

Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Научно-исследовательский институт кардиологии»

Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

На правах рукописи

КОЛОГРИВОВА

Ирина Вячеславовна

**ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЙ ДИСБАЛАНС У
ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ,
АССОЦИИРОВАННОЙ С НАРУШЕНИЯМИ
УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА**

14.03.03 – патологическая физиология

14.01.05 – кардиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Кошельская О.А.

кандидат медицинских наук

Сулова Т.Е.

Томск – 2014

Оглавление

Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	13
1.1. Сахарный диабет 2-го типа – «неинфекционная эпидемия» современности.....	13
1.2. Взаимосвязь артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа.....	14
1.3. Проявление воспалительных реакций при сахарном диабете 2-го типа	16
1.4. Роль Т-хелперов 17-го типа в модуляции воспаления.....	22
1.5. Т-регуляторные лимфоциты как антагонисты Th17.....	28
1.6. Метаболизм глюкозы как модулятор активности Т-лимфоцитов... ..	35
Глава 2. Материалы и методы исследования	42
2.1. Характеристика обследованных групп	42
2.2. Материал и методы исследования	49
2.2.1. Материал исследования	49
2.2.2. Культивирование мононуклеаров крови в среде с различными концентрациями инсулина и глюкозы	50
2.2.3. Определение фенотипа лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии	51
2.2.3.1. Анализ основных субпопуляций лимфоцитов	52
2.2.3.2. Анализ содержания Th17- и Th1-лимфоцитов	53
2.2.3.3. Определение содержания Т-регуляторных лимфоцитов.....	55
2.2.4. Определение концентрации цитокинов методом мультиплексного анализа.....	57
2.2.5. Иммуноферментный анализ	59
2.2.5.1. Определение концентрации инсулина в сыворотке крови.....	59
2.2.5.2. Определение концентрации С-пептида инсулина в сыворотке крови	60
2.2.5.3. Определение концентрации С-реактивного белка высокочувствительным методом в сыворотке крови	61
2.2.5.4. Определение концентрации ревматоидного фактора в сыворотке крови.....	62

2.2.5.5. Определение концентрации антител к митохондриям подтипа M2 в сыворотке крови	63
2.2.5.6. Определение концентрации антител к экстрагируемым ядерным антигенам в сыворотке крови	64
2.2.5.7. Определение концентрации металлопротеиназ-2 и -9 в сыворотке крови.....	65
2.2.5.8. Определение концентрации тканевого ингибитора металлопротеиназ-1 (TIMP-1) в сыворотке крови	67
2.2.5.9. Определение концентрации IL-1 β	68
2.2.5.10. Определение концентрации IL-17	69
2.2.5.11. Определение концентрации IL-23	70
2.2.5.12. Определение концентрации TGF- β	71
2.2.6. Определение содержания антител к ткани сердца методом непрямой иммунофлуоресценции	72
2.2.7. Биохимические методы	73
2.2.7.1. Определение липидного спектра сыворотки крови	73
2.2.7.2. Определение содержания глюкозы глюкозооксидазным методом.....	75
2.2.8. Определение содержания гликозилированного гемоглобина иммунотурбодиметрическим методом	75
2.3. Методы статистической обработки результатов исследования	76
Глава 3. Результаты и обсуждение	78
3.1. Оценка параметров углеводного и липидного обменов в исследуемых группах	78
3.2. Оценка популяционного состава лимфоцитов в крови.....	81
3.3. Оценка содержания Th1 и Th17 в крови	83
3.4. Оценка содержания FoxP3+ T-регуляторных лимфоцитов в крови	93
3.5. Оценка секреции цитокинов	98
3.5.1. Оценка содержания цитокинов в сыворотке крови.....	98
3.5.2. Оценка содержания цитокинов в супернатантах суточных культур клеток крови	102

3.6. Оценка содержания аутоантител различной специфичности в сыворотке крови	105
3.7. Оценка состояния сывороточной системы матриксных металлопротеиназ при артериальной гипертензии, ассоциированной с нарушениями углеводного обмена	111
3.8. Корреляционный и регрессионный анализ взаимосвязей между показателями липидного, углеводного обмена и иммунологическими параметрами.....	116
3.9. Взаимосвязь иммунологических маркеров воспаления с клинико-метаболическими особенностями течения артериальной гипертензии, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа.....	125
3.9.1. Особенности функционирования субпопуляций Т-лимфоцитов в зависимости от выраженности субклинического воспаления при артериальной гипертензии, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа.....	125
3.9.2. Особенности функционирования субпопуляций Т-лимфоцитов в зависимости от контроля гликемии при артериальной гипертензии, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа	133
3.9.3. Изменение функциональной активности Т-лимфоцитов в зависимости от степени инсулинорезистентности	144
3.10. Влияние различных концентраций глюкозы и инсулина на функциональную активность Th17-лимфоцитов <i>in vitro</i>	149
Заключение	165
Выводы.....	170
Практические рекомендации.....	173
Список сокращений	174
Литература	176

Введение

Актуальность темы исследования

Ассоциация артериальной гипертензии (АГ) с сахарным диабетом (СД) 2-го типа многократно увеличивает риск развития микрососудистых осложнений, макроангиопатий и смертности у пациентов [149, 238]. Наличие СД 2-го типа у пациентов даже в отсутствии ишемической болезни сердца (ИБС) приравнивает их по степени риску развития коронарных событий к пациентам, перенесшим инфаркт миокарда [7, 19]. Распространенность СД 2-го типа неуклонно растет и, на сегодняшний день, приобрела характер неинфекционной эпидемии [7]. Стремительный рост числа больных СД во многом обусловлен тем, что пациенты на стадии латентных нарушений углеводного обмена зачастую не получают адекватного лечения, считаясь «условно здоровыми» [7].

Было показано, что субклиническое воспаление может вносить вклад в патогенез СД 2-го типа, но механизмы его развития остаются изученными недостаточно [122, 134, 268]. Считается, что макрофаги являются основными клетками-эффекторами при воспалительных нарушениях, ассоциированных с СД 2-го типа [165, 253, 290]. Оказалось, что наряду с макрофагами в жировой ткани пациентов с СД 2-го типа находится большое количество Т-лимфоцитов, которые могут выступать в роли важных регуляторов активности других клеток [89, 300].

Нарушение равновесия между субпопуляциями провоспалительных Т-хелперов 17-го и 1-го типа (Th1 и Th17) и Т-регуляторных лимфоцитов (Treg) является патогенетическим звеном многих заболеваний, таких как ревматоидный артрит, системный склероз, сахарный диабет 1-го типа и ряда других патологий, сопровождающихся развитием воспаления [68, 140, 223, 232, 257, 267]. Th17 и Treg тесно взаимосвязаны: их активность зависит от общих ростовых факторов, они происходят из одного клеточного предшественника и обладают пластичностью по отношению друг к другу и другим субпопуляциям Т-хелперов [54, 197, 287].

Следствием нарушения равновесия между субпопуляциями Th17/Treg-лимфоцитов является увеличение продукции провоспалительных цитокинов, предрасположенность к отмене иммунологической толерантности и усилению продукции аутоантител, развитие дисбаланса в системе матриксных металлопротеиназ (ММП) [44, 121, 145, 207, 227, 241, 309]. Все вышеперечисленные факторы могут иметь место у пациентов с сочетанием АГ и СД 2-го типа, способствовать поддержанию провоспалительного тканевого микроокружения и еще большему усугублению инсулинорезистентности. Кроме того, хроническое воспаление является фактором риска и неотъемлемым компонентом одного из наиболее распространенных и грозных осложнений СД 2-го типа – атеросклероза [110, 153].

Степень разработанности темы исследования

В экспериментальных исследованиях отмечена ассоциация ожирения и инсулинорезистентности с увеличением содержания провоспалительных Th17 и Th1 и снижением количества иммуносупрессорных FoxP3+T-регуляторных лимфоцитов в жировой ткани и селезенке [98, 295]. Однако имеется лишь незначительное количество исследований, посвященных изучению функционирования Th17 и Treg у пациентов с СД 2-го типа, в которых взаимосвязь между метаболическими и иммунологическими параметрами не изучалась [128, 308]. Также мы не встретили данных о состоянии хелперных субпопуляций T-лимфоцитов при НТУ.

Дифференцировка и пролиферация Th17 в высокой степени зависят от клеточного метаболизма глюкозы [127, 224, 293]. Было показано, что как инсулин, так и глюкоза могут не только регулировать обменные процессы в T-лимфоцитах, но и влиять на их дифференцировку в направлении определенных субпопуляций [64, 77, 180, 251]. Однако в литературе нет данных о том, как влияет состояние гипергликемии и внеклеточная концентрация инсулина на функциональную активность Th17.

В связи с тем, что Th17 и T-регуляторные клетки за счет своей пластичности и разносторонней активности обладают мощным регуляторным

потенциалом, и их дифференцировка зависит от инсулинового сигналинга и обмена глюкозы, можно предположить, что они представляют собой одно из связующих звеньев между метаболическими нарушениями и воспалительными явлениями при СД 2-го типа и атеросклерозе. Таким образом, установление патогенетической роли субпопуляций CD4⁺-лимфоцитов в развитии хронического субклинического воспаления у больных АГ, ассоциированной с СД 2 типа и НТУ, представляется актуальным.

Цель работы:

Выявить особенности иммунорегуляторного дисбаланса у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с предиабетом и сахарным диабетом 2-го типа.

Задачи исследования:

1. Оценить содержание основных субпопуляций лимфоцитов и субпопуляций CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови, сывороточную концентрацию и секрецию цитокинов в культуре клеток крови у пациентов с артериальной гипертензией без нарушений углеводного обмена и у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с нарушением толерантности к углеводам и сахарным диабетом 2-го типа.

2. Проанализировать взаимосвязи между иммунологическими показателями и параметрами углеводного и липидного метаболизма у пациентов с артериальной гипертензией при наличии и отсутствии нарушений углеводного обмена.

3. Изучить содержание Th17-, Th1- и T-регуляторных лимфоцитов в крови, сывороточную концентрацию и секрецию цитокинов в культуре клеток крови в зависимости от особенностей клинического варианта заболевания и характера структурных изменений магистральных артерий у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа.

4. Исследовать концентрацию в крови компонентов системы матриксных металлопротеиназ (матриксные металлопротеиназы-2 и -9, тканевый ингибитор металлопротеиназ-1) и спектра аутоантител (ревматоидный фактор,

антитела к митохондриям, экстрагируемыми ядерными антигенами, ткани сердца) у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с нарушением толерантности к углеводам и сахарным диабетом 2-го типа.

5. Исследовать влияние различных концентраций инсулина и глюкозы *in vitro* на секрецию IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-23, TGF- β , TNF- α , IFN- γ мононуклеарами крови и внутриклеточную продукцию IL-17 Т-хелперами-17 у пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа.

Научная новизна

Получены новые данные об особенностях иммунорегуляторного дисбаланса при хроническом субклиническом воспалении у пациентов с артериальной гипертензией без нарушений углеводного обмена и у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с нарушением толерантности к углеводам и сахарным диабетом 2-го типа.

Установлено, что повышение провоспалительного потенциала иммунных реакций имеет место уже на латентной стадии нарушений углеводного обмена и проявляется снижением содержания иммуносупрессорных FoxP3⁺ Т-регуляторных лимфоцитов, увеличением содержания Th17⁻, Th1⁻, Th1/Th17⁻, IL-23R⁺-лимфоцитов в крови, IL-1 β в супернатантах интактных культур клеток крови и повышением концентрации аутоантител к митохондриям подтипа M2 в крови. У пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа увеличение содержания Th17⁻, Th1⁻, IL-23R⁺-лимфоцитов в крови, возрастание концентрации IL-17 в сыворотке и супернатантах интактных культур клеток крови при сниженной секреции противовоспалительного IL-10 и дефиците FoxP3⁺ Т-регуляторных лимфоцитов сочетается с повышением частоты выявления антител к ткани сердца и содержания тканевого ингибитора металлопротеиназ-1 (TIMP-1) в сыворотке крови.

Показано, что снижение содержания FoxP3⁺ Т-регуляторных лимфоцитов, увеличение количества IFN- γ ⁺ Th1-лимфоцитов в крови и концентрации IL-17 в супернатантах интактных культур клеток крови связаны с неудовлетворительным контролем гликемии, высокой степенью абдоминального ожирения и

инсулинорезистентности у пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа. Впервые установлено, что при неудовлетворительном контроле гликемии снижение содержания Т-регуляторных лимфоцитов и IL-10 в супернатантах интактных культур клеток крови ассоциируется с увеличением концентрации MMP-9 в крови и наличием признаков субклинического атеросклероза сонных артерий.

Приведены новые данные о влиянии различных концентраций инсулина и глюкозы на функциональную активность Th17 *in vitro* у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа. Культивирование мононуклеаров в присутствии глюкозы и инсулина приводит к увеличению содержания IL-17+ Th17-лимфоцитов *in vitro* как у пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа, так и у здоровых людей. При этом показано, что у пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа, в отличие от здоровых лиц, отсутствует ингибирующее влияние инсулина на секрецию IL-23, IL-6, TGF- β мононуклеарами крови *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе исследования данные носят фундаментальный и прикладной характер, и свидетельствуют о системной дисрегуляции функционирования субпопуляций Т-лимфоцитов-хелперов у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с нарушениями углеводного обмена. Выявленные изменения проявляются увеличением функциональной активности Т-хелперов с провоспалительным потенциалом (Th17- и Th1-лимфоциты) и снижением содержания Т-регуляторных лимфоцитов, выполняющих иммуносупрессорную функцию.

Результаты данного исследования могут быть использованы для разработки лабораторных алгоритмов выявления иммунологически опосредованного хронического субклинического воспаления при артериальной гипертензии, ассоциированной с нарушениями углеводного обмена. Проведенное исследование указывает на возможность коррекции иммунорегуляторного дисбаланса у

пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа с помощью терапии, направленной на повышение периферической чувствительности к инсулину и изменение активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС).

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в учебном процессе кафедр иммунологии и аллергологии (раздел «Регуляция иммунного ответа»), молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики (раздел «Молекулярные основы патологии») ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Методология и методы исследования

Для достижения поставленной цели на базе ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН (директор – д-р мед. наук, академик РАН Р. С. Карпов) было проведено одномоментное, проспективное, сравнительное исследование. Были сформированы 4 группы: пациенты с АГ, ассоциированной с НТУ или СД 2-го типа, пациенты с АГ без нарушений углеводного обмена и здоровые добровольцы. Всем пациентам проводили комплексное клинико-инструментальное обследование и ультразвуковое исследование сонных артерий.

Материалом исследования являлись мононуклеары периферической крови, супернатанты клеточных культур, сыворотка крови и цельная кровь с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА).

Основные методы исследования:

1. Выделение и культивирование мононуклеаров периферической крови;
2. Определение содержания основных субпопуляций лимфоцитов и субпопуляций CD4⁺ Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии;
3. Определение концентрации цитокинов методом мультиплексного анализа;
4. Определение содержания антител к ткани сердца методом непрямой иммунофлуоресценции;
5. Иммуноферментный анализ;
6. Биохимические методы;

7. Статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Хроническое субклиническое воспаление у пациентов с артериальной гипертензией и нарушениями углеводного обмена формируется на фоне иммунорегуляторного дисбаланса, который проявляется активацией Т-хелперов-1 (увеличением внутриклеточной продукции IFN- γ), Т-хелперов-17 (увеличением внутриклеточной продукции и секреции IL-17), повышением экспрессии рецепторов к провоспалительному IL-23 и снижением количества циркулирующих в крови FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов.

2. Функциональная активность субпопуляций CD4+ Т-лимфоцитов и нарушения в системе цитокинов (IL-17, IFN- γ , IL-10) у пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа взаимосвязаны с клиническими особенностями заболевания: гипертриглицеролемией, степенью контроля гликемии, абдоминального ожирения и гиперинсулинемии/инсулинорезистентности.

3. Инсулин *in vitro* оказывает стимулирующее воздействие на внутриклеточную продукцию IL-17 как у здоровых добровольцев, так и у пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа. У пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, в отличие от здоровых добровольцев, отсутствует ингибирующий эффект инсулина в отношении секреции IL-23, IL-6 и трансформирующего фактора роста (TGF)- β , регулирующих активность Th17.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности результатов, представленных в работе, обоснована достаточным объемом выборок, применением современных методов исследования, высокотехнологического оборудования и подтверждена адекватными методами статистической обработки.

Результаты исследования доложены и обсуждены на XI (2010), XII (2011), XIII (2012), XIV (2014) ежегодном семинаре Молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной кардиологии» (Томск),

Всероссийской научной конференции «Молекулярно-генетические основы функционирования цитокиновой сети в норме и при патологии» (Новосибирск, 2010), Пятой Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2011), 4-ом Международном конгрессе по предиабету и метаболическому синдрому «Epidemiology, management and prevention of diabetes and cardiovascular disease» (Мадрид, 2011), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» (Абакан, 2011), XIV Всероссийском форуме с международным участием им. академика В.И.Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2011), Отчетной научной сессии НИИ кардиологии СО РАМН «Актуальные проблемы кардиологии» (Томск, 2012), Международной виртуальной конференции «Медицина в XXI веке: традиции и перспективы» (2012), 1-ой Международной академической конференции «Applied and Fundamental studies» (Сент-Луис, 2012), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Сахарный диабет, метаболический синдром и сердечно-сосудистые заболевания: современные подходы к диагностике и лечению» (Томск, 2012), Международной конференции студентов и молодых ученых, посвященной 15-летию СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова «Дни биохимии в СПбГМУ» (Санкт-Петербург, 2012), Российском национальном конгрессе кардиологов (Санкт-Петербург, 2013).

По материалам диссертации опубликовано 28 печатных работ, из них – 7 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 209 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 26 таблицами и 40 рисунками. Список литературы включает 314 источников (28 – отечественных и 286 – иностранных).

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Сахарный диабет 2-го типа – «неинфекционная эпидемия» современности

Распространенность сахарного диабета (СД) с каждым годом неуклонно растет. Численность больных СД в мире в 2011 году составила 366 млн человек. По прогнозам Всемирной диабетической федерации к 2030 году эта цифра увеличится в 1,5 раза и составит 522 млн, главным образом, за счет пациентов с СД 2-го типа [7, 20]. Организация Объединенных Наций (ООН) и Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) приводят следующие статистические данные, касающиеся заболеваемости и смертности от сахарного диабета: каждые 7 секунд в мире умирает 1 больной, каждые 10 секунд заболевают 12 человек; ежегодно умирает около 4,6 млн больных. Такой стремительный рост числа больных СД во многом обусловлен тем, что пациенты на стадии предиабета (нарушения толерантности к углеводам, НТУ) зачастую не получают адекватного лечения, считаясь «условно здоровыми», хотя уже сегодня более 500 млн человек в мире характеризуются наличием метаболического синдрома или НТУ. За счет них ежегодно число заболевших СД 2-го типа увеличивается на 15% [7].

В России в 2011 году насчитывалось 3 млн 112 тыс. пациентов с СД 2-го типа. Однако полагают, что реальная цифра еще более внушительна и превышает данное число в 3 – 4 раза (5,5% всего населения Российской Федерации) [7, 20]. На Первой глобальной министерской конференции по здоровому образу жизни и неинфекционным заболеваниям, которая прошла в 2011 г. в Москве и была поддержана Министерством здравоохранения и социального развития России и ВОЗ, сахарный диабет был признан одним из четырех важнейших неинфекционных заболеваний (наряду с сердечно-сосудистыми, онкологическими и заболеваниями легких), требующих принятия немедленных действий по его профилактике [7].

Сахарный диабет 2-го типа обычно проявляется уже во взрослом возрасте и характеризуется инсулинорезистентностью с относительным дефицитом инсулина или преимущественно нарушением секреции инсулина с развитием инсулинорезистентности [35]. На фоне инсулинорезистентности увеличивается масса и инсулин-продуцирующая активность β -клеток поджелудочной железы. Пока секреция инсулина возрастает пропорционально степени инсулинорезистентности, толерантность к глюкозе у индивидов сохраняется на нормальном уровне. Когда функциональные резервы поджелудочной железы становятся недостаточными, чтобы компенсировать все более усугубляющуюся инсулинорезистентность и развивающуюся гипергликемию, манифестируется СД 2-го типа [82, 89].

При НТУ концентрация глюкозы через 2 часа после глюкозотолерантного теста превышает границы референсного интервала, но ниже, чем у пациентов с диабетом (т.е. колеблется от 7,8 мМ до 11,0 мМ). При этом содержание глюкозы натощак может оставаться нормальным (в отличие от нарушенной тощачковой гликемии) [36]. Время, в течение которого ранние метаболические нарушения (в частности, нарушение толерантности к углеводам) трансформируются в диабет, может составлять годы. Тем не менее, у большинства пациентов с НТУ (до 70%) рано или поздно развивается сахарный диабет 2-го типа [191, 218].

СД 2-го типа многократно увеличивает риск развития макроангиопатий (атеросклероз) и микрососудистых осложнений (ретинопатии, нейропатии, нефропатии), причем частота сердечно-сосудистых осложнений кратно возрастает, если СД 2-го типа сочетается с артериальной гипертензией (АГ) [89, 219, 249].

1.2. Взаимосвязь артериальной гипертензии и сахарного диабета

2-го типа

СД 2-го типа ассоциируется с АГ в 50-80% случаев. При увеличении артериального давления на каждые 10 мм рт.ст. риск развития сердечно-

сосудистых событий у пациентов с СД 2-го типа увеличивается на 20% [249]. При этом встречаемость АГ у диабетических пациентов примерно в 2 раза выше, чем у пациентов без диабета. В то время как у нелеченных пациентов с эссенциальной гипертензией содержание инсулина натощак и после приема пищи выше, чем у пациентов с нормальным артериальным давлением, независимо от индекса массы тела (ИМТ) [238].

Существует ряд гипотез, объясняющих распространение сочетания АГ и СД 2-го типа, таких как генетическая предрасположенность и нарушение инсулинового сигналинга. Последнее приводит к изменению ионообменных процессов в клеточных мембранах, активации симпатической нервной системы и ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), а также к подавлению активности предсердного натрийуретического пептида, задержке натрия в организме и последующему увеличению объема жидкости, прогрессирующей почечной патологии, гипертрофии левого желудочка, дислипидемии, хронической гипергликемии и оксидативному стрессу [149, 238]. Кроме того, ожирение является фактором риска развития как СД 2-го типа, так и АГ. При этом от ожирения страдает до 90% пациентов с СД 2-го типа [173].

Гипергликемия при СД способствует повреждению почек и артериальной стенки посредством депонирования конечных продуктов гликозилирования, генерации активных форм кислорода и активации протеин киназы С [149].

Роль гиперинсулинемии в патогенезе АГ по-прежнему обсуждается. Так, у пациентов с инсулиномой не наблюдается увеличения частоты выявления повышенного давления. Однако при инсулинорезистентности наблюдается ингибирование ряда сигнальных путей инсулина, что вносит вклад в развитие вазоконстрикции. Инсулинорезистентность зачастую присутствует у пациентов с нарушением содержания глюкозы натощак и является фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний даже при отсутствии выраженной гипергликемии [238].

В результате гиперинсулинемии повышается тонус симпатической нервной системы и активность РААС, что может приводить к реабсорбции натрия,

увеличению объема циркулирующей крови, что, в свою очередь, еще более усиливает активацию РААС. При этом сниженная эластичность артерий способствует развитию АГ посредством увеличения сосудистого сопротивления [149].

Таким образом, инсулинорезистентность является отличительной чертой АГ, ассоциированной с СД 2-го типа. Однако только у трети пациентов с инсулинорезистентностью действительно манифестируется сахарный диабет. У большинства β -клетки оказываются способными компенсировать все более возрастающую потребность в инсулине и гипергликемия не развивается [89]. Причины такой гетерогенности в популяции до конца не ясны.

В последнее время появляется все больше доказательств, что инсулинорезистентность при СД 2-го типа сопровождается развитием субклинического воспаления, и воспаление может быть вовлечено в патогенез инсулинорезистентности [122, 134, 268].

1.3. Проявление воспалительных реакций при сахарном диабете 2-го типа

Воспаление развивается как комплексная реакция на повреждение ткани, обусловленное каким-либо патогенным агентом. Острое воспаление, как правило, высоко координировано и имеет своей целью устранение патогенного агента и восстановление целостности поврежденной ткани. При хроническом воспалении устранить повреждение не удастся в течение продолжительного времени, и реакции, в норме призванные контролировать гомеостаз, приобретают патологический характер и только усугубляют нарушение функционирования организма [29]. Длительный воспалительный ответ, ассоциированный с метаболическими нарушениями, рядом авторов обозначается как «мета-воспаление» [122].

Впервые о роли воспаления в развитии «более легкой формы» СД (предположительно имеется в виду именно СД 2-го типа) заговорили еще в 1876

году, когда было показано, что назначение салицилатов значительно снижает уровень глюкозурии у пациентов [253].

Результаты многочисленных эпидемиологических исследований показали, что для пациентов с СД 2-го типа характерно увеличение содержания белков острой фазы, хемокинов и цитокинов в сыворотке крови. В 1993 году внимание исследователей привлек фактор некроза опухоли (TNF)- α , как провоспалительный цитокин, который был способен вызывать инсулинорезистентность [253], однако попытки использования антагонистов TNF- α для лечения СД 2-го типа пока не привели к ощутимому контролю за уровнем гликемии [89]. Особая роль в диагностике мета-воспаления на сегодняшний день отводится С-реактивному белку, определенному высокочувствительным методом (hsCRP), а также цитокинам – интерлейкину (IL)-1 β и IL-6. Считается, что данные провоспалительные маркеры могут служить предикторами развития СД 2-го типа [89]. В проспективном популяционном исследовании EPIC-Потсдам (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) было показано, что у пациентов с повышенным уровнем IL-6 и определяемым количеством IL-1 β в сыворотке в течение последующих двух лет развивался СД 2-го типа. Эта закономерность отсутствовала, если изначально у пациентов был повышен только уровень IL-6 [258].

Как правило, для пациентов с СД 2-го типа характерно абдоминальное ожирение [104]. Именно абдоминальная жировая ткань, обильно васкуляризированная, рассматривается как один из главных источников провоспалительных агентов. Основное внимание при исследовании воспаления, ассоциированного с СД 2-го типа, до недавнего времени уделялось самим адипоцитам и макрофагам жировой ткани [165]. Известно, что адипоциты способны продуцировать моноцитарный хемоаттрактант, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), таким образом привлекая моноциты [253]. У мышей, дефицитных по гену рецептора MCP-1, снижается степень инсулинорезистентности, индуцированной высококалорийной диетой, и доля макрофагов в жировой ткани [290]. Однако тот факт, что инфильтрация

макрофагами и признаки воспаления в жировой ткани все-таки сохраняются, свидетельствует в пользу того, что имеются и другие стимулы, помимо MCP-1, которые способствуют созданию провоспалительного окружения при СД 2-го типа.

Одной из отличительных черт СД 2-го типа является проградиентное снижение функциональной активности инсулинопродуцирующих β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы и нарушение первой фазы секреции инсулина [261]. В данном процессе также показана роль воспаления и инфильтрация островков Лангерганса макрофагами [92]. Снижение функции β -клеток ассоциируется с отложением амилоида в ткани железы, характерным компонентом которого является островковый амилоидный полипептид (islet amyloid polypeptide, IAPP) или амилин. Причем его количество в поджелудочной железе коррелирует с тяжестью заболевания. Показано, что при фагоцитозе IAPP макрофагами активируется процессинг и секреция $IL-1\beta$ [175]. Вероятно, изначально целью индукции воспалительного ответа в ткани поджелудочной железы подобным образом является стремление организма восстановить функцию β -клеток. Однако в дальнейшем, по мере перехода острого воспаления в хроническое, вместо регенерации наблюдаются выраженные процессы повреждения и потери функции органа [88]. За счет того, что экспрессия антагониста рецептора $IL-1\beta$ ($IL-1RA$) в поджелудочной железе при СД 2-го типа снижена, и β -клетки островков Лангерганса несут большое количество рецепторов 1-го типа к $IL-1\beta$ ($IL-1R1$), воспаление, индуцированное $IL-1\beta$, еще более усиливается и нарушается секреторная функция железы [89]. В течение трех месяцев после однократной инъекции моноклональных антител к $IL-1\beta$ у пациентов с СД 2-го типа наблюдалось снижение уровня гликозилированного гемоглобина и улучшение секреторной функции β -клеток. Похожий эффект вызывало и введение $IL-1RA$ [89]. За счет того, что в условиях гипергликемии увеличивается экспрессия рецептора Fas, которой также способствует повышенное содержание $IL-1\beta$, развивается апоптоз β -клеток [88, 89].

Признаки воспаления при сахарном диабете обнаруживаются и в печени. До 5% клеток печени составляют клетки Купфера. В процессе развития метаболических нарушений их функциональная активность возрастает [253].

Хроническое системное воспаление, характерное для состояния инсулинорезистентности, наряду с АГ, дислипидемией и протромботическим состоянием, многократно увеличивает риск развития атеросклероза у пациентов с СД 2-го типа [284]. В ходе атерогенеза моноциты рекрутируются во внутреннюю оболочку сосуда (интиму, в норме состоящую из эндотелиальных клеток), в которой происходит их дифференцировка в макрофаги и фагоцитоз модифицированных липопротеинов с формированием «пенистых» клеток. Помимо макрофагов в формировании атеросклеротической бляшки принимают участие и другие клетки иммунной системы: нейтрофилы, тучные клетки и Т-лимфоциты. В процессе развития атеросклеротического поражения стенки сосуда в результате миграции иммуноцитов, а также пролиферации гладкомышечных клеток и миграции их из меди в интиму сосуда, происходит набухание интимы и увеличение толщины комплекса «интима-медиа», которое можно зафиксировать при ультразвуковом исследовании сонных артерий уже в доклиническом периоде течения атеросклероза [172, 211, 297].

Нет точных данных о том, является ли воспаление при СД 2-го типа неспецифическим или антигензависимым. В качестве кандидатов на роль антигенов выступают вещества, которые образуются при стресс-реакции или повреждении клеток, например, белок теплового шока 60 или окисленные липопротеины, которые способствуют развитию воспаления в жировой ткани и сосудистой стенке [134].

Имеются свидетельства в пользу того, что воспаление предшествует развитию СД 2-го типа, а не является его следствием, то есть может служить одним из этиопатогенетических факторов развития СД 2-го типа. Признаки субклинического воспаления наблюдаются не только при выраженном СД 2-го типа, но и у пациентов с нарушением толерантности к углеводам. Кроме того, результаты проспективных исследований показали развитие воспалительных

изменений, таких как лейкоцитоз и увеличение провоспалительных медиаторов в сыворотке крови, за много лет до постановки пациентам диагноза СД 2-го типа [134].

Возможным механизмом, за счет которого цитокины, в частности TNF- α , могут вызывать инсулинорезистентность, является активация c-Jun NH₂-терминальной киназы. Это приводит к фосфорилированию субстратов инсулинового рецептора (IRS)-1 и IRS-2, и, следовательно, к ингибированию сигналинга инсулина. Также происходит стимуляция белков, которые связывают IRS-1 и IRS-2 и вызывают их деградацию, так называемых белков-супрессоров сигналинга цитокинов (SOCS). Провоспалительные цитокины, такие как TNF- α , IL-1 β и IL-6, также снижают экспрессию PPAR- γ (пролифератор-активируемые рецепторы пероксисом) [216].

Однако нарушения метаболизма при СД 2-го типа также способствуют развитию воспалительного ответа. Так, при интенсивном увеличении массы жировой ткани развивается гипоксия, сопровождающаяся клеточной гибелью и привлечением макрофагов; при развитии метаболического стресса происходит активация провоспалительных сигнальных путей I κ B киназы- β (IKK- β) и JUN N-терминальной киназы (JNK); свободные жирные кислоты и высокие концентрации глюкозы стимулируют продукцию провоспалительных цитокинов (IL-6 и IL-1 β) и хемокинов [89]. Таким образом, образуется порочный круг, в котором метаболические и воспалительные изменения могут индуцировать и потенцировать развитие друг друга, и особенно важным становится более полное понимание патогенеза СД 2-го типа.

Важную регуляторную функцию в процессе развития воспаления играет иммунная система, в частности, лимфоциты. Именно они привлекают к очагу воспаления лейкоциты общевоспалительного назначения – нейтрофилы, моноциты, базофилы, тучные клетки, и способствуют активации или синтезу гуморальных факторов воспаления [23].

После обнаружения в жировой ткани Т-лимфоцитов, вполне вероятной становится концепция, согласно которой макрофаги и адипоциты выступают в

роли эффекторных клеток, а регулирующую функцию при развитии воспаления выполняют именно Т-клетки [89, 300] (Рисунок 1). Лимфоциты составляют примерно 10% от всей клеточной массы абдоминальной жировой ткани у мышей C57BL/6 [98]. Причем различные Т-клеточные субпопуляции играют различную роль. Так, Т-хелперы 1-го типа (Th1) и CD8+ Т-лимфоциты являются провоспалительными, а forkhead box P3 (FoxP3+) Т-регуляторные лимфоциты препятствуют развитию воспаления [98, 125].

