (0,14;0,20)	>0,05
Resistin, усл. ед.	0,14 (0,142;0,27)	0,17 (0,14;0,22)	>0,05
Adipoq, усл. ед.	2,34 (2,25;2,55)	0,81 (0,59;1,34)	<0,05

Примечание: p – статистическая значимость межгрупповых значений

Из таблицы 34 видно, что висцеральная жировая ткань способна экспрессировать гены всех изучавшихся нами цитокинов и адипокинов. При этом статистически значимые различия в сравниваемых группах больных были обнаружены только по уровню экспрессии Adipoq (ген адипонектина). Как и следовало ожидать, уровень экспрессии мРНК этого адипокина у больных с МС оказался статистически значимо ниже такового у пациентов сравниваемой группы.

Для установления связи вышеперечисленных показателей с выраженностью клинико-лабораторных симптомов МС проводили корреляционный анализ (табл. 35).

Таблица 35

**Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) корреляционные взаимосвязи (r) между уровнем экспрессии клетками жировой ткани мРНК адипокинов и цитокинов и клинико-лабораторными симптомами метаболического синдрома**

Показатель	IL-6	TNF- $\alpha$	Leptin	Resistin
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	0,54	0,41	-	-

Показатель	IL-6	TNF- $\alpha$	Leptin	Resistin
ЛПВП, ммоль/л	-	-	-0,57	-0,81
Лактат, ммоль/л	-	-	-	-0,68
Фибриноген, г/л	-	0,67	-	-

Примечание: (-) – отсутствие статистически значимой взаимосвязи

Данные корреляционного анализа свидетельствуют об участии экспрессии генов некоторых цитокинов и адипокинов в патогенезе МС и сопровождающего его воспаления.

Таким образом, структурно-функциональные особенности жировой ткани у пациентов с метаболическим синдромом при воспалительном процессе проявляются в виде изменения морфометрических свойств жировой ткани (увеличение размеров и объемной плотности адипоцитов и лейкоцитарных инфильтратов), повышенной секреции провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-8, MCP-1) и активных форм кислорода адипоцитами и мезенхимальными стромальными клетками (рис. 21).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема метаболического синдрома как симптомокомплекса факторов риска развития и дальнейшего течения ряда социально значимых заболеваний стала особенно актуальной в последнее время [Кондаков И.К., 2009; Маколкин В.И., 2010; Alshehri A.A., 2010; Пинхасов Б.Б. и соавт., 2014]. В качестве главного и обязательного компонента метаболического синдрома, по мнению ряда авторов, можно рассматривать абдоминальное ожирение. Одним из процессов, объединяющих абдоминальное ожирение и инсулинорезистентность, является хроническое субклиническое воспаление. Воспалительный процесс существенным образом оказывает влияние на метаболическую и секреторную функции жировой ткани [Rasouli N, Kern P.A., 2008]. Результаты исследований последних лет показали, что жировая ткань секретирует целый ряд активных молекул – адипокинов, влияющих на метаболические процессы, развитие окислительного стресса, нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы [Ковалева О.Н., 2009; Galic S et al., 2010; Ikedika D., 2010; Иванов В.В. и соавт., 2013; Mattu H.S., Randeва H.S., 2013].

Одним из наиболее изученных и специфических для жировой ткани адипокинов является лептин – гормон, основной эффект которого направлен на подавление аппетита и регуляции энергетического обмена в организме. Доказано, что при метаболическом синдроме и ожирении имеют место гиперлептинемия и лептинорезистентность; гиперлептинемия, в свою очередь, участвует в механизмах инсулинорезистентности и артериальной гипертензии у тучных людей [Villaret A. et al., 2010]. В связи с этим гиперлептинемия можно отнести к компонентам, связанным с метаболическим синдромом, который играет роль в формировании не только сердечно-сосудистой патологии, но и является фактором риска развития других социально значимых заболеваний [Sanchez P.L. et al., 2014]. Известно также, что лептин стимулирует активацию симпатoadреналовой системы, которая лежит в основе инсулинорезистентности и артериальной гипертензии [Leon-Cabrera S. et al., 2013]. Проведенный нами корреляционный анализ показал, что наибольшее количество сильных положительных

взаимосвязей было обнаружено между концентрацией лептина в сыворотке крови и клинико-лабораторными показателями метаболического синдрома (табл. 16). Установленные положительные взаимосвязи уровня лептина с маркерами системного воспаления (С-реактивный белок, неоптерин, фибриноген) подтверждают способность лептина влиять на продукцию провоспалительных цитокинов, влияющих на синтез белков острой фазы печенью [Falcao-Pires I. et al., 2012].

Известно, что адипонектин – это гормон жировой ткани, характеризующийся значительным антиатерогенным и противовоспалительным действием. Известно также, что концентрация адипонектина в сыворотке крови у людей с абдоминальным ожирением снижена [Ouchi N., 2007].

Как показали результаты проведенного нами исследования, воспалительный процесс и метаболические нарушения у пациентов с метаболическим синдромом тесно взаимосвязаны с гормональной активностью жировой ткани. При этом в данной взаимосвязи гиперлептинемия имеет определяющее значение для женщин, а гипoadипонектинемия – для мужчин.

Диаметр адипоцитов является, как известно, наиболее значимым при ожирении морфометрическим показателем, так как ожирение, развивающееся у взрослых, возникает за счет гипертрофии этих клеток [Holland, W.L. et al., 2011]. Проведенный нами сравнительный анализ морфометрических данных у больных с метаболическим синдромом и у обследованных группы сравнения (табл. 20) выявил наличие статистически значимых различий диаметра, а также объемной плотности адипоцитов и количества инфильтратов, что соответствует активно обсуждаемому в современной медицинской литературе положению о воспалении жировой ткани при ожирении [Ballak D.V. et al., 2014; Padilla J. et al., 2014].

Известно, что ключевую роль в регуляции клеточного гомеостаза играют межклеточные взаимодействия. При этом в процессе воспаления жировой ткани наибольшей специфичностью обладает межклеточная сигнализация, осуществляемая путем непосредственного контактного взаимодействия клеток, в котором участвуют поверхностные рецепторы (CD-маркеры) [Хаитов Р.М., 2006].

По результатам настоящего исследования установлено, что статистически значимые различия экспрессии CD-маркеров на поверхности клеток жировой ткани (табл. 23) определились только для CD68 (маркер макрофагов), который также обнаружил у пациентов положительную взаимосвязь с антропометрическими параметрами, характеризующими ожирение.

Для установления взаимосвязи морфометрических особенностей жировой ткани и иммунофенотипического состава ее клеток был проведен корреляционный анализ, который установил положительные взаимосвязи только с количеством и объемной плотностью инфильтратов. По результатам данного исследования было установлено, что в образовании клеточных инфильтратов в висцеральной жировой ткани при метаболическом синдроме принимают участие CD3<sup>+</sup> лимфоциты, а также CD36<sup>+</sup> и CD68<sup>+</sup> макрофаги (табл. 25).

Обосновано также, что висцеральная жировая ткань и ее клеточные популяции (адипоциты и мезенхимальные стромальные клетки) способны к спонтанной продукции всех определявшихся в настоящем исследовании про- (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , MCP-1) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов в той или иной степени у больных обеих групп наблюдения, что согласуется с данными литературы, характеризующей жировую ткань как орган иммунной системы [Swensson H. et al., 2014]. При этом, однако, следует подчеркнуть, что в супернатантах биоптатов жировой ткани у пациентов с МС обнаружена повышенная концентрация провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-8, MCP-1).