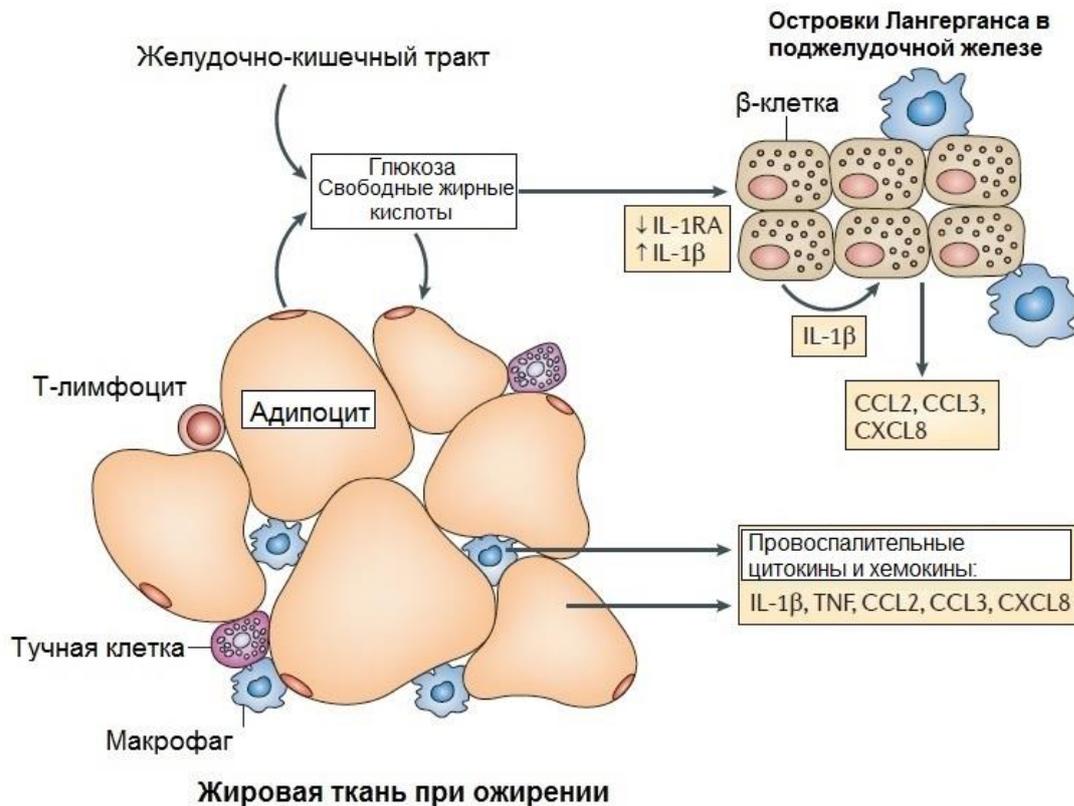


Рисунок 1. Схема развития воспаления при сахарном диабете 2-го типа (представлен перевод схемы, составленной M.Y. Donath и S.E. Shoelson, (2011))

При избыточном поступлении глюкозы и свободных жирных кислот в тканях, чувствительных к инсулину, происходит наработка и секреция цитокинов и хемокинов, наряду со снижением продукции антагониста рецептора IL-1. В результате клетки иммунной системы привлекаются в ткани и вносят вклад в развитие воспаления. Высвобождение цитокинов и хемокинов из жировой ткани в циркуляцию вызывает воспаление в других тканях.

В последнее время пересматривается парадигма, предложенная Т. R. Mossman и R. L. Coffman (1989), согласно которой CD4+ клетки дифференцируются в два подкласса с реципрокными функциями и различным набором секретируемых цитокинов – Т-хелперы 1-го типа (Th1) и Т-хелперы 2-го типа (Th2) [115, 187, 207]. Появляются сведения о новых субпопуляциях Т-лимфоцитов-хелперов [204]. К ним, в частности, относятся Т-лимфоциты 17-го типа (Th17), являющиеся перспективными для изучения патогенетических аспектов СД 2-го типа, так как они могут вносить весомый вклад в развитие воспаления.

1.4. Роль Т-хелперов 17-го типа в модуляции воспаления

Th17 были впервые выделены в отдельную субпопуляцию в 2005 году [115, 207]. В норме Th17 защищают организм хозяина от внеклеточных и внутриклеточных бактерий и грибов, а в соответствии с недавно опубликованными данными – и от вирусных инфекций [14, 26, 287]. Основным местом их локализации являются барьерные ткани, в особенности – lamina propria слизистой кишечника [287]. Но было показано, что патологические эффекты Th17 проявляются при целом ряде заболеваний, затрагивающих различные органы и ткани. В частности, чрезмерная активация Th17 наблюдается при ревматоидном артрите, псориазе, системном склерозе, воспалительной болезни кишечника, репродуктивной дисфункции [4, 16, 267]. Активно изучается роль Th17 в развитии воспалительных респираторных и сердечно-сосудистых заболеваний [68, 140, 223, 257]. IL-17 вовлечен в патогенез атеросклероза, артериальной гипертензии, вирусного миокардита и дилатационной кардиомиопатии, а также вносит вклад в повреждение тканей при ишемии/реперфузии мозга, почек и кишечника [152]. При СД 1-го типа нарушение баланса между Т-регуляторными лимфоцитами и Th17 приводит к развитию субклинического воспаления и прогрессированию микрососудистых осложнений [232].

Исследования, касающиеся участия Th17 в развитии воспаления у пациентов с СД 2-го типа, немногочисленны [128, 308]. Несмотря на то, что эти работы подтверждают активацию Th17, механизмы отклонения оси дифференцировки Т-лимфоцитов в сторону данной провоспалительной субпопуляции при нарушениях углеводного обмена остаются плохо изученными.

В целом, молекулярные основы функционирования Th17 активно изучаются с момента их открытия вот уже почти 10 лет. Были прояснены многие аспекты, касающиеся особенностей их дифференцировки, эффекторных свойств и роли в иммунном ответе.

Транскрипционными факторами Th17 у мышей являются ROR γ t (retinoid orphan nuclear receptor), ROR α и STAT3 [305, 306]. У человека аналогом ROR γ t является белок RORC вариант 2 [40]. К цитокинам, стимулирующим дифференцировку и активность Th17, относятся TGF- β (в том случае, если его действие дополняется IL-6), IL-23 и IL-21 [32, 115, 136, 196, 207, 278]. Причем IL-21 продуцируется самими Th17 и осуществляет аутокринную регуляцию их функциональной активности по принципу положительной обратной связи [136, 196, 204]. Кроме того, было показано, что у человека важную роль в дифференцировке Th17 играет IL-1 β . Он может усиливать стимулирующее действие IL-6 и IL-23 [30].

К поверхностным маркерам Th17 относят рецептор к IL-23 (IL-23R), рецепторы к хемокинам CXCR4 и CXCR6 [38]. Также для Th17 характерна высокая экспрессия CCR4, CCR5 и CCR6 [38]. Кроме того, все Th17-лимфоциты у людей являются CD161-позитивными [40]. CD161 имеет два лиганда. Один из них, лигандоподобный транскрипт-1, белок, относящийся к лектинам, вероятно, служит для трансэндотелиальной миграции Th17 в ткани. Второй, индуцируемый пролиферацией лимфоцит-ассоциированный рецептор (PILAR), увеличивает экспрессию антиапоптотического белка Bcl-xL [40]. Вероятно, именно сигналинг через Bcl-xL, а также Bcl-2 (факторы, высоко экспрессированные в Th17) обуславливает резистентность к апоптозу и большую продолжительность жизни

данной субпопуляции лимфоцитов, которые можно сопоставить даже со стволовыми клетками [138, 288].

Основными цитокинами, которые продуцируют Th17, являются IL-17A и IL-17F. IL-17 был известен задолго до открытия Th17. Человеческий IL-17A был впервые клонирован в 1995 году и первоначально носил название CTLA-8 [31]. В ранних работах показаны его многочисленные воспалительные и гемопоэтические эффекты в отношении эпителиальных, эндотелиальных клеток и фибробластов [262].

IL-17F является наиболее близким гомологом IL-17A [139]. IL-17A и IL-17F оба являются гомодимерными цитокинами, но, согласно последним данным, человеческие и мышьиные Т-клетки также продуцируют IL-17A/F – гетеродимер [151, 298]. В настоящее время о воспалительных эффектах IL-17F известно меньше, чем об IL-17A, но, в основном, они являются цитокинами-синергистами.

IL-17A индуцирует синтез IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагального CSF (GM-CSF) и других провоспалительных факторов, а также вызывает увеличение синтеза мРНК циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) [121, 241]. Показано, что IL-17A увеличивает экспрессию таких костимуляторных молекул, как ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule 1), с помощью других цитокинов усиливая Т-клеточную активацию [31]. В ряде клеток, в частности, в β -клетках поджелудочной железы, эндотелиальных клетках и клетках костного мозга, IL-17 стимулирует активность индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и приводит к высвобождению NO [181] (Рисунок 2).

Установлено, что IL-17F совместно с IL-17A индуцирует синтез хемокинов моноцитарного хемотаксического протеина-1 (MCP-1) и макрофагального воспалительного протеина-2 (MIP-2) мезангиальными клетками [162] (Рисунок 2).

Th17 способны участвовать в метаболизме соединительной ткани. IL-17F вызывает CD40-опосредованное увеличение экспрессии мРНК коллагена-1, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и ангиогенина [117]. Показано, что IL-17 влияет на продукцию металлопротеиназ и их ингибиторов [207] (Рисунок 2).

Мыши, дефицитные по IL-17A, характеризовались сниженной экспрессией металлопротеиназ-2 и -9 и снижением их активности [44].

Сведения о том, какое влияние Th17 оказывают на гуморальный иммунный ответ, являются противоречивыми. Было показано, что добавление IL-17 *in vitro* не оказывало влияния на продукцию антител мышинными В-лимфоцитами [252]. В то же время у мышей Th17 были обнаружены в В-клеточных фолликулах лимфоузлов и характеризовались высокой экспрессией индуцибельного Т-клеточного коостимулятора (ICOS) – коостимуляторной молекулы, важной для В-клеточного ответа [208]. Человеческие Th17 индуцировали продукцию IgG, IgM и IgA В-лимфоцитами, но не влияли на продукцию IgE [227] (Рисунок 2).

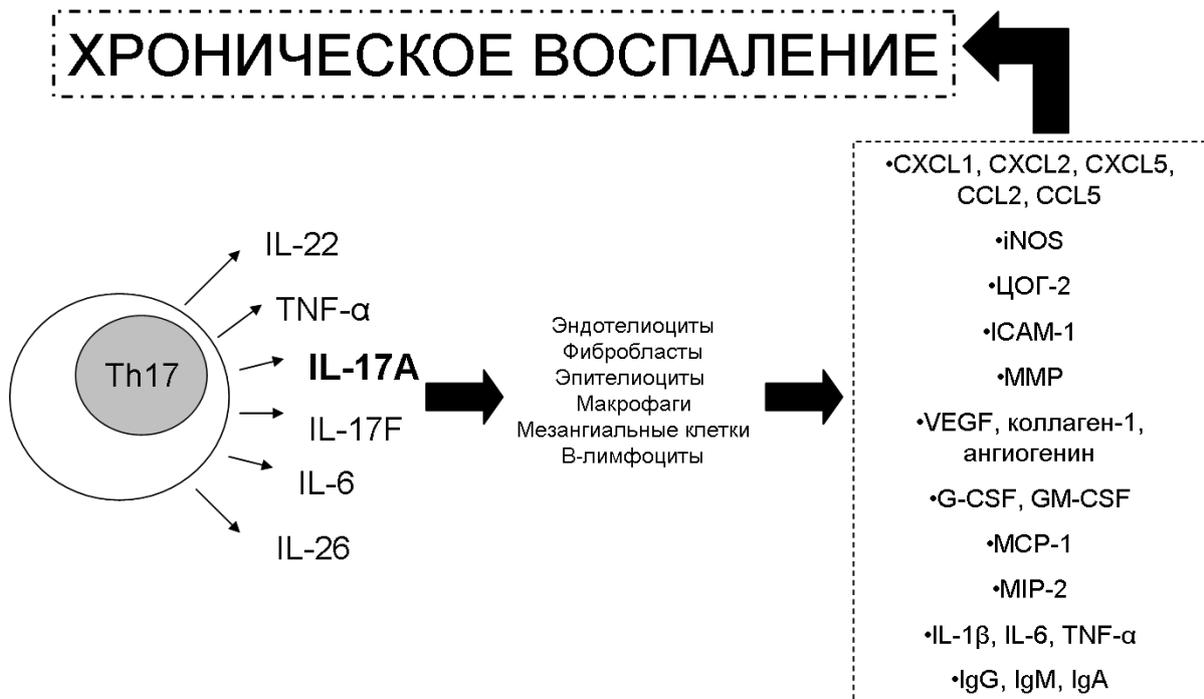


Рисунок 2. Роль Th17 в реализации воспаления (Схема составлена по данным Н. Park et al., 2005; D. Miljkovic et al., 2005; B. Afzali et al., 2007; S. Romagnani, 2008; S.M. Schulz et al., 2008; T. Hirata et al., 2008; M. Iyoda et al., 2010)

Кроме популяции CD4⁺-клеток IL-17 также продуцируется γδ-Т-клетками, CD8⁺-Т-клетками, натуральными киллерами (NK-клетками) и NKT-клетками. В определенных условиях IL-17 может также вырабатываться тучными клетками, альвеолярными макрофагами и нейтрофилами [197].

Мышиные и человеческие Th17 секретируют и другие провоспалительные цитокины: TNF- α , IL-6, IL-22 и IL-26 [30, 67, 71, 294]. IL-22 и IL-26 поддерживают тканевые реакции врожденного иммунитета. Хотя Th17 клетки обладают способностью продуцировать IL-22 совместно с IL-17, обычно коэкспрессии этих цитокинов не наблюдается [275].

В присутствии TGF- β и IL-6 некоторые популяции Th17-клеток экспрессируют IL-10 наряду с IL-17. IL-10 является противовоспалительным цитокином, который помогает контролировать Th1- и Th2-зависимые процессы [177]. Продолжительное воздействие TGF- β и IL-6 приводит к увеличению синтеза IL-10, но при рестимуляции посредством IL-23 эти клетки приобретают патологическую активность, и продукция IL-10 прекращается. Эти IL-17+IL-10+ клетки, скорее всего, не являются отдельной клеточной линией, а продукция IL-10 служит механизмом саморегуляции и необходима для ограничения потенциально опасного для собственного организма Th17-иммунного ответа [269].

Главной функцией Th17 является индукция синтеза различных цитокинов и хемокинов и, посредством этого, привлечение других клеток в очаг воспаления [227]. Считается, что IL-17 является ключевым цитокином для активации и миграции нейтрофилов [227]. В то же время, было показано, что у трансгенных мышей, отличающихся повышенной экспрессией IL-17, макрофаги существенно доминировали над нейтрофилами в воспалительных инфильтратах в легких, что подтвердило важную роль IL-17 в развитии аутоиммунных заболеваний, так как макрофаги являются главными воспалительными клетками при аллергическом энцефаломиелите и коллаген-индуцированном артрите у мышей [207].

Особенностью субпопуляции Th17 является то, что закономерности их функционирования у мышей и у человека оказались различающимися по ряду ключевых факторов [227]. Так, у мышей IL-23 не требовался для дифференцировки наивных Т-хелперов в Th17, а служил исключительно для стабилизации фенотипа и пролиферации уже дифференцированных клеток, в то время как у человека IL-23 оказался критическим для экспрессии RORC. Кроме того, у людей лимитирующим фактором для синтеза и секреции IL-17 клетками,

являлось присутствие в среде $IL-1\beta$ [227]. Поэтому результаты, характеризующие особенности патогенеза заболеваний с участием Th17, полученные на мышинных моделях, невозможно безапелляционно экстраполировать на людей. Человеческие Th17 характеризовались незначительным цитотоксическим потенциалом, а также оказались менее подверженными супрессорному воздействию FoxP3+ Treg-лимфоцитов по сравнению с Th1 и Th2 [227]. Несмотря на ранее опубликованные сведения о том, что Th17 характеризуются низким пролиферативным потенциалом, более поздние исследования свидетельствуют о высокой пролиферационной активности данной клеточной субпопуляции [138, 227].

Th17 были открыты как антагонисты Th1-лимфоцитов. Изначально считалось, что при патологии, опосредованной Th17, Th1 играют роль клеток-протекторов. Однако впоследствии появились данные, свидетельствующие в пользу того, что взаимоотношения между Th1 и Th17 гораздо сложнее, чем полагали ранее, и их активация не является взаимоисключающей. Напротив, Th1 и Th17 могут дополнять действие друг друга [204]. Так, на мышинной модели артрита было показано, что Th1 активировали моноциты с воспалительным фенотипом, которые впоследствии способствовали развитию аутореактивных Th17 и $IL-17$ -опосредованного локального воспаления в лимфоузлах [254]. Было показано существование клеток, которые одновременно продуцировали $IFN-\gamma$ и $IL-17$. Они получили название «двойные позитивные T-лимфоциты» или «Th1/Th17-лимфоциты». Функциональные черты Th17 и Th1/Th17 оказались довольно схожими. [13, 38]. Кроме того, Th17 обладают пластичностью по отношению к Th1: под влиянием $IL-12$ или $IL-23$ в отсутствие $TGF-\beta$ они начинают экспрессировать STAT-4 и T-bet вместо ROR- γt и ROR- α и переключаются на синтез $IFN-\gamma$ вместо $IL-17A$ и $IL-17F$. При этом Th1 не способны превращаться в Th17 ни при каких условиях [40]. Существует гипотеза, что пластичность субпопуляций T-лимфоцитов регулируется микро-РНК [244].

Ряд авторов склоняются к мнению, что Th17 являются не столько провоспалительными, сколько выступают в роли модуляторов иммунного ответа [197, 287]. В пользу данной гипотезы свидетельствует тесная взаимосвязь Th17 с

FoxP3+ T-регуляторными лимфоцитами, что делает целесообразным комплексное изучение данных клеточных субпопуляций.

1.5. T-регуляторные лимфоциты как антагонисты Th17

В связи с тем, что эффекторные лимфоциты отличаются высокой активностью, значительной продолжительностью жизни и распознают разнообразные антигены, возникает риск развития аутоиммунного заболевания или иммунного ответа, неадекватного по силе антигенной нагрузке. Поэтому в ходе эволюции потребовалось выработать механизмы, способные контролировать эффекторные клетки иммунной системы хозяина. Различают внутренние механизмы поддержания аутоотолерантности (клональная селекция в центральных органах иммунной системы, редактирование клеточных рецепторов, увеличение порога клеточной активации) и внешние, опосредуемые T-регуляторными лимфоцитами (Treg). В настоящее время показано, что снижение содержания или нарушение функционирования Treg приводит к формированию воспалительных или аутоиммунных реакций в организме человека [237, 287].

Поиск субпопуляции T-лимфоцитов, опосредующих супрессорные функции в отношении других клеток иммунной системы, начался более 40 лет назад. Однако в то время оказалось невозможным идентифицировать клеточные маркеры, специфичные для данной субпопуляции, и исследования в данном направлении были прекращены, будучи признанными бесперспективными [245]. В 1995 году S. Sakaguchi et al. впервые описали CD4+CD25+ клетки у мышей, участвующие в поддержании аутоотолерантности, которые впоследствии и получили название «T-регуляторные лимфоциты» [234].

Различают естественные T-регуляторные клетки (nTreg), которые образуются в тимусе, и адаптивные, которые развиваются из наивных T-лимфоцитов на периферии при встрече с антигеном (iTreg). Основная функция естественных Treg заключается в предотвращении аутоиммунных процессов, в то время как адаптивные Treg ограничивают иммунный ответ на заключительных

этапах [28, 245]. Многие авторы обозначают адаптивные Treg как Т-хелперы 3-го типа (Th3) [212].

Treg несут на своей поверхности TCR, которые могут распознавать как свои, так и чужеродные антигены. Однако после активации подавление иммунного ответа осуществляется по антигеннезависимому механизму [235, 245].

Было показано, что специфическим транскрипционным фактором и маркером Treg является FoxP3 (forkhead box P3), который необходим для супрессорной активности клеток и подавления альтернативных путей дифференцировки Т-лимфоцитов [101, 212]. Экспрессия FoxP3 индуцируется в nTreg в тимусе и может активироваться в наивных Т-лимфоцитах на периферии под влиянием TGF- β , IL-2, ретиноевой кислоты, 17- β -эстрадиола и сигналинга через рецептор 1-го типа к сфингозин-1-фосфату, что в результате приводит к образованию iTreg [212].

Фенотип nTreg хорошо описан. В покое они являются CD45RA+FoxP3^{low}, а в активированном состоянии – CD45RO+FoxP3^{high} [48, 155]. Treg экспрессируют в большом количестве CD25 (α -цепь рецептора к IL-2) и IL-2 является важным ростовым фактором для FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов [245]. Показано, что металлопротеиназа-9 может влиять на развитие Treg. Вероятно, ее действие может опосредоваться именно увеличением продукции IL-2 [50, 282]. У людей, в отличие от грызунов, не существует дискретной субпопуляции CD25+ лимфоцитов (CD25 в определенных количествах может определяться на активированных Т-клетках других субпопуляций), и при фенотипировании выделяют CD4+CD25^{high}FoxP3+ клетки [245, 250]. К другим маркерам активированных nTreg относятся: CD45RO, молекулы адгезии CD62L и CD44, CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated protein-4; протеин-4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами), CD28, хемокиновые рецепторы CCR7 и CXCR4, GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein; индуцированный глюкокортикоидами белок, связанный с TNFR), OX40 (CD134), рецептор фолата-4. Покоящиеся nTreg-клетки отличаются тем, что несут на своей поверхности CD45RB вместо CD45RO, экспрессируют интегрин $\alpha_4\beta_7$ и хемокиновый рецептор

CCR9. Адаптивные Treg также являются FoxP3-позитивными и не имеют специфических маркеров, в связи с чем, не представляется возможным фенотипически дифференцировать их от nTreg-лимфоцитов [21, 212].

Treg подавляют пролиферацию и активацию Т- и В-лимфоцитов, дендритных клеток, NK- и NKT-клеток, моноцитов/макрофагов, тучных клеток, базофилов, эозинофилов и остеобластов [212, 236]. Для трансгенных линий мышей, имеющих дефицит регуляторных Т-клеток, характерно увеличение содержания антител к митохондриям и ядерным антигенам в циркуляции [145, 309].

Выделяют несколько механизмов, за счет которых CD4+CD25+FoxP3+ Treg могут осуществлять иммуносупрессорную функцию.

Во-первых, регуляторное действие может реализовываться за счет растворимых факторов. Было показано, что Treg секретируют TGF- β и IL-10, отличающиеся ингибирующими свойствами в отношении клеток иммунной системы. Однако добавление специфических моноклональных антител к данным цитокинам *in vitro* не влияло на супрессорную активность Treg [183]. Позже было выявлено, что Treg могут также продуцировать ингибиторный цитокин IL-35, уровень мРНК которого был увеличен в активно функционирующих Т-регуляторных клетках, что поддерживало теорию о цитокин-опосредованном функционировании Treg [73]. К супрессорным молекулам, секретируемым Treg, относится и фибриногеноподобный протеин 2 (FGL2), связывание которого со специфическим рецептором Fc γ RIIB ингибирует созревание дендритных клеток и активацию Т-лимфоцитов, а также вызывает апоптоз В-лимфоцитов [160].

Вторичный мессенджер циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) негативно влияет на функционирование эффекторных Т-лимфоцитов [112, 202]. Показано, что Treg способны транспортировать цАМФ в клетки-мишени напрямую через образующиеся межмембранные контакты [56]. Более того, Treg несут на своей поверхности CD39 (эктонуклеозид трифосфат дифосфогидролаза) и CD73 (экто-5'-нуклеотидаза). Эти эктоэнзимы катализируют генерацию внеклеточного аденозина, который оказывает ингибирующее влияние на

эффекторные клетки через взаимодействие с аденозиновыми A2A рецепторами. [81]. Вероятно, сами Treg при этом оказываются защищенными от апоптоза, опосредуемого повышенным содержанием АТФ во внеклеточной среде при повреждении тканей [311].

Во-вторых, важную роль в реализации супрессорной функции Treg играет контактный механизм регуляции. Поверхностные молекулы T-регуляторных лимфоцитов: CTLA-4, LAG-3 (активирующий лимфоциты ген-3) и нейропилин-1, связываются с антигенпрезентирующими клетками (АПК). Следствием является нарушение созревания и функционирования АПК, и, в дальнейшем, угнетение активации и функций T-лимфоцитов [123, 183, 239]. Кроме того, Treg обладают киллерной активностью, которая реализуется через цитолитические молекулы, такие как гранзимы A/B и перфорины, или через TRAIL-DR5 путь (tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand-death receptor 5 pathway) [245].

Контактный механизм действия Treg может осуществляться и за счет мембраносвязанной формы галектина-1, который также необходим для нормального созревания T-регуляторных лимфоцитов. Галектин-1 при связывании с гликопротеиновыми рецепторами эффекторных клеток (такими как CD45, CD43 и CD7) вызывает остановку клеточного роста и апоптоз [27, 106].

И, наконец, Treg могут конкурировать с эффекторными клетками за факторы роста. Поверхностный маркер CD25 не только стимулирует созревание Treg, но и адсорбирует IL-2 из микроокружения, таким образом, приводя к апоптозу эффекторных T-лимфоцитов [205].

Помимо CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-лимфоцитов описаны и другие субпопуляции регуляторных клеток: регуляторные T-клетки 1-го типа (Tr1), различные классы CD8⁺ регуляторных T-лимфоцитов, двойные негативные (CD4⁻CD8⁻CD3⁺) T-клетки и даже регуляторные B-лимфоциты, продуцирующие IL-10 и TGF- β [66, 95, 130, 171, 212, 229, 245, 256, 289, 301]. Показано, что $\gamma\delta$ T-лимфоциты и T-натуральные киллеры также осуществляют иммунорегуляторную функцию [109, 158]. Однако именно субпопуляция CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg наиболее хорошо

изучена и тесно связана с Th17-лимфоцитами на функциональном и, скорее всего, на эволюционном уровне.

Фактор роста TGF- β является критическим для дифференцировки как Th17, так и Treg [281]. Под воздействием TGF- β наивные T-лимфоциты приобретают «переходный» фенотип, экспрессируя одновременно FoxP3 и ROR- γ t+ROR α [136, 195, 275]. В дальнейшем клетки могут подвергнуться влиянию провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-21, которые ингибируют FoxP3 и запускают программу развития Th17, или продолжить дифференцировку по пути Treg под действием TGF- β [136, 212, 275].

Показано, что FoxP3 подавляет программу развития Th17, напрямую связывая и инактивируя факторы ROR. Идентифицированы домены, через которые осуществляется взаимодействие FoxP3 и ROR. Под влиянием провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-21 и IL-23) STAT3 отменяет FoxP3-опосредуемую репрессию ROR γ t и ROR α . Следствием является угнетение дифференцировки iTreg и коммитирование клеток в сторону линии Th17-лимфоцитов [287].

Если в активированных Treg-клетках снижается экспрессия FoxP3, они утрачивают супрессорную функцию и могут продуцировать IL-17 или IFN- γ . Причем тип провоспалительного цитокина, который продуцируют Treg, специфичен для органа, в котором они локализуются. Например, в селезенке, печени и периферических лимфатических узлах ex-FoxP3+ клетки продуцируют IFN- γ . А клетки из лимфатических фолликулов желудочно-кишечного тракта переключаются на синтез IL-17 [54, 312].

Была открыта популяция ROR γ t+FoxP3+-T-клеток, которые способны оказывать супрессорное действие на эффекторные лимфоциты, но продолжают секретировать IL-17 при рестимуляции [51, 279]. Такие «гибридные» клетки могут демонстрировать супрессорное или провоспалительное влияние, или оставаться «нейтральными по отношению к воспалению», в зависимости от локального микроокружения [197, 287].

Так же как и Th17, iTreg в большом количестве содержатся в слизистой кишечника. Если основной функцией Th17 является защита организма от патогенных микроорганизмов, то Treg призваны ограничивать чрезмерный T-клеточный ответ, с целью создания толерантности к пищевым антигенам и поддержанию комменсальной микрофлоры. При их взаимодействии в кишечнике на фоне постоянно высокой продукции TGF- β проявляется функциональный антагонизм данных субпопуляций. Если дендритные клетки продуцируют ретиноевую кислоту (метаболит витамина A, поступающего с пищей), то происходит развитие iTreg и супрессия иммунного ответа. Если же на дендритные клетки поступают сигналы от патогенных микроорганизмов, они начинают вырабатывать IL-6, который в комплексе с TGF- β активирует программу дифференцировки Th17 [287]. Схематично данные процессы представлены на рисунке 3. Имеется мнение, что ко-эволюция линий iTreg и Th17 в кишечнике легла в основу развития приобретенного иммунитета у позвоночных, и линии iTreg/Th17 являются самыми древними среди путей дифференцировки CD4⁺ T-лимфоцитов. В пользу данной гипотезы свидетельствует и тот факт, что Th17 и iTreg обладают пластичностью в отношении других линий, но другие эффекторные T-лимфоциты не способны трансформироваться в Th17 и iTreg ни при каких известных на сегодняшний день условиях [54, 287].

Имеются данные, что активность Treg находится в тесной взаимосвязи с метаболическими параметрами. У мышей доля Treg-клеток в висцеральной жировой ткани значительно выше, чем в других лимфоидных и нелимфоидных тканях организма [98]. Treg жировой ткани отличаются повышенной экспрессией рецептора PPAR γ , который при ожирении играет роль в восстановлении чувствительности к инсулину [72]. При избирательном разрушении Treg-клеток с помощью дифтерийного токсина в жировой ткани мышей нарастала продукция провоспалительных цитокинов, и значительно увеличивалось содержание инсулина в крови, что косвенно свидетельствовало о развивающейся инсулинорезистентности [98]. Количество Treg обратно коррелирует с

содержанием лептина – гормона, секретируемого жировой тканью, концентрация которого у пациентов с СД 2-го типа зачастую повышена [184, 285].

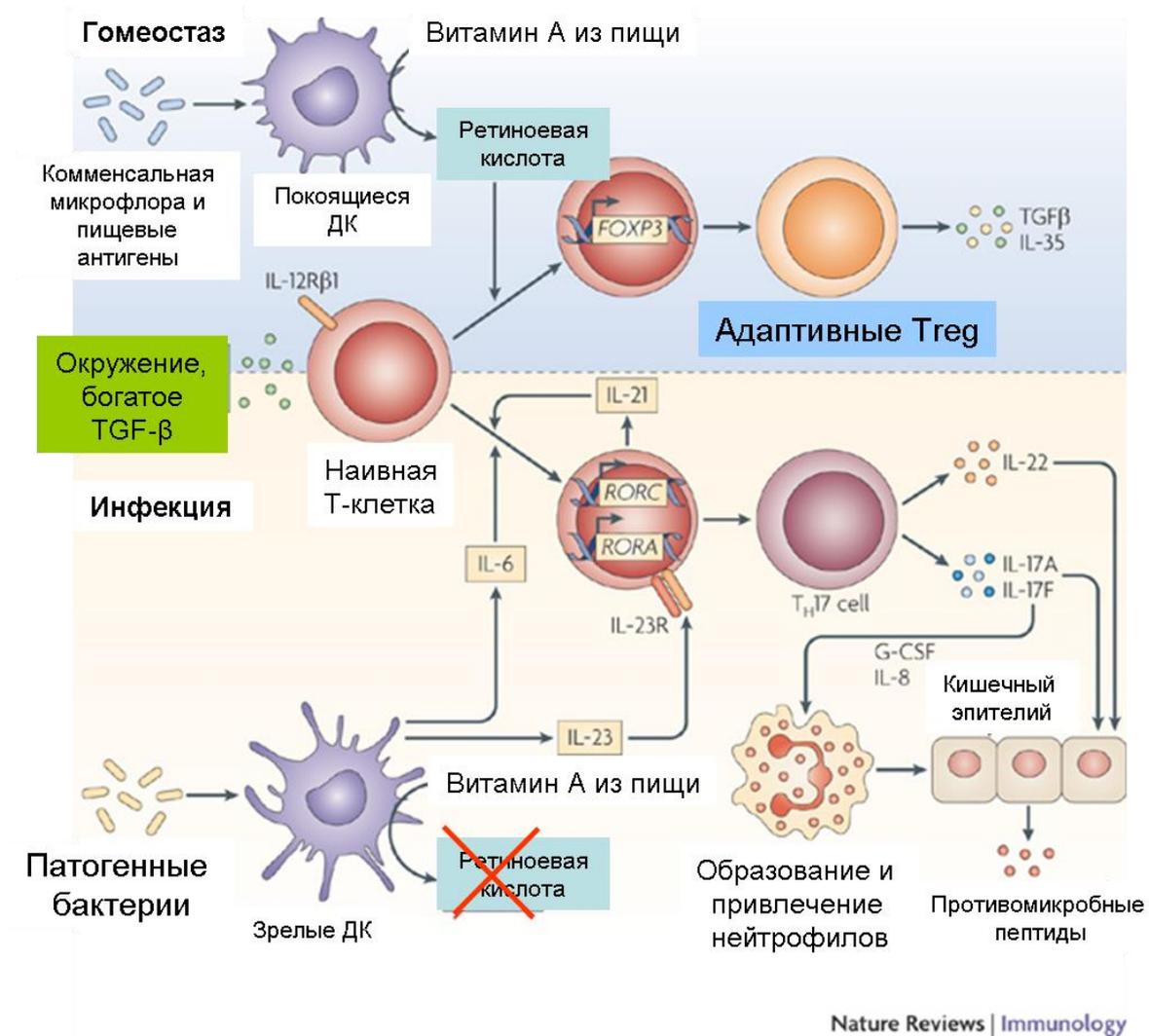


Рисунок 3. Дифференцировка адаптивных Treg и Th17 в микроокружении, обогащенном TGF- β на примере кишечника (представлен перевод схемы из работы С. Т. Weaver и R. D. Natton, 2009); ДК – дендритные клетки

Исследования, касающиеся изучения роли Treg в развитии СД 2-го типа у людей, являются немногочисленными. Имеются данные, что у пациентов с ожирением, которое, как правило, сопровождается развитием СД 2-го типа, CD4+CD25+FoxP3+ Treg доминируют в циркуляции по сравнению с другими линиями Т-клеток [273]. Но результаты ряда других работ свидетельствуют о том, что для пациентов с СД 2-го типа характерен дефицит FoxP3+ Т-регуляторных

лимфоцитов, что может вносить вклад в развитие субклинического воспаления [128, 308].

Механизмы, которые обуславливают изменение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов при развитии СД 2-го типа, остаются плохо изученными. В то же время, показано, что глюкоза и инсулин, содержание которых критически изменяется при развитии СД 2-го типа, могут оказывать существенное влияние на функционирование клеток иммунной системы.

1.6. Метаболизм глюкозы как модулятор активности Т-лимфоцитов

Иммунная и эндокринная системы связаны на различных уровнях. В макроорганизме они постоянно взаимодействуют через сложную и тонко регулируемую сеть гормонов, цитокинов и хемокинов, которые служат для формирования координированного ответа на различные сигналы тревоги и поддержания гомеостаза [91]. Не менее важным является и то, как регулируется метаболизм на уровне клетки. Т-лимфоциты подвергаются метаболическому репрограммированию на всей продолжительности их жизненного цикла, и успешность регуляции обменных процессов, протекающих в них, непосредственно сказывается на эффективности иммунного ответа [168].

Глюкоза и глутамин являются основными источниками энергии Т-лимфоцитов. Для образования АТФ, универсального клеточного макроэрга, глюкоза может метаболизироваться по пути гликолиза или окислительного фосфорилирования. Для покоящихся лимфоцитов требуется мало энергии, и практически весь АТФ клетка получает в результате окислительного фосфорилирования. При активации лимфоцита анаболизм преобладает над катаболизмом, и происходит усиление аэробного гликолиза, даже при наличии достаточного количества кислорода для утилизации глюкозы по пути окислительного фосфорилирования (аналогично эффекту Варбурга в клетках злокачественных опухолей) [169, 251, 283].

Наличие глюкозы в среде является лимитирующим фактором выживания и пролиферации Т-лимфоцитов [127]. При стимуляции TCR-рецептора, а также под влиянием различных цитокинов (IL-3, IL-7), факторов роста и гормонов на поверхности Т-клеток увеличивает экспрессия Glut1, основного транспортера глюкозы в лимфоцитах. Если этого не происходит, эффективность гликолиза становится недостаточной, чтобы обеспечить выживаемость клетки, активируются белки семейства Bcl-2 и клетка подвергается апоптозу [224, 293]. У пациентов с СД 2-го типа на мембране лимфоцитов появляется Glut4. Возможно, это связано со стимуляцией его экспрессии в условиях гиперинсулинемии и гипергликемии [263]. В. Oleszczak et al. (2012) показали, что в условиях гипергликемии *in vitro* в лимфоцитах здоровых людей снижается внутриклеточное количество молекул Glut1 и Glut3, в то время как количество Glut4, напротив, увеличивается [199].

В таких тканях, как жировая и мышечная, метаболизм глюкозы контролируется, главным образом, инсулином. Связывание этого гормона поджелудочной железы со специфическим рецептором приводит к активации фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и далее – протеин киназы В (PKB; другое название - Akt), что, в свою очередь, усиливает транспорт и утилизацию глюкозы по пути гликолиза. В Т-лимфоцитах связывание костимуляторного рецептора CD28 с лигандами (CD80 или CD86 на антигенпрезентирующих клетках) активирует путь PI3K/Akt аналогично инсулину. Стимуляция CD3/CD28 в Т-лимфоцитах вызывает увеличение экспрессии Glut1 и, следовательно, возрастание транспорта глюкозы, а также сопровождается индукцией аэробного гликолиза [103].

На трансгенных мышах, избыточно экспрессирующих Glut1 на Т-лимфоцитах, было показано, что следствием избыточного поступления глюкозы в периферические Т-клетки является увеличение их размера, возрастание продукции IL-2, IFN- γ и появление на клеточной поверхности большего числа маркеров активации (CD25, CD44 и CD69). Мыши характеризовались гипергаммаглобулинемией и отложением иммунных комплексов в почках [127].

Несмотря на потенцирующее действие глюкозы в отношении Т-лимфоцитов, данные о влиянии гипергликемии на их функциональную активность являются противоречивыми. Так, даже лимфоциты различных линий мышей реагируют на повышение концентрации глюкозы по-разному: Т- и В-лимфоциты мышей BALB/cByJ характеризовались снижением жизнеспособности и пролиферативной активности, вероятно, под действием оксидативного стресса, в то время как у мышей линии C57Bl/6J не было выявлено влияния гипергликемии на лимфоциты [230].

От того, какой сигнальный путь используется в качестве основного источника энергии в клетке, зависит не только пролиферация и активация Т-лимфоцитов, но и их дифференцировка. Показано, что конечный продукт гликолиза, лактат, стимулирует продукцию IL-17 в спленоцитах мышей [302]. Важную роль играют сигнальные молекулы-регуляторы метаболизма глюкозы. Усиление гликолиза происходит через сигнальный путь, регулируемый mTOR (mammalian target of rapamycin). Активация сигнального пути АМФ-зависимой протеин киназы (АМРК) приводит к противоположному эффекту: сигналинг mTOR ингибируется и активируются окислительные процессы в митохондриях [180]. Имеются данные, что запуск mTOR-опосредуемого гликолиза приводит к образованию Т-клеток-эффекторов, в то время как для дифференцировки в сторону Т-регуляторных лимфоцитов требуется активация пути АМРК и переключение клеточного метаболизма на окисление липидов. При этом Treg характеризуются низкой экспрессией как поверхностного Glut1, так и его внутриклеточной формы. Th17 являются особо чувствительной субпопуляцией эффекторных Т-лимфоцитов – в отсутствии глюкозы в среде культивирования дифференцировка в направлении Th17 оказалась невозможной [180].

Показано, что лептин, адипокин-регулятор метаболизма глюкозы, вызывает активацию mTOR и, таким образом, способен направлять дифференцировку Т-лимфоцитов в сторону провоспалительных субпопуляций [221]. При сахарном диабете 2-го типа, зачастую ассоциированном с увеличением содержания лептина в крови, регуляция пути, контролируемого mTOR, нарушается [99, 143].

Синтез ферментов, вовлеченных в гликолиз, зависит от транскрипционного фактора HIF1 (hypoxia-inducible factor 1; индуцируемый гипоксией фактор 1), состоящего из субъединиц HIF1 α и HIF1 β . Содержание HIF1 α увеличивается в состоянии нормоксии при активации NF- κ B и повышено в Th17-лимфоцитах, в то время как Treg имеют минимальную концентрацию данного фактора среди всех субпопуляций Т-лимфоцитов. Полагают, что HIF1 α является ключевым регулятором «судьбы» Т-лимфоцитов, и от него зависит, дифференцируется ли наивный Т-лимфоцит в Th17 в условиях активно протекающего гликолиза, или продолжит развитие по пути Treg, в которых основным источником энергии является окисление липидов [77, 251]. HIF1 α вызывает деградацию транскрипционного фактора FoxP3. Вследствие этого развитие Treg-лимфоцитов нарушается, и активируется путь дифференцировки, контролируемый ROR- γ t, результатом которого является образование Th17-лимфоцитов [64] (Рисунок 4).

В то же время, известно, что определенные полиморфизмы HIF1 α ассоциируются с повышенным риском развития СД 2-го типа, а ингибирование данного фактора у мышей способствует снижению ожирения и степени инсулинорезистентности [303, 307].

При активации митогенами или антигенами Т-лимфоциты активно экспрессируют рецептор к инсулину, который отсутствует на клеточной поверхности в состоянии покоя [169, 260]. После связывания с рецептором инсулин в Т-лимфоцитах оказывает классическое воздействие на метаболизм: стимулирует поступление в клетку и утилизацию глюкозы, активирует транспорт аминокислот, липогенез и синтез белков. Благодаря своим эффектам, инсулин поддерживает активированное состояние Т-клеток и усиливает действие регуляторных, ростовых и дифференцировочных факторов. F.B. Stentz et al. (2003) показали, что ответ ФГА-стимулированных Т-лимфоцитов на инсулин отражает состояние углеводного обмена в организме хозяина. У пациентов с диабетическим кетоацидозом и гипергликемией было выявлено увеличение продукции провоспалительных цитокинов и активация CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов [260].

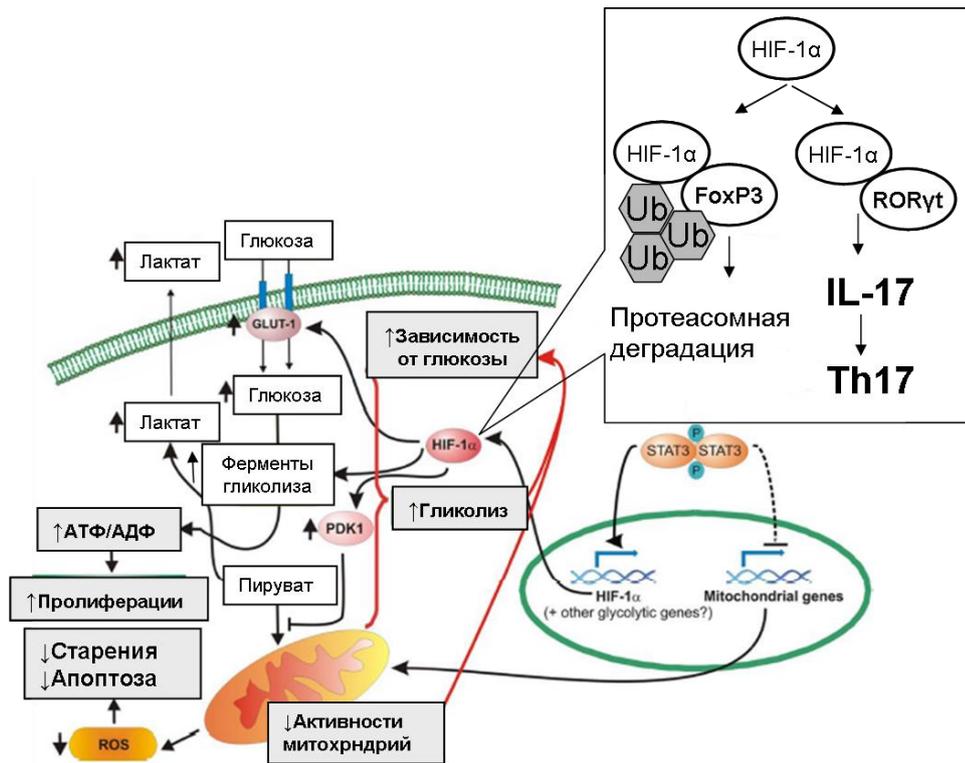


Рисунок 4. Метаболизм глюкозы в клетке и направление дифференцировки Т-лимфоцитов контролируется общим фактором HIF-1 α ; Ub – убиквитин; ROS – активные формы кислорода; PDK1 – киназа-1 пируватдегидрогеназы (По данным M. Demaria et al., 2010; L. Z. Shi et al., 2011; E. V. Dang et al., 2011; A. Caromaldonado et al., 2012)

В ряде исследований установлена важная роль поддержания нормальной концентрации инсулина в среде для полноценного функционирования Т-лимфоцитов. В Т-лимфоцитах крыс в отсутствие инсулина происходит ингибирование аденозинкиназы, повышение образования аденозина и, как следствие, цАМФ, что, в конечном итоге, приводит к подавлению пролиферации Т-лимфоцитов и нарушению иммунного ответа [209]. В то же время, N. Mito et al. (2002) показали, что при высоких концентрациях инсулина происходит ингибирование пролиферативной активности лейкозных Т-клеточных линий [182].

Было показано, что помимо влияния на метаболизм глюкозы, протеинов и липидов, инсулин может направлять дифференцировку Т-лимфоцитов в сторону Th2, таким образом, выполняя иммунорегуляторную функцию [276]. Соответственно, развитие инсулинорезистентности при сахарном диабете 2-го типа и ожирении создает условия, благоприятные для поляризации лимфоцитов в направлении провоспалительных субпопуляций [169]. Показано, что при аутоиммунном миокардите у мышей инсулин приводил к активации пролиферации CD3⁺-лимфоцитов [310].

Было выявлено, что синтез инсулина и функционирование Т-лимфоцитов зависят от общего транскрипционного фактора – ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT, nuclear factor of activated T cells), активируемого кальцинейрином [144, 167]. Этим можно объяснить высокую частоту (до 20%) развития сахарного диабета у пациентов, перенесших трансплантацию почки и подвергавшихся лечению цитостатиками [144]. При этом TGF- β , фактор роста, участвующий в развитии Th17 и FoxP3⁺ Treg-лимфоцитов, ингибирует транскрипцию гена инсулина в β -клетках поджелудочной железы [156].

Таким образом, механизмы регуляции метаболизма глюкозы тесно переплетаются с механизмами поддержания сбалансированного иммунного ответа на различных уровнях.

В целом, исходя из данных литературы, представленных в обзоре, можно предположить, что при инсулинорезистентности и гипергликемии (состояниях, характерных для артериальной гипертензии, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа) нарушается функционирование субпопуляций провоспалительных (Th1-, Th17-лимфоцитов) и иммуносупрессорных (FoxP3⁺ T-регуляторных) лимфоцитов, что, в свою очередь, может вносить вклад в развитие субклинического воспаления и аутореактивных процессов. Причем, активация Th17 может быть опосредована высокими концентрациями глюкозы и инсулина, которые играют важную роль при метаболическом репрограммировании данной

провоспалительной субпопуляции. Особое медико-социальное значение имеет высокая распространенность артериальной гипертензии, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, в связи с повышенной летальностью и высокой частотой развития микро- и макрососудистых осложнений в этой группе пациентов. В связи с тем, что сведения об особенностях функционирования субпопуляций CD4⁺ Т-лимфоцитов при метаболических нарушениях, характерных для пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и нарушений углеводного обмена крайне немногочисленны, исследование в данном направлении является актуальным.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1. Характеристика обследованных групп

Для достижения поставленной цели было проведено одномоментное проспективное сравнительное исследование. Исследование было выполнено в ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН (директор – д-р мед. наук, академик РАН Р. С. Карпов). Набор клинического материала проводился на базе отделения атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца (руководитель – д-р мед. наук, академик РАН Р. С. Карпов). Дизайн исследования представлен на рисунке 5.

Обследовано 90 человек (42 мужчины и 48 женщин) в возрасте от 32 до 65 лет. Все лица, включенные в исследование, были разделены по группам:

1 группа – пациенты с медикаментозно контролируемой артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа (далее – пациенты с сахарным диабетом 2-го типа) – 35 человек;

2 группа – пациенты с медикаментозно контролируемой артериальной гипертензией, ассоциированной с нарушением толерантности к углеводам (далее – пациенты с нарушением толерантности к углеводам) – 16 человек;

3 группа – в качестве группы сравнения обследовано 15 пациентов с медикаментозно контролируемой артериальной гипертензией без нарушений углеводного обмена;

4 группа – в качестве контрольной группы обследовано 24 здоровых лица сопоставимого возраста и пола (здоровые добровольцы).

Характеристика пациентов и здоровых добровольцев представлена в таблице 1.

Всем пациентам проводили комплексное клиничко-инструментальное и лабораторное обследование для верификации диагноза, исключения вторичных форм АГ, определения сочетания метаболических факторов риска и уточнения состояния органов-мишеней.

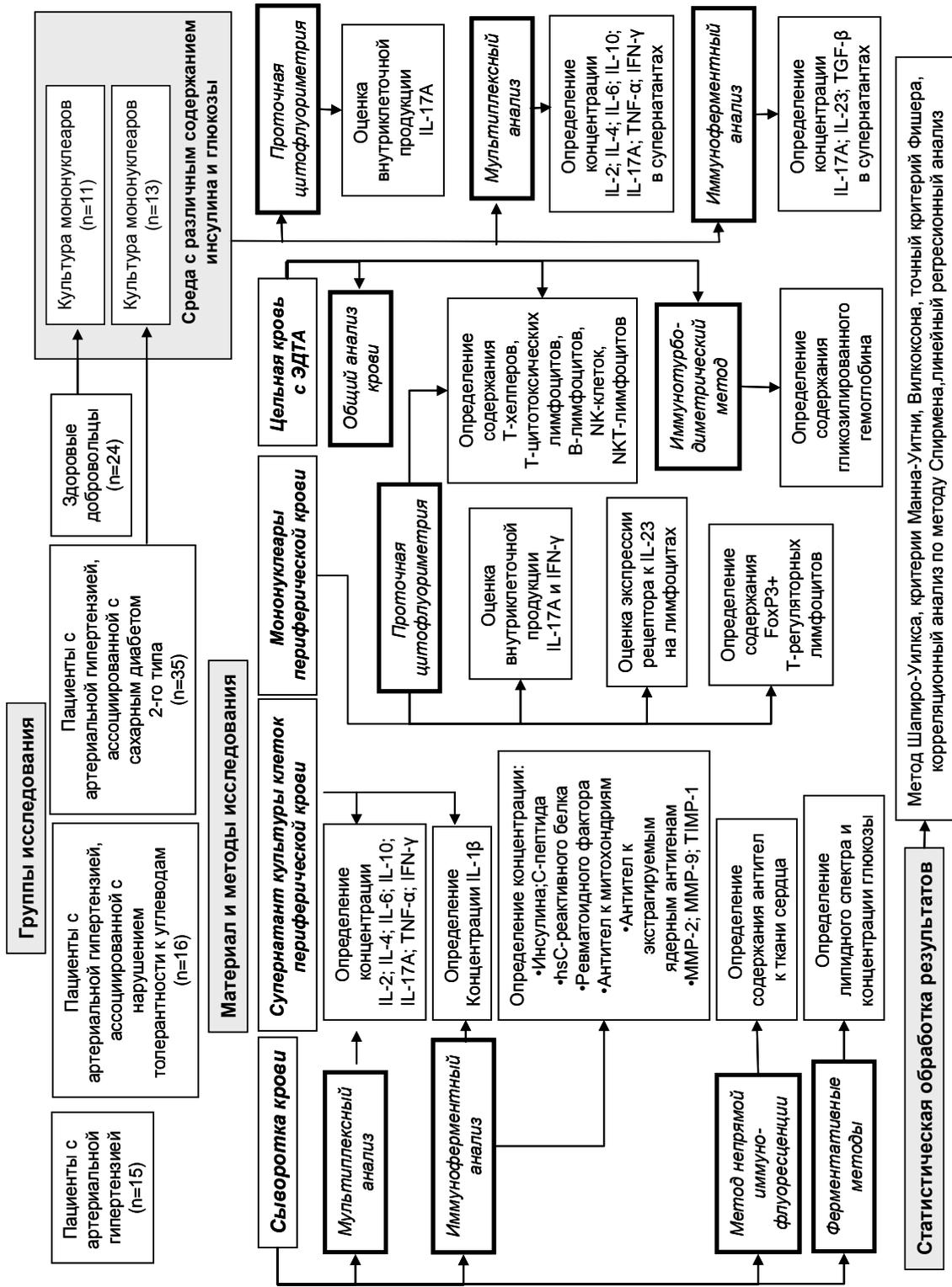


Рисунок 5. Дизайн исследования

Характеристика пациентов и здоровых добровольцев, (Me (Q₁ – Q₃))

Параметры		Пациенты с АГ+СД (n=35)	Пациенты с АГ+НТУ (n=16)	Пациенты с АГ (n=15)	Здоровые добровольцы (n=24)
Мужчины/женщины		17/18	7/9	8/7	10/14
Возраст (лет)		58,0 (56,0 – 62,0)	57,5 (52,0 – 61,0)	53,0 (51,0 – 56,0)	52,0 (40,0 – 59,0)
Индекс массы тела (кг/м ²)		32,4 (29,8 – 35,3)	31,4 (29,0 – 33,2)	30,2 (24,6 – 32,1)	22,6 (21,0 – 33,0)
Окружность тали (см)	муж	105,0 (102,0 – 114,0)	98,0 (95,5 – 102,0)	88,0 (83,0 – 97,5)	85,0 (85,0 – 89,0)
	жен	108,0 (103,0 – 116,0)	105,0 (93,3 – 110,0)	99,5 (90,0 – 109,0)	75,0 (70,0 – 82,0)
Продолжительность диабета (годы)		7,0 (1,0 – 12,0)	-	-	-
Продолжительность АГ (годы)		10,5 (7,0 – 14,0)	11,0 (5,0- 13,0)	9,0 (7,0 – 15,0)	-
Ишемическая болезнь сердца (количество пациентов)		11	9	0	-

Примечание: здесь и далее во всех таблицах Me-медиана, Q₁ – 25-ый процентиль, Q₃ – 75-ый процентиль; n – число обследованных

Диагноз АГ и стратификация риска больных устанавливались на основе действующих национальных рекомендаций по управлению АГ (2010) [8]. У всех пациентов, включенных в исследование, до назначения антигипертензивного лечения была диагностирована 1-2-ая степень артериальной гипертонии. Артериальную гипертонию 1-й степени определяли как повышение систолического артериального давления (САД) в пределах 140 – 159 мм рт. ст. и диастолического артериального давления (ДАД) – в пределах 90 – 99 мм рт. ст.; артериальную гипертонию 2-ой степени – как повышение САД в пределах 160 – 179 мм рт.ст. и ДАД – в пределах 100 – 109 мм рт.ст. Степень АГ оценивали путем измерения офисных значений артериального давления по методу Н. С. Короткова, ориентируясь на данные многократных «случайных» измерений. По результатам данных лабораторного обследования (определение сывороточного содержания мочевого кислоты, креатинина, калия, альдостерона, кортизола, активности ренина), ультразвукового исследования магистральных почечных и внутрпочечных артерий и динамической радионуклидной реносцинтиграфии

были исключены клинически выраженная нефроангиопатия и другие хронические почечные заболевания.

Диагноз НТУ и СД 2-го типа устанавливался в соответствии с критериями современной классификации сахарного диабета (Standards of Medical Care in Diabetes, 2013) [259] и отечественными методическими рекомендациями Федеральной программы «Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом» под ред. И. И. Дедова, М. В. Шестаковой (2013) [1]. Диагноз был подтвержден врачом-эндокринологом ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН канд. мед. наук Е. Н. Бабич. Качество контроля углеводного обмена оценивали по содержанию гликозилированного гемоглобина (HbA1c) и пре- и постпрандиальной (натощак и через 2 ч после приема пищи) концентрации глюкозы в плазме.

У 11 пациентов с СД 2-го типа и 9 пациентов с НТУ была диагностирована ишемическая болезнь сердца (ИБС) (Таблица 1). Для верификации ИБС использовали: опросник Роуза; электрокардиограмму (ЭКГ) в покое (патологический зубец Q, комплекс QS, отрицательный коронарный зубец T, горизонтальная или косонисходящая депрессия сегмента ST); эхокардиографию (снижение локальной сократимости левого желудочка); суточное мониторирование ЭКГ; сцинтиграфию миокарда с технетрилом и нагрузочные пробы (велоэргометрию, Стресс-ЭхоКГ с дипиридамолом, добутамином). Больные не имели в анамнезе перенесенного инфаркта миокарда, операционных вмешательств на коронарных артериях, получали адекватное медикаментозное лечение. Стенокардия напряжения не превышала I – II функционального класса (ФК).

Пациентам было проведено ультразвуковое исследование сонных артерий. Ультразвуковое сканирование в В-режиме в правой и левой общей сонной артерии проводилось на ультразвуковой диагностической системе «ACUSON» 128 XR/10 (США). Оценивали наличие атеросклеротических бляшек, степень стенозирования, проводили количественную оценку толщины комплекса «интима-медиа» (КИМ) сонных артерий. Субклинический атеросклероз

диагностировали при утолщении КИМ более 0,9 мм и/или наличии стенозирования просвета сосуда менее 50% [76, 270]. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2

Частота встречаемости структурных изменений общих сонных артерий у пациентов, включенных в исследование

Подгруппы	Атеросклеротические бляшки		Утолщение комплекса «интима-медиа» общей сонной артерии	
	есть	нет	есть	нет
Пациенты с АГ+СД (n=35)	5 (14,3%)	30 (85,7%)	22 (62,9%)	13 (37,1%)
Пациенты с АГ+НТУ (n=16)	3 (18,8%)	13 (81,2%)	3 (18,8%)	13 (81,2%)
Пациенты с АГ (n=15)	2 (13,3%)	13 (86,7%)	13 (86,7%)	2 (13,3%)

Всем пациентам выполнялся общий анализ крови на автоматическом гематологическом анализаторе АВХ Micros 60 (Франция).

Большинство пациентов, отобранных в исследование, по крайней мере, в течение 10 – 14 дней терапию статинами не получали; 7 пациентов с СД 2-го типа, 6 пациентов с НТУ и 4 пациента с АГ находились на неинтенсивных режимах лечения статинами: аторвастатином и розувастатином в средних дозах 15 мг и 7,5 мг, соответственно. Все обследованные пациенты получали регулярную антигипертензивную терапию, включающую комбинацию блокаторов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) (ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ) или сартанов), индапамидом ретардом и блокаторами медленных кальциевых каналов либо бета-блокаторами. Проводимая антигипертензивная терапия позволила достичь значений АД < 140/85 мм рт. ст. у большинства пациентов, включенных в исследование. У 94,3 % больных с СД 2-го типа проводилась сахароснижающая терапия бигуанидами и производными сульфонилмочевины, трое пациентов находились на

инсулинотерапии (Таблицы 3, 4). Здоровые добровольцы на момент исследования медикаментозных препаратов не получали.

Таблица 3

Особенности терапии пациентов, включенных в исследование

Терапия	Пациенты с АГ+СД (n=35)	Пациенты с АГ+НТУ (n=16)	Пациенты с АГ (n=15)
Образ жизни, диета	5,7 % (n=2)	17,1% (n=6)	0
Антигипертензивная терапия	20,0 % (n=7)	82,9% (n=10)	100% (n=15)
Сахароснижающая терапия	14,3% (n=5)	0	0
Антигипертензивная +сахароснижающая терапия	80,0 % (n=28)	0	0
Статины	20,0% (n=7)	37,5% (n=6)	26,7% (n=4)

Таблица 4

Характер антигипертензивной и сахароснижающей терапии пациентов, включенных в исследование

Группы препаратов		Пациенты с АГ+СД (n=35)	Пациенты с АГ+НТУ (n=16)	Пациенты с АГ (n=15)
Антигипертензивная терапия	Блокаторы ренин-ангиотензин-альдостероновой системы	80,0 % (n=28)	81,3% (n=13)	80,0% (n=12)
	Антагонисты кальция	42,9% (n=15)	23,1% (n=3)	20,0% (n=3)
	Селективные β 1-адреноблокаторы	34,3% (n=12)	46,2% (n=6)	20,0% (n=3)
	Диуретики	42,9% (n=15)	61,5% (n=8)	86,7% (n=13)
Сахароснижающая терапия	Бигуаниды	57,1% (n=20)	0	0
	Производные сульфонилмочевины	60,0% (n=21)	0	0
	Инсулин	8,6 % (n=3)	0	0

На момент обследования у пациентов и здоровых добровольцев отсутствовали клинические и лабораторные признаки острого воспаления.

Критериями включения в исследование для пациентов являлись:

- установленный по результатам расширенного клинико-инструментального обследования диагноз артериальная гипертензия 1-ой – 2-ой степени; СД 2-го типа или НТУ;
- информированное согласие пациента на участие в исследовании.

Критериями исключения являлись:

- возраст младше 30 лет, старше 65 лет;
- аутоиммунные заболевания у пациента и у близких родственников пациента в анамнезе;
- обострение воспалительных заболеваний за месяц или на момент обследования;
- иммуномодулирующая терапия;
- кризовое или злокачественное течение АГ;
- острые сосудистые осложнения (инсульт, транзиторная ишемическая атака, инфаркт миокарда) менее чем за 1 год до включения в исследование;
- нестабильная стенокардия, нарушения ритма сердца, требующие антиаритмической терапии или оперативного вмешательства, хроническая сердечная недостаточность выше 2 ФК (NYHA);
- выраженный периферический атеросклероз;
- СД 1-го типа;
- отказ пациента от участия в исследовании.

При формировании группы здоровых добровольцев производился врачебный осмотр, измерение артериального давления, комплексное лабораторное обследование (общий и биохимический анализ крови). Критериями включения были информированное согласие на участие в исследовании, возраст, отсутствие клинических проявлений острых воспалительных процессов, нормальное артериальное давление, отсутствие отклонений от референсных

значений показателей углеводного, липидного обмена, серологических маркеров острого воспаления и показателей общего анализа крови, отсутствие аллергических и аутоиммунных заболеваний в анамнезе. Исключалось донорство и вакцинация в течение месяца, предшествующего обследованию.

2.2. Материал и методы исследования

2.2.1. Материал исследования

Материалом исследования являлись сыворотка крови, цельная кровь с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА), супернатанты суточных культур клеток крови, мононуклеары периферической крови.

Взятие периферической венозной крови производилось утром натощак в пробирки-вакутейнеры без коагулянта и пробирки-вакутейнеры с ЭДТА и гепарином.

Свернувшуюся кровь без антикоагулянта центрифугировали при ускорении 1500 g. После центрифугирования и ретракции сгустка сыворотку крови аликвотировали в пластиковые пробирки, замораживали при -40°C и хранили до последующего исследования.

Супернатанты культур клеток крови получали после культивирования и митогенной активации клеток крови с помощью набора реагентов «ЦИТОКИН-СТИМУЛ-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) [17]. Для этого кровь с гепарином вносили во флакон, содержащий питательную среду Игла, модифицированную Дульбекком (DMEM), и во флакон, содержащий среду DMEM и комплекс поликлональных активаторов (фитогемагглютинин, конканавалин А и липополисахарид). Клетки культивировали в течение 24 ч при температуре 37°C и концентрации CO_2 5%. По окончании инкубации пробы переносили в пробирки для центрифугирования и осаждали клетки центрифугированием при ускорении 3000g в течение 10 мин. Полученные супернатанты аликвотировали, замораживали и хранили при -40°C до проведения анализа.

Для получения мононуклеаров крови венозную кровь с гепарином разводили в 2 раза фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и центрифугировали на градиенте плотности (Histopaque 1077, Sigma Aldrich, США) при ускорении 400g в течение 30 мин. Полученное кольцо мононуклеарных клеток переносили в другую пробирку и отмывали центрифугированием в PBS с фетальной бычьей сывороткой при ускорении 400g двукратно в течение 10 мин. Клетки ресуспендировали в 1 мл PBS. Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева под микроскопом ЛОМО (Биолам, Россия). Концентрацию клеток доводили до 2×10^6 клеток на мл [12].

2.2.2. Культивирование мононуклеаров крови в среде с различными концентрациями инсулина и глюкозы

Повышенная постпрандиальная концентрация глюкозы (после приема пищи) является основным фактором риска развития микро- и макрососудистых осложнений при СД 2-го типа [266]. У пациентов с СД 2-го типа постпрандиальная гипергликемия может достигать 20 мМ при норме 5 мМ. На стадии предиабета повышение концентрации глюкозы после приема пищи не так выражено и обычно не превышает 10 мМ [33]. В ответ на гипергликемию для поддержания гомеостаза глюкозы происходит повышение секреции инсулина β -клетками поджелудочной железы, развивается гиперинсулинемия. По мере прогрессирования инсулинорезистентности наблюдается десенситизация β -клеток с ухудшением их секреторной активности [220, 247]. Таким образом, концентрация инсулина и глюкозы в крови изменяется в ходе развития СД 2-го типа.

Для изучения влияния инсулина и глюкозы на функциональную активность Th17-лимфоцитов, их *in vitro* концентрации были подобраны таким образом, чтобы соответствовать условиям, которые имеют место *in vivo* в ходе развития СД 2-го типа.

У 11 здоровых добровольцев и 13 пациентов с СД 2-го типа 10^6 мононуклеарных клеток культивировали в пробирках емкостью 15 мл в течение 24 ч при 37 °С и 5% CO₂ в 1 мл среды RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 1% L-глутамин и 1% пенициллина/стрептомицина. В культуральную среду добавляли инсулин и D-глюкозу в различных концентрациях (оба реагента – Sigma Aldrich, США). Три пробирки имели концентрацию D-глюкозы 5 мМ, 10 мМ и 20 мМ и не содержали инсулина. В трех пробирках было создано следующее сочетание концентраций инсулина и D-глюкозы: 5 мМ глюкозы и 10^{-10} М инсулина; 5 мМ глюкозы и 10^{-8} М инсулина; 20 мМ глюкозы и 10^{-8} М инсулина. Для контроля осмолярности была использована пробирка, содержащая 5 мМ D-глюкозы и 15 мМ D-маннитола. Через 24 ч супернатанты клеточных культур собирали и хранили при –40 °С для последующего определения содержания в них цитокинов. Клетки ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе. Для оценки жизнеспособности клетки окрашивали 7-актиноаминомицином D (7-AAD, Becton Dickinson, США). Жизнеспособность клеток варьировала от 95% до 98%. В дальнейшем в мононуклеарах периферической крови определяли базальную и активированную внутриклеточную продукцию IL-17 методом проточной цитометрии.

2.2.3. Определение фенотипа лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии

Проточная цитометрия представляет собой современный метод быстрого измерения различных характеристик клеток, который не только ускоряет анализ, но и позволяет обнаружить и охарактеризовать редкие события и минорные субпопуляции клеток. Принципом метода является гидродинамическое фокусирование клеток в струе жидкости. После того, как клетки пересекают луч лазера, они отражают свет под разными углами (что позволяет судить о размере клеток, соотношении ядра и цитоплазмы, гранулярности цитоплазмы) и, за счет

использования моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами, испускают флуоресценцию (что позволяет идентифицировать различные вне- и внутриклеточные маркеры) [5, 162, 248].

2.2.3.1. Анализ основных субпопуляций лимфоцитов

Содержание основных субпопуляций лимфоцитов (Т-хелперов, Т-цитотоксических лимфоцитов, В-лимфоцитов, НК-клеток, НКТ-лимфоцитов) учитывали в цельной крови с ЭДТА.

В полистирольные пробирки 12x75 мм для проточной цитометрии вносили по 50 мкл крови с ЭДТА. Для фенотипирования клеток использовали следующие моноклональные антитела, меченные флуорохромами: анти-CD3-флуоресцеинизотиоцианат (FITC), анти-CD45-перидинин хлорофилл протеин (PerCP), анти-CD4-фикоэритрин (PE), анти-CD8-PE, анти-CD19-PE, анти-CD16+56-PE (Becton Dickinson, США). После инкубации с моноклональными антителами в образцы добавляли лизирующий раствор для лизиса эритроцитов. Пробы анализировали на четырехцветном проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы CellQuestPro (BD Biosciences, США). При сборе данных учитывали 10000 событий. Результаты выражали в проценте клеток от общего количества лейкоцитов.