Обнаруженные по итогам проведенного исследования положительные взаимосвязи концентрации IL-8 с объемной плотностью и количеством инфильтратов подтверждают участие этого хемокина в привлечении иммунокомпетентных клеток в жировую ткань. Также подчеркнута, что IL-8 может выполнять роль посредника между адипоцитами и клетками иммунной системы [German A.J. et al., 2010].

Полифункциональность (плейотропность) биологического действия цитокинов объясняет наличие обратных корреляций уровня спонтанной

продукции IL-6 клетками жировой ткани с большим числом клинико-лабораторных симптомов при метаболическом синдроме (табл. 29). При метаболическом синдроме и ожирении отмечается повышение концентрации IL-6 в крови. Жировая ткань является вторым по величине после иммунной системы источником IL-6 и синтезирует до 10-35% цитокина, циркулирующего в крови [Kalurahana N.S. et al., 2011]. Анализируя полученные нами результаты корреляционного анализа и данные литературы, можно предположить, что IL-6 в жировой ткани оказывает противовоспалительное действие, что отличает наши результаты от данных других авторов и подтверждает дуальную роль IL-6 в организме, зависящей от вида клеток и органов [Hashizume M., Mihara M., 2011].

Определенные нами морфофункциональные особенности висцеральной жировой ткани характеризуют «вялотекущий» воспалительный процесс, сопряженный с нарушениями обмена. По данным литературы, такой вид воспаления носит название «метаболического», триггерами этого процесса являются не инфекционные факторы, а нутриенты и продукты метаболизма [Васюкова О.В., Огороков П.А., 2012]. Известно также, что при воспалении активация свободнорадикального окисления сопровождается увеличением выработки АФК, играющих важную роль в регуляции сигнальных систем клетки [Часовских Н.Ю. и соавт., 2009, Шахристова и соавт., 2014]. Анализируя результаты проведенных нами исследований, касающихся оценки продукции АФК клетками жировой ткани (рис. 19, 20; табл. 26), можно сделать вывод о том, что свободно-радикальное окисление, как правило, сопровождающее воспаление любой локализации, является важным звеном патогенеза воспаления жировой ткани [Kawasaki N. et al., 2012; Picklo M. et al., 2012]. При этом уровень спонтанной продукции АФК адипоцитами и мезенхимальными стромальными клетками у больных с метаболическим синдромом указывает на повышенную активность воспалительного процесса в жировой ткани.

Таким образом, нарушения структуры висцеральной жировой ткани при воспалительном процессе проявляются изменениями её морфометрических свойств – увеличением размеров и объемной плотности адипоцитов, увеличением



количества и объемной плотности инфильтратов, которые ассоциированы с уровнем лептина в крови.

В процессе воспаления клетки жировой ткани (адипоциты и мезенхимальные стромальные клетки) приобретают провоспалительную активность, выделяют биологически активные вещества (гормоны, цитокины, хемокины и АФК) и тем самым привлекают в жировую ткань иммунокомпетентные клетки (лимфоциты и макрофаги).

Основные результаты диссертационного исследования представлены в виде схемы на рис. 21.

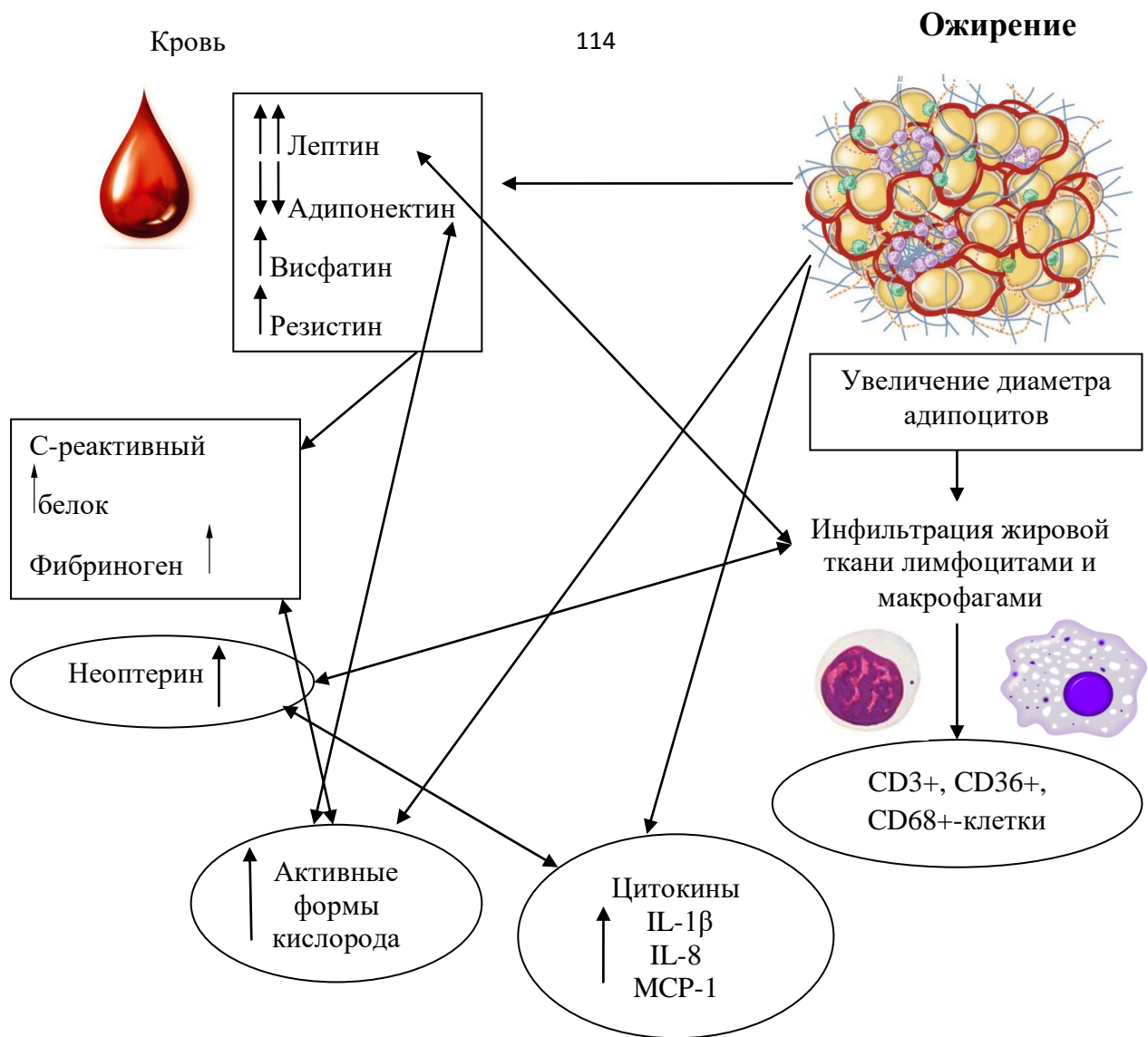


Рис. 21. Патогенез воспаления висцеральной жировой ткани при метаболическом синдроме (по данным литературы [В. Шварц, 2009; С.N. Lumeng, 2013; К. Makki et al., 2013; G. Ghigloitti et al., 2014] и результатам собственных исследований [выделено овалом])

## ВЫВОДЫ

1. Метаболические нарушения (абдоминальное ожирение, нарушения углеводного, липидного, пуринового обменов) и сопровождающий их воспалительный процесс у пациентов с метаболическим синдромом тесно взаимосвязаны с нарушением (гипергликемия, дислипидемия) гормональной активности висцеральной жировой ткани. При этом для женщин в этой взаимосвязи определяющее значение имеет гиперлептинемия, а для мужчин – гипoadипонектинемия.