Для расчета абсолютного количества клеток проводили общий анализ крови с помощью автоматического гематологического анализатора ABX Micros 60 OT 18 (HORIBA ABX Diagnostics Inc., Франция). Абсолютное количество лимфоцитов различных субпопуляций рассчитывали по формуле:

$$x = (a * b) / 100,$$

где а – абсолютное количество лейкоцитов;

б – относительное содержание лимфоцитов определенной субпопуляции.

Результаты выражали в количестве клеток $\times 10^9$ / л.

2.2.3.2. Анализ содержания Th17- и Th1-лимфоцитов

Принадлежность клеток к субпопуляциям Th17- и Th1-лимфоцитов оценивали по их способности к внутриклеточной продукции IL-17 и IFN- γ , соответственно [96].

Для оценки внутриклеточной продукции цитокинов мононуклеарные клетки культивировали в течение 6 ч на среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 1% L-глутамин и 1% пенициллина/стрептомицина, при 37 °C и концентрации CO₂ 5%. Через 2 ч после начала культивирования в среду добавляли GolgiPlug (активное вещество - брэфельдин А) (BD Pharmingen, США) в концентрации, рекомендованной производителем, для ингибирования секреции цитокинов. Часть фракции мононуклеаров стимулировали форбол 12-мирикат 13-ацетатом (ФМА) в концентрации 50 нг/мл (Sigma Aldrich) и иономицином (1 мкг/мл, Sigma Aldrich). Часть фракции мононуклеаров периферической крови оставляли нестимулированными для оценки спонтанной внутриклеточной продукции цитокинов.

После культивирования по 100 мкл клеточной суспензии каждого образца переносили в две полистирольные пробирки 12x75 мм для проточной цитометрии. В одной из пробирок оценивали внутриклеточную продукцию IL-17 и IFN- γ ; в другой – количество IL-23R⁺ Т-лимфоцитов. Для определения фенотипа клеток были использованы следующие моноклональные антитела: фикоэритрин карбоксициан-5 (PECy5)-меченные анти-CD4 (Becton Dickinson, США), аллофикоцианин (APC)-меченные анти-IL-23R (R&D, США). Для внутриклеточного окрашивания клетки фиксировали 1% параформальдегидом (CellFIX, BD Biosciences, США) и увеличивали проницаемость клеток для моноклональных антител (пермеабилizировали) FACS-пермеабилizирующим раствором (BD Biosciences, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Затем клетки инкубировали с PE-меченными анти-IL-17 (R&D, США) и FITC-меченными анти-IFN- γ (Becton Dickinson, США) антителами в течение 30 мин при комнатной температуре. После окрашивания клетки отмывали

однократно и фиксировали 1% параформальдегидом. В качестве контрольного образца использовали неокрашенные мононуклеары крови.

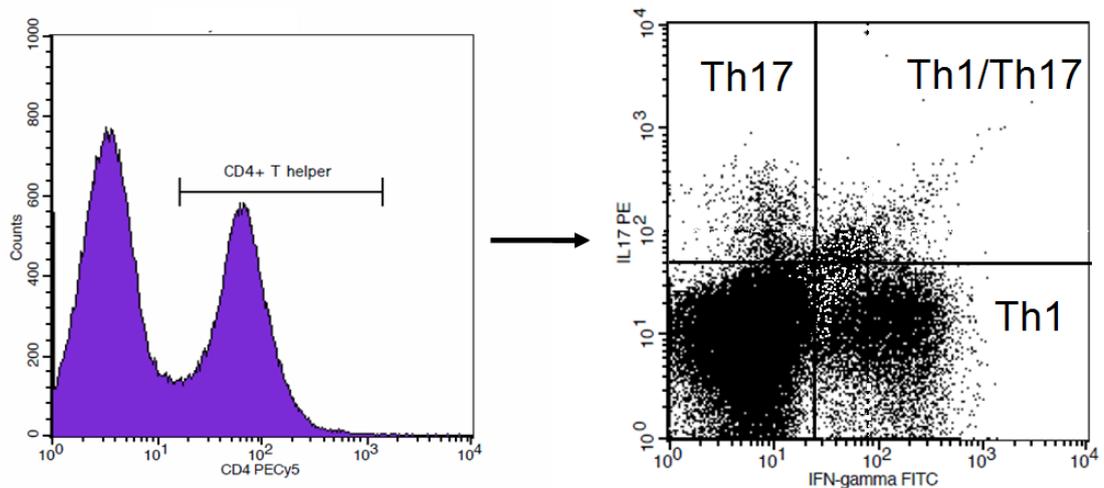


Рисунок 6. Определение относительного содержания Th17- и Th1-лимфоцитов

Пробы анализировали на четырехцветном проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения CellQuestPro (BD, США). При сборе данных учитывали от 50000 до 200000 событий. Результаты выражали в проценте клеток от CD4⁺-лимфоцитов и в средней интенсивности флуоресценции (MFI). Клетки, позитивные как по IL-17, так и по IFN- γ , относили к двойным позитивным Th1/Th17 лимфоцитам. Используемая стратегия гейтирования представлена на рисунке 6.

Абсолютное содержание Th17- и Th1-лимфоцитов рассчитывали по следующей формуле:

$$x = (c * d) / 100,$$

где c – абсолютное количество CD4⁺-лимфоцитов, рассчитанное по результатам общего анализа крови и анализа основных субпопуляций лимфоцитов;

d – относительное содержание IL-17⁺ или IFN- γ ⁺ Т-хелперов.

Результаты выражали в количестве клеток $\times 10^3/\text{л}$ или $\times 10^6/\text{л}$ (для стимулированной внутриклеточной продукции IFN- γ).

2.2.3.3. Определение содержания Т-регуляторных лимфоцитов

Содержание Т-регуляторных лимфоцитов определяли во фракции мононуклеаров периферической крови. Treg идентифицировали по высокой экспрессии молекулы CD25 и внутриклеточного фактора транскрипции FoxP3 [166].

Для этого 100 мкл клеточной суспензии помещали в полистирольную пробирку 12x75 мм для проточной цитометрии. Для фенотипирования клеток были использованы FITC-меченные анти-CD4 и APC-меченные анти-CD25 моноклональные антитела (Becton Dickinson, США). После окрашивания поверхностных маркеров клетки фиксировали и пермеабелизировали с помощью специализированных буферных растворов для детекции FoxP3+ Treg-лимфоцитов (eBioscience, США). Затем клетки инкубировали с PE-меченными анти-FoxP3 антителами (Becton Dickinson, США) для выявления внутриклеточного фактора транскрипции. В качестве контрольного образца использовали неокрашенные мононуклеары крови.

Пробы анализировали на четырехцветном проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения CellQuestPro (Becton Dickinson, США). Последовательность выделения целевой субпопуляции лимфоцитов представлена на рисунке 7. Были гейтированы CD4+-лимфоциты с исключением CD4+-моноцитов, характеризовавшихся более низкой экспрессией маркера. В связи с тем, что у людей выделение дискретной субпопуляции CD25^{high} лимфоцитов представляет сложность, мы опирались на данные K. Lühn et al. (2007), которые показали, что для CD25^{high} Treg-лимфоцитов характерна несколько сниженная экспрессия CD4 (Рисунок 7) [164]. Результаты выражали в проценте CD4+CD25^{high}-клеток и CD4+FoxP3+-клеток от CD4+-лимфоцитов. CD25^{high} Treg гейтировали и

определяли относительное содержание $CD25^{high}$ клеток среди всех $CD4+FoxP3+$ лимфоцитов.

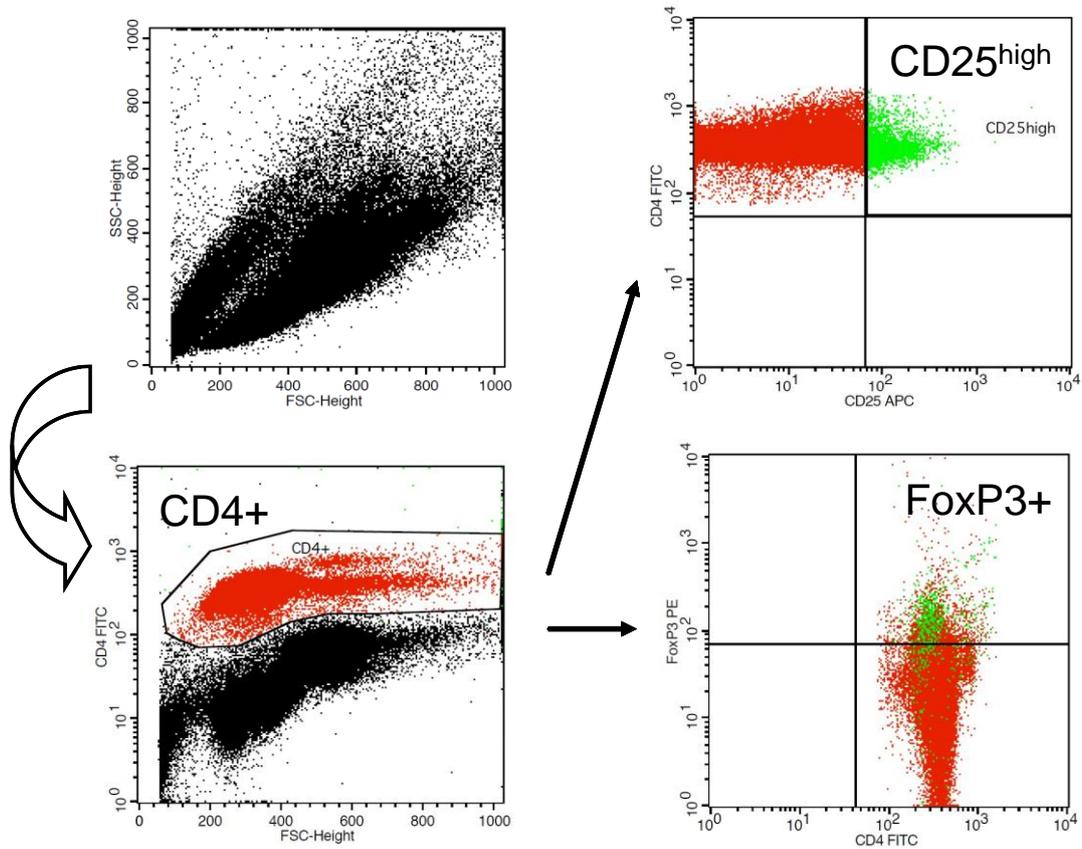


Рисунок 7. Определение содержания $CD4+CD25^{high}$ и $CD4+FoxP3+$ лимфоцитов

Абсолютное содержание $FoxP3+$ Treg-лимфоцитов рассчитывали по следующей формуле:

$$x = (c * e) / 100,$$

где c – абсолютное количество $CD4+$ -лимфоцитов, рассчитанное по результатам общего анализа крови и анализа основных субпопуляций лимфоцитов;

e – относительное содержание $FoxP3+$ Treg-лимфоцитов.

Результаты выражали в количестве клеток $\times 10^6/л$.

2.2.4. Определение концентрации цитокинов методом мультиплексного анализа

Принципом мультиплексного анализа является связывание растворимых аналитов гранулами, отличающимися по размеру и интенсивности флуоресценции, что позволяет в дальнейшем определить концентрацию аналитов методом проточной цитометрии. Преимуществом метода является возможность одновременного определения большого числа аналитов в малом объеме образца [185, 265].

В работе использовался набор для мультиплексного анализа содержания Th1/Th2/Th17 цитокинов человека (BD Bioscience, США), который позволяет определять концентрацию IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ и TNF- α .

50 мкл сыворотки крови, супернатантов суточной культуры клеток крови или супернатантов суточной культуры мононуклеаров, инкубированных в среде с различными концентрациями инсулина и глюкозы, помещали в полистирольные пробирки 12x75 мм для проточной цитометрии. В каждую пробирку добавляли приготовленную смесь гранул, отличающихся по интенсивности флуоресценции, и меченных моноклональными антителами к IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ и TNF- α . К смеси анализируемого образца и гранул добавляли 50 мкл антител для детекции, меченных фикоэритрином (PE). В ходе инкубации формировались комплексы «специфические гранулы + определенный цитокин + антитела для детекции». Интенсивность флуоресценции каждого комплекса была пропорциональна концентрации цитокина в образце. Параллельно подготавливались стандартные растворы цитокинов, в которых концентрация каждого цитокина варьировала от 0 до 5000 пг/мл (калибровочные образцы).

Пробы и калибровочные образцы анализировали на четырехцветном проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения CellQuestPro (Becton Dickinson, США). Пример точечной гистограммы представлен на рисунке 8. Затем с помощью программы FCAP Array software (Soft Flow, США), в которой были построены калибровочные

кривые для каждого цитокина, определяли концентрацию цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ и TNF- α в каждом образце.

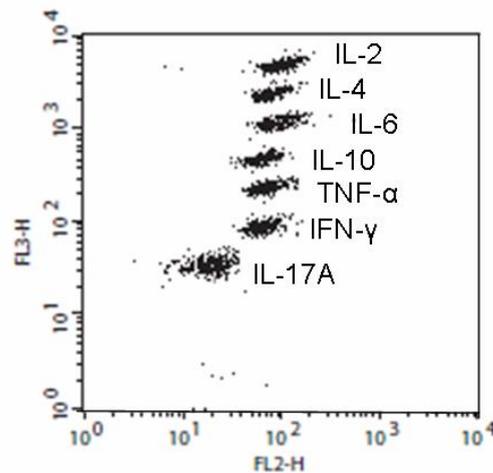


Рисунок 8. Пример точечной диаграммы, полученной в ходе мультиплексного анализа (калибровочный образец с концентрацией цитокинов 80 пг/мл)

Для супернатантов суточных культур клеток периферической крови рассчитывали концентрацию цитокинов на 10^6 лейкоцитов, исходя из общего количества лейкоцитов у пациентов и фактора разведения образца в процессе культивирования с помощью набора «ЦИТОКИН-СТИМУЛ-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Формулы представлены ниже.

$$x = a / (0,2 * b);$$

$$y = c / (0,8 * b),$$

где x – концентрация цитокина в супернатанте интактной культуры клеток крови в пг/мл на 10^6 лейкоцитов;

y – концентрация цитокина в супернатанте митоген-активированной культуры клеток крови в пг/мл на 10^6 лейкоцитов;

a – концентрация цитокина в супернатанте интактной культуры клеток крови в пг/мл;

c – концентрация цитокина в супернатанте митоген-активированной культуры клеток крови в пг/мл;

b – общее количество лейкоцитов;

0,2 и 0,8 – факторы разведения образца.

2.2.5. Иммуноферментный анализ

В работе использовали твердофазный «сэндвич»-вариант иммуноферментного анализа (ИФА). Антитела к одному из эпитопов определяемого антигена были сорбированы на твердой фазе (лунка 96-луночного полистирольного планшета). Анализируемую пробу добавляли к твердой фазе, инкубировали и отмывали. После отмывки вносили конъюгат антител ко второму эпитопу антигена с ферментом. После инкубации и отмывки добавляли субстратный реагент. Интенсивность окрашивания продукта ферментативной реакции регистрировалась фотометрически и была прямопропорциональна содержанию антигена в пробе [12].

2.2.5.1. Определение концентрации инсулина в сыворотке крови

Для определения концентрации инсулина в сыворотке крови использовали набор AccuBind (Monobind, США).

Иммобилизация инсулина, содержащегося в образце, происходила при его соединении с биотинилированными моноклональными антителами, и дальнейшем связывании со стрептавидином, фиксированным на поверхности лунки ИФА-планшета. Одновременно были добавлены антитела к инсулину, связанные с ферментом (пероксидазой хрена). При добавлении субстрата (тетраметилбензидин (ТМБ) + H_2O_2), в лунке планшета протекала ферментативная реакция, активность которой определяли фотометрически.

В соответствующие лунки планшета, покрытые стрептавидином, добавляли 50 мкл проб и калибровочных образцов. Вносили 100 мкл раствора, содержащего фермент, конъюгированный с моноклональными антителами к инсулину, и антитела к инсулину, связанные с биотином. Образцы инкубировали 120 мин при постоянном встряхивании и температуре 25 °С. После инкубации планшет

опорожняли и промывали промывочным буфером трехкратно. В течение второй инкубации с субстратным комплексом в планшете развивалась голубая окраска. Реакцию останавливали добавлением 0,05 мл 10% H_3PO_4 , при этом цвет окраски изменялся на желтый. Результаты ИФА учитывали с помощью автоматического иммуноферментного анализатора АИФ-Ц-01С при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм, чтобы минимизировать влияние стенки лунки планшета. Концентрация инсулина определялась по калибровочной кривой и была прямо пропорциональна интенсивности окрашивания. Результаты выражали в мкМЕ/мл.

По результатам определения концентрации инсулина и глюкозы в сыворотке (описание метода определения содержания глюкозы дано в главе 2.2.7.2) рассчитывали индекс инсулинорезистентности НОМА (homeostatic model assessment) с помощью формулы, приведенной ниже:

$$\text{НОМА} = G_0 \times I_0 / 22,5;$$

где G_0 – концентрация глюкозы в сыворотке натощак (ммМ);

I_0 – концентрация инсулина в сыворотке натощак (мкМЕ/мл).

В сыворотке пациентов, получающих терапию инсулином (3 человека из группы пациентов с сочетанием АГ и СД 2-го типа), определение инсулина и расчет индекса НОМА не проводили.

2.2.5.2. Определение концентрации С-пептида инсулина в сыворотке крови

Для определения концентрации С-пептида инсулина в сыворотке крови использовали набор Diagnostic System Laboratories (США).

В данном варианте «сэндвич»-метода ИФА исследуемые, калибровочные и контрольные образцы инкубировали с моноклональными антителами к С-пептиду инсулина, конъюгированными с пероксидазой хрена, в то время как вторые моноклональные антитела были иммобилизованы на лунках планшета. При добавлении раствора субстрата (тетраметилбензидин (ТМБ) + H_2O_2) в лунке

планшета протекала ферментативная реакция с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски определялась фотометрически.

В соответствующие лунки планшета добавляли 20 мкл исследуемых и контрольных образцов, стандартных растворов. Добавляли 200 мкл конъюгата моноклональных антител с пероксидазой хрена. Планшет инкубировали на орбитальном шейкере при комнатной температуре в течение 60 мин. После декантирования смеси и отмывки планшета в лунки добавляли 100 мкл субстрата, инкубировали и останавливали реакцию добавлением 100 мкл 0,2 М серной кислоты. Результаты ИФА учитывали с помощью автоматического иммуноферментного анализатора АИФ-Ц-01С при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм, чтобы минимизировать влияние стенки лунки планшета. Концентрация С-пептида инсулина определялась по калибровочной кривой и была прямо пропорциональна интенсивности окрашивания. Результаты выражали в нг/мл.

2.2.5.3. Определение концентрации С-реактивного белка высокочувствительным методом в сыворотке крови

После введения в лабораторную практику высокочувствительных методов определения С-реактивного белка (СРБ) (нижняя граница определения – 0,5 мг/л), его концентрации, ранее считавшиеся «следовыми» (< 5 – 8 мг/л) стали называть «базовыми». «Базовые» концентрации СРБ являются диагностически значимыми для выявления субклинического воспаления. СРБ, содержание которого было определено высокочувствительным методом, обозначается как hsСРБ (high sensitive).

Концентрацию hsСРБ определяли в сыворотке крови (набор Вектор-БЕСТ, Россия).

В лунки планшета с иммобилизованными моноклональными антителами к СРБ вносили калибровочные образцы с известными концентрациями СРБ, контрольные образцы и исследуемые пробы. Одновременно добавляли

пероксидазный конъюгат антител к СРБ. Образовавшиеся иммунные комплексы «иммобилизованные моноклональные антитела – СРБ – конъюгат» выявляли ферментативной реакцией пероксидазы с H_2O_2 в присутствии ТМБ. Интенсивность окраски хромогена была прямо пропорциональна концентрации СРБ в образцах.

В лунки планшета вносили 10 мкл предварительно разведенной в 100 раз сыворотки крови, а также контрольных и калибровочных образцов. Добавляли по 100 мкл конъюгата антител с ферментом и инкубировали в термостатируемом шейкере при 37 °С в течение 45 мин. Затем содержимое лунок удаляли, планшет промывали буфером согласно рекомендациям производителя и вносили во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ с перекисью водорода. После 20-минутной инкубации реакцию останавливали добавлением 100 мкл стоп-реагента.

Результаты учитывали фотометрически с помощью автоматического иммуноферментного анализатора АИФ-Ц-01С при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм. Концентрация hsСРБ определялась по калибровочной кривой с учетом фактора разведения и была прямо пропорциональна интенсивности окрашивания. Результаты выражали в мг/л.

2.2.5.4. Определение концентрации ревматоидного фактора в сыворотке крови

Суммарный ревматоидный фактор представляет собой аутоиммунные антитела классов М, G, А к человеческим иммуноглобулинам и обнаруживается в сыворотке пациентов с инфекционными и аутоиммунными заболеваниями, гипергаммаглобулинемией [2].

Концентрацию ревматоидного фактора определяли в сыворотке крови (набор Вектор-БЕСТ, Россия).

На первом этапе калибровочные, контрольные и исследуемые образцы инкубировали в лунках планшета с иммобилизованными иммуноглобулинами класса G кролика. После отмывки связавшийся ревматоидный фактор выявляли

при инкубации с моноклональными антителами к IgM, IgG и IgA человека, конъюгированными с пероксидазой хрена. При добавлении раствора субстрата (тетраметилбензидин (ТМБ) + H_2O_2), в лунке планшета протекала ферментативная реакция с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски определялась фотометрически.

В соответствующие лунки планшета вносили по 100 мкл калибровочных и контрольных образцов, и по 10 мкл предварительно разведенной в 10 раз сыворотки крови. В лунки с исследуемыми пробами добавляли 90 мкл раствора для разведения сывороток. Планшет инкубировали в термостатируемом шейкере при 37 °С в течение 30 мин. После отмывки в соответствии с рекомендациями производителя во все лунки вносили по 100 мкл раствора конъюгата «моноклональные антитела – пероксидаза хрена» и инкубировали еще 30 мин на термостатируемом шейкере при 37 °С. Затем содержимое лунок удаляли, планшет промывали буфером согласно рекомендациям производителя и вносили во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ с перекисью водорода. После 25-минутной инкубации реакцию останавливали добавлением 100 мкл стоп-реагента.

Результаты учитывали фотометрически с помощью автоматического иммуноферментного анализатора АИФ-Ц-01С при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм. Концентрация ревматоидного фактора определялась по калибровочной кривой с учетом фактора разведения и была прямо пропорциональна интенсивности окрашивания. Результаты выражали в Ед/мл.

2.2.5.5. Определение концентрации антител к митохондриям подтипа М2 в сыворотке крови

Концентрацию антител к митохондриям подтипа М2 в сыворотке крови определяли с помощью набора ORGENTEC Diagnostika GmbH (Германия).

Высоко очищенный антиген для антимитохондриальных М2 антител был иммобилизован в лунках планшета. Если в исследуемых образцах присутствовали

антитела к данному антигену, они связывались с ним во время первой инкубации. Во время второй инкубации с моноклональными IgG антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, образовывался комплекс «конъюгат-антитело-антиген», который детектировали фотометрически после добавления раствора субстрата (ТМБ+перекись водорода).

В лунки планшета вносили по 100 мкл калибровочных и контрольных проб, а также предварительно разведенных в 100 раз исследуемых образцов. Пробы инкубировали 20 мин в орбитальном шейкере при 25 °С, планшет отмывали и добавляли в каждую лунку 100 мкл конъюгата. После инкубации в течение 15 мин в орбитальном шейкере при 25 °С планшет снова отмывали и вносили в каждую лунку 100 мкл раствора субстрата. Инкубировали 15 мин при комнатной температуре и останавливали ферментативную реакцию внесением 100 мкл стоп-реагента. Результаты учитывали фотометрически с помощью автоматического иммуноферментного анализатора АИФ-Ц-01С при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм. Концентрация антимитохондриальных антител класса M2 определялась по калибровочной кривой с учетом фактора разведения и была прямо пропорциональна интенсивности окрашивания. Результаты выражали в МЕ/мл.

2.2.5.6. Определение концентрации антител к экстрагируемым ядерным антигенам в сыворотке крови

Концентрацию антител к экстрагируемым ядерным антигенам в сыворотке определяли с помощью набора ORGENTEC Diagnostika GmbH (Германия), который позволяет оценить содержание антител к двуцепочечной ДНК, гистонам, SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, SmRNP, Scl-70, PM-Scl-100, Jo-1 и центромерным антигенам.

В наборе очищенные ядерные антигены были иммобилизованы в лунках планшета. Если в образцах сыворотки присутствовали антитела к ним, они связывались при инкубации с соответствующими антигенами. Конъюгат

моноклональных антител к человеческому IgG при добавлении в лунки образовывал комплекс с иммобилизованными антителами к экстрагируемыми ядерным антигенам. При добавлении в лунки раствора субстрата происходила ферментативная реакция, сопровождающаяся развитием голубой окраски, интенсивность которой была прямо пропорциональна содержанию антител в образце.

В лунки планшета вносили по 100 мкл калибровочных и контрольных проб, а также предварительно разведенных в 100 раз исследуемых образцов. Пробы инкубировали 30 мин в орбитальном шейкере при 25 °С, планшет отмывали и добавляли в каждую лунку 100 мкл конъюгата. После инкубации в течение 15 мин в орбитальном шейкере при 25 °С планшет снова отмывали и вносили в каждую лунку 100 мкл раствора субстрата. Инкубировали 15 мин при комнатной температуре и останавливали ферментативную реакцию внесением 100 мкл стоп-реагента. Результаты учитывали фотометрически с помощью автоматического иммуноферментного анализатора АИФ-Ц-01С при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм. Содержание антител к экстрагируемыми ядерным антигенам выражали в условных единицах, в виде индекса I, рассчитанного по формуле $I = \text{ОПан} / \text{ОПк}$, где ОПан – оптическая плотность анализируемой сыворотки, ОПк – оптическая плотность контроля. Учитывали разводящий фактор.

2.2.5.7. Определение концентрации металлопротеиназ-2 и -9 в сыворотке крови

Содержание металлопротеиназ (ММП)-2 и -9 определяли в сыворотке крови с помощью наборов Quantikine (R&D, США).

В наборе был реализован «сэндвич»-вариант ИФА. Поликлональные антитела к ММП-2 или моноклональные антитела к ММП-9 были иммобилизованы в лунках планшета, с которыми в дальнейшем связывались соответствующие металлопротеиназы, присутствующие в анализируемых и

стандартных образцах, вносимых в лунки. После отмывки в лунки добавляли специфичные к соответствующим ММР поликлональные антитела, конъюгированные с ферментом. После удаления несвязавшихся антител методом отмывки в каждую лунку добавляли раствор субстрата, и развивавшаяся окраска была прямо пропорциональна концентрациям ММР в образцах. После остановки реакции интенсивность окраски измеряли фотометрически.

Для определения ММР-2 образцы сыворотки разводили в 10 раз; для определения ММР-9 – в 100 раз. В каждую лунку вносили по 100 мкл разводящего буфера, поставляемого в наборе. Добавляли 50 мкл стандартных, контрольных и анализируемых образцов для определения ММР-2, или 100 мкл образцов для определения ММР-9. Планшет инкубировали на орбитальном шейкере в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшет отмывали в соответствии с рекомендациями производителя и добавляли 200 мкл раствора конъюгата антител с пероксидазой хрена в каждую лунку. В случае определения ММР-2 инкубировали планшет на орбитальном шейкере при комнатной температуре в течение 2 ч; в случае ММР-9 – в течение 1 ч. Отмывали планшет в соответствии с рекомендациями производителя и добавляли 200 мкл субстратного раствора в каждую лунку планшета. Инкубировали 30 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл стоп-реагента (2Н соляная кислота). Результаты учитывали фотометрически с помощью автоматического иммуноферментного анализатора АИФ-Ц-01С при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм. Концентрация металлопротеиназ определялась по калибровочной кривой с учетом фактора разведения и была прямо пропорциональна интенсивности окрашивания. Результаты выражали в нг/мл.

2.2.5.8. Определение концентрации тканевого ингибитора металлопротеиназ-1 (TIMP-1) в сыворотке крови

Концентрацию TIMP-1 в сыворотке крови определяли с помощью набора eBioscience (США).

Во время первой инкубации TIMP-1, присутствующий в образцах, связывался со специфическими антителами, адсорбированными на лунках микропланшета. Одновременно к нему добавляли специфические антитела, конъюгированные с биотином. В дальнейшем несвязавшиеся биотинилированные антитела удаляли методом отмывки и вносили конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена. После отмывки в лунки планшета вносили субстратный раствор. В результате образовывался окрашенный продукт ферментативной реакции, интенсивность окраски которого была прямо пропорциональна концентрации TIMP-1 в образцах. Реакцию останавливали добавлением сильной кислоты и регистрировали результат фотометрически.

Образцы сывороток предварительно разводили в 100 раз. Лунки планшета промывали буферным раствором в соответствии с рекомендациями производителя. В каждую лунку вносили по 100 мкл стандартных растворов и 20 мкл исследуемых образцов. В лунки с исследуемыми образцами добавляли 80 мкл буферного раствора. В каждую лунку вносили 50 мкл конъюгата антител с биотином и инкубировали планшет в течение 2 ч при комнатной температуре. Отмывали планшет по рекомендациям производителя и в каждую лунку вносили 100 мкл пероксидазы хрена со стрептавидином. Инкубировали планшет на шейкере в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки в лунки добавляли 100 мкл субстратного раствора, инкубировали 10 мин в темноте при комнатной температуре и останавливали реакцию добавлением 100 мкл стоп-реагента (1 М фосфорной кислоты). Результаты учитывали фотометрически с помощью автоматического иммуноферментного анализатора АИФ-Ц-01С при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм. Концентрация TIMP-1 определялась по калибровочной кривой с учетом фактора разведения и была

прямо пропорциональна интенсивности окрашивания. Результаты выражали в нг/мл.

2.2.5.9. Определение концентрации IL-1 β

Концентрацию IL-1 β определяли в сыворотке крови и супернатантах суточных культур клеток периферической крови с помощью набора «Протеиновый контур» (Россия).

Один тип антител к IL-1 β был иммобилизован в лунках планшета, другой – находился в наборе в виде конъюгата с биотином. Индикаторным компонентом набора являлся конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена. Активность связанной пероксидазы, пропорциональную количеству IL-1 β в образцах, измеряли после инкубации с субстратом фотометрически. Предварительно реакцию останавливали внесением сильной кислоты.

Перед началом работы планшет промывали в соответствии с рекомендациями производителя. В каждую лунку планшета вносили по 200 мкл калибровочных и исследуемых образцов. Инкубировали 2 ч при 37 °С в термостатируемом шейкере. После промывки планшета в каждую лунку вносили по 200 мкл биотинилированных антител, инкубировали планшет 30 мин при 37 °С в термостатируемом шейкере. Отмывали планшет и вносили 200 мкл конъюгата стрептавидина с пероксидазой. Инкубировали 30 мин при комнатной температуре при непрерывном встряхивании. Затем планшет снова промывали и в каждую лунку добавляли по 200 мкл раствора субстрата. Инкубировали в темноте при комнатной температуре 15 мин до развития интенсивной голубой окраски. Реакцию останавливали внесением 50 мкл стоп-реагента в каждую лунку. Результаты учитывали фотометрически с помощью автоматического иммуноферментного анализатора АИФ-Ц-01С при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм. Концентрация IL-1 β определялась по калибровочной кривой и была прямо пропорциональна интенсивности окрашивания. Результаты выражали в пг/мл.

2.2.5.10. Определение концентрации IL-17

В супернатантах суточных культур мононуклеаров, инкубированных в среде с различной концентрацией инсулина и глюкозы, содержание IL-17 помимо мультиплексного анализа определяли методом ИФА (Вектор-БЕСТ, Россия), в связи с тем, что предел чувствительности метода ИФА ниже и равен 2 пг/мл цитокина.

В основе метода определения лежал «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. На первой стадии образцы инкубировали в планшете с иммобилизованными на поверхности лунок антителами к IL-17. После отмывки следовала инкубация с биотинилированными антителами к IL-17. Затем в лунки вносили конъюгат стрептавидина, имеющего высокое сродство к биотину, с пероксидазой хрена. После третьей отмывки количество связавшегося конъюгата определяли цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена (перекиси водорода) и хромогена – ТМБ. Реакцию останавливали добавлением сильной кислоты и измеряли оптическую плотность растворов в лунках. Интенсивность желтого окрашивания была прямо пропорциональна концентрации IL-17 в образцах.

В начале анализа во все лунки вносили по 100 мкл раствора для разведения образцов и добавляли 100 мкл калибровочных, контрольных и исследуемых проб. Инкубировали планшет 2 ч в термостатируемом шейкере при 37 °С. После промывки в соответствии с рекомендациями производителя в лунки вносили по 100 мкл раствора антител к IL-17, связанных с биотином. После инкубации в течение 1 ч в термостатируемом шейкере при 37 °С планшет отмывали и вносили по 100 мкл конъюгата стрептавидина с пероксидазой. Инкубировали 30 мин в термостатируемом шейкере при 37 °С. Затем планшет снова промывали и добавляли в каждую лунку по 100 мкл раствора субстрата. Инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темном месте и останавливали реакцию добавлением 100 мкл стоп-реагента. Результаты учитывали фотометрически с помощью автоматического иммуноферментного анализатора АИФ-Ц-01С при

длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм. Концентрация IL-17 определялась по калибровочной кривой и была прямо пропорциональна интенсивности окрашивания. Результаты выражали в пг/мл.

2.2.5.11. Определение концентрации IL-23

Концентрацию IL-23 оценивали в супернатантах суточных культур мононуклеаров, инкубированных в среде с различной концентрацией инсулина и глюкозы, с помощью набора eBioscience (США).

Во время первой инкубации IL-23, присутствующий в образцах, связывался со специфическими антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета. После первой инкубации и отмывки в лунки планшета добавляли антитела к IL-23, конъюгированные с биотином, которые связывались с уже образовавшимся комплексом «IL-23-антитело». В дальнейшем несвязавшиеся биотинилированные антитела удаляли методом отмывки и вносили конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена. После отмывки в лунки планшета вносили субстратный раствор. В результате образовывался окрашенный продукт ферментативной реакции, интенсивность окраски которого была прямо пропорциональна концентрации IL-23 в образцах. Реакцию останавливали добавлением сильной кислоты и регистрировали результат фотометрически.

Перед началом анализа планшет промывали буфером в соответствии с рекомендациями производителя. В соответствующие лунки добавляли 100 мкл калибровочных растворов и 50 мкл анализируемых проб. К анализируемым пробам добавляли 50 мкл раствора для разведения. Планшет с внесенными образцами инкубировали 2 ч при комнатной температуре на орбитальном шейкере. После отмывки в каждую лунку вносили 100 мкл конъюгата антител к IL-23 с биотином. Планшет инкубировали при комнатной температуре на орбитальном шейкере в течение 1 ч, отмывали и в каждую лунку вносили 100 мкл стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой. После 30-минутной инкубации при комнатной температуре на шейкере планшет отмывали и в

каждую лунку вносили 100 мкл субстратного раствора, инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темном месте и добавляли 100 мкл стоп-реагента (1 М фосфорной кислоты). Результаты учитывали фотометрически с помощью автоматического иммуноферментного анализатора АИФ-Ц-01С при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм. Концентрация IL-23 определялась по калибровочной кривой с учетом фактора разведения и была прямо пропорциональна интенсивности окрашивания. Результаты выражали в пг/мл.

2.2.5.11. Определение концентрации TGF- β

Содержание TGF- β оценивали в супернатантах суточных культур мононуклеаров крови, инкубированных в среде с различной концентрацией инсулина и глюкозы, с помощью набора Invitrogen (США).

В наборе реализован принцип твердофазного «сэндвич»-ИФА. В лунки планшета, покрытые моноклональными антителами, вносили образцы, содержащие неизвестное количество TGF- β . Затем добавляли вторые антитела, конъюгированные с биотином. Во время первой инкубации формировался иммобилизованный в лунке планшета комплекс из двух антител, связанных с TGF- β в различных сайтах. Затем добавляли конъюгат из стрептавидина и пероксидазы хрена и после второй инкубации вносили субстратный реагент, который при взаимодействии с ферментом приобретал синюю окраску, прямо пропорциональную по интенсивности содержанию TGF- β в пробах.

Перед постановкой анализа проводили экстракцию TGF- β . Для этого к 250 мкл каждого образца супернатантов добавляли 50 мкл экстрагирующего раствора. Смесь инкубировали 30 мин при 4 °С. Добавляли 250 мкл буфера для разведения. Таким образом, после процедуры экстракции образцы были разведены в 2,2 раза.

В соответствующие лунки планшета вносили по 200 мкл калибровочных, контрольных и экстрагированных исследуемых образцов. Добавляли 50 мкл биотинилированных антител. Планшет инкубировали в течение 3 ч при комнатной температуре на орбитальном шейкере. После отмывки в соответствии

с рекомендациями производителя в лунки вносили по 100 мкл конъюгата стрептавидин-пероксидаза. Инкубировали планшет 30 мин на шейкере при комнатной температуре. После промывки планшета во все лунки вносили 100 мкл раствора субстрата с хромогеном и инкубировали 30 мин в темном месте при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл стоп-реагента. Результаты учитывали фотометрически с помощью автоматического иммуноферментного анализатора АИФ-Ц-01С при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм. Концентрация TGF- β определялась по калибровочной кривой с учетом фактора разведения и была прямо пропорциональна интенсивности окрашивания. Результаты выражали в пг/мл.

2.2.6. Определение содержания антител к ткани сердца методом непрямой иммунофлуоресценции

Для определения антител к ткани сердца в сыворотке крови использовали тест-системы производства «IMMCO Diagnostics» (США).

Определение IgG к ткани сердца проводили методом непрямой иммунофлуоресценции. Антиген, сорбированный на твердой подложке, связывался с немечеными антителами. Комплексы антиген-антитело выявляли с помощью меченых антител к иммуноглобулинам. В качестве флуорохрома использовался флуоресцеин изотиоцианат (FITC).

Готовили серийные разведения сыворотки от 1:20 до 1:320. Оптимально подготовленные препараты ткани, поставляемые с набором, инкубировали с 0,05 мл разведенной сыворотки крови пациентов, позволяя антителам связываться с субстратом. Все несвязавшиеся компоненты сыворотки удаляли при промывке. Связавшиеся антитела класса G выявляли, инкубируя субстрат с конъюгатом – мечеными FITC антителами к IgG человека. Результат реакции оценивали с помощью люминесцентного микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Microimaging DmbH, Германия). По локализации флуорохрома на гистологическом препарате учитывали наличие аутоантител к фибриллярным и сарколеммным структурам

кардиомиоцитов. Результат выражали в титре аутоантител различной специфичности. Титр – величина, обратная наибольшему разведению, при котором еще наблюдалась положительная иммунофлуоресцентная реакция.

2.2.7. Биохимические методы

В сыворотке крови ферментативным колориметрическим методом определяли липидный спектр (общий холестерол (ОХС), триацилглицеролы (ТАГ), холестерол липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) – все наборы ЗАО «Диакон-ДС», Россия) и глюкозооксидазным методом оценивали концентрацию глюкозы (анализатор BIOSEN C-line Clinic (EKF diagnostic, Германия)).

2.2.7.1. Определение липидного спектра сыворотки крови

В основе определения ТАГ лежала цепь ферментативных реакций. Под влиянием липазы триацилглицеролы гидролизовались с образованием жирных кислот и эквимолярного количества глицерола. Глицерол в присутствии АТФ, гексокиназы и глицерофосфатоксидазы окислялся кислородом воздуха с образованием эквимолярного количества перекиси водорода. Под действием пероксидазы в присутствии хлорфенола перекись окисляла хромогенные субстраты (4-аминоантипирин) с образованием окрашенного продукта, интенсивность окраски которого была прямо пропорциональна концентрации ТАГ в пробе и измерялась фотометрически при длине волны 500 нм.

Для проведения реакций 10 мкл сыворотки смешивали с 1000 мкл реагента, в состав которого входили фосфатный буфер рН 7,2 (50 мМ), 4-хлорфенол (4 мМ), 4-аминоантипирин (0,5 мМ), АТФ (2 мМ), магний хлористый (15 мМ), глицеринкиназу (400 Ед/мл), глицеро-3-фосфатоксидазу (1500 Ед/л), липопротеинлипазу (4000 Ед/л), пероксидазу (2000 Ед/л), азид натрия (0,095%). В калибровочную пробу вместо сыворотки добавляли 10 мкл калибратора (2,3 мМ

ТАГ в растворе 0,9% хлористого натрия с глицерином и азидом натрия), а в холостую пробу – 10 мкл дистиллированной воды. Пробы перемешивали и инкубировали при 37 °С в течение 10 мин. Измеряли оптическую плотность опытной и калибровочной пробы против холостой пробы при длине волны 500 нм на биохимическом анализаторе Clima MC-15 (Испания). Результаты выражали в мМ.

Для определения содержания ОХС использовали свойство холестеролэстеразы гидролизовать эфиры холестерина с образованием свободного холестерина. Образовавшийся в результате гидролиза и уже содержащийся в пробе холестерол окислялся кислородом воздуха под действием холестеролоксидазы с образованием эквимольных количеств перекиси водорода. Под действием пероксидазы перекись водорода окисляла хромогенный субстрат (4-аминоантипирин) с образованием окрашенного соединения, интенсивность окраски которого была прямо пропорциональна концентрации холестерина в пробе и измерялась фотометрически при длине волны 500 нм.

Для проведения реакций 10 мкл сыворотки смешивали с 1000 мкл реагента, в состав которого входили калий фосфорнокислый (250 мМ), фенол (5 мМ), 4-аминоантипирин (0,33 мМ), холестеролэстераза (200 Ед/л), холестеролоксидаза (100 Ед/л), пероксидаза (3000 Ед/л). В калибровочную пробу вместо сыворотки добавляли 10 мкл калибратора (5,2 мМ холестерина в растворе кавасола с азидом натрия), а в холостую пробу – 10 мкл дистиллированной воды. Пробы перемешивали и инкубировали при 37 °С в течение 10 мин. Измеряли оптическую плотность опытной и калибровочной пробы против холостой пробы при длине волны 500 нм на биохимическом анализаторе Clima MC-15 (Испания). Результаты выражали в мМ.

ХС-ЛПВП в сыворотке выявляли методом осаждения. Метод осаждения основан на свойстве фосфовольфрамовой кислоты и ионов магния связывать хиломикроны, липопротеины очень низкой плотности и липопротеины низкой плотности. Образовавшийся осадок осаждали центрифугированием. Фракция

липопротеинов высокой плотности оставалась в супернатанте, в котором определяли содержание ХС-ЛПВП ферментативным фотометрическим методом.

В центрифужную пробирку вносили 500 мкл анализируемой сыворотки крови, добавляли 1000 мкл реагента, содержащего фосфовольфрамную кислоту и магний. Пробу перемешивали и выдерживали в течение 10 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали при 4000g в течение 10 мин. Затем определяли содержание ХС-ЛПВП в 100 мкл супернатанта холистеринэстеразным фотометрическим методом, описанным выше.

Содержание ХС-ЛПНП рассчитывали по формуле Фридвальда:

$$\text{ХС-ЛПНП (мМ)} = \text{ОХС (мМ)} - (\text{ТАГ (мМ)} / 2,2) - \text{ХС-ЛПВП (мМ)};$$

Рассчитывали соотношение ХС-ЛПНП/ХС-ЛПВП.

2.2.7.2. Определение содержания глюкозы глюкозооксидазным методом

Определение содержания глюкозы на автоматическом анализаторе BIOSEN C-line Clinic основывалось на электрохимическом методе. Глюкоза, содержащаяся в пробе, под влиянием глюкозооксидазы, иммобилизованной на чипе-сенсоре, распадалась до глюконовой кислоты и перекиси водорода. Перекись водорода регистрировалась электродом. Электрический ток, пропорциональный концентрации глюкозы, преобразовывался в постоянное напряжение и измерялся аналогово-цифровым преобразователем. Результат представляли в мМ глюкозы.

2.2.8. Определение содержания гликозилированного гемоглобина иммунотурбодиметрическим методом

Содержание гликозилированного гемоглобина (HbA1c) определяли в цельной крови с ЭДТА с помощью набора DiaSys (Германия). Тест стандартизован согласно IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) референсному методу.

После гемолиза общий гемоглобин и HbA1c крови соединялись с латексными частицами, обладая одинаковым сродством к ним. Связанное количество было пропорционально концентрации общего гемоглобина и HbA1c в крови. К связанному латексными частицами HbA1c присоединялись мышинные моноклональные антитела к человеческому HbA1c. Затем добавляли козы поликлональные антитела к мышинному IgG, что приводило к агглютинации латексных частиц с иммобилизованным комплексом «HbA1c-антитела». Измеряемое поглощение света было пропорционально количеству HbA1c в пробах.

Перед анализом пробы гемолизировали, добавляя 20 мкл образца крови с ЭДТА к 1000 мкл гемолизирующего раствора (DiaSys, Германия). Перемешивали пробы и инкубировали 5 мин до полного гемолиза. Для анализа к 750 мкл реагента с латексными частицами добавляли 20 мкл гемолизированной крови, калибратора или дистиллированной воды (холостая проба). Перемешивали, инкубировали 2 мин и добавляли 250 мкл мышинных моноклональных антител к человеческому HbA1c. После инкубации в течение 3 мин в пробы вносили 150 мкл козых поликлональных антител к мышинному IgG. Немедленно перемешивали, инкубировали 2 мин и измеряли оптическую плотность при 660 нм на биохимическом анализаторе Clima MC-15 (Испания). Результаты выражали в процентах от общего содержания гемоглобина.

2.3. Методы статистической обработки результатов исследования

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ SPSS 11.5 for Windows. Результаты представляли в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом (25 – 75-й процентиль). Характер распределения параметров оценивался методом Шапиро-Уилкса. Для анализа всей выборки на однородность использовали многовыборочный критерий Крускала-Уоллиса. Все исследуемые показатели не подчинялись законам нормального распределения. Для оценки достоверности различий независимых выборок использовали

непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Для оценки достоверности различий между зависимыми выборками использовали критерий Вилкоксона. Для сравнения качественных и полуколичественных признаков использовали точный критерий Фишера. Корреляционный анализ применяли для оценки связи двух различных количественных признаков и проводили по методу Спирмена. Для формирования групп наблюдений при помощи предварительно заданных переменных использовали кластерный анализ. Для определения вклада различных параметров в вариацию численности регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов применяли линейный регрессионный анализ с построением уравнения регрессии. В ходе линейного регрессионного анализа учитывали значение F-критерия и уровень значимости p ; R – коэффициент множественной корреляции (характеризовал тесноту линейной связи между зависимой и всеми независимыми переменными); R^2 – коэффициент детерминации (численно выражал долю вариации зависимой переменной, объясненную с помощью регрессионного уравнения; чем больше R^2 , тем большую долю вариации объясняли переменные, включенные в модель). Во всех методах статистической обработки результатов принимали альтернативную гипотезу (о различии выборок или взаимосвязи параметров) при уровне значимости $p < 0,05$ [10].

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Оценка параметров углеводного и липидного обменов в исследуемых группах

Для подтверждения или исключения метаболических нарушений у пациентов и здоровых добровольцев было проведено исследование липидного спектра и лабораторных параметров, характеризующих состояние обмена глюкозы.

Нарушения углеводного обмена при СД 2-го типа и НТУ проявлялись в увеличении концентрации глюкозы натощак, инсулина, С-пептида инсулина в сыворотке крови и процентного содержания гликозилированного гемоглобина (Таблица 5). У пациентов с артериальной гипертензией содержание С-пептида инсулина было повышено по сравнению с группой здоровых добровольцев (Таблица 5). Известно, что инсулинорезистентность (ИР) зачастую сопровождает артериальную гипертензию [242, 243]. Однако нормальное содержание глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови позволило рассматривать данную группу как группу сравнения для пациентов с СД 2-го типа и НТУ.

«Золотым стандартом» количественной оценки ИР является эугликемический гиперинсулиновый клэмп-тест, который напрямую оценивает влияние инсулина на утилизацию глюкозы в состоянии покоя *in vivo*. Однако данный метод является сложной и трудоемкой процедурой, поэтому для оценки чувствительности тканей к инсулину предложены различные расчетные показатели, основанные на определении концентрации инсулина и глюкозы в крови [9, 65]. Расчет НОМА-индекса выявил повышение резистентности тканей к инсулину у пациентов с СД 2-го типа по сравнению со здоровыми добровольцами, пациентами с АГ и с НТУ, и у пациентов с НТУ по сравнению со здоровыми добровольцами (Таблица 5).

Параметры, характеризующие особенности липидного и углеводного обмена обследованных пациентов и здоровых добровольцев, (Me (Q₁ – Q₃))

Показатель	Здоровые добровольцы (n=24)	Пациенты с АГ (n=15)	Пациенты с АГ+СД (n=35)	Пациенты с АГ+НТУ (n=16)
Глюкоза натощак, мМ	4,90 (4,50 – 5,10)	4,70 (4,50 – 4,90)	9,20 (6,40 – 10,10) p1=0,038 p2<0,001	6,30 (6,00 – 6,60) p1=0,013 p2<0,001 p3=0,028
НbA1 _c , %	4,76 (3,71 – 5,37)	5,06 (4,93 – 5,50)	7,79 (6,41 – 9,21) p1<0,001 p2<0,001	6,04 (4,93 – 7,50) p1=0,036 p3=0,041
Инсулин, мкМЕ/мл	8,71 (7,18 – 12,57)	14,83 (9,25 – 19,90)	13,65 (10,00 – 24,00) p1<0,001	17,35 (9,56 – 21,64) p1=0,002
С-пептид, нг/мл	1,61 (0,91 – 2,12)	2,60 (1,52 – 3,47) p1=0,041	2,77 (2,15 – 3,77) p1<0,001	2,20 (1,90 – 3,22) p1=0,001
Индекс НОМА	1,88 (1,84-1,91)	3,37 (1,81-4,16)	4,72 (3,37-8,66) p1<0,001 p2<0,001	4,41 (2,21-5,36) p1<0,001 p2=0,018 p3=0,033
ОХС, мМ	4,88 (4,29 – 5,56)	6,43 (5,60 – 6,86) p1<0,001	5,9 (4,65 – 6,66)	5,43 (5,29 – 5,60) p2=0,002
ТАГ, мМ	0,82 (0,68 – 1,11)	1,44 (1,20 – 2,09) p1<0,001	2,25 (1,68 – 2,94) p1<0,001 p2<0,001	1,50 (1,40 – 2,14) p1=0,001 p3=0,023
ХС-ЛПНП, мМ	2,86 (2,47 – 3,54)	4,44 (4,32 – 4,72) p1<0,001	3,42 (2,73 – 4,31) p2=0,015	3,39 (3,10 – 3,76) p2=0,001
ХС-ЛПВП, мМ	1,52 (1,29 – 1,70)	1,06 (0,76 – 1,61) p1<0,001	1,05 (0,86 – 1,32) p1=0,002	1,31 (1,02 – 1,38) p1=0,024
ХС-ЛПНП/ ХС-ЛПВП	1,93 (1,64 – 2,41)	4,18 (2,93 – 5,91) p1<0,001	3,26 (2,37 – 4,76) p1=0,021	2,86 (2,24 – 3,49) p1=0,020 p2=0,028

Примечание: здесь и далее в таблицах представлены только уровни значимости различий < 0,05; p1 – уровень значимости различий по сравнению с группой здоровых добровольцев; p2 – уровень значимости различий по сравнению с группой пациентов с АГ; p3 – уровень значимости различий по сравнению с группой пациентов с АГ, ассоциированной с СД

Дислипидемия, выявленная при артериальной гипертензии, проявлялась в увеличении содержания ОХС, ХС-ЛПНП, ТАГ. Содержание ХС-ЛПВП было

снижено (Таблица 5). При СД 2-го типа и НТУ наблюдалось уменьшение содержания ХС-ЛПВП и увеличение соотношения ХС-ЛПНП/ХС-ЛПВП, увеличение содержания ТАГ по сравнению с группой здоровых добровольцев. Причем при СД 2-го типа уровень ТАГ был выше, чем у пациентов с АГ и НТУ (Таблица 5). Показано, что при СД 2-го типа дислипидемия является следствием многих факторов и тесно связана с развитием инсулинорезистентности и гиперинсулинемии. При этом происходит нарушение функционирования ферментных систем, вовлеченных в метаболизм липидов, изменяется качественный состав липопротеинов и, как следствие, нарушается количественное соотношение липидных фракций [53, 97].

Содержание ОХС и ХС-ЛПНП в группах пациентов с нарушениями углеводного обмена не отличалось от группы здоровых добровольцев (Таблица 5). Однако мы не проводили исследования размеров частиц липопротеинов. Известно, что при СД 2-го типа частицы ЛПНП – меньшего размера, чем у здоровых, и, таким образом, являются более атерогенными [53].

Провоспалительные цитокины способны оказывать влияние на метаболизм липидов, напрямую или опосредованно путем изменения сигналинга инсулина [97]. В свою очередь, инсулинорезистентность, независимо от ее генеза, всегда ассоциируется с явлениями субклинического хронического воспаления. Любой воспалительный процесс приводит к снижению чувствительности тканей к действию инсулина, а инсулинорезистентность усугубляет течение воспаления [97]. У всех пациентов на момент включения в исследование отсутствовали признаки активного воспалительного процесса. Определение концентрации С-реактивного белка высокочувствительным методом позволяет определить наличие субклинического воспаления [214]. Было установлено, что содержание С-реактивного белка, определяемого высокочувствительным методом, было повышено во всех исследуемых группах пациентов по сравнению с группой здоровых добровольцев (Таблица 6). У пациентов с НТУ была выявлена тенденция к увеличению содержания СРБ по сравнению с группой пациентов с АГ ($p=0,067$). Показано, что синтез СРБ и действие инсулина взаимосвязаны: СРБ

ингибирует сигналинг инсулина, а инсулин, в свою очередь, в нормальных условиях селективно супрессирует экспрессию ряда белков в печени, в том числе и СРБ [85, 214]. Однако в условиях инсулинорезистентности синтез СРБ возрастает. Кроме того, увеличению продукции СРБ способствуют провоспалительные цитокины [226].

Таблица 6

Концентрация С-реактивного белка, определяемого высокочувствительным методом, в сыворотке крови (мг/л), (Ме (Q₁ – Q₃))

Здоровые добровольцы (n=24)	Пациенты с АГ (n=15)	Пациенты с АГ+СД (n=35)	Пациенты с АГ+НТУ (n=16)
1,16 (0,43 – 3,06)	4,10 (2,84 – 8,24)	4,88 (3,47 – 9,74)	7,87 (7,60 – 10,76)
	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Примечание: p – уровень значимости различий по сравнению с группой здоровых добровольцев

Умеренное увеличение концентрации СРБ у пациентов, выявленное высокочувствительным методом, свидетельствовало в пользу наличия хронического субклинического воспаления в исследуемых группах. Однако СРБ является неспецифическим маркером воспаления. Все последующие этапы исследования были направлены на изучение иммунных механизмов, вовлеченных в развитие воспаления при нарушениях углеводного обмена, ассоциированных с АГ.

3.2. Оценка популяционного состава лимфоцитов в крови

В группе пациентов с СД 2-го типа выявлено увеличение абсолютного и относительного содержания Т-хелперных лимфоцитов (CD3+CD4+) по сравнению с группой здоровых добровольцев (p=0,002 и p=0,029, соответственно), по сравнению с группой пациентов с АГ (p=0,001 для абсолютного и относительного содержания), а также по сравнению с пациентами с НТУ (p=0,010 – в случае

абсолютного содержания Т-хелперов; $p=0,035$ – в случае относительного содержания) (Таблица 7), что позволяет предположить вовлеченность Т-хелперов в развитие воспаления у пациентов с СД 2-го типа.

Таблица 7

Относительная и абсолютная численность основных субпопуляций лимфоцитов в цельной крови, (Me ($Q_1 - Q_3$))

Показатель	Здоровые добровольцы (n=24)	Пациенты с АГ (n=15)	Пациенты с АГ+СД (n=35)	Пациенты с АГ+НТУ (n=16)
CD3-CD19+, %	3,50 (2,52 – 5,24)	4,02 (3,06 – 4,40)	4,80 (3,23 – 5,93)	4,01 (2,75 – 5,27)
CD3-CD19+, $10^9/л$	0,22 (0,18 – 0,25)	0,29 (0,17 – 0,30)	0,32 (0,21 – 0,35)	0,24 (0,18 – 0,26)
CD3+CD4+, %	13,07 (12,24 – 17,60)	13,30 (8,22 – 16,20)	20,47 (18,00 – 24,30) $p_1=0,029$ $p_2=0,001$	11,38 (7,06 – 15,70) $p_3=0,038$
CD3+CD4+, $10^9/л$	0,88 (0,82 – 0,97)	0,75 (0,61 – 0,78) $p_1=0,047$	1,22 (1,09 – 1,55) $p_1=0,003$ $p_2=0,001$	0,63 (0,46 – 0,79) $p_1=0,016$ $p_3=0,010$
CD3+CD8+, %	7,10 (5,86 – 8,99)	8,45 (5,31 – 11,25)	8,90 (6,46 – 10,00)	6,70 (3,10 – 10,30)
CD3+CD8+, $10^9/л$	0,49 (0,35 – 0,57)	0,60 (0,27 – 0,66)	0,51 (0,38 – 0,87)	0,36 (0,20 – 0,52)
CD3-CD16+CD56+, %	5,41 (2,93 – 6,51)	7,52 (6,00 – 8,31) $p_1=0,038$	5,21 (3,44 – 6,70) $p_2=0,042$	3,06 (2,61 – 3,51) $p_2=0,001$
CD3-CD16+CD56+, $10^9/л$	0,30 (0,22 – 0,45)	0,52 (0,37 – 0,56) $p_1=0,047$	0,42 (0,20 – 0,44)	0,18 (0,17 – 0,18) $p_1=0,049$ $p_2=0,001$ $p_3=0,019$
CD3+CD16+CD56+, %	1,60 (1,01 – 2,36)	1,76 (1,12 – 2,54)	1,61 (1,09 – 1,81)	2,17 (1,17 – 3,17)
CD3+CD16+CD56+, $10^9/л$	0,09 (0,06 – 0,14)	0,10 (0,08 – 0,17)	0,10 (0,08 – 0,18)	0,12 (0,08 – 0,16)

Примечание: указано процентное содержание клеток от общего количества лейкоцитов; p_1 – уровень значимости различий по сравнению с группой здоровых добровольцев; p_2 – уровень значимости различий по сравнению с группой пациентов с АГ; p_3 – уровень значимости различий по сравнению с группой пациентов с АГ, ассоциированной с СД 2-го типа

При этом у пациентов с НТУ абсолютное содержание Т-хелперов было ниже, чем у здоровых добровольцев ($p=0,012$) (Таблица 7). Популяция CD3+CD4+ является гетерогенной и включает субпопуляции Т-лимфоцитов как с

провоспалительной, так и с противовоспалительной активностью, которые могут оказывать различное влияние на метаболические параметры [28, 89]. Так, предполагается, что Th1 усугубляют состояние инсулинорезистентности, а Treg и Th2 способствуют восстановлению чувствительности к инсулину [98, 125]. Принадлежность клеток к той или иной субпопуляции была оценена в ходе дальнейшего исследования методом определения внутриклеточной продукции цитокинов и экспрессии транскрипционных факторов.

В группе пациентов с АГ было обнаружено более высокое абсолютное и относительное содержание НК-клеток (CD3-CD16+CD56+) по сравнению с группой здоровых добровольцев ($p=0,044$ и $p=0,037$ соответственно) (Таблица 7). При СД 2-го типа и при НТУ относительное содержание НК-клеток было ниже, чем у пациентов с АГ ($p=0,041$ и $p=0,001$, соответственно) (Таблица 7). Абсолютное содержание НК-клеток при НТУ было минимальным в сравнении с группами здоровых добровольцев ($p=0,048$), пациентов с АГ ($p=0,001$) и пациентов с СД 2-го типа ($p=0,019$) (Таблица 7). НК-клетки обладают цитотоксической активностью и секретируют цитокины (в первую очередь – IFN- γ), таким образом участвуя в регуляции иммунных процессов [28]. Кроме того, было показано, что НК-клетки способны принимать участие в регуляции ангиогенеза и ремоделировании сосудов [201].

Результаты данного раздела работы показали наличие изменений в популяционном составе лимфоцитов как у пациентов с нарушениями углеводного обмена, так и у пациентов с АГ. Однако выявленные изменения затрагивали различные клеточные субпопуляции. Таким образом, субклиническое воспаление, характерное в той или иной степени для всех групп пациентов, включенных в исследование, может иметь различный генез в зависимости от патологии.

3.3. Оценка содержания Th1 и Th17 в крови

Определение внутриклеточной продукции цитокинов CD4+-лимфоцитами позволяет разделить Т-хелперы на дискретные субпопуляции. Th1 можно

идентифицировать по наработке IFN- γ , в то время как Th17 продуцируют IL-17. При этом можно выделить субпопуляцию Th1/Th17-лимфоцитов, позитивных как по IFN- γ , так и по IL-17 [11, 116].

Для пациентов с СД 2-го типа было характерно увеличение относительного количества IFN- γ -продуцирующих Th1-лимфоцитов по сравнению с группой здоровых добровольцев ($p=0,001$ для спонтанной продукции и для продукции после стимуляции ФМА и иономицином) (Рисунок 9; таблица 8). При СД 2-го типа было обнаружено увеличение количества Т-хелперов-17 и Т-хелперов-1, спонтанно продуцирующих IL-17 и IFN- γ , по сравнению с группой пациентов с изолированной АГ (Рисунок 9; таблица 8). Также содержание двойных позитивных лимфоцитов (одновременно спонтанно продуцирующих IL-17 и IFN- γ) у пациентов с СД 2-го типа было выше, чем у пациентов с АГ. Однако количество Th1/Th17 лимфоцитов, отличавшихся как спонтанной, так и стимулированной внутриклеточной продукцией цитокинов, было ниже, чем в группе пациентов с НТУ (Рисунок 9; таблица 8).

В группе пациентов с НТУ было выявлено увеличение количества лимфоцитов, спонтанно продуцирующих IL-17 и IFN- γ , по сравнению с группой пациентов с АГ (Рисунок 9; таблица 8). Только в группе пациентов с НТУ мы обнаружили увеличение содержания Th1/Th17 после стимуляции ФМА и иономицином по сравнению с группой здоровых добровольцев (Рисунок 9; таблица 8). Количество Th1, внутриклеточно продуцирующих IFN- γ , при НТУ также было выше, чем в группе здоровых добровольцев (Рисунок 9; Таблица 8).

В группе пациентов с АГ при анализе моноклеарной фракции клеток после стимуляции ФМА и иономицином наблюдалось увеличение относительного содержания Th1-лимфоцитов, продуцирующих внутриклеточно IFN- γ ($p=0,001$) (Рисунок 9; таблица 8). При АГ количество Th17 и Th1, спонтанно внутриклеточно продуцирующих IL-17 и IFN- γ соответственно, равно как и двойных позитивных Th1/Th17 лимфоцитов, было снижено по сравнению с группой здоровых добровольцев (Рисунок 9; таблица 8).

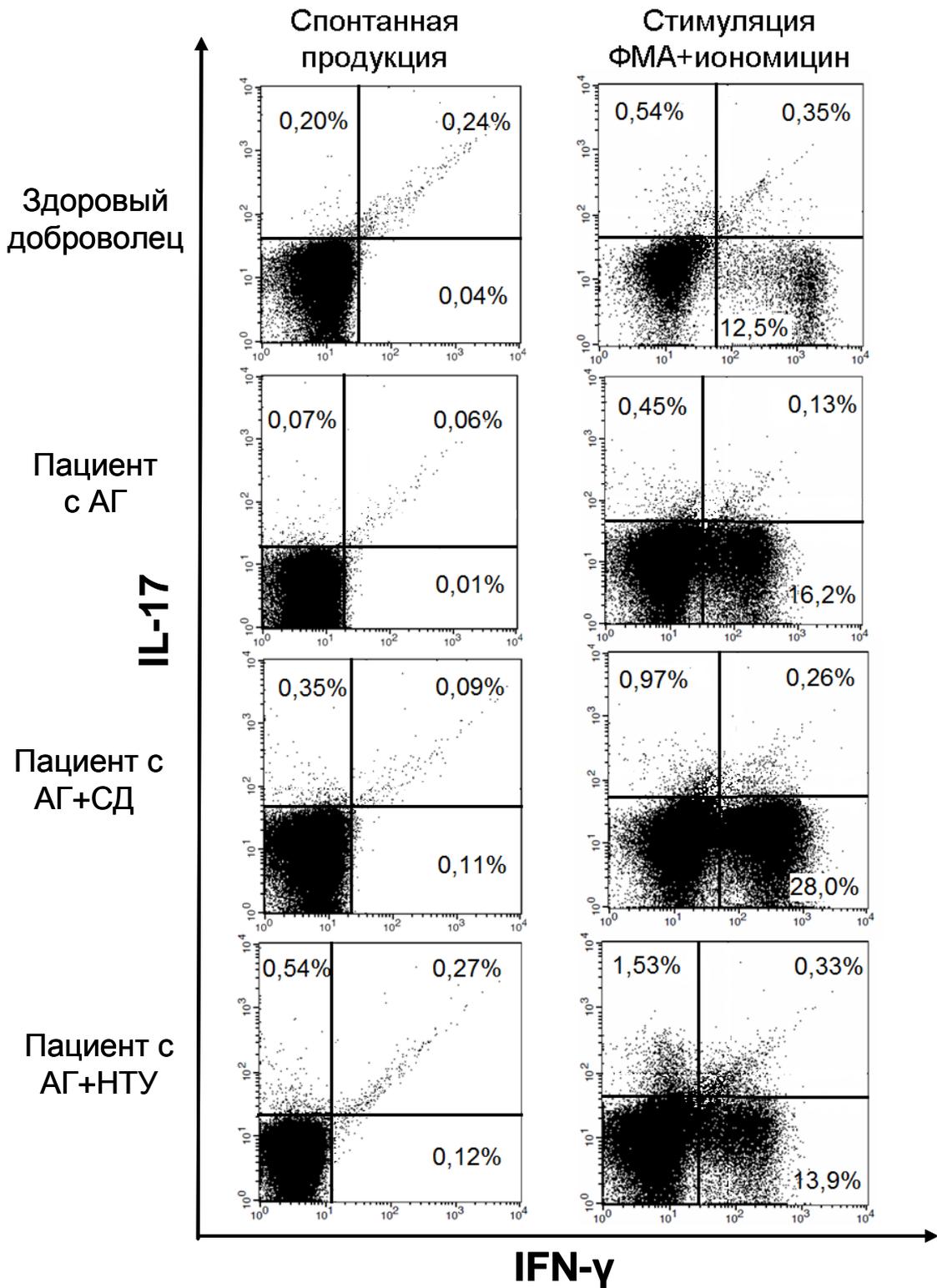


Рисунок 9. Примеры точечных диаграмм, отражающих относительное количество Th17-, Th1- и Th1/Th17-лимфоцитов. Указано процентное содержание относительно общего количества CD4+-лимфоцитов

Абсолютное и относительное содержание Th1-, Th17- и Th1/Th17-лимфоцитов, (Me (Q₁ – Q₃))

Параметр	1. Здоровые (n=24)	2. Пациенты с АГ (n=15)	3. Пациенты с АГ+СД (n=35)	4. Пациенты с АГ+НТУ (n=16)	p	
Нестимулированная культура клеток	Th17,%	0,2 (0,15 – 0,28)	0,09 (0,09 – 0,12)	0,22 (0,17 – 0,26)	0,21 (0,12 – 0,23)	p ₂₋₃ =0,004 p ₂₋₄ =0,063
	Th17, 10 ³ клеток/л	1900 (1651 - 2771)	600 (549 - 702)	1499 (968 - 2635)	711 (552 - 869)	p ₂₋₃ <0,001 p ₃₋₄ =0,001
	Th1,%	0,06 (0,04 – 0,11)	0,01 (0,01 – 0,02)	0,14 (0,09 – 0,22)	0,13 (0,04 – 0,13)	p ₂₋₃ =0,001 p ₃₋₄ =0,016 p ₂₋₄ =0,001
	Th1, 10 ³ клеток/л	4710 (3121 - 5120)	1388 (1350 - 1630)	2430 (1890 - 5240)	2197 (1570 - 2824)	p ₂₋₃ <0,001 p ₁₋₄ =0,010 p ₂₋₄ =0,013
	Th1/Th17, %	0,09 (0,06 – 0,12)	0,06 (0,05 – 0,07)	0,08 (0,06 – 0,09)	0,11 (0,06 – 0,16)	p ₂₋₃ =0,066 p ₃₋₄ =0,006 p ₂₋₄ =0,002
	Th1/Th17, 10 ³ клеток/л	330 (78 - 302)	180 (85 - 196)	189 (93 - 280)	196 (104 - 288)	
Стимуляция ФМА+иономицин	Th17,%	0,74 (0,37 – 1,05)	0,91 (0,59 – 1,28)	0,78 (0,66 – 1,05)	1,12 (0,85 – 1,50)	p ₁₋₄ =0,001
	Th17, 10 ³ клеток/л	7128 (5306 - 11990)	6643 (4543 - 7808)	10812 (10573 - 12054)	9448 (6808 - 12087)	p ₂₋₃ <0,001 p ₂₋₄ =0,013
	Th1,%	10,18 (7,01 – 12,67)	14,14 (11,83–20,52)	18,19 (11,87 – 22,19)	14,93 (12,53 – 18,79)	p ₁₋₂ =0,001 p ₁₋₃ =0,001 p ₁₋₄ =0,001
	Th1, 10 ⁶ клеток/л	1884 (967 - 2603)	1565 (1438 - 1929)	3707 (3307 - 10131)	1513 (843 - 2183)	p ₁₋₃ =0,001 p ₂₋₃ <0,001 p ₃₋₄ =0,001
	Th1/Th17, %	0,32 (0,28 – 0,35)	0,36 (0,18 – 0,45)	0,26 (0,21 – 0,37)	0,48 (0,23 – 0,73)	p ₁₋₄ =0,040 p ₂₋₄ =0,012 p ₃₋₄ =0,001
	Th1/Th17, 10 ³ клеток/л	2816 (2296 - 3395)	2700 (1098 - 3510)	3172 (2289 - 5735)	3024 (1058 - 5767)	p ₁₋₄ =0,010

Примечание: относительное содержание клеток представлено в виде процентного содержания клеток от CD4+ лимфоцитов; уровень значимости различий между содержанием цитокин-продуцирующих клеток в интактной культуре и после стимуляции ФМА с иономицином <0,05 во всех обследованных группах

По результатам определения абсолютного содержания CD3+CD4+ в циркуляции (сводные данные приведены в таблице 7) и определения относительного количества Th17, Th1 и Th1/Th17 от CD4+ лимфоцитов мы рассчитали абсолютное количество клеток, принадлежащих к различным субпопуляциям Т-хелперов, в различных клинических группах (Таблица 8).