2. Изменения структуры висцеральной жировой ткани при метаболическом синдроме характеризуются увеличением размеров и объемной плотности адипоцитов, а также увеличением количества и объемной плотности инфильтратов, положительно коррелирующих с концентрацией неоптерина в крови. Взаимосвязь инфильтративных изменений с компонентами метаболического синдрома, включая концентрацию маркеров воспаления (С-реактивный белок, неоптерин, фибриноген), ассоциирована с уровнем лептина в крови.

3. Степень выраженности инфильтративных изменений висцеральной жировой ткани при метаболическом синдроме сопряжена с увеличением относительного количества CD3+, CD36+, CD68+ клеток, что характеризует участие лимфоцитов и макрофагов в формировании инфильтратов.

4. Способность висцеральной жировой ткани к повышенной продукции ряда провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-8, MCP-1) и взаимосвязь ее не только с компонентами метаболического синдрома, но и с повышенной концентрацией белков острой фазы в крови свидетельствует о роли жировой ткани в формировании общей воспалительной реакции организма.

5. Повышенный уровень активных форм кислорода в адипоцитах и мезенхимальных стромальных клетках, а также тесная его взаимосвязь с выраженными проявлениями метаболического синдрома, включая уровень адипокинов и белков острой фазы в крови, доказывает роль окислительного стресса в патогенезе воспаления при данном симптомокомплексе.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АГ – артериальная гипертензия  
АД – артериальное давление  
АО – абдоминальное ожирение  
АФК – активные формы кислорода  
ВЖТ – воспаление жировой ткани  
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения  
вчСРБ – высокочувствительный С-реактивный белок  
ГБ – гипертоническая болезнь  
ДХФ-ДА – дихлорфлуоресцеин диацетат  
ЖКБ – желчнокаменная болезнь  
ЖТ – жировая ткань  
ИБС – ишемическая болезнь сердца  
ИМТ – индекс массы тела  
ИНФ $\gamma$  – интерферон гамма  
ИР – инсулинорезистентность  
ЛПВП – липопротеины высокой плотности  
ЛПНП – липопротеины низкой плотности  
ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности  
МКАТ – моноклональные антитела  
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота  
МС – метаболический синдром  
МСК – мезенхимальные стромальные клетки  
НТГ – нарушение толерантности к глюкозе  
НЭЖК – незэтерифицированные жирные кислоты  
ОБ – окружность бедер  
ОВЖТ – объем висцеральной жировой ткани  
ООЖТ – объем общей жировой ткани  
ОП – объёмная плотность  
ОПЖТ – объем подкожной жировой ткани

ОТ – окружность талии

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СД – сагиттальный диаметр

СД 2 типа – сахарный диабет 2 типа

ТАГ – триацилглицеролы

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ХС – холестерол

АНА (American Heart Association) – Американская ассоциация сердца

АНА/NHLBI (National Heart, Lung and Blood Institute) – Национальный институт сердца, легких и крови

АТР III (Adult Treatment Panel III) – критерии III Доклада о лечении взрослых

CD (cluster of differentiation) – кластер дифференцировки

НОМА-IR – индекс инсулинорезистентности (индекс Хома)

IDF (International Diabetes Federation) – Международная ассоциация диабета

IL (ИЛ) – интерлейкины

МСР-1 – моноцитарный хемотаксический белок-1

TNF $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ) – фактор некроза опухоли альфа

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абдоминальное ожирение: клинико-социальные аспекты проблемы / В.Б. Гриневич, Е.И. Сас, Ю.А. Кравчук и др. // Ожирение и метаболизм. – 2012. - № 2. – С. 28-32.
2. Автандилов, Г. Г. Медицинская морфометрия (руководство) / Г. Г. Автандилов. – М. : Медицина, 1990. – 384 с.
3. Адипокины: биологические, патофизиологические и метаболические эффекты / О.Н. Ковалева, Т.Н. Амбросова, Т.В. Ащеулова и др. // Внутренняя медицина. – 2009. - № 3(15) – С. 7-15.
4. Адипоциты. Сахарный диабет. Окислительный стресс / В. В. Иванов, Е. В. Шахристова, Е. А. Степовая и др. – Томск : Печатная мануфактура, 2013. – 122 с.
5. Бекезин, В.В. Сагиттальный абдоминальный диаметр в диагностике висцерального ожирения у детей и подростков / В.В. Бекезин // Рос. мед.-биол. вест. им. акад. И.П. Павлова. – 2004. - №3-4. – С. 186-188.
6. Бурков, С.Г. Избыточный вес и ожирение – проблема медицинская, а не косметическая / С.Г. Бурков, А.Я. Ивлева // Ожирение и метаболизм. – 2010. - №3. – С.15-19.
7. Васюкова, О.В. Роль специфических шаперонов в патогенезе ожирения и ассоциированных с ним заболеваний / О.В. Васюкова, П.А. Окорочков // Проблемы эндокринологии. – 2012. - № 4. – С. 48-53.
8. Возрастная зависимость ассоциации метаболического синдрома с типами ожирения у женщин / Б.Б. Пинхасов, В.Г. Селятицкая, А.Р. Карапетян и др. // Успехи геронтологии. – 2012. – Т. 25, № 4. – С. 617-622.
9. Гольдберг, Е.Д. Справочник по гематологии с атласом микрофотограмм / Е.Д. Гольдберг. – Томск : Изд-во Том. Ун-та, 1989. – 468 с.
10. Дамбаева, С.В. Оценка продукции активных форм кислорода методом лазерной проточной цитометрии в клетках периферической крови человека / С.В. Дамбаева, Д.В. Мазуров, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 2001. - № 6. – С. 58-61.