Абсолютное количество CD4+-клеток, отличавшихся спонтанной продукцией IL-17, при СД 2-го типа было наибольшим среди всех обследованных пациентов и достоверно превышало значения аналогичного показателя при НТУ и АГ. У пациентов с АГ и НТУ число активных Th17 в отсутствии стимуляции было достоверно ниже, чем у здоровых добровольцев (Таблица 8). После стимуляции ФМА с иономицином при СД 2-го типа и НТУ достоверно большее количество клеток характеризовалось внутриклеточной продукцией IL-17, чем при АГ без нарушений углеводного обмена (Таблица 8).

Абсолютное количество Th1, продуцирующих IFN- γ в отсутствии стимуляции при СД 2-го типа и НТУ было достоверно выше, чем при АГ (Таблица 8). Стимуляция ФМА и иономицином привела к наибольшему увеличению внутриклеточной продукции IFN- γ Th1-лимфоцитами в группе пациентов с СД 2-го типа – статистически значимые различия были выявлены по сравнению со здоровыми добровольцами, пациентами с АГ и с НТУ (Таблица 8).

При расчете абсолютного количества клеток с внутриклеточной продукцией IFN- γ в группе пациентов с АГ не было выявлено увеличения показателей по отношению к группе здоровых добровольцев, и значения оказались минимальными среди всех исследуемых групп (Таблица 8).

Абсолютное содержание двойных позитивных Th1/Th17 лимфоцитов было увеличено после стимуляции ФМА с иономицином только в группе пациентов с НТУ по сравнению с группой здоровых добровольцев, аналогично относительному содержанию Th1/Th17 (Таблица 8).

Определение средней интенсивности флуоресценции (mean fluorescence intensity, MFI) позволяет оценить уровень продукции цитокинов каждой отдельной клеткой.

Мы обнаружили, что средняя интенсивность флуоресценции IL-17 в Th17 в отсутствии стимуляции была выше в группе пациентов с НТУ по сравнению со здоровыми добровольцами ($p=0,019$), пациентами с АГ ($p=0,006$) и пациентами с СД 2-го типа ($p=0,006$) (Рисунок 10-А).

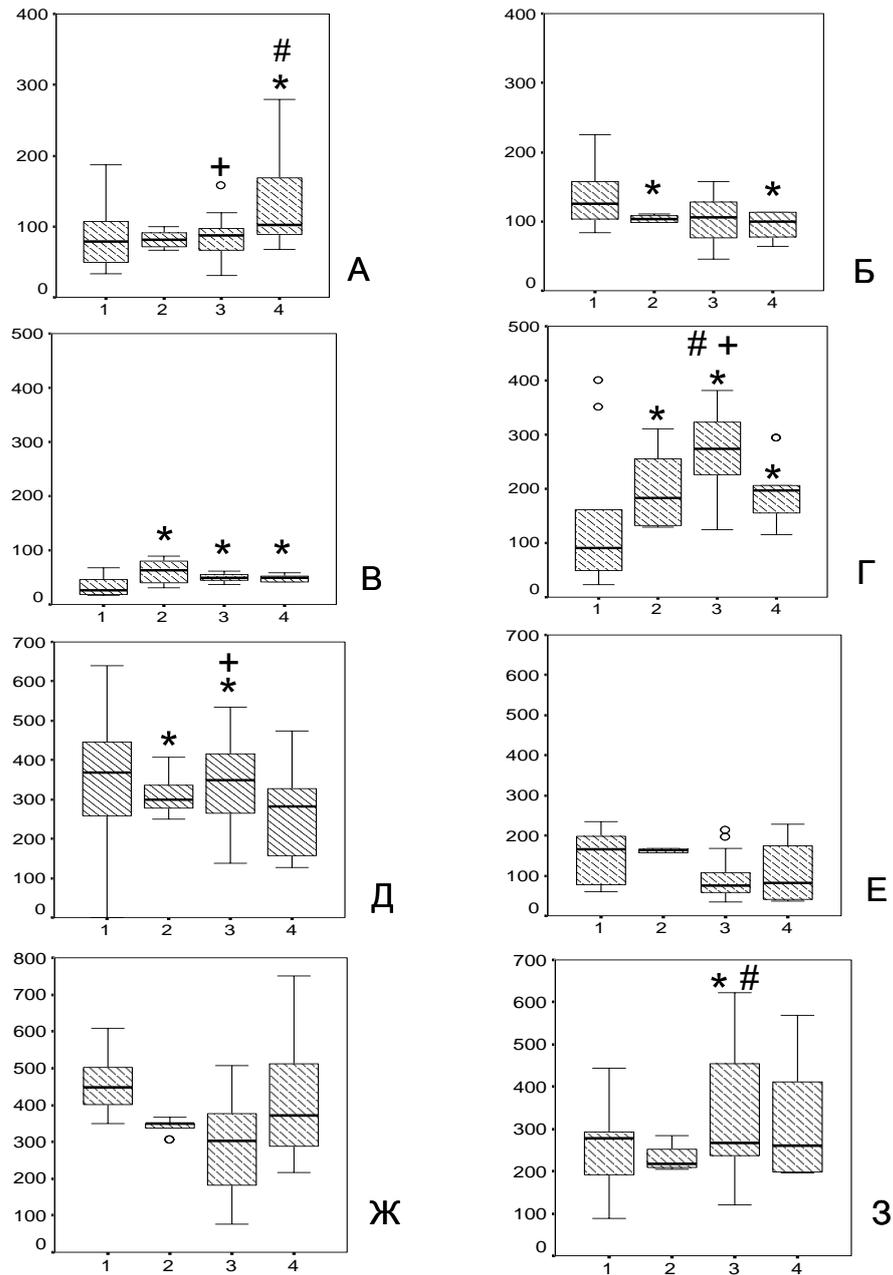


Рисунок 10. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) CD4+-лимфоцитов, внутриклеточно продуцирующих IL-17 и IFN- γ

Примечание: по оси y – средняя интенсивность флуоресценции (MFI, условные единицы); А – спонтанная продукция IL-17 Th17-лимфоцитами; Б – стимулированная ФМА и иономицином продукция IL-17 Th17-лимфоцитами; В – спонтанная продукция IFN- γ Th1-лимфоцитами; Г – стимулированная ФМА и иономицином продукция IFN- γ Th1-лимфоцитами; Д – спонтанная продукция IL-17 Th1/Th17-лимфоцитами; Е – стимулированная ФМА и иономицином продукция IL-17 Th1/Th17-лимфоцитами; Ж – спонтанная продукция IFN- γ Th1/Th17-лимфоцитами; З – стимулированная ФМА и иономицином продукция IFN- γ Th1/Th17-лимфоцитами; * - статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой здоровых добровольцев; # - статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой пациентов с АГ; + - статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой пациентов с НТУ; здесь и далее на рисунках 11, 12, 14, 15, 18, 19: 1 – здоровые добровольцы, 2 – пациенты с артериальной гипертензией, 3 – пациенты с сахарным диабетом 2-го типа, 4 – пациенты с нарушением толерантности к углеводам; ° - экстремумы

После стимуляции ФМА с иономицином MFI по IL-17 в группах пациентов с АГ и НТУ была ниже, чем в группе здоровых добровольцев ($p=0,044$ и $p=0,019$ соответственно; рисунок 10-Б). При СД 2-го типа выявлена тенденция к снижению MFI IL-17 по сравнению со здоровыми добровольцами ($p=0,060$; рисунок 10-Б).

Средняя интенсивность флуоресценции IFN- γ в Th1 во всех исследуемых группах была выше, чем у здоровых добровольцев, как при стимуляции клеток, так и при спонтанной продукции цитокинов (для спонтанной и стимулированной продукции IFN- γ соответственно: $p=0,001$ и $p=0,002$ при АГ; $p=0,004$ и $p=0,007$ при НТУ; $p=0,001$ и $p=0,001$ при СД 2-го типа; рисунок 10-В,-Г). При СД 2-го типа MFI IFN- γ после стимуляции клеток ФМА с иономицином была выше, чем при АГ без нарушений углеводного обмена ($p=0,012$) и при НТУ ($p=0,040$) (Рисунок 10-Г).

В Th1/Th17-лимфоцитах мы анализировали MFI отдельно для IL-17 и для IFN- γ . Средняя интенсивность флуоресценции IL-17 в двойных позитивных лимфоцитах в отсутствие стимуляции при АГ и СД 2-го типа была ниже, чем в группе здоровых добровольцев ($p=0,001$ и $p=0,003$, соответственно) (Рисунок 10-Д). Однако при СД 2-го типа данный показатель превышал значения, полученные в группе пациентов с НТУ ($p=0,043$). После стимуляции MFI IL-17 снижалась и не различалась между исследуемыми группами (Рисунок 10-Е).

Статистически значимых различий между группами по средней интенсивности флуоресценции IFN- γ в Th1/Th17 лимфоцитах в отсутствие стимуляции выявлено не было (Рисунок 10-Ж). После стимуляции ФМА с иономицином было выявлено, что Th1/Th17 в группе пациентов с СД 2-го типа продуцировали IFN- γ с большей интенсивностью, чем в группах здоровых добровольцев ($p=0,014$) и пациентов с АГ ($p=0,004$) (Рисунок 10-З).

Таким образом, при НТУ и СД 2-го типа мы обнаружили увеличение функциональной активности Th17 по сравнению с группой пациентов с АГ без нарушений углеводного обмена. Причем при НТУ наибольшие изменения заключались в увеличении доли Th17 в субпопуляции CD4⁺-лимфоцитов (Т-

хелперов) и возрастании интенсивности продукции IL-17 каждой отдельной клеткой. Тогда как при СД 2-го типа мы наблюдали значительное увеличение абсолютного содержания активированных Th17 в циркуляции, даже в отсутствии стимуляции цитокинопродукции. M. Jagannathan-Bogdan et al. (2011) также показали увеличение функциональной активности Th17 при СД 2-го типа по сравнению с пациентами без нарушений углеводного обмена [128].

По некоторым данным наличие Th17 в циркуляции характерно для ранних стадий заболевания и коррелирует с активностью воспалительных процессов [147]. Вероятно, на этапе НТУ, уже при начальных нарушениях обмена углеводов, запускается активация Th17. Причем Th17 у пациентов с НТУ обладали более выраженной способностью к продукции провоспалительного IL-17 – только в этой группе наблюдалось увеличение стимулированной ФМА и иономицином внутриклеточной продукции IL-17 по сравнению со здоровыми добровольцами.

Кроме того, именно у пациентов НТУ мы выявили повышение абсолютного и относительного содержания клеток, принадлежащих к субпопуляции двойных позитивных лимфоцитов Th1/Th17 по сравнению со здоровыми добровольцами (Таблица 8). Предполагается, что Th1/Th17 лимфоциты обладают большим провоспалительным потенциалом: способны к более быстрой экспансии и характеризуются более длительным временем полужизни, чем Th17 [86]. Хотя в соответствии с последними данными Th17 также характеризуются необычно продолжительным для терминально дифференцированных эффекторных Т-хелперов временем жизни, сопоставимым со стволовыми клетками. Косвенным свидетельством этого является их высокая пластичность и высокий уровень экспрессии антиапоптотических генов [288].

Мы показали, что помимо увеличения содержания Th17-лимфоцитов у пациентов с НТУ и СД 2-го типа наблюдается повышенное число IFN- γ + Т-лимфоцитов в циркуляции. Эти данные согласуются с результатами исследований других авторов, в соответствии с которыми Th1 и Th17-лимфоцитами являются синергистами по своему вкладу в развитие воспаления при СД 2-го типа [128, 308]. По результатам нашей работы не только большее число клеток вовлекается в

пул IFN- γ -продуцирующих Т-клеток при нарушениях углеводного обмена, но каждая отдельная клетка продуцирует достоверно большее количество цитокина, по крайней мере, внутриклеточно, по сравнению с индивидами без нарушений углеводного обмена.

Показано, что IFN- γ *in vitro* нарушает сигналинг инсулина в адипоцитах – эффект, который может связывать воспаление, опосредованное Т-клетками, с инсулинорезистентностью [178].

Установлено, что IL-17 также может вносить вклад в развитие инсулинорезистентности. L. A. Zuniga et al. (2010) показали, что IL-17 приводит к нарушению опосредованного инсулином транспорта глюкозы и ингибирует экспрессию генов, вовлеченных в метаболизм липидов, в адипоцитах мыши *in vitro*, а также усугубляет индуцированное диетой ожирение у животных [314]. Однако популяция Th17-лимфоцитов является минорной (в нашем исследовании относительное содержание IFN- γ -лимфоцитов превосходило относительное содержание IL-17-лимфоцитов в десятки раз). Мы полагаем, что основная роль Th17 при СД 2-го типа и НТУ все-таки относится к регулированию воспалительных процессов. В основном, это может осуществляться за счет высокой пластичности Th17. Показано, что Th17 способны приобретать фенотип Th1- и Th2-лимфоцитов и продуцировать соответствующие им цитокины под влиянием определенных стимулов; Th1 и Th2-лимфоциты таким свойством не обладают [146, 287]. Некоторыми авторами Th17-фенотип рассматривается как переходный, необходимый для инициации Т-клеточной инфильтрации тканей. При этом Т-лимфоциты сохраняют способность продуцировать IFN- γ , когда для этого создаются благоприятные условия [146, 204]. Кроме того, тесные взаимосвязи Th17 с Treg-лимфоцитами и существование двойных позитивных FoxP3+ROR γ t+ Т-клеток указывают на способность Th17 выступать в роли провоспалительных или противовоспалительных клеток в зависимости от микроокружения [54, 197, 287].

Известно, что для поддержания функциональной активности Th17 требуется их взаимодействие с IL-23. Экспрессия рецептора к этому цитокину (IL-23R)

необходима для осуществления сигналинга IL-23, который приводит к стабилизации Th17-фенотипа [49]. Мы оценили спонтанную экспрессию рецептора к IL-23 на Т-лимфоцитах и экспрессию IL-23R при активации Т-клеток ФМА и иономицином. Процент клеток, несущих на своей поверхности IL-23R, в группах пациентов с СД 2-го типа и АГ без нарушений углеводного обмена был достоверно ниже, чем в группе здоровых добровольцев ($p=0,027$; $p=0,001$ при АГ и $p=0,012$; $p=0,002$ при СД 2-го типа для спонтанной и стимулированной экспрессии, соответственно) (Рисунок 11-А,-Б). При НТУ количество клеток, экспрессирующих IL-23R спонтанно, не отличалось от аналогичного показателя группы здоровых добровольцев (Рисунок 11-А,-Б).

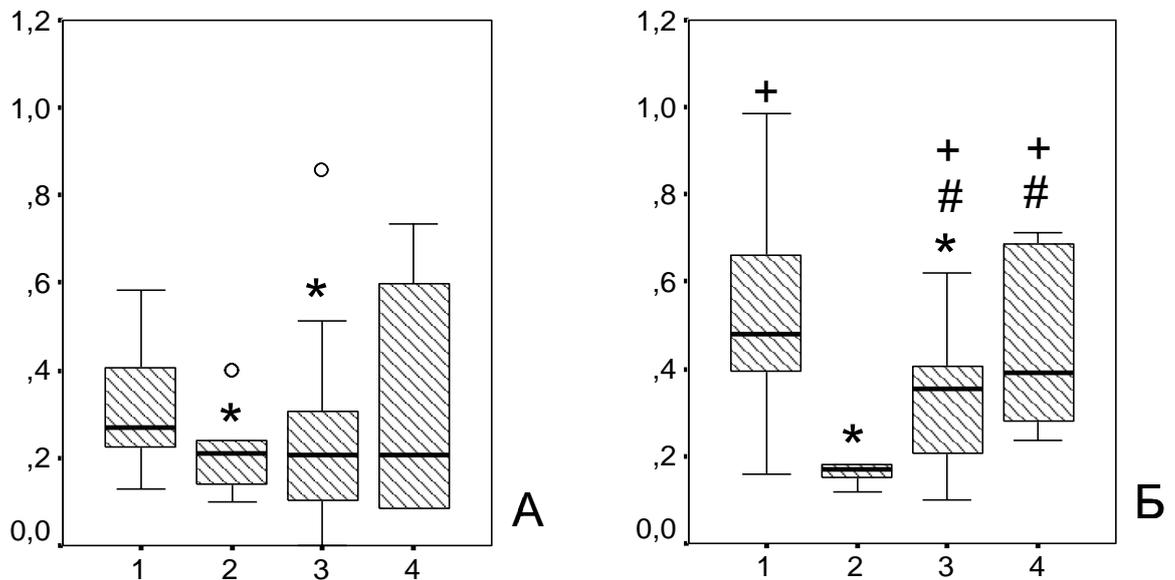


Рисунок 11. Относительное содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности рецептор к IL-23

Примечание: по оси у – процент клеток от всех CD4+-лимфоцитов, несущих на поверхности рецептор к IL-23; А – спонтанная экспрессия рецептора; Б – экспрессия рецептора после стимуляции клеток ФМА и иономицином; * - статистически значимые различия ($p<0,05$) по сравнению с группой здоровых добровольцев; # - статистически значимые различия ($p<0,05$) по сравнению с группой пациентов с АГ; + - статистически значимые различия между интактной и стимулированной культурами мононуклеаров крови

При НТУ и при СД 2-го типа после стимуляции ФМА и иономицином процент клеток, экспрессирующих IL-23R на поверхности, был выше, чем в группе пациентов с АГ ($p=0,002$ и $p=0,028$ при НТУ и СД 2-го типа,

соответственно) (Рисунок 11-Б). В группе пациентов с СД 2-го типа количество клеток, несущих IL23-R после стимуляции ФМА с иономицином, положительно коррелировало с длительностью СД ($R=0,560$, $p=0,001$).

В соответствии с полученными результатами, повышенная способность клеток экспрессировать IL-23R при нарушениях углеводного обмена может приводить к поддержанию фенотипа Th17 и функционированию данной клеточной субпопуляции в качестве провоспалительной (показано, что именно под воздействием IL-23 Th17 продуцируют провоспалительные цитокины, но не продуцируют IL-10) [80, 177].

3.4. Оценка содержания FoxP3+ T-регуляторных лимфоцитов в крови

FoxP3+ T-регуляторные лимфоциты способны ограничивать силу иммунных ответов [237]. Показано, что они связаны с субпопуляцией Th17 на филогенетическом уровне, имея общие ростовые факторы и пути внутриклеточного сигналинга [287], и, зачастую, увеличение количества Th17 в циркуляции ассоциируется со снижением содержания Treg [42]. Поэтому мы предположили, что при СД 2-го типа и НТУ на фоне избыточной активации Th17 может наблюдаться дефицит FoxP3+ Treg-лимфоцитов.

Для пациентов с СД 2-го типа и НТУ было характерно снижение процентного содержания CD4+FoxP3+ T-регуляторных лимфоцитов относительно здоровых добровольцев ($p=0,001$ и $p=0,049$, соответственно) и относительно пациентов с АГ ($p=0,001$ и $p=0,007$, соответственно) (Рисунок 12-А; Рисунок 13).

Количество клеток с высокой экспрессией молекулы CD25 (CD4+CD25^{high}) было снижено при АГ, а также при СД 2-го типа, по сравнению с группой здоровых добровольцев ($p=0,018$ и $p=0,007$ соответственно) (Рисунок 12-Б). В случае гипоэкспрессии молекулы CD25, которая представляет собой α -цепь рецептора к IL-2, иммуносупрессорные функции T-регуляторных лимфоцитов снижаются (страдает способность Treg конкурировать с провоспалительными субпопуляциями лимфоцитов за факторы роста) [205].

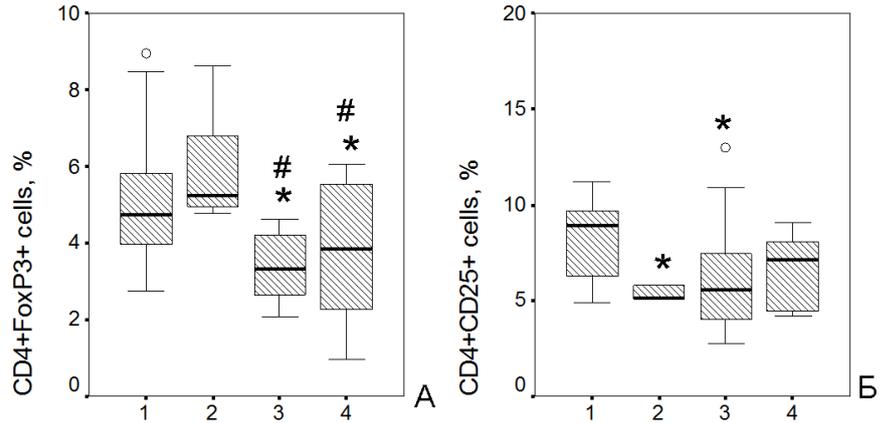


Рисунок 12. Содержание в крови клеток, экспрессирующих маркерные молекулы Т-регуляторных лимфоцитов

Примечание: по оси у – процент клеток от всех CD4+-лимфоцитов; А – содержание CD4+FoxP3+-клеток; Б – содержание CD4+CD25+-клеток; * - статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой здоровых добровольцев; # - статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой пациентов с АГ

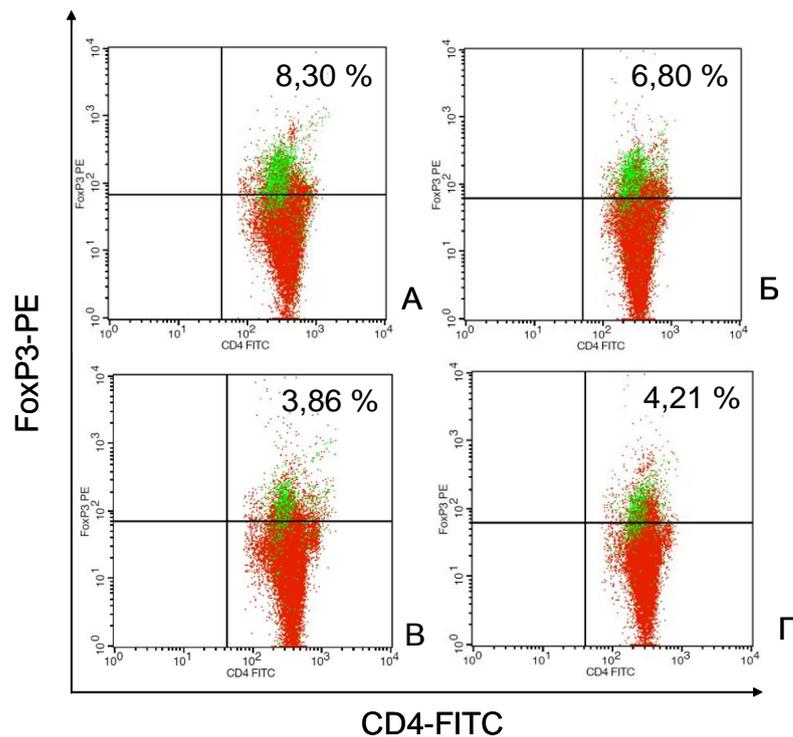


Рисунок 13. Примеры точечных диаграмм, отражающих относительное количество в крови CD4+FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов

Примечание: А – здоровый доброволец; Б – пациент с артериальной гипертензией; В – пациент с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа; Г – пациент с артериальной гипертензией, ассоциированной с нарушением толерантности к углеводам

Процентное содержание клеток, характеризующихся высокой экспрессией CD25, среди всех CD4+FoxP3+ лимфоцитов в среднем составило: в группе здоровых добровольцев 34,6%; при СД 2-го типа – 36,1%; при НТУ – 35,1%; при АГ – 29,98%. Достоверных различий по данному показателю между группами выявлено не было.

Также мы рассчитали абсолютное содержание CD4+FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов в периферической крови (Таблица 9). В связи с тем, что при СД 2-го типа общее количество Т-хелперов было повышено, мы не выявили изменения абсолютного содержания Treg в данной группе. Однако у пациентов с НТУ количество Treg было меньше, чем у здоровых добровольцев, пациентов с АГ и пациентов с СД 2-го типа (Таблица 9).

Таблица 9

Абсолютное содержание в периферической крови FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов, (Me (Q₁ – Q₃))

Показатель	Здоровые добровольцы (n=24)	Пациенты с АГ (n=15)	Пациенты с АГ+СД (n=35)	Пациенты с АГ+НТУ (n=16)
FoxP3+ Treg, 10 ⁶ клеток/л	1055 (820-1220)	647 (599-851) p1=0,002	879 (599-1098)	270 (148-392) p1<0,001 p2=0,001 p3=0,001

Примечание: p1 - уровень значимости различий по сравнению с группой здоровых добровольцев; p2 – уровень значимости различий по сравнению с группой пациентов с артериальной гипертензией; p3 – уровень значимости различий по сравнению с группой пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа

Таким образом, мы показали, что нарушения углеводного обмена сопровождаются снижением процентного содержания FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов в периферической крови, а при НТУ снижено и их абсолютное содержание. Отметим, что при СД 1-го типа, в патогенезе которого Th17 играют важную роль, частота выявления в крови Treg-клеток не изменяется, но

нарушается их способность осуществлять супрессорные функции по отношению к эффекторным лимфоцитам [60, 157, 240].

Анализируя соотношение провоспалительных и противовоспалительных субпопуляций Т-лимфоцитов, мы обнаружили, что в группе пациентов с нарушениями углеводного обмена наблюдается отклонение оси дифференцировки Т-лимфоцитов в сторону провоспалительных Th1- и Th17-лимфоцитов по сравнению с группой пациентов с АГ без нарушений углеводного обмена (Таблица 10).

Таблица 10

Соотношение процентного содержания FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов и Т-эффекторных субпопуляций (Th17 и Th1), (Me (Q₁ – Q₃))

Показатель	Здоровые добровольцы (n=24)	Пациенты с АГ (n=15)	Пациенты с АГ+СД (n=35)	Пациенты с АГ+НТУ (n=16)
Treg / Th17	21,14 (14,34 – 35,75)	58,00 (52,89 – 70,57) p1<0,001	15,09 (11,33 – 21,71) p2<0,001	15,14 (8,55 – 40,33) p2<0,001
Treg / Th1	33,06 (16,03 – 212)	494 (431,5 - 522) p1<0,001	19,58 (14,61 – 28,16) p2<0,001	18,71 (10,69 – 94,00) p2<0,001
Treg/Th17, стимуляция ФМА+ иономицин	6,09 (4,25 – 8,50)	7,47 (5,39 – 8,37)	3,68 (2,67 – 4,81) p1=0,013 p2=0,003	1,74 (1,45 – 5,74) p1=0,015 p2=0,026
Treg/Th1, стимуляция ФМА+ иономицин	0,44 (0,33 – 0,60)	0,42 (0,34 – 0,44)	0,19 (0,13 – 0,25) p1<0,001 p2<0,001	0,24 (0,11 – 0,41) p1=0,005 p2=0,019

Примечание: p1 - уровень значимости различий по сравнению с группой здоровых добровольцев; p2 – уровень значимости различий по сравнению с группой пациентов с артериальной гипертензией

При стимуляции ФМА соотношение Treg/Th17 и Treg/Th1 в группе пациентов с СД 2-го типа и НТУ было достоверно снижено не только в сравнении

с пациентами с АГ, но и с группой здоровых добровольцев (Таблица 10). Наши данные согласуются с результатами, полученными С. Zeng et al. (2012), которые показали, что соотношение $CD4+CD25^{high}Treg/Th17$ клеток и $CD4+CD25^{high}Treg/Th1$ клеток меньше у пациентов с СД 2-го типа по сравнению со здоровыми добровольцами [308].

Все пациенты на момент проведения исследования получали препараты, способные оказывать влияние на метаболические (сахароснижающая терапия, у ряда пациентов – терапия статинами) и эндокринные параметры (увеличение секреции инсулина, снижение степени инсулинорезистентности, влияние на ренин-ангиотензин-альдостероновую систему (РААС)). Ретроспективно мы оценили, какое влияние могла оказывать терапия на состояние иммунорегуляции.

Оказалось, что пациенты, получающие в качестве гипотензивной терапии ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ), характеризовались более высоким содержанием $FoxP3+$ Т-регуляторных лимфоцитов в циркуляции (Таблица 11).

Таблица 11

Количество $FoxP3+$ Т-регуляторных лимфоцитов в группе пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, в зависимости от приема ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ)

Количество $FoxP3+$ Treg-лимфоцитов, %	Пациенты с АГ+СД, не принимающие иАПФ (n=14)	Пациенты с АГ+СД, принимающие иАПФ (n=21)	p
	2,93 (2,51 – 3,33)	3,72 (3,26 – 4,26)	0,038

Примечание: указано процентное содержание от общего количества $CD4+$ Т-лимфоцитов

На мышинной модели множественного склероза (экспериментальный аллергический энцефаломиелит) было показано, что назначение иАПФ приводило к значительному увеличению числа Treg-лимфоцитов, обладающих высоким супрессорным потенциалом по отношению к провоспалительным субпопуляциям

T-лимфоцитов и вызывающих обратное развитие заболевания [217]. Имеются и другие данные, свидетельствующие о взаимосвязи РААС и функциональной активности Treg. Так, внутривенное введение мышам T-регуляторных лимфоцитов на фоне постоянной инфузии ангиотензина II приводило к снижению артериального давления и уменьшению рекрутирования T-лимфоцитов и макрофагов в стенку аорты [46].

Результаты, полученные в нашем исследовании, свидетельствуют о перспективах регуляции дисбаланса функциональной активности субпопуляций T-лимфоцитов у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа с помощью воздействий, направленных на модуляцию состояния РААС системы.

Обобщая результаты данного раздела, можно заключить, что при СД 2-го типа и НТУ снижается количество FoxP3+ T-регуляторных лимфоцитов, что, наряду с повышенной функциональной активностью субпопуляций провоспалительных T-лимфоцитов, может способствовать формированию субклинического воспаления у пациентов.

3.5. Оценка секреции цитокинов

3.5.1. Оценка содержания цитокинов в сыворотке крови

Определение содержания цитокинов в сыворотке крови позволяет оценить выраженность системного воспаления и определить вовлеченность в него ключевых звеньев иммунного ответа [2].

Содержание цитокинов IL-4 ($p < 0,001$), IL-6 ($p < 0,001$), IL-10 ($p = 0,014$), TNF- α ($p = 0,001$), IFN- γ ($p = 0,037$) и IL-17A ($p < 0,001$) в сыворотке крови было повышено в группе пациентов с СД 2-го типа по сравнению со здоровыми добровольцами (Рисунок 14Б – Ж). При СД 2-го типа выявлена тенденция к увеличению содержания IL-10 ($p = 0,059$, рисунок 14Г) и IL-17A ($p = 0,052$, рисунок 14Ж) по сравнению с группой пациентов с НТУ.