11. Данченко, Е. О. Изучение влияния гепатотропных веществ на липогенез *in vitro* (инструкция к применению) / Е. О. Данченко. – Витебск : Витебский государственный медицинский университет, 2001. – 6 с.
12. Драпкина, О.М. Адипокины и сердечно-сосудистые заболевания: патогенетические параллели и терапевтические эффекты / О.М. Драпкина, О.Н. Корнеева, Л.О. Палаткина // Артериальная гипертензия. – 2011. – Т. 17, № 3. – С. 203-208.
13. Ивашкин, В.Т. Липотоксичность и метаболические нарушения при ожирении / В.Т. Ивашкин, М.В. Маевская // РЖГГК. – 2010. - № 1. С. 4-13.
14. Изучение факторов воспаления у больных метаболическим синдромом / И.И. Чукаева, Н.В. Орлова, Н.Н. Хавка и др. // Лечебное дело. – 2010. - № 4. – С. 50-56.
15. Кайдашев, И.П. Эволюция понятия «метаболический синдром» и его современное значение / И.П. Кайдашев // Укр. мед. часопис. – 2011. - № 2. – С. 1-4.
16. Карзакова, Л.М. Цитокины в норме и при патологии / Л.М. Карзакова // Здравоохранение Чувашии. – 2009. – № 2. – С. 74-81.
17. Классические и современные представления о метаболическом синдроме / А.Н. Шишкин, Ю.И. Строев, Л.П. Чурилов и др. // Вестник санкт-петербургского университета. – 2009. – Сер. 11. – Вып. 3. – С. 24-37.
18. Клебанова, Е.М. Гормоны жировой ткани и их роль в патогенезе сахарного диабета 2 типа / Е.М. Клебанова, М.И. Балаболкина // Лечащий врач. – 2010. – № 11. – С. 12-16.
19. Ковалева, О.Н. Адипокины: биологические, патофизиологические и метаболические эффекты / О.Н. Ковалева // Внутренняя медицина. – 2009. - № 3(15) – С. 7-15.
20. Коваль, С.Н. Гормон жировой ткани адипонектин и его роль в патогенезе метаболического синдрома и сердечно-сосудистых заболеваний. Гипоадипонектинемия как терапевтическая мишень / С.Н. Коваль, И.А. Снегурская // Журнал НАМН Украины. – 2011. – Т. 17, № 2. – С. 174-185.

21. Кондаков, И.К. К проблеме патогенеза метаболического синдрома. Жировая ткань и маркеры острой фазы воспаления / И.К. Кондаков, С.Н. Коваль, И.А. Снегурская // Артериальная гипертензия. – 2009. - № 3(5). – С. 39-42.
22. Криволапов, Ю. А. Морфологическая диагностика лимфом / Ю. А. Криволапов, Е. Е. Леенман. – СПб. : Издательско-полиграфическая компания «КОСТА», 2006. – 208 с.
23. Кузьмина-Крутецкая, С. Р. Метаболический синдром у женщин (методические рекомендации) / С. Р. Кузьмина-Крутецкая, М. А. Репина. – СПб. : Н-Л, 2011. – 76 с.
24. Майданник, В.Г. Клинические рекомендации по диагностике и лечению метаболического синдрома и ожирения у детей и подростков / В. Г. Майданник // Международный журнал педиатрии, акушерства и гинекологии. – 2014. – Т. 6, №2. – С. 39-55.
25. Маколкин, В. И. Метаболический синдром / В. И. Маколкин. – М. : Медицинское информационное агентство, 2010. – 144 с.
26. Меняйлова, Н.Н. Гиперлептинемия и ее клинико-метаболические ассоциации при синдроме инсулинорезистентности у детей и подростков / Н.Н. Меняйлова, Е.Л. Сундукова, Ю.И. Ровда // Педиатрия. – 2009. – Т. 88, №6. – С. 1-13.
27. Механизмы развития артериальной гипертензии у больных метаболическим синдромом / Е.И. Красильникова, Е.И. Баранова, Я.В. Благосклонная и др. // Артериальная гипертензия. – 2011. – Т.17, № 5. - С. 405-414.
28. Мычка, В. Б. Рекомендации экспертов Всероссийского общества кардиологов по диагностике и лечению метаболического синдрома (второй пересмотр) / В. Б. Мычка, Ю. В. Жернакова, И. Е. Чазова. – М. : Доктор.Ру, 2010. – 18 с.
29. Ройтберг, Г. Е. Метаболический синдром / Г. Е. Ройтберг. – М. : МЕД-М54 пресс-информ, 2007. – 224 с.
30. Саркисов, Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Д. С. Перов. – М. : Медицина, 1996. – 544 с.



31. Свободнорадикальное окисление белков и липидов в адипоцитах в условиях окислительного стресса / Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая, В.В. Иванов и др. // Молекулярная медицина. – 2014. - № 1. – С. 59-64.
32. Симоненко, В.Б. Патогенетические аспекты АГ при метаболическом синдроме / В.Б.Симоненко, И.М. Медведев, В.В. Толмачев // Клиническая медицина. – 2011. - № 89 (1) – С.49-51.
33. Состояние системы MAP-киназ JNK и P38 в мононуклеарных лейкоцитах крови при воспалении / Н. Ю. Часовских, Н. В. Рязанцева, Е. В. Кайгородова и др. // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 6. – С. 515-522.
34. Сочетание артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа с ожирением / Б.Б. Пинхасов, Селятицкая В.Г., Митрофанов И.М. и др. // Клиническая медицина. – 2014. – Т. 92, № 9. – С. 65-69.
35. Структурно-функциональные показатели сердца, инсулинорезистентность и нарушения липидного обмена у больных с гипертонической болезнью с метаболическим синдромом и бессимптомной гиперурикемией / С.Н. Коваль, И.А. Снегурская, О.В. Мысниченко и др. // Экспериментальная и клиническая медицина. – 2013. - №3(60) – С. 46-52.
36. Хаитов, Р. М. Иммунология: учебник для студентов медицинских вузов / Р. М. Хаитов. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 320 с.
37. Чубриева, С.Ю. Жировая ткань как эндокринный регулятор (обзор литературы) / С.Ю. Чубриева, Н.В. Глухов, А.М. Зайчик // Вестник санкт-петербургского университета. – 2008. – Сер. 11. – Вып. 1. – С. 32-43.
38. Шварц, В. Воспаление жировой ткани. Часть 1. Морфологические и функциональные проявления / В. Шварц // Проблемы эндокринологии. – 2009. – Т. 55, №4. – С. 44-49.
39. Шварц, В. Воспаление жировой ткани. Часть 2. Патогенетическая роль при сахарном диабете 2-го типа / В. Шварц // Проблемы эндокринологии. – 2009. – Т. 55, №5. – С. 43-48.

40. Шварц, В. Воспаление жировой ткани. Часть 3. Патогенетическая роль в развитии атеросклероза / В. Шварц // Проблемы эндокринологии. – 2009. - Т.55, №6. – С. 40-45.
41. Шварц, В. Жировая ткань как орган иммунной системы / В. Шварц // Цитокины и воспаление. – 2009. – № 8(4). – С. 3-10.
42. Школьник, В.В. Изменение уровней висфатина у гипертоников на фоне нарушения углеводного обмена / В.В. Школьник, А.А. Андреева // ВІСНИК ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». – 2009. – Т. 12, № 3. – С. 113-115.
43. Щеглова, М.Ю. Система цитокинов в норме и при болезнях органов дыхания / М.Ю. Щеглова // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2005. – № 21. – С. 93-97.
44. Экспрессия гена адипонектина (*ADIPOQ*) в подкожной и висцеральной жировой ткани и уровень адипонектина в сыворотке крови у детей / А.В. Косыгина, В.В. Сосунов, В.А. Петеркова и др. // Проблемы эндокринологии. – 2010. - № 6. – С. 3-8.
45. A simplified method for determination of specific DNA or RNA copy number using quantitative PCR and an automatic DNA sequencer / C. Porcher, M.C. Malinge, C. Picat et al. // Biotechniques. – 1992. – Vol. 13. – P. 106-114.
46. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways / M. T. Nguyen, S. Favellyukis, A.-K. Nguyen et al. // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 35279-35292.
47. Accumulation of adiponectin in inflamed adipose tissues of obese mice / H. Nakatsuji, K. Kishida, R. Sekimoto et al. // Metabolism Clinical and Experimental. – 2014. – Vol. 63, № 4. – P. 542-553.
48. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans / S. Cinti, G. Mitchell, G. Barbatelli et al. // J. Lipid. Res. – 2005. – Vol. 46, N 11. – P. 2347-2355.

49. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes / A. Guilherme, J.V. Virbasius, V. Puri et al. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2008. – Vol. 9, N 5. – P. 367-377.
50. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels / S. Nishimura, I. Manabe, M. Nagasaki et al. // *Diabetes.* – 2007. – Vol. 56, N 6. – P. 1517-1526.
51. Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin / M.K. Piya, P.G. McTernan, S. Kumar et al. // *Journal of Endocrinology.* – 2013. – Vol. 216. – P.1-15.
52. Adipokines in inflammation and metabolic disease / N. Ouchi, J.L. Parker, J.J. Lugus et al. // *Nature Reviews Immunology.* – 2011. – Vol. 11. – P. 85-97.
53. Adiponectin and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in subcutaneous and omental adipose tissue in children / L. Xiaonan, S. Lindquist, G. Angsten et al. // *Acta. Paediat.* – 2008. – Vol. 97. – P. 630-635.
54. Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies / Y. Takemura, N. Ouchi, R. Shibata et al. // *J. Clin. Invest.* – 2007 – Vol. 117(2). – P. 375-386.
55. Adiponectin, chemerin, cytokines, and dipeptidyl peptidase 4 are released from human adipose tissue in a depot-dependent manner: an in vitro system including human serum albumin / H. Swensson, B. Oden, S. Eden et al. // *BMC Endocrine Disorders.* – 2014. – Vol. 14(7). – P. 1-10.
56. Adipose tissue endothelial cells from obese human subjects: differences among depots in angiogenic, metabolic, and inflammatory gene expression and cellular senescence / A. Villaret, J. Galitzky, P. Decaunes et al. // *Diabetes.* – 2010. – Vol. 59. – P. 2755-2763.
57. Adipose tissue immune response: novel triggers and consequences for chronic inflammatory conditions / G. Ghigliotti, C. Barisione, S. Garibaldi et al. // *Inflammation.* – 2014. – Vol. 37(4). – P. 1337-1353.
58. Alberti, K.G. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional

- report of a WHO consultation / K.G. Alberti, Zimmet P.Z. // *Diabet Med.* – 1998. – Volume 15(7). – P. 539–553.
59. Alberti, K.G. The metabolic syndrome – a new worldwide definition / K.G. Alberti, P. Zimmet, J. Shaw // *Lancet.* – 2005. – Vol. 366. – P. 1059-1062.
  60. Alshehri, A.A. Metabolic syndrome and cardiovascular risk / A.A. Alshehri // *J. Family Community Med.* – 2010. – Vol. 17(2). – P. 73-78.
  61. Al-Suhaimi, E.A. Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity / E.A. Al-Suhaimi, A. Shehzad // *Journal of Medical Research.* – 2013. – Vol. 18(12). – P. 1-13.
  62. Angiotensinogen gene silencing reduces markers of lipid accumulation and inflammation in cultured adipocytes / W.X. Carroll, N.S. Kalupahana, S.L. Booker et al. // *Frontiers in Endocrinology.* – 2013. – Vol. 4, N 10. – P. 1-12.
  63. Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and human / C. Dray, C. Debard, J. Jager et al. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2010. – Vol. 298. – P. 1161-1169.
  64. Apelin/APJ signaling system: a potential link between adipose tissue and endothelial angiogenic processes / O. Kunduzova, N. Alet, N. Delesque-Touchadr et al. // *The FASEB Journal.* – 2008. – Vol. 22. – P. 4146-4153.
  65. Association of metabolic syndrome with inflammatory mediators in women with previous gestational diabetes mellitus / B. Edalat, F. Sharifi, Z. Badamchizadeh et al. // *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders.* – 2013. – Vol. 8, № 12. – P. 1-8.
  66. Canello, R. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue / R. Canello, K. Clement // *BJOG.* – 2006. - № 113. – P.1141-1147.
  67. CD 8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity / S. Nishimura, I. Manabe, M. Nagasaki et al. // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 15, N 8. – P. 1-8.
  68. Clinical analysis of selected complement-derived molecules in human adipose tissue / W. Blogowski, M. Budkowska, D. Salata et al. // *J. Transl. Med.* – 2013. – Vol. 11. – P. 1-6.

69. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans / J.N. Fain, S.W. Bahouth, M.L. Hiler et al. // *Endocrinology*. – 2004. – Vol. 145. – P. 2273-2282.
70. Correlation of resistin with inflammatory and cardiometabolic markers in obese adolescents with and without metabolic syndrome / E. Makni, W. Moalla, L. Benezzeddine-Boussaidi et al. // *Obes. Facts*. – 2013. - № 6. – P. 393-404.
71. Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators / J.L. Stow, P.C. Low, C. Offenhäuser et al. // *Immunobiology*. – 2009. – Vol. 214(7). – P. 601-612.
72. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice / I. Murano, G. Barbatelli, V. Parisani et al. // *J Lipid Res*. – 2008. - № 49. – P. 1562-1568.
73. Definition of metabolic syndrome. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition / S.M. Grundy, B. Brewer, J.I. Cleeman et al. // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109. – P. 433-438.
74. Despres, J-P. Review article Abdominal obesity and metabolic syndrome / J-P. Despres, I. Lemieux // *Nature*. – 2006. – Vol. 444. – P. 881-887.
75. Differential regulation of adipose tissue and vascular inflammatory gene expression by chronic systemic inhibition of NOS in lean and obese rats / J. Padilla, N.T. Jenkins, P.K. Thorne et al. // *Physiological Reports*. – 2014. – Vol. 2(2). – P. 1-16.
76. Dunmore, S.J. The role of adipokines in  $\beta$ -cell failure of type 2 diabetes / S.J. Dunmore, J. Brown // *J. Endocrinol*. – 2013. – Vol. 216. – P. 37-45.
77. Effect of Angiotensin II Type 2 Receptor-Interacting Protein on Adipose Tissue Function via Modulation of Macrophage Polarization / F. Jing, M. Mogi, L-J. Min et al. // *Plos One*. – 2013. – Vol. 8. – P. 60067-60076.