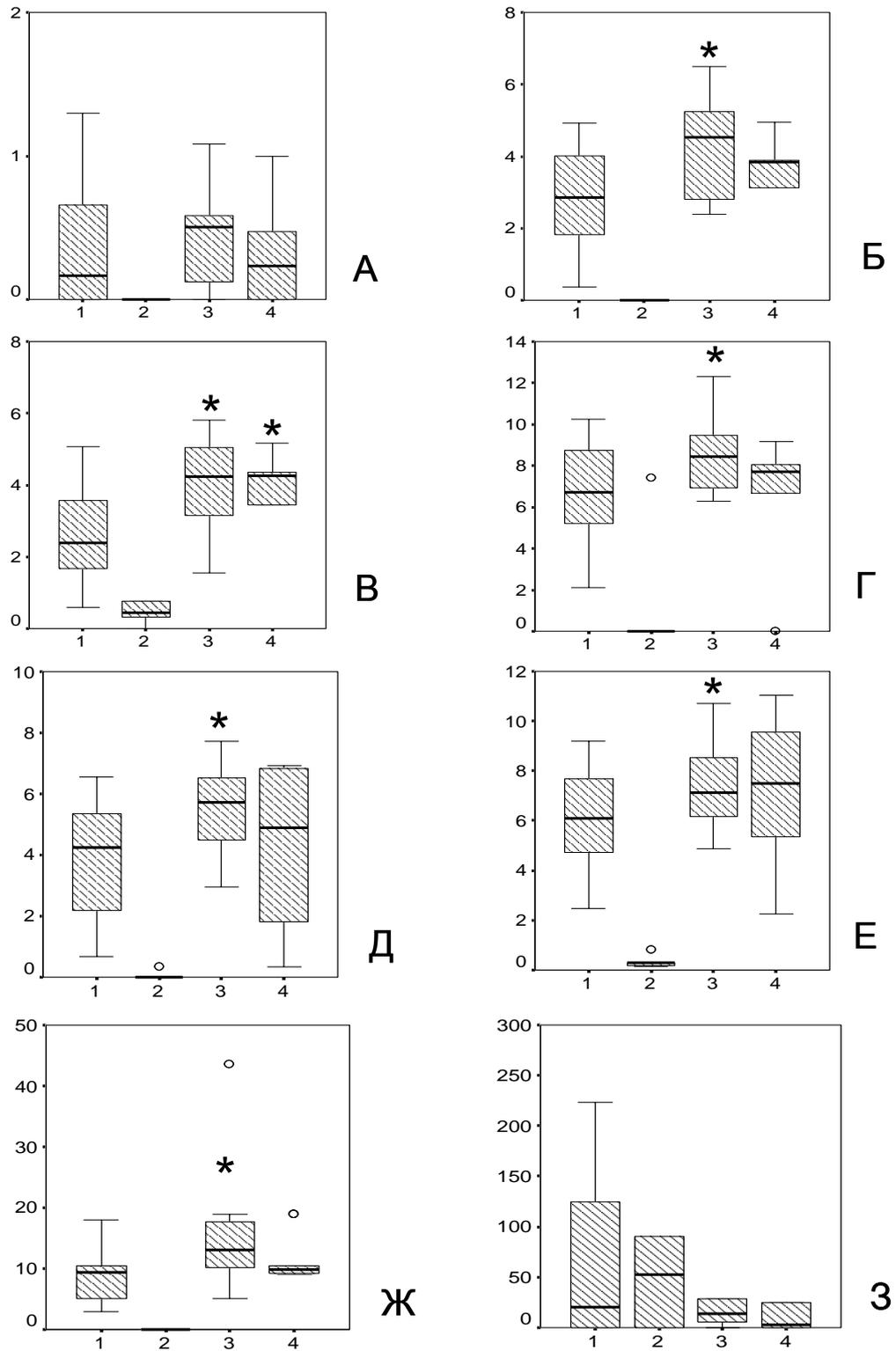


Рисунок 14. Концентрация цитокинов в сыворотке периферической крови

Примечание: концентрация цитокинов представлена в пг/мл; * - статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой здоровых добровольцев

Корреляционный анализ показал наличие тесных и средней силы взаимосвязей в группе пациентов с СД 2-го типа между содержанием глюкозы

натошак и уровнем IL-17A ($R=0,800$; $p=0,005$), IL-6 ($R=0,800$; $p=0,005$), IL-4 ($R=0,700$; $p=0,024$) и IL-10 ($R=0,800$; $p=0,005$). Уровень гликозилированного гемоглобина коррелировал с концентрацией TNF- α ($R=0,457$; $p=0,019$) и IL-10 ($R=0,645$; $p<0,001$).

При НТУ выявлено увеличение концентрации IL-6 по сравнению с группой здоровых добровольцев ($p=0,002$; рисунок 14В), и обнаружена положительная корреляционная связь средней силы между содержанием IL-17A и концентрацией СРБ ($R=0,674$; $p=0,001$).

У пациентов с АГ содержание всех цитокинов, за исключением IL-1 β , лежало в пределах чувствительности метода (рис. 14 А – Ж).

Наибольший интерес для нашего исследования представлял IL-17A, основными продуцентами которого являются Th17 [135]. Однако, как правило, при анализе патогенеза заболеваний отмечают изменения со стороны комплекса цитокинов [258]. Наряду с IL-17A при СД 2-го типа мы наблюдали увеличение содержания и других цитокинов в сыворотке крови, обладающих как противовоспалительными, так и провоспалительными эффектами.

Увеличение содержания IL-6 может индуцировать увеличение продукции IL-17 и, одновременно, являться следствием влияния данного цитокина [287]. Показано, что глюкоза и конечные продукты гликозилирования способствуют продукции IL-6 клетками периферической крови [215]. В то же время, IL-6 ингибирует инсулинзависимый синтез гликогена в гепатоцитах и снижает экспрессию мессенджеров, вовлеченных в сигналинг инсулина [210]. Кроме того, увеличение концентрации IL-6 в системном кровотоке может быть обусловлено повышенным индексом массы тела, выявленным нами у всех обследованных пациентов с НТУ и СД 2-го типа. Известно, что около 25% циркулирующего в крови IL-6 синтезируется подкожной жировой клетчаткой [219].

Есть мнение, что IL-6, отличающийся повышенной концентрацией при СД 2-го типа, оказывает скорее позитивный эффект на патогенез заболевания. Так, было выявлено, что лечение пациентов с ревматоидным артритом моноклональными антителами к IL-6 приводит к развитию метаболических

нарушений и развитию инсулинорезистентности [70, 194]. Однако можно предположить, что именно хроническое воспаление, ассоциированное с длительным увеличением содержания IL-6 в сыворотке крови, приводит к реализации негативных эффектов данного цитокина в отношении чувствительности к инсулину и поддержания гомеостаза глюкозы [210].

Повышенное содержание TNF- α может также являться как дополнительным индуктором дифференцировки Th17, так и результатом стимуляции моноцитов и нейтрофилов под влиянием IL-17. Кроме того, показано, что Th17 также способны продуцировать TNF- α [275, 294]. TNF- α оказывает синергичное влияние с IL-17 на состояние эндотелия. Комбинированное воздействие TNF- α и IL-17 приводит к увеличению экспрессии P-селектина и E-селектина клетками эндотелия *in vitro* и стимулирует трансмиграцию нейтрофилов через стенку сосудов *in vivo* [113].

Считается, что IL-17 является антагонистическим цитокином по отношению к IFN- γ , IL-4 и IL-10 [39, 119, 159, 286]. В нашей работе мы наблюдали одновременное увеличение содержания IL-17, IFN- γ , IL-4 и IL-10 в сыворотке крови пациентов с СД 2-го типа. В последнее время появляется все больше данных в пользу того, что взаимосвязи между продукцией данных цитокинов являются более сложными, чем предполагалось изначально.

Так, Th17-лимфоциты экспрессируют рецептор к IL-10 и даже могут переключаться на продукцию IL-10 под влиянием FoxP3⁺ T-лимфоцитов или при рестимуляции определенными антигенами [124, 161, 313]. E. S. Vanden et al. установили, что рекомбинантный IL-23 стимулировал секрецию как IL-17, так и IL-10 наивными CD4⁺-лимфоцитами [274]. Введение NOD-мышам (линия мышей с диабетом без ожирения, non-obese diabetic mice) полного адьюванта Фрейнда (CFA) приводило к одновременному увеличению экспрессии генов IL-17, IL-10 и IFN- γ в клетках поджелудочной железы и предотвращению развития у мышей сахарного диабета 1-го типа [193]. То есть, увеличение содержания противовоспалительного IL-10 не препятствовало манифестации острой воспалительной реакции у животных.

Продукция IFN- γ также тесно взаимосвязана с продукцией IL-17. Причем, в свете результатов последних исследований данные цитокины являются не антагонистами, а комплементарно дополняют друг друга, изменяя экспрессию транскрипционных факторов, вовлеченных в реализацию иммунного ответа [93].

Также в нашем исследовании мы выявили одновременное увеличение содержания в сыворотке IL-4 и IL-17. Некоторыми авторами было показано, что супрессорное воздействие IL-4 на Th17 нарушается при ряде аутоиммунных заболеваний [147], и IL-17 может потенцировать эффекты IL-4 *in vitro* [37, 38, 299].

3.5.2. Оценка содержания цитокинов в супернатантах суточных культур клеток крови

Содержание цитокинов в сыворотке крови отражает текущее состояние иммунной системы. Для оценки функционального резерва иммуноцитов было проведено определение уровней спонтанной и митоген-активированной секреции цитокинов мононуклеарами периферической крови *in vitro*.

У пациентов с СД 2-го типа наблюдалось увеличение спонтанной секреции TNF- α ($p=0,013$), IL-6 ($p=0,035$) и IL-17 ($p=0,001$) по сравнению со здоровыми добровольцами (Таблица 12). Спонтанная секреция IL-17 также была выше у пациентов с артериальной гипертензией ($p=0,007$) относительно группы здоровых добровольцев (Таблица 12). В группе пациентов с НТУ обнаружено увеличение спонтанной секреции IL-1 β по сравнению с пациентами с АГ ($p=0,013$) (Таблица 12).

Было выявлено увеличение стимулированной секреции TNF- α при СД 2-го типа ($p=0,002$) и при артериальной гипертензии ($p<0,001$) по сравнению с группой здоровых добровольцев. Стимулированная секреция IL-10 при СД 2-го типа была снижена относительно группы здоровых добровольцев ($p=0,009$) (Таблица 12).

Содержание цитокинов в супернатантах интактных и митоген-активированных культур клеток крови обследованных пациентов и здоровых добровольцев, (Me (Q₁ – Q₃))

Показатели	Здоровые добровольцы (n=24)	Пациенты с АГ (n=15)	Пациенты с АГ+СД (n=35)	Пациенты с АГ+НТУ (n=16)	
Спонтанная секреция, пг/мл на 10 ⁶ лейкоцитов	IL-2	0	0	0	
	IL-4	0,00 (0,00-0,10)	0	0,10 (0,00-0,60)	
	IL-6	26,47 (4,49-43,39)	26,25 (13,00-71,18)	32,70 (11,38-152,30) p1=0,035	28,69 (23,31-34,08)
	IL-10	0 (0-0,10)	0 (0-0,10)	0 (0-0,20)	0 (0-0,10)
	IL-17	45,29 (8,64-82,69)	87,93 (64,85-105,93) p1=0,007	100,83 (82,60-140,25) p1=0,001	76,28 (60,13-92,43)
	TNF-α	1,76 (0,59-3,37)	2,43 (1,49-7,35)	2,88 (0,22-8,08) p1=0,013	2,73 (1,72-3,74)
	IFN-γ	0	0,00 (0,00-0,60)	0	0
	IL-1β	120,90 (57,42-253,70)	70,55 (62,43-87,39)	55,37 (41,06-364,70)	464,45 (221,80-707,10) p2=0,013
Митоген-активированная секреция, пг/мл на 10 ⁶ лейкоцитов	IL-2	74,71 (51,55-120,60)	139,10 (50,99-157,59)	52,35 (30,46-144,17)	111,84 (17,70-205,98)
	IL-4	9,55 (5,53-15,66)	12,23 (5,06-15,54)	3,73 (0,75-17,26)	18,19 (0,42-35,96)
	IL-6	10262,91 (8134,12-14496,67)	9159,95 (8891,16-9231,86)	9812,26 (7325,82-16222,62)	10739,55 (8170,49-13308,61)
	IL-10	402,81 (205,12-577,52)	252,42 (186,53-308,71)	295,27 (169,84-365,81) p1=0,009	356,94 (209,12-504,77)
	IL-17	187,93 (117,30-338,38)	168,95 (167,96-225,60)	270,32 (113,68-496,45)	135,61 (43,64-227,58)
	TNF-α	838,99 (744,03-983,87)	1385,41 (1368,36-1510,08) p1<0,001	1394,51 (788,45-2087,37) p1=0,002	1319,13 (713,87-1924,39)
	IFN-γ	709,46 (497,61-902,82)	950,23 (644,44-1593,03)	984,39 (261,40-1417,57)	1041,99 (150,77-1933,21)
	IL-1β	2090,25 (1498,00-2707,00)	2255,25 (2028,50-3015,50)	2493,00 (1438,50-2684,50)	2526,00 (1500,50-3551,50)

Примечание: содержание цитокинов указано в пересчете на 10⁶ лейкоцитов; p1 – уровень значимости различий по сравнению с группой здоровых добровольцев; p2 – уровень значимости различий по сравнению с группой пациентов с артериальной гипертензией; уровни значимости различий между содержанием цитокинов в супернатантах интактной и митоген-активированной культур клеток крови <0,05 во всех группах пациентов

Следует отметить, что в группе пациентов с НТУ мы наблюдали наиболее значительное увеличение содержания Th17 и Th1/Th17-лимфоцитов, при активации которых у человека ИЛ-1 β является одним из ключевых цитокинов [30, 39, 52, 294]. Имеются сведения, что повышенное системное содержание ИЛ-1 β приводит к активации продукции ИЛ-17 на ранних этапах развития СД 1-го типа. Причем, на более поздних стадиях ИЛ-1 β в циркуляции может не определяться, но активация Th17 продолжает поддерживаться [52]. В нашем исследовании у пациентов с СД 2-го типа мы также не выявили увеличения содержания и секреции ИЛ-1 β при повышенной внутриклеточной продукции и секреции ИЛ-17. Вероятно, при СД 2-го типа ИЛ-1 β необходим для инициации отклонения дифференцировки Т-лимфоцитов в сторону провоспалительной субпопуляции Th17, а затем их активация поддерживается за счет других факторов.

Длительность СД 2-го типа положительно коррелировала с уровнем стимулированной секреции ИЛ-17 ($R=0,774$; $p=0,003$). У всех пациентов, включенных в исследование, продолжительность СД 2-го типа была ниже, чем стаж АГ ($p=0,001$). Не исключено, что повышенная секреция ИЛ-17 связана именно с прогрессированием метаболических нарушений у пациентов.

Таким образом, исследование *in vitro* также свидетельствовало о дисбалансе продукции цитокинов при СД 2-го типа, характерном для увеличения функциональной активности Th17 (повышенная секреция ИЛ-17, ИЛ-6 и TNF- α) и снижения эффективности регуляторных механизмов, призванных контролировать силу иммунного ответа (сниженная митоген-активированная секреция ИЛ-10). Изменения секреции цитокинов при НТУ были менее выраженными, однако увеличение спонтанной секреции ИЛ-1 β также свидетельствовало о наличии субклинического воспаления у данной группы пациентов. Следует отметить, что именно спонтанная секреция цитокинов отражает функциональное состояние клеток в момент обследования.

Неожиданным оказалось увеличение спонтанной секреции ИЛ-17 в группе пациентов с АГ, так как в данной клинической группе исследуемые нами цитокины в сыворотке не определялись или определялись в следовых количествах

(Рисунок 14), а содержание Th17-лимфоцитов было незначительным (Таблица 8). Имеются данные, что IL-17 вовлечен в патогенез АГ. М. S. Madhur et al. (2010) показали, что содержание IL-17 в сыворотке крови пациентов с СД 2-го и АГ выше, чем у пациентов с СД 2-го типа и нормальным артериальным давлением. Однако число пациентов с СД 2-го типа без АГ, включенных в исследование, было в несколько раз меньше, чем пациентов, у которых АГ ассоциировалась с СД 2-го типа, поэтому не исключено, что важную роль в увеличении продукции IL-17 все-таки сыграло нарушение углеводного обмена [170]. Мы полагаем также, что секретировать IL-17 при АГ и СД 2-го типа могут разные клеточные субпопуляции. Так, для пациентов с АГ было характерно увеличение содержания НК-клеток в циркуляции, которые способны продуцировать IL-17 (Таблица 4) [75].

Таким образом, результаты определения содержания субпопуляций CD4+ Т-лимфоцитов, экспрессии цитокиновых рецепторов, концентрации цитокинов в сыворотке и секреторной активности клеток периферической крови показали, что характер иммунорегуляторного дисбаланса различается у пациентов с АГ без нарушений углеводного обмена и пациентов с АГ, ассоциированной с НТУ и СД 2-го типа. Изменение функционирования Th17- и FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов было выявлено исключительно в группах пациентов с сочетанием АГ и нарушений углеводного обмена.

3.6. Оценка содержания аутоантител различной специфичности в сыворотке крови

Отмена аутоотолерантности, вызванная нарушением созревания или изменением функций Т-регуляторных лимфоцитов, на фоне усиления провоспалительных иммунных реакций может привести к продукции аутоантител различной специфичности. Обнаружение аутоантител в периферической крови и их количественный анализ имеет значительную прогностическую ценность и отражает выраженность аутодеструктивных процессов при хроническом

воспалении. Мы оценили содержание антител к клеткам (антитела к ткани сердца), антител к компонентам клеток (антимитохондриальные антитела M2 подтипа и антитела к экстрагируемым ядерным антигенам) и антител к белкам (ревматоидный фактор) в сыворотке крови пациентов и здоровых доноров (Рисунок 15).

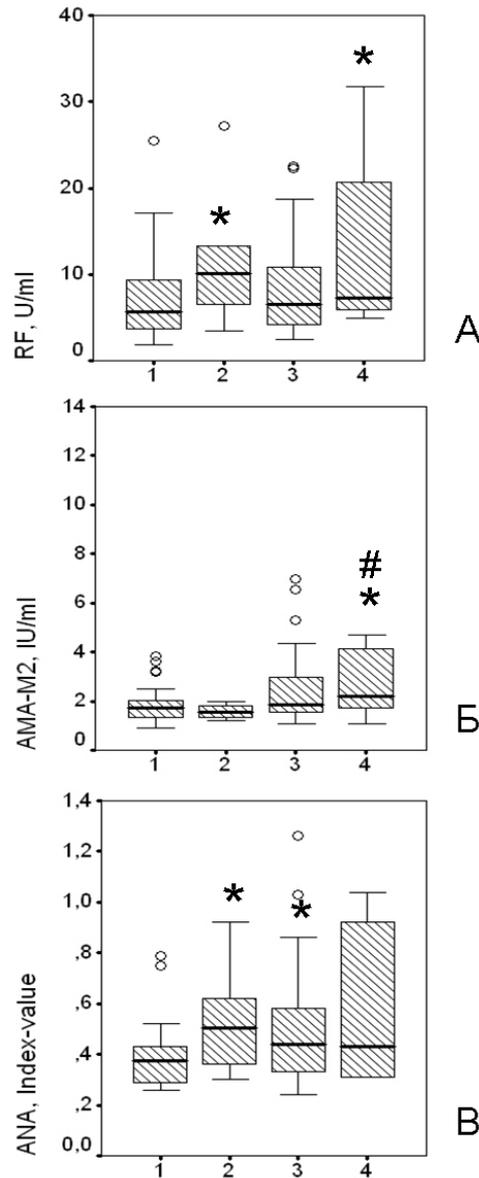


Рисунок 15. Содержание аутоантител различной специфичности в сыворотке крови

Примечание: А – содержание ревматоидного фактора; Б – содержание антимитохондриальных аутоантител; В – содержание антител к экстрагируемым ядерным антигенам; * - статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой здоровых добровольцев; # - статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой пациентов с артериальной гипертензией

Концентрация ревматоидного фактора была достоверно выше при АГ и НТУ, чем в группе здоровых добровольцев ($p=0,047$ и $p=0,032$, соответственно) (Рисунок 15-А). В исследовании М. М. Newkirk et al. (2003) было показано, что концентрация ревматоидного фактора (РФ) прямо коррелирует с уровнем конечных продуктов гликозилирования иммуноглобулинов в сыворотке крови [192].

Содержание антимитохондриальных антител при НТУ было повышено относительно группы здоровых добровольцев ($p=0,038$) и относительно пациентов с изолированной АГ ($p=0,012$). Выявлена тенденция к увеличению уровня антимитохондриальных антител при СД 2-го типа по сравнению с группой пациентов с АГ без СД ($p=0,061$) (Рисунок 15-Б). Известно, что антимитохондриальные антитела подтипа М2 (АМА-М2) являются прогностическим маркером развития первичного билиарного цирроза печени [100]. Следствием цирроза печени у 80% пациентов является инсулинорезистентность и гепатогенный сахарный диабет. В свою очередь, у 80% пациентов с СД 2-го типа развивается неалкогольная жировая дистрофия печени [186]. У пациентов, включенных в исследование, заболевания печени не были диагностированы. Дальнейшие проспективные исследования требуются для выяснения возможности использования определения содержания АМА-М2 как прогностического маркера риска развития осложнений со стороны печени при нарушениях углеводного обмена.

При АГ и СД 2-го типа мы выявили увеличение относительного содержания антител к экстрагируемым ядерным антигенам по сравнению с группой здоровых добровольцев ($p=0,049$ и $p=0,033$, соответственно) (Рисунок 15-В). При НТУ выявлена тенденция к увеличению уровня антител к ядерным антигенам по сравнению со здоровыми добровольцами ($p=0,078$) (Рисунок 15-В).

Анализ содержания аутоантител к миокарду показал увеличение частоты встречаемости высоких титров антител к фибриллярным структурам ткани сердца при СД 2-го типа по сравнению с группами пациентов с НТУ ($p=0,010$) и изолированной АГ ($p=0,004$) (Рисунок 16-А). Также выявлена тенденция к

увеличению частоты выявления высоких титров антител (1:40 и выше) к фибриллярным и сарколеммным структурам ткани сердца при СД 2-го типа по сравнению с группой здоровых добровольцев ($p=0,073$ и $p=0,056$, соответственно) (Рисунок 16-А, Б). Интенсивная продукция аутоантител к ткани сердца при СД 2-го типа может рассматриваться как фактор риска развития сердечно-сосудистых заболеваний в этой клинической группе [6].

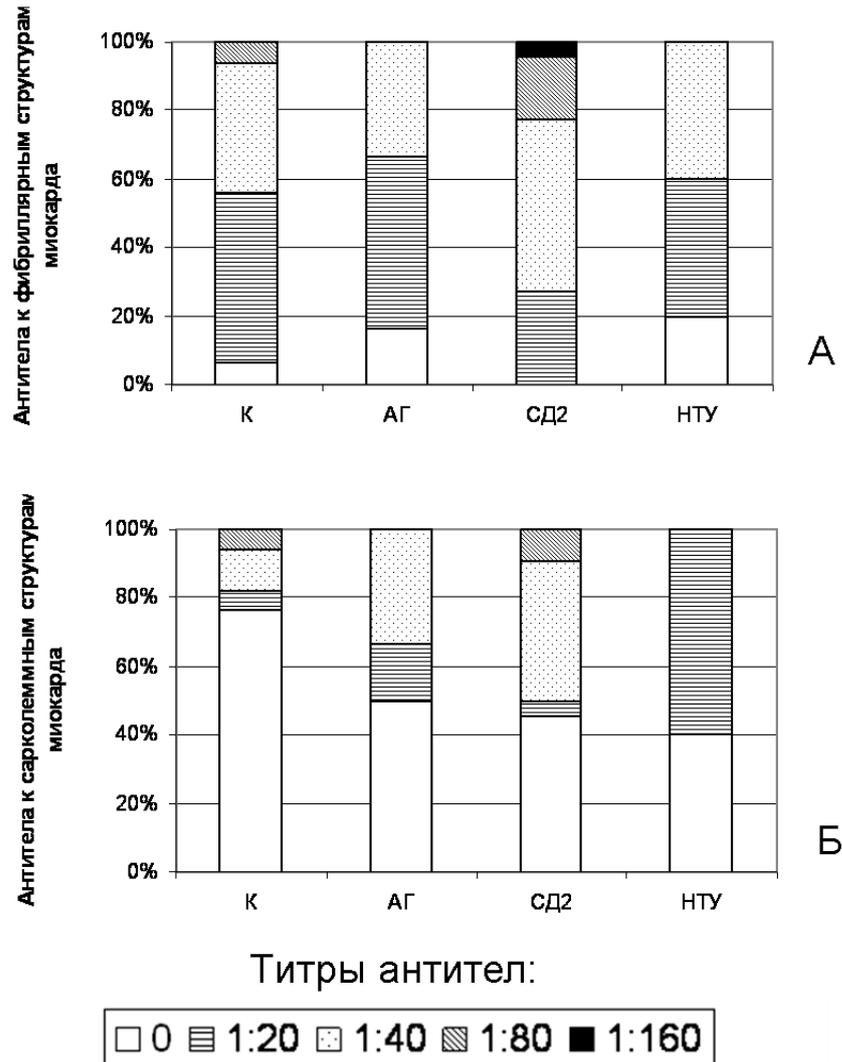


Рисунок 16. Распределение пациентов различных клинических групп с учетом титров аутоантител к ткани сердца

Примечание: А – антитела к фибриллярным структурам ткани сердца; Б – антитела к сарколеммным структурам ткани сердца. По оси у указан процент пациентов, имеющих определенный титр антител. К – здоровые добровольцы; АГ – пациенты с артериальной гипертензией; СД2 – пациенты с артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2-го типа; НТУ – пациенты с артериальной гипертензией и нарушением толерантности к углеводам

Корреляционный анализ показал наличие сильной корреляционной связи между количеством CD4+FoxP3+ лимфоцитов и содержанием антимиохондриальных антител при СД 2-го типа ($R=0,975$; $p=0,049$) и между содержанием В-лимфоцитов и титром антител к фибриллярным структурам миокарда ($R=0,775$; $p=0,024$); при СД 2-го типа содержание антимиохондриальных антител отрицательно коррелировало с концентрацией антиатерогенных ХС-ЛПВП ($R=-0,353$; $p=0,047$), а также с длительностью АГ и СД ($R=-0,405$; $p=0,010$ и $R=-0,529$; $p<0,001$, соответственно). У пациентов с длительностью АГ < 10 лет содержание АМА-M2 было достоверно выше, чем у пациентов с АГ продолжительностью более 10 лет ($p=0,014$). Снижение титра аутоантител различной специфичности по мере прогрессирования заболевания характерно для СД 1-го типа и дилатационной кардиомиопатии [62]. В соответствии с нашими результатами содержание антимиохондриальных антител при сочетании АГ и нарушений углеводного обмена также снижается с увеличением длительности протекания заболевания. Поэтому наибольшее прогностическое значение они могут иметь на ранних стадиях болезни.

При НТУ выявлены многочисленные тесные и средней силы корреляционные связи между метаболическими параметрами и содержанием аутоантител в сыворотке крови. Так, концентрация РФ прямо коррелировала с содержанием инсулина ($R=0,643$; $p=0,013$), С-пептида ($R=0,786$; $p=0,001$), ТАГ ($R=0,600$; $p=0,039$), и обратно – с уровнем ХС-ЛПВП ($R=-0,600$; $p=0,039$). Уровень антител к ядерным антигенам напрямую коррелировал с концентрацией ТАГ ($R=0,700$; $p=0,024$), С-пептида ($R=0,571$; $p=0,033$), гликозилированного гемоглобина ($R=0,800$; $p=0,017$). Корреляционные взаимосвязи выявлены между содержанием антимиохондриальных антител и инсулина ($R=0,643$; $p=0,013$), а также С-пептида ($R=0,964$; $p=0,001$).

Анализируя исследованные показатели в группе пациентов с АГ, мы обнаружили сильную отрицательную корреляционную связь между содержанием антител к ядерным антигенам и количеством CD4+FoxP3+ лимфоцитов ($R=-0,900$; $p=0,001$). Несмотря на то, что содержание Т-регуляторных лимфоцитов в данной

группе пациентов не отличалось от группы здоровых добровольцев, данные корреляционного анализа свидетельствуют о взаимосвязи между снижением иммуносупрессии и повышением аутореактивности у пациентов с АГ без нарушений углеводного обмена.

В соответствии с нашими результатами, продукция аутоантител широкого спектра специфичностей ассоциируется с нарушениями углеводного и липидного обмена. Было показано, что дислипидемия существенно влияет на функционирование различных клеточных субпопуляций, в том числе, ингибирует Th1-путь, и активирует Th2-путь иммунного ответа [246].

Мы полагаем, что снижение контроля со стороны Treg на фоне развития нарушений обмена глюкозы (НТУ и СД 2-го типа), является важным фактором, способствующим отмене аутоотолерантности.

Одним из факторов, который также может влиять на увеличение продукции аутоантител при СД 2-го типа и НТУ, является лептин, представляющий собой гормон, продуцируемый, главным образом, жировой тканью [45]. Имеются данные о том, что для пациентов с нарушениями углеводного обмена, сопровождающимися инсулинорезистентностью и избыточной массой тела, характерно увеличение содержания лептина в сыворотке крови [45, 95, 285]. Показано, что лептин способен увеличивать продукцию аутоантител класса G *in vitro* [225]. В-лимфоциты экспрессируют большое количество рецепторов к лептину, и воздействие данного адипокина реализуется посредством подавления Fas-индуцированного апоптоза В-лимфоцитов [206]. В то же время, лептин негативно влияет на пролиферативную активность FoxP3+ T-регуляторных лимфоцитов [79]. Можно предположить, что лептин способствует продукции аутоантител напрямую и опосредованно, путем снижения контроля антителопродукции со стороны Treg-лимфоцитов. Вероятный механизм увеличения содержания аутоантител широкого спектра специфичностей при нарушениях углеводного обмена можно отразить с помощью гипотетической схемы на рисунке 17. Данная концепция требует дальнейшего изучения.

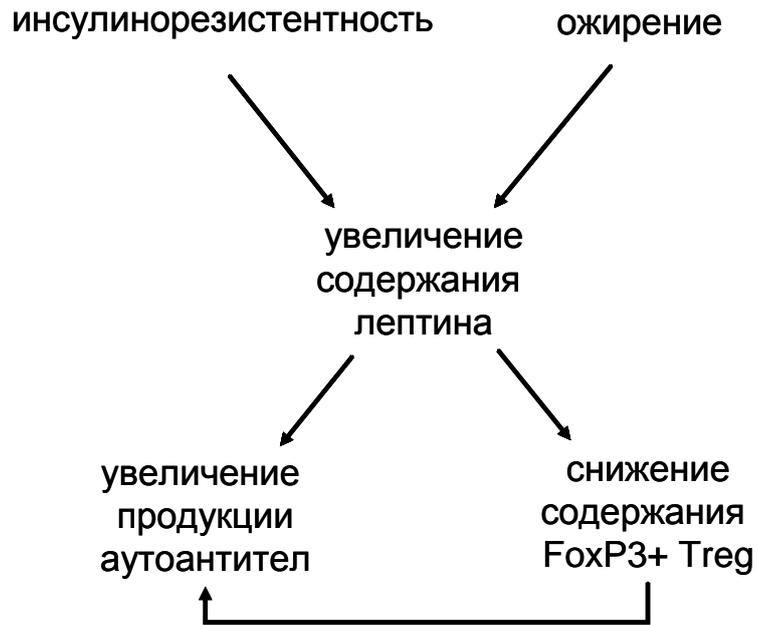


Рисунок 17. Возможный механизм увеличения продукции аутоантител при артериальной гипертензии, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа (по результатам собственных исследований и данным S. Fischer et al. (2002), M. Wauters et al. (2003), E. Papathanassoglou et al. (2006), H. Ren et al. (2006), V. De Rosa et al. (2007), P. Bandaru et al. (2011))

Таким образом, СД 2-го типа и НТУ сопровождаются активацией продукции аутоантител различных специфичностей, что может быть связано с нарушением механизмов функционирования иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов, и вносит существенный вклад в развитие и поддержание субклинического воспаления.

3.7. Оценка состояния сывороточной системы матриксных металлопротеиназ при артериальной гипертензии, ассоциированной с нарушениями углеводного обмена

Ремоделирование соединительной ткани является важным процессом, сопровождающим как микрососудистые, так и макрососудистые осложнения СД 2-го типа [94]. Кроме того, перестройка внеклеточного матрикса является

неотъемлемым этапом при дифференцировке адипоцитов в процессе развития ожирения, основного фактора риска развития СД 2-го типа [179]. И в том, и в другом случае деградация внеклеточных белков опосредуется семейством ферментов матриксных металлопротеиназ (ММР) и их ингибиторов, активность которых также контролируется регуляторными субпопуляциями Т-лимфоцитов [44, 94, 179, 207].

При СД 2-го типа нами обнаружено повышение концентрации TIMP-1 по сравнению с группой здоровых добровольцев ($p < 0,001$) и пациентами с АГ ($p = 0,029$) (Рисунок 18-А).

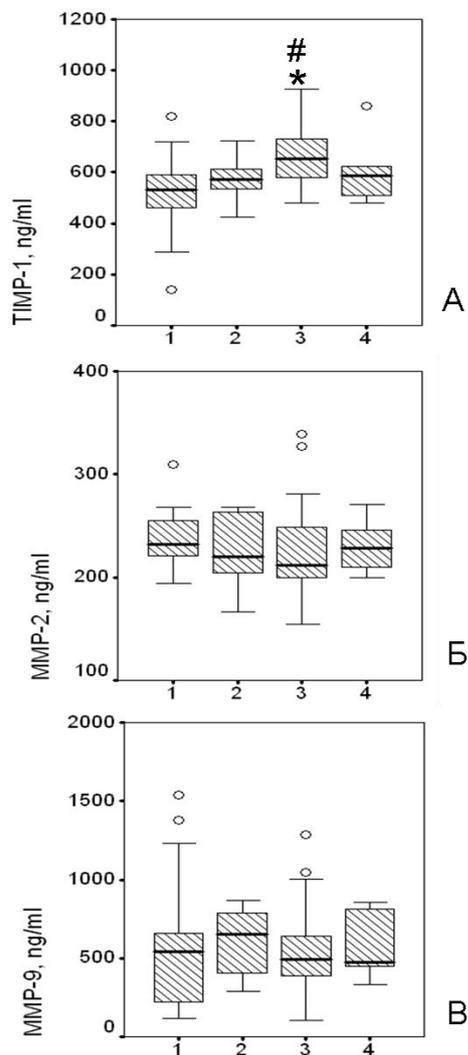


Рисунок 18. Содержание металлопротеиназ и их ингибитора в сыворотке крови

Примечание: * - статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой здоровых добровольцев; # - статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой пациентов с артериальной гипертензией

У пациентов с НТУ наблюдалась тенденция к увеличению содержания TIMP-1 по сравнению со здоровыми добровольцами ($p=0,059$) (Рисунок 18-А). Содержание MMP-2 и MMP-9 в сыворотке крови достоверно не различалось в исследуемых группах (Рисунок 18-Б,-В).