78. Effect of exercise training intensity on adipose tissue hormone sensitive lipase gene expression in obese women under weight loss / T. You, X. Wang, R. Yang et al. // *Journal of Sport and Health Science*. – 2012. – Vol. 1, № 3. – P. 184-190.
79. Effect of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\alpha$  Ligands in the Interaction Between Adipocytes and Macrophages in Obese Adipose Tissue / T. Toyoda, Y. Kamei, H. Kato et al. // *Obesity*. – 2008. – Vol. 16. – P. 1199-1207.
80. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis / D. Wu, A. B. Molofsky, H. E. Liang et al. // *Science*. – 2011. – Vol. 332. – P. 243-247.
81. Erta, M. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system / M. Erta, A. Quintana, J. Hidalgo // *International Journal of Biological Sciences*. – 2012. – Vol. 8(9). – P. 1254-1266.
82. Esteve, E. Adipocytokines and Insulin Resistance. The possible role of lipocalin-2, retinol binding protein-4, and adiponectin / E. Esteve, W. Ricart, J.M. Fernandez-Real // *Diabetes Care*. – 2009. – Vol. 32. – P. 362-367.
83. Fernandes-Real, J.M. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome / J.M. Fernandes-Real, W. Ricard // *Endocrine Rev.* – 2003 – Vol. 4, N 3. – P. 278-301.
84. Galic, S. Adipose tissue as an endocrine organ / S. Galic, J.S. Oakhill, G.R. Steinberg // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2010. – Vol. 316. – P. 129-139.
85. Gillum, M.P. Sir T1 regulates adipose tissue inflammation / M.P. Gillum, M.E. Kotas, D.M Erion // *Diabetes*. – 2011. – Vol. 60, N 12. – P. 3235-3245.
86. Gonzalez, A. Resolution of Adipose Tissue Inflammation / A. Gonzalez, J. Claria // *The Scientific World Journal*. – 2010. – Vol. 10. – P. 832-856.
87. Grundy, S.M. Diagnosis and management of metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary / S.M. Grundy // *Crit. Pathw. Cardiol.* – 2005. – Vol. 4(4). – P. 198-203.
88. Gustafson, B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis / B. Gustafson // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2010. – Vol. 17, N 4. – P. 1-10.

89. Haffner, S.M. The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease / S.M. Haffner // *Am. J. Cardiol.* – 2006. – Vol. 97(2). – P. 3-11.
90. Harmonizing the metabolic syndrome / R. Alberti, S. Grundy, P. Zimmet et al. // *Circulation.* – 2009. – Vol. 120. – P. 1640-1645.
91. Harmonizing the metabolic syndrome a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity / K.G. Alberti, R.H. Eckel, S.M. Grundy et al. // *Circulation.* – 2009. – Vol. 120. – P. 1640-1645.
92. Hashizume, M. IL-6 and lipid metabolism / M. Hashizume, M. Mihara // *Inflammation and Regeneration.* – 2011. – Vol. 31, N 3. – P. 325-333.
93. Helming, L. The scavenger receptor CD36 plays a role in cytokine-induced macrophage fusion / L. Helming, J. Winter, S. Gordon // *Journal of Cell Science* – 2008. – Vol. 122(4). – P. 453-459.
94. Hotamisligil, G.S. Inflammation and metabolic disorders / G.S. Hotamisligil // *Nature.* – 2006. – Vol. 444, N 7121. – P. 860-867.
95. Hyperleptinemia is associated with parameters of low-grade systemic inflammation and metabolic dysfunction in obese human beings / S. Leon-Cabrera, L. Solis-Lozano, K. Suarez-Alvarez et al. // *Frontiers in Integrative Neuroscience.* – 2013. – Vol.7, N 62. – P. 1-7.
96. Hyperleptinemia: implications on the inflammatory state and vascular protection in obese adolescents submitted to an interdisciplinary therapy / P.L. Sanches, M.T. de Mello, N. Elias et al. // *Inflammation.* – 2014. – Vol. 37. – P. 35-43.
97. Ikedika, D. Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease / D. Ikedika, J.K. Mader, T.R. Pieber // *Rev. Assoc. Med. Bras.* – 2010. – Vol. 56(1). – P. 116-121.
98. IL-8 induced neutrophil chemotaxis is mediated by Janus Kinase 3 (JAK3) / K.M. Hemkels, K. Frondorf, M.E. Gonzalez-Mejia et al. // *FEBS Letters.* – 2011. – Vol. 585, № 1. – P. 159-166.

99. In vivo imaging revealed local cell dynamics in obese adipose tissue inflammation / S. Nishimura, I. Manabe, M. Nagasaki et al. // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118, N 2. – P. 710-721.
100. Increased levels and adipose tissue expression of visfatin in morbidly obese women: the relationship with pro-inflammatory cytokines / X. Terra, T. Auguet, I. Quesada et al. // *Clinical Endocrinology.* – 2012. – Vol. 77, N 5. – P. 691-698.
101. Increased production of proinflammatory cytokines in adipose tissue of patients with end-stage renal disease / T. Roubicek, M. Bartlova, J. Krajickova et al. // *Nutrition.* – 2009. – Vol. 25. – P. 762-768.
102. Inflammatory induction of human resistin causes insulin resistance in endotoxemic mice / H-K. Park, M. Qatanani, E.R. Briggs et al. // *Diabetes.* – 2011. – Vol. 60, N 3. – P. 775-783.
103. Jones, G.E. Human cell culture protocols / G.E. Jones. – Totowa. : Humana Press, 1996 – 545 p.
104. Kalupahana, N.S. (n-3) fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights / N.S. Kalupahana, K.J. Claycombe, N. Moustaid-Moussa // *Adv. Nutr.* – 2011. - № 2. – P. 304-316.
105. Kalupahana, N.S. Immunity as a link between obesity and insulin resistance / N.S. Kalupahana, N. Moustaid-Moussa, K.J. Claycombe // *Molecular Aspects of Medicine.* – 2012. – Vol. 33. – P. 26-34.
106. Kolattukudy, P.E. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR 2 pathway / P.E. Kolattukudy, J. Niu // *Circulation Research.* – 2012. – Vol. 110. – P. 174-189.
107. Kwon, H. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance / H. Kwon, J.E. Pessin // *Frontiers in Endocrinology.* – 2013. – Vol. 4, № 71. – P. 1-13.
108. Lacy, P. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane / P. Lacy, J.L. Stow // *Blood.* – 2011. – Vol. 118, № 1 – P. 9-18.
109. Lattimer, J.M. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health / J.M. Lattimer, M.D. Haub // *Nutrients.* – 2010. – Vol 2(12). – P. 1266-1289.



110. Lecke, S.B. Leptin and adiponectin in the female life course / S.B. Lecke, D.M. Morsch, P.M. Spritzer // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2011. – Vol. 44(5). – P. 381-387.
111. Lee, B-C. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance / B-C. Lee, J. Lee // *Molecular Basis of Disease.* – 2014. – Vol. 1842, № 3. – P. 446-462.
112. Leptin and adiponectin: distribution and associations with cardiovascular risk factors in men and women of the general population // A.N. Andreasson, A.L. Undén, S. Elofsson et al. // *Am. J. Hum. Biol.* – 2012. – Vol. 24(5). – P. 595-601.
113. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice / W.L. Holland, B.T. Bikman, L.P. Wang et al. // *J. Clin. Invest.* – 2011. – Vol. 121. – P. 1858-1870.
114. Lolmede, K. Immune cells in adipose tissue: Key players in metabolic disorders / K. Lolmede, C. Duffaut, A. Zakaroff-Girard // *Diabetes & Metabolism.* – 2011. – Vol. 37. – P. 283-290.
115. Lucas, S. Is the Adipose Tissue The Key Road to Inflammation? / S. Lucas, C. Verwaerde, I. Wolowczuk // *Immunology and Immunogenetics Insights.* – 2009. - № 1. – P. 3-14.
116. Lumeng, C.N. Innate immune activation in obesity / C.N. Lumeng // *Molecular Aspects of Medicine.* – 2013. – Vol. 34(1). – P. 12-29.
117. Lumeng, C.N. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization / C.N. Lumeng, J.L. Bodzin, A.R. Saltiel // *J. Clin. Invest.* – 2007. - № 117. – P. 175-184.
118. Lumeng, C.N. T-ing up inflammation in fat / C.N. Lumeng, I. Maillard, A.R. Saltiel // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 15, N 8. – P. 846-847.
119. Macrophage Infiltration into Omental Versus Subcutaneous Fat across Different Populations: Effect of Regional Adiposity and the Comorbidities of Obesity / I. Harman-Boehm, M. Bluher, H. Redel et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – N 92(6). – P. 2240-2247.

120. Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice / M. Qatanani, N.R. Szwegold, D.R. Greaves et al. // *J. Clin. Invest.* – 2009. – Vol. 119, N 3. – P. 531-539.
121. Makki, K. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines and chemokines / K. Makki, P. Froguel, I. Wolowczuk // *Inflammation.* – 2013. – Vol. 1156. – P. 111-118.
122. MAP3K8 (TPL2/COT) affects obesity-induced adipose tissue inflammation without systemic effects in humans and in mice / D.B. Ballak, P. Essen, J. Diepen et al. // *Plos One.* – 2014. – Vol. 9(2). – P. 1-8.
123. Markers of macrophage infiltration and measures of lipolysis in human abdominal adipose tissues / A. Michaud, M. Pelletier, S. Noët et al. // *Obesity.* – 2013. – Vol. 21, N 11. – 2342-2349.
124. Martins, M.C. Relationship between leptin and body mass and metabolic syndrome in an adult population / M.C. Martins, L.L. Faleiro, A. Fonseca // *Rev. Port. Cardiol.* – 2012. – Vol. 31(11). – P. 711-719.
125. Mattu, H.S. Role of adipokines in cardiovascular disease / H.S. Mattu, H.S. Randeve // *Journal of Endocrinology.* – 2013. – Vol. 216. – P. 17-36.
126. Maury, E. Adipokine dysregulation adipose tissue inflammation and metabolic syndrome / E. Maury, S.M. Brichard // *Molecular and Cellular Endocrinology.* – 2010. – Vol. 314. – P. 1-16.
127. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue / S. Sun, Y. Ji, S. Kersten et al. // *Annual Review of Nutrition.* – 2012. – Vol. 32. – P. 261-286.
128. Metabolic inflammation: role of cytokines in the crosstalk between adipose tissue and liver / R.R. Gerner, V. Wieser, A.R. Moschen et al. // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* – 2013. – Vol. 91(11). – P. 867-872.
129. Metabolic syndrome and cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis / S. Mottillo, K.B. Filion, J. Genest et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2010. – Vol. 56, N 14. – P. 1113-1132.

130. Metabolic syndrome and health-related quality of life in obese individuals seeking weight reduction / A.G. Tsai, T.A. Wadden, D.B. Sarwer et al. // *Obesity*. – 2008. – Vol. 16, N 1. – P. 59-63.
131. Metabolic syndrome and inflammatory biomarkers: a community-based cross-sectional study at the framingham heart study / D. Dallmeier, M. Larson, R. Vasan et al. // *Diabetology and Metabolic Syndrome*. – 2012. – Vol. 4(28). – P. 1-7.
132. Metabolic syndrome: definitions and controversies / E. Kassi, P. Pervanidou, G. Kaltsas et al. // *BMC Medicine*. – 2011. – Vol. 9(48). – P. 1741-1748.
133. Model, M.A. A sensitive flow cytometric method for measuring the oxidative burst / M.A. Model, M.A. Kukuruga, R.F. Todd // *J. Immunol. Methods*. – 1997. – Vol. 202(2). P. 105-111.
134. Monocyte CD163 and CD36 expression in human whole blood and isolated mononuclear cell samples: influence of different anticoagulants / M. Moniuszko, K. Kowal, M. Rusak et al. // *Clin. Vaccine. Immunol.* – 2006. – Vol. 13(6). – P. 704-707.
135. Monteiro, R. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome / R. Monteiro, I. Azevedo // *Mediators of Inflammation*. – 2010. – Vol 1155. – P. 1-10.
136. Nardo, D.D. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease / D. D. Nardo, E. Latz // *Trends in Immunology*. – 2011. – Vol. 32, N 8. – P. 373-379.
137. Natural killer T cells in adipose tissue prevent insulin resistance / H.S. Schipper, M. Rakhshandehroo, S.F. van de Graaf et al. // *Journal of Clinical Investigation*. – 2012. – Vol. 22, N 9. – P. 3343-3354.
138. Neutralization of osteopontin inhibits obesity-induced inflammation and insulin resistance/ F.W. Kiefer, M. Zeyda, K. Gollinger et al. // *Diabetes*. – 2010. – Vol. 59. – P. 935-946.
139. Niacin increases adiponectin and decreases adipose tissue inflammation in high fat diet-fed mice / D. Wanders, E.C. Graff, B.D. White et al. // *Plos One*. – 2013. – Vol. 8, № 8. – P. 1-12.
140. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy / S. Winer, Y. Chan, G. Paltser et al. // *Nat. Med.* 2009. - Vol. 15, N 8. – P. 921-929.

141. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance / H. Yang, Y-H. Youm, B. Vandanmagsar et al. // *The Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 185. – P. 1836-1845.
142. Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals / A.J. German, V.H. Ryan, A.C. German et al. // *The Veterinary Journal*. – 2010. – Vol. 185. – P. 4-9.
143. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue / J.Y. Kim, E. van de Wall, M. Laplante et al. // *J Clin Invest*. – 2007. – Vol. 117, N 9. – P. 2621-2637.
144. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue / N. Kawasaki, R. Asada, A. Saito et al. // *Scientific Reports*. – 2012. – N 2(799). – P. 1-7.
145. Ouchi, N. Adiponectin as an anti-inflammatory factor / N. Ouchi, K. Walsh // *Clinica Chimica Acta*. – 2007. – N 380. – P. 24-30.
146. Pang, S.S. Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases / S.S. Pang, Y.Y. Le // *Cell. Mol. Immunol*. – 2006. – Vol. 3(1). – P. 29-34.
147. Park, S.E. The role of serum adipocyte fatty acid-binding protein on the development of metabolic syndrome is independent of pro-inflammatory cytokines / S.E. Park, E.-J. Rhee, W.-Y. Lee // *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. – 2012. – Vol. 22. – P. 525-532.
148. Physiological, pathological and potential therapeutic roles of adipokines / I. Falcao-Pires, P. Castro-Chaves, D. Miranda-Silva et al. // *Drug Discovery Today*. – 2012. – Vol. 17. – P. 880-889.
149. Picklo, M. Adipose Dysfunction, Interaction of Reactive Oxygen Species, and Inflammation / M. Picklo, K.J. Claycombe, M. Meydani // *American Society for Nutrition. Adv. Nutr*. – 2012. – Vol. 3. – P. 734-735.
150. Potenza, M.V. The metabolic syndrome: definition, global impact, and pathophysiology / M.V. Potenza, J.I. Mechanick // *Nutr. Clin. Pract*. – 2009. – Vol. 24, N 5. – P. 560-577.

151. PPAR- $\gamma$  is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue T<sub>reg</sub> cells / D. Cipolletta, M. Feuerer, A. Li et al. // *Nature*. – 2012. – Vol. 486. – P. 549-554.
152. Rasouli, N. Adipocytokines and the Metabolic Complications of Obesity / N. Rasouli, P.A. Kern // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2008. – Vol. 93. – P. 64-73.
153. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin / W.L. Holland, R.A. Miller, Z.V. Wang et al. // *Nat. Med.* – 2011. – Vol. 17(1). – P. 55-63.
154. Redinger, R.N. The Pathophysiology of Obesity and Its Clinical Manifestations / R.N. Redinger // *Gastroenterology and Hepatology*. – 2007. – Vol. 31. – P. 856-863.
155. Regulatory T cells in obesity: the leptin connection / G. Matarese, C. Procaccini, V. De Rosa et al. // *Trends in Molecular Medicine*. – 2010. – Vol. 16, N 6. – P. 247-256.
156. Relationship between visceral adipose tissue and adiponectin, inflammatory markers and thyroid hormones in obese males with hepatosteatosis and insulin resistance / F. Ozcelik, C. Yuksel, E. Arslan et al. // *Arch. Med. Res.* – 2013. – Vol. 44. - № 4. – P. 273-280.
157. Resistin: an inflammatory cytokine. Role in cardiovascular diseases, diabetes and the metabolic syndrome / N. Abate, H.S. Sallam, M. Rizzo et al. // *Curr. Pharm. Des.* – 2014. – Vol. 20(31). – P. 4961-4969.
158. Role of adiponectin and proinflammatory gene expression in adipose tissue chronic inflammation in women with metabolic syndrome / L. Litvinova, D. Atochin, M. Vasilenko et al. // *Diabetology & Metabolic Syndrome*. – 2014. – Vol. 137, № 6. – P. 1-9.
159. Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue / J. Yin, Z. Gao, Q. He et al. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2009. – Vol. 296. – P. 333-342.
160. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance / A. Yadav, M.A. Kataria, V. Saini et al. // *Clin. Chim. Acta*. – 2013. – Vol. 417. – P. 80-84.

161. Role of sex hormones in modulation of brown adipose tissue activity / C. Quarta, R. Mazza, R. Pasquali et al. // *Journal of Molecular Endocrinology*. – 2012. – Vol. 49. – P. 1-7.
162. Ronti, T. The Endocrine Function of Adipose Tissue: An Update / T. Ronti, G. Lupattelli, E. Mannarino // *Clinical Endocrinology*. – 2006. – Vol. 64(4). – P. 355-365.
163. RUNX3 negatively regulates CD36 expression in myeloid cell lines / A. Puig-Kroger, A. Domínguez-Soto, L. Martínez-Muñoz et al. // *The Journal of Immunology*. – 2006. – Vol. 177. – P. 2107-2114.
164. Severe obesity increases adipose tissue expression of interleukin-33 and its receptor ST2, both predominantly detectable in endothelial cells of human adipose tissue / M. Zeyda, B. Wernly, S. Demyanets et al. // *Int. J. Obes. (Lond)*. – 2012. - № 12. – P. 45-53.
165. Shachar, I. The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications / I. Shachar, N. Karin // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2013. – Vol. 93 – P. 51-61.
166. Sidorenkov, O. Metabolic syndrome in Russian adults: associated factors and mortality from cardiovascular diseases and all causes / O. Sidorenkov, O. Nilssen, A.M. Grjibovski // *BMC Public Health*. – 2010. – Vol. 582. – P. 1-10.
167. Sjostrom, C.D. Relationships between changes in body composition and changes in cardiovascular risk factors: the SOS Intervention Study Swedish Obese Subjects / C.D. Sjostrom, L. Lissner, L. Sjostrom // *Obes. Res*. 1997. – Vol. 5, N 6. – P. 519-530.
168. Sorisky, A. Macrophage-induced adipose tissue dysfunction and the preadipocyte: should stay (and differentiate) or should I go? / A. Sorisky, A. Molgal, A. Gagnon // *Adv. Nutr*. – 2013. – Vol. 4(1). – P. 67-75.
169. Stanley, A.C. Pathways for cytokine secretion / A.C. Stanley, P. Lacy // *Physiology (Bethesda)*. – 2010. – Vol. 25(4). – P. 218-229.

170. Suganami, T. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling / T. Suganami, Y. Ogawa // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2010. – Vol. 88. – P. 33-39.
171. Sun, K. Adipose tissue remodeling and obesity // K. Sun, C.M. Kusminski, P.E. Scherer // *J. Clin. Invest.* – 2011. – Vol. 121(6). – P. 2094-2101.
172. Thaman, R.G. Metabolic syndrome: definition and pathophysiology – the discussion goes on! / R.G. Thaman, G.P. Arora // *J. Phys. Pharm. Adv.* – 2013. – Vol 3(3). – P. 48-56.
173. The interleukin-6 and noradrenaline mediated inflammation-stress feedback mechanism is dysregulated in metabolic syndrome: Effect of exercise / L. Martin-Cordero, J.J. Garcia, M.D. Hinchado et al. // *Cardiovascular Diabetology*. – 2011. – Vol. 42, № 10. – P. 1-9.
174. Tilg, H. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance / H. Tilg, A.R. Moschen // *Mol Med*. – 2008. – Vol. 14, N 3-4. – P. 222-231.
175. Tissue Tregs: A unique population of adipose-tissue-resident Foxp3+CD4+ T cells that impacts organismal metabolism / D. Cipolletta, D. Kolodin, C. Benoist et al. // *Seminars in Immunology*. – 2011. – Vol. 23. – P. 431-437.
176. Trauhurn, P. Signaling role adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity / P. Trauhurn, I.S. Wood // *Biochem. Soc. Trans.* – 2005. - № 23. – P. 1078-1081.
177. Visfatin (nampt) and ghrelin as novel markers of carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes / N.P. Kadoglou, N. Sailer, A. Moumtzouoglou et al. // *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. – 2010 – Vol. 118. – P. 75-80.
178. Visfatin levels are low in subjects with type 2 diabetes compared to age-matched controls / S. Yaturu, J. Davis, L.T. Franklin et al. // *Journal of Diabetes Mellitus*. – 2012. – Vol. 2, № 4. – P. 373-377.
179. Wimalawansa, S.J. Visceral adiposity and cardiometabolic risks: epidemic of abdominal obesity in North America / S.J. Wimalawansa // *Research and Reports in Endocrine Disorders*. – 2013. – Vol. 3. – P. 17-30.

180. Ye, J. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance / J. Ye // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* – 2009. – Vol. 33. – P. 54-66.
181. Zhang, J-M. Cytokines, inflammation and pain / J-M. Zhang, J. An // *Int. Anesthesiol. Clin.* – 2007. – Vol. 45(2). – P. 27-37.
182. Zhao, D. Adipose tissue dysfunction and the pathogenesis of metabolic syndrome / D. Zhao, H. Liu // *World. J. Hypertens.* – 2013. – Vol 3(3). – P. 18-26.
183.  $\alpha$ -1 antitrypsin regulates human neutrophil chemotaxis induced by soluble immune complexes and IL-8 / D.A. Bergin, E.P. Reeves, P. Meleady et al. // *The Journal of Clinical Investigation.* – 2010. – Vol. 120, № 12. – P. 4236-4250.