Соотношение TIMP-1/MMP-2 (коэффициент ингибирования по MMP-2) было выше у пациентов с СД 2-го типа по сравнению со здоровыми добровольцами ($p<0,001$) и пациентами с НТУ ($p=0,046$) (Рисунок 19-А). Соотношение TIMP-1/MMP-9 (коэффициент ингибирования по MMP-9) при СД 2-го типа превышало таковое при АГ без нарушений углеводного обмена ($p=0,008$) (Рисунок 19-Б).

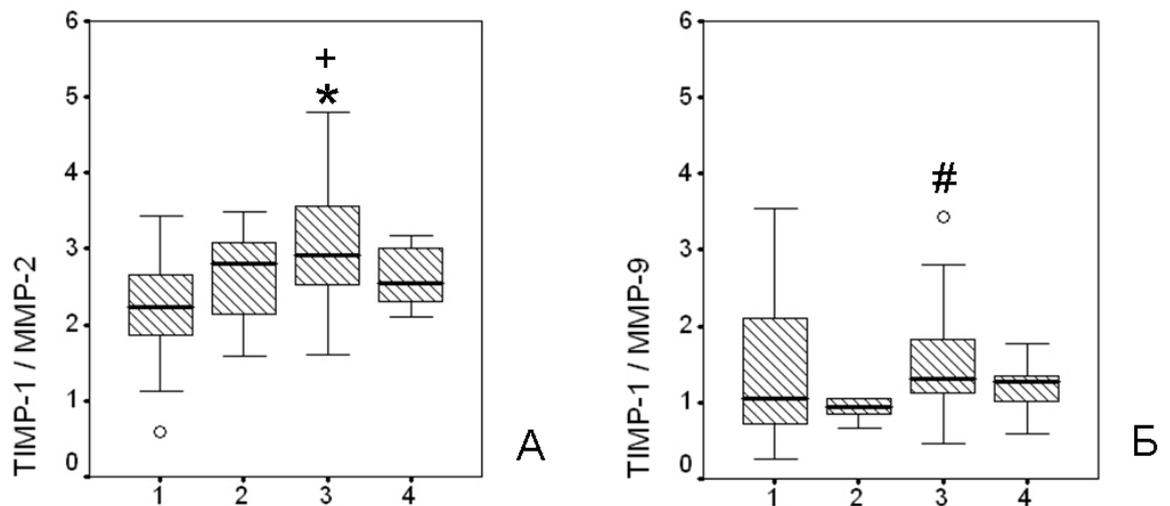


Рисунок 19. Коэффициенты ингибирования по MMP-2 и MMP-9 по результатам исследования сыворотки крови

Примечание: * - статистически значимые различия ($p<0,05$) по сравнению с группой здоровых добровольцев; # - статистически значимые различия ($p<0,05$) по сравнению с группой пациентов с АГ; + - статистически значимые различия ($p<0,05$) по сравнению с группой пациентов с НТУ

В группе здоровых добровольцев уровень стимулированной секреции IL-10 коррелировал с содержанием TIMP-1 ($R=0,745$; $p=0,013$) и соотношением TIMP-1/MMP-2 ($R=0,697$; $p=0,026$). В группе пациентов с нарушением толерантности к углеводам, характеризовавшейся наличием гиперинсулинемии, взаимосвязь между уровнем TIMP-1 и IL-10 отсутствовала, однако, обнаружена

корреляционная связь средней силы между содержанием инсулина в сыворотке и TIMP-1 ($R=0,679$; $p=0,008$).

При СД 2-го типа мы обнаружили умеренную корреляционную взаимосвязь между уровнем спонтанной суточной секреции IL-17 и содержанием TIMP-1 ($R=0,491$; $p=0,020$), и умеренную отрицательную корреляционную взаимосвязь между содержанием MMP-9 и количеством FoxP3+ Treg в циркуляции ($R=-0,437$; $p=0,002$). Умеренная корреляционная связь выявлена между концентрацией TIMP-1 и индексом инсулинорезистентности HOMA ($R=0,478$; $p=0,001$) при СД 2-го типа.

В нашем исследовании мы не выявили изменения концентрации MMP у пациентов. Однако увеличение содержания TIMP-1 в циркуляции свидетельствует о нарушении функционирования системы матричных металлопротеиназ при нарушениях углеводного обмена. Известно, что MMP и их ингибиторы играют важную роль в адипогенезе и широко представлены в жировой ткани [179]. В. Meissburger et al. (2011) показали, что повышенное содержание TIMP-1 *in vivo* приводит к нарушению утилизации глюкозы адипоцитами и усугублению состояния инсулинорезистентности [179]. Ограничением нашего исследования является то, что определение концентрации MMP проводилось в периферической крови, что не позволяет исключить вероятности изменения активности металлопротеиназ в тканях. Имеются данные о том, что TIMP-1 также может оказывать MMP-независимое влияние на клеточный рост, что позволяет рассматривать его не только как ингибитор ферментов, но и как фактор роста [179].

В группе пациентов с НТУ мы выявили взаимосвязь между содержанием TIMP-1 и концентрацией инсулина. G. Boden et al. (2008) установили, что гиперинсулинемия вызывает увеличение продукции TIMP-1 и TIMP-2 [55].

Имеются данные о том, что TNF- α , IL-1 β и IL-6 приводят к увеличению продукции TIMP-1 адипоцитами [137, 291]. В соответствии с результатами нашей работы, пациенты с СД 2-го типа и НТУ характеризовались повышенным содержанием провоспалительных цитокинов в сыворотке крови и супернатантах

культур клеток периферической крови (Таблица 12; рисунок 14). Выявленная положительная корреляционная взаимосвязь между спонтанной секрецией IL-17 и содержанием TIMP-1 позволяет предположить, что Th17 также могут вносить вклад в нарушение гомеостаза системы матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов при СД 2-го типа и НТУ.

Таким образом, гиперинсулинемия и субклиническое воспаление, сопровождающие инсулинорезистентность при нарушениях углеводного обмена, могут приводить к избыточной активации TIMP-1. А увеличение концентрации TIMP-1 может еще более усугублять инсулинорезистентность. Вследствие этого, формируется порочный круг, схематично представленный на рисунке 20.

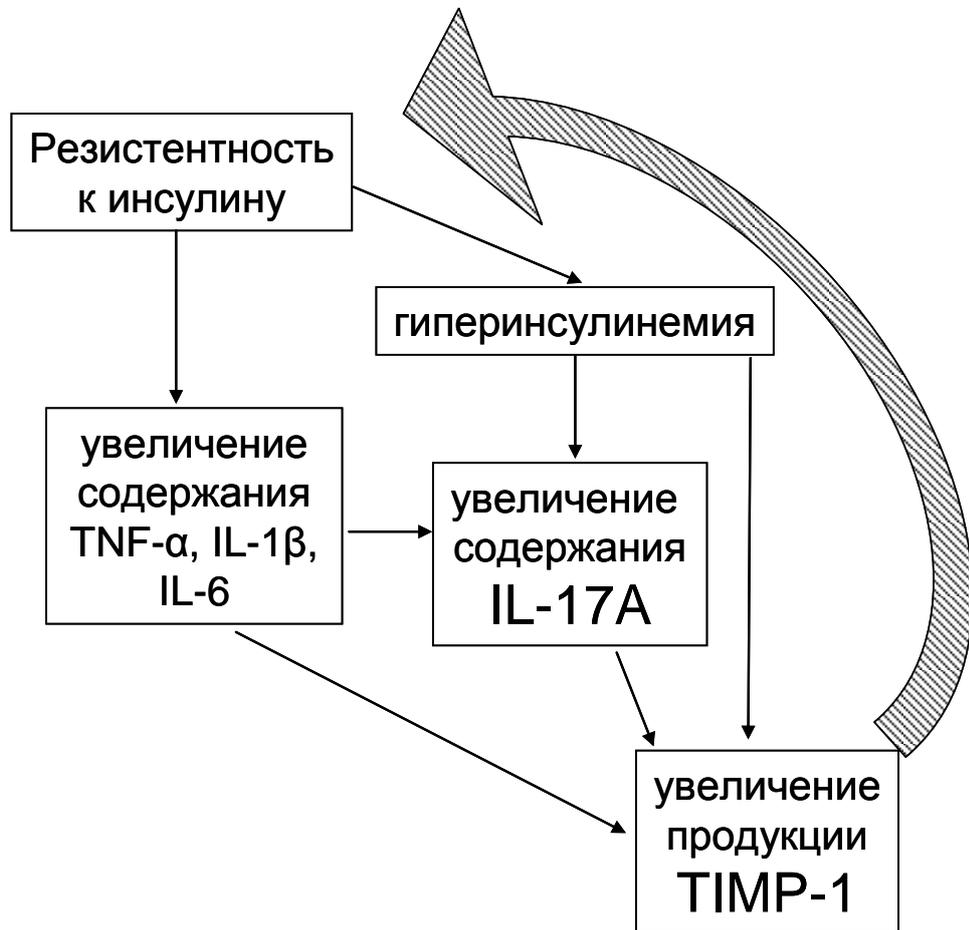


Рисунок 20. Возможный механизм увеличения содержания TIMP-1 при артериальной гипертензии, ассоциированной с нарушениями углеводного обмена (по результатам собственных исследований и данным S. Kralisch et al. (2005), G. Boden et al. (2008), S. Weise et al. (2008), B. Meissburger et al. (2011))

3.8. Корреляционный и регрессионный анализ взаимосвязей между показателями липидного, углеводного обмена и иммунологическими параметрами

Для изучения взаимосвязей между параметрами, характеризующими особенности функционирования CD4+ субпопуляций Т-лимфоцитов, и состоянием метаболизма был проведен корреляционный анализ.

В группе здоровых добровольцев были выявлены немногочисленные корреляционные взаимосвязи между параметрами липидного и углеводного обмена и иммунологическими показателями (Рисунок 21, 22). Взаимосвязи между содержанием различных липидных фракций и параметрами функционирования провоспалительных Th17 и Th1 в нестимулированной культуре отсутствовали (Рисунок 21). Вероятно, в нормальных условиях влияние обмена веществ на работу иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов ограничено и не приводит к формированию дисбаланса.

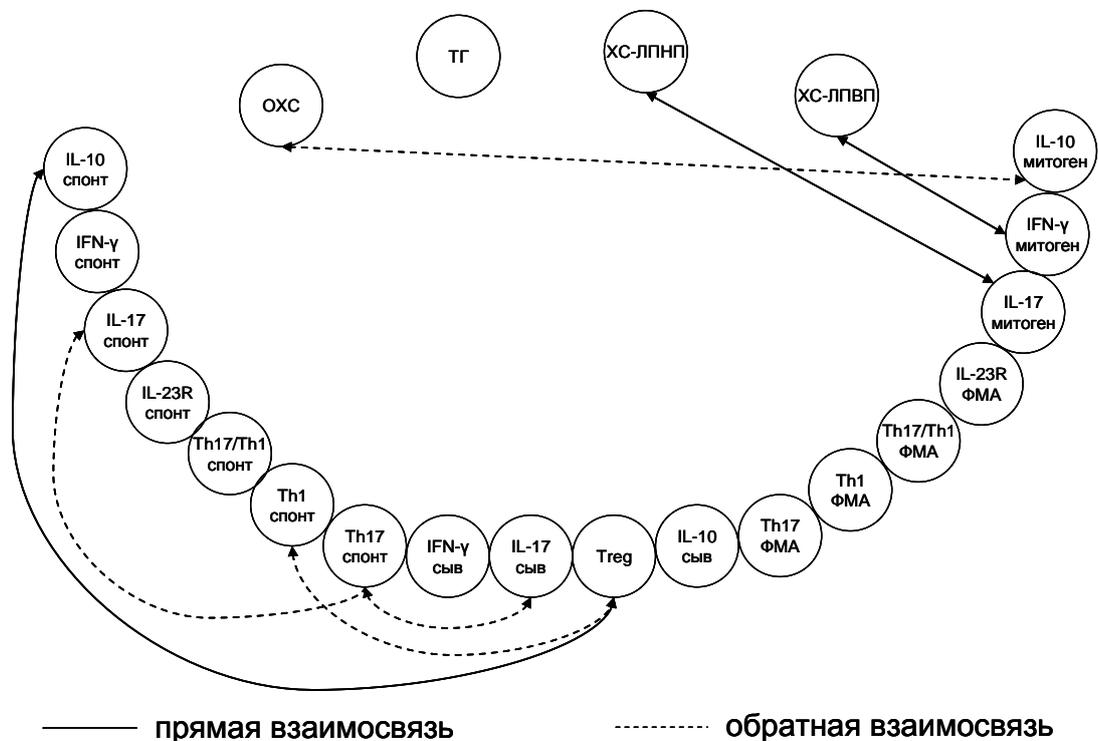


Рисунок 21. Корреляционные взаимосвязи между показателями липидного спектра и иммунологическими параметрами у здоровых добровольцев
Примечание: коэффициент корреляции $R > 0,4$; $p < 0,05$

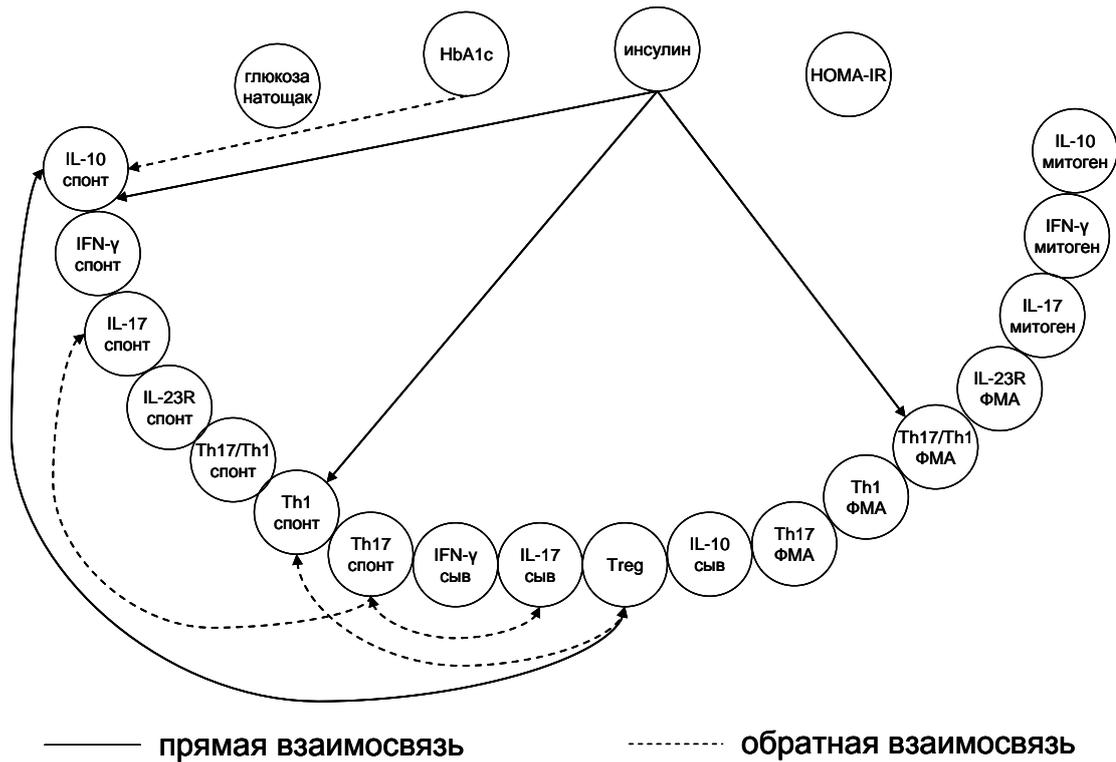


Рисунок 22. Корреляционные взаимосвязи между показателями углеводного обмена и иммунологическими параметрами у здоровых добровольцев
Примечание: коэффициент корреляции $R > 0,4$; $p < 0,05$

У пациентов с АГ выявлено наибольшее количество корреляционных взаимосвязей между компонентами липидного спектра и иммунологическими параметрами среди всех обследованных групп (общее количество – 23; положительных взаимосвязей – 16; отрицательных – 7) (Рисунок 23). Основные положительные корреляционные взаимосвязи выявлены между концентрацией ТАГ, ХС-ЛПНП (проатерогенные фракции липидов), ОХС и содержанием провоспалительных субпопуляций Т-лимфоцитов (Th17 и Th1), секрецией их ключевых цитокинов (IL-17 и IFN- γ соответственно), экспрессией рецептора к IL-23R. Концентрация ХС-ЛПВП прямо коррелировала с содержанием Treg и обратно – с содержанием Th1 и Th17/Th1-лимфоцитов (Рисунок 23). Следует отметить, что, несмотря на увеличение относительного количества Th1-лимфоцитов у пациентов с АГ (Таблица 8), содержание Th1 отрицательно коррелировало с сывороточной концентрацией IFN- γ и уровнем его спонтанной секреции (Рисунок 23). Мы полагаем, что это свидетельствует о низкой

функциональной активности Th1 у пациентов с АГ. В целом, данные корреляционного анализа позволяют заключить, что дислипидемия, выявленная у пациентов с АГ, приводит к формированию напряженности в функционировании субпопуляций CD4+ Т-лимфоцитов.

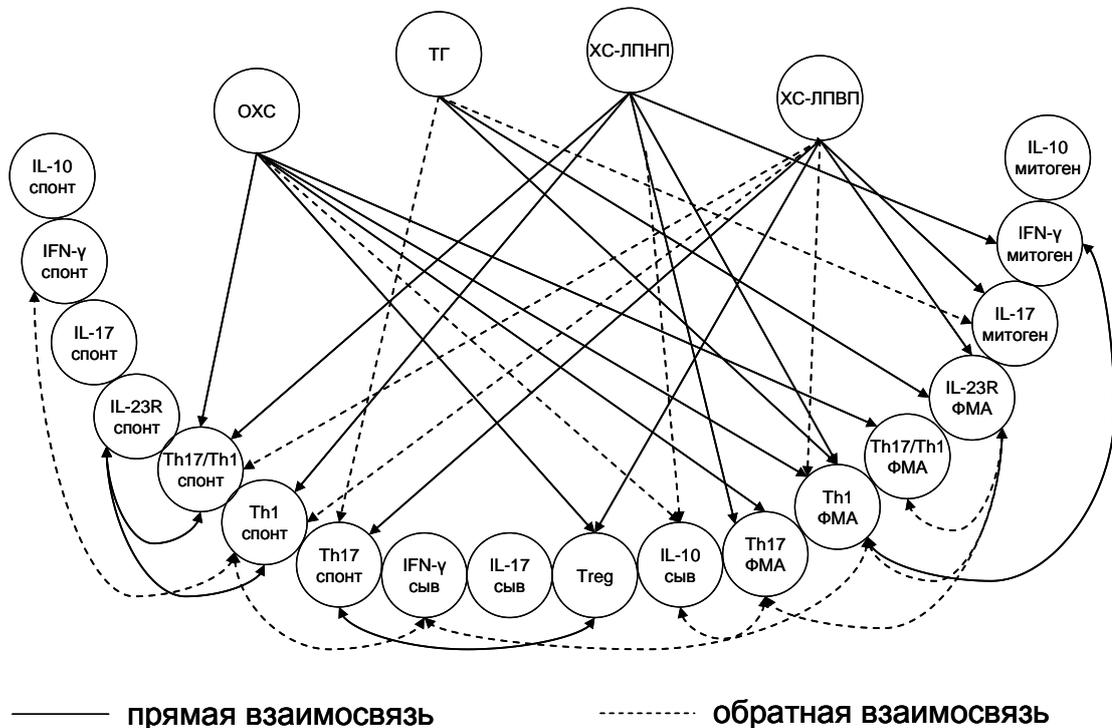


Рисунок 23. Корреляционные взаимосвязи между показателями липидного спектра и иммунологическими параметрами у пациентов с артериальной гипертензией

Примечание: коэффициент корреляции $R > 0,4$; $p < 0,05$

Общее количество корреляционных взаимосвязей между параметрами углеводного обмена и иммунологическими показателями у пациентов с АГ также было значительным (24), однако большинство из них имели обратный характер (19 отрицательных связей при наличии лишь 5 положительных) (Рисунок 24). Учитывая тот факт, что содержание глюкозы, инсулина, HbA1c, индекса НОМА при АГ не отличалось от здоровых добровольцев, мы полагаем, что выявленные взаимосвязи могут быть обусловлены воздействием дополнительных факторов, например, терапии. Так, 3 пациента (20%) из группы АГ принимали β -блокаторы (Таблица 4). Известно, что одним из побочных эффектов данной группы препаратов является увеличение степени инсулинорезистентности [173]. С другой

стороны, показано, что прием β -блокаторов в сочетании с ингибиторами АПФ способствует снижению продукции провоспалительных цитокинов [105].

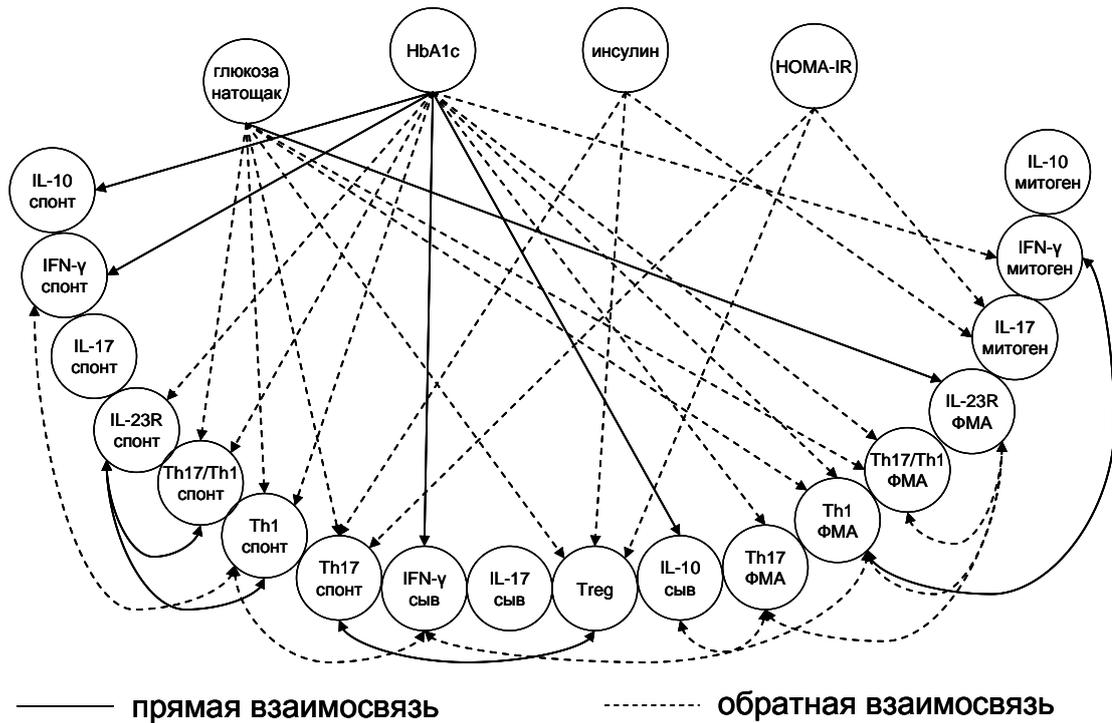


Рисунок 24. Корреляционные взаимосвязи между показателями углеводного обмена и иммунологическими параметрами у пациентов с артериальной гипертензией

Примечание: коэффициент корреляции $R > 0,4$; $p < 0,05$

У пациентов с НТУ+АГ количество корреляционных взаимосвязей между метаболическими и иммунологическими параметрами также было значительным (Рисунки 25, 26). При этом было выявлено большое количество положительных связей между содержанием Th1 и Treg и сывороточной концентрацией соответствующих им цитокинов. Обрато коррелировали Treg и концентрация IL-17 в сыворотке; Th17 после стимуляции и концентрация IL-10 в сыворотке (Рисунки 25, 26). Вероятно, именно сочетание нарушений углеводного и липидного обмена приводит к формированию иммунорегуляторного дисбаланса при НТУ, который мы выявили в ходе нашего исследования.

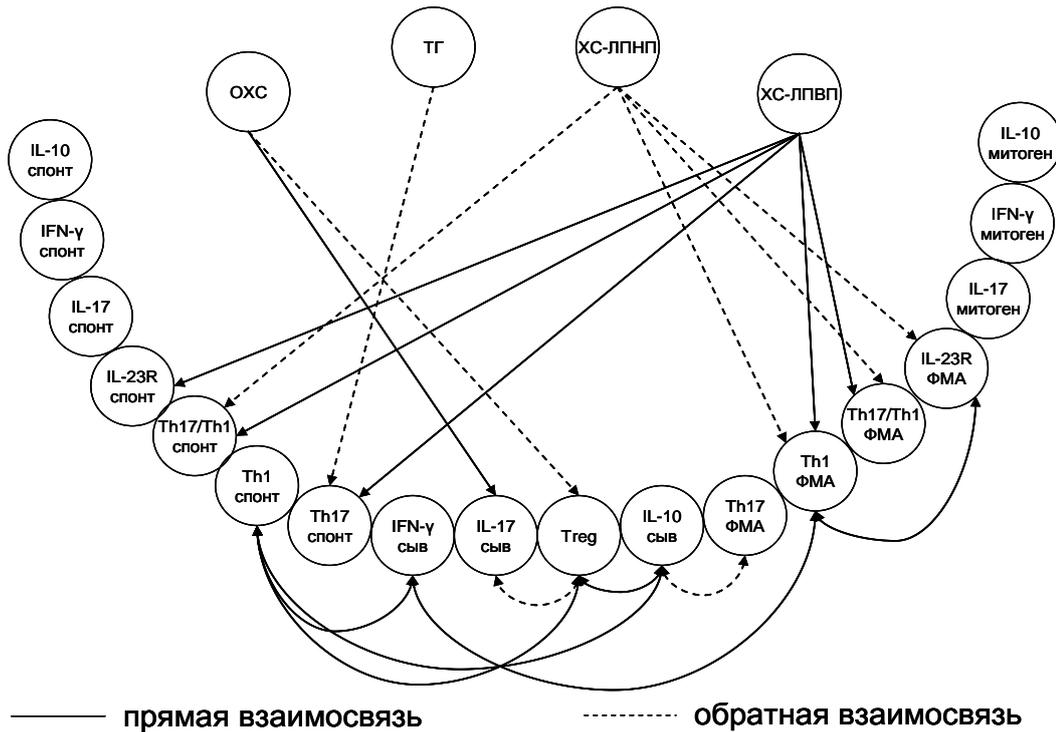


Рисунок 25. Корреляционные взаимосвязи между показателями липидного спектра и иммунологическими параметрами у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с нарушением толерантности к углеводам
Примечание: коэффициент корреляции $R > 0,4$; $p < 0,05$

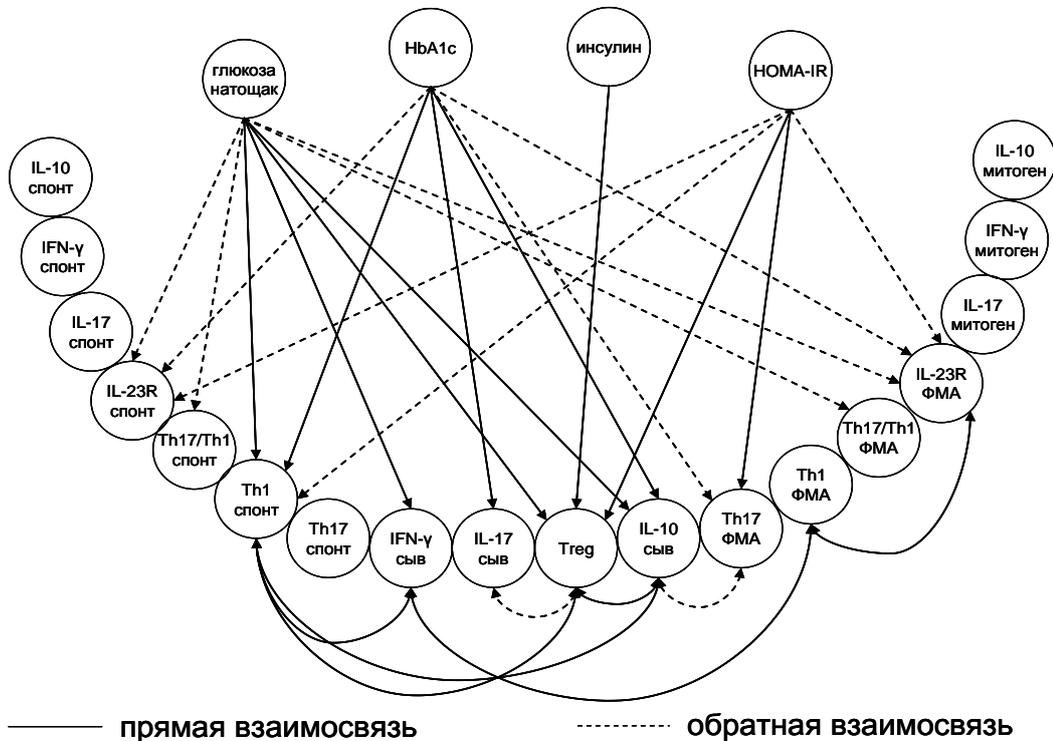


Рисунок 26. Корреляционные взаимосвязи между показателями углеводного обмена и иммунологическими параметрами у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с нарушением толерантности к углеводам
Примечание: коэффициент корреляции $R > 0,4$; $p < 0,05$

В группе пациентов с СД 2-го типа мы обнаружили относительно небольшое общее количество корреляционных взаимосвязей между параметрами обмена веществ и показателями функционирования иммунорегуляторных субпопуляций (7 – с содержанием липидных фракций (5 «+» и 2 «-»); 12 – с параметрами углеводного обмена (8 «+» и 4 «-»); рисунки 27, 28). Однако они затрагивали показатели, изменения которых в данной подгруппе пациентов были наиболее выраженными. Так, спонтанная и митоген-активированная секреция IL-17 была прямо связана с содержанием ТАГ, HbA1c, индексом НОМА; в то время как митоген-активированная секреция IL-10 и количество Treg-лимфоцитов были отрицательно связаны с содержанием HbA1c; индекс НОМА положительно коррелировал с содержанием Th1 и сывороточной концентрацией IFN- γ (Рисунки 27, 28).

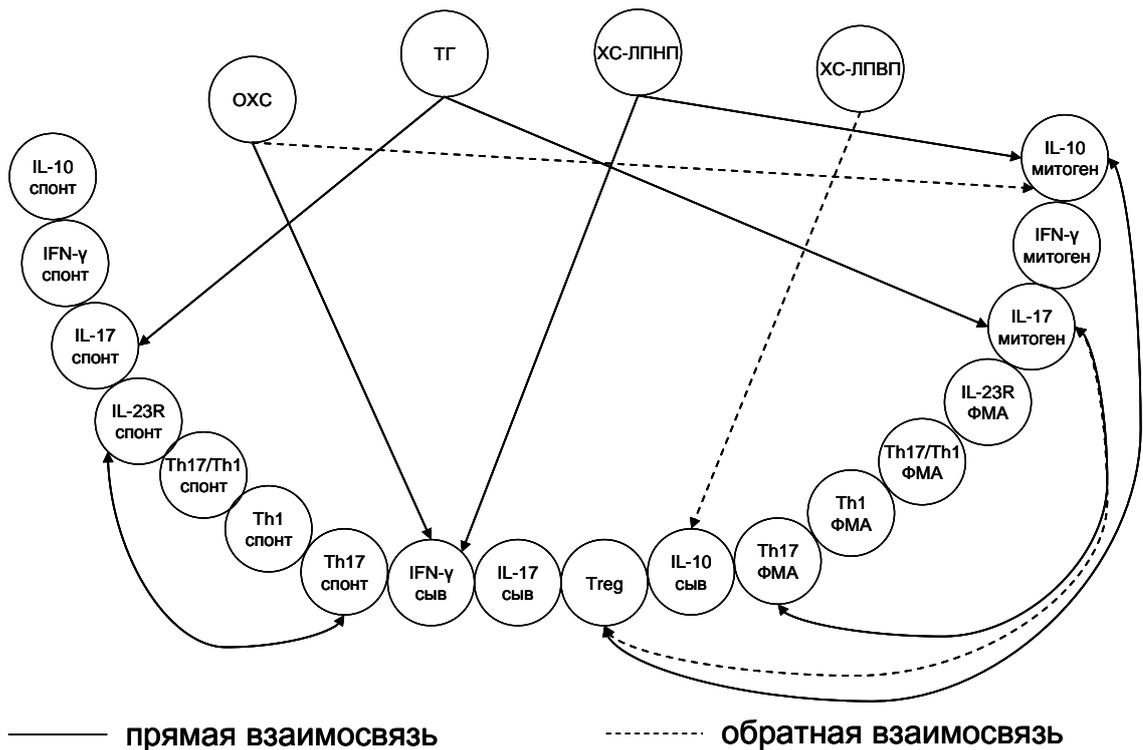


Рисунок 27. Корреляционные взаимосвязи между показателями липидного спектра и иммунологическими параметрами у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа

Примечание: коэффициент корреляции $R > 0,4$; $p < 0,05$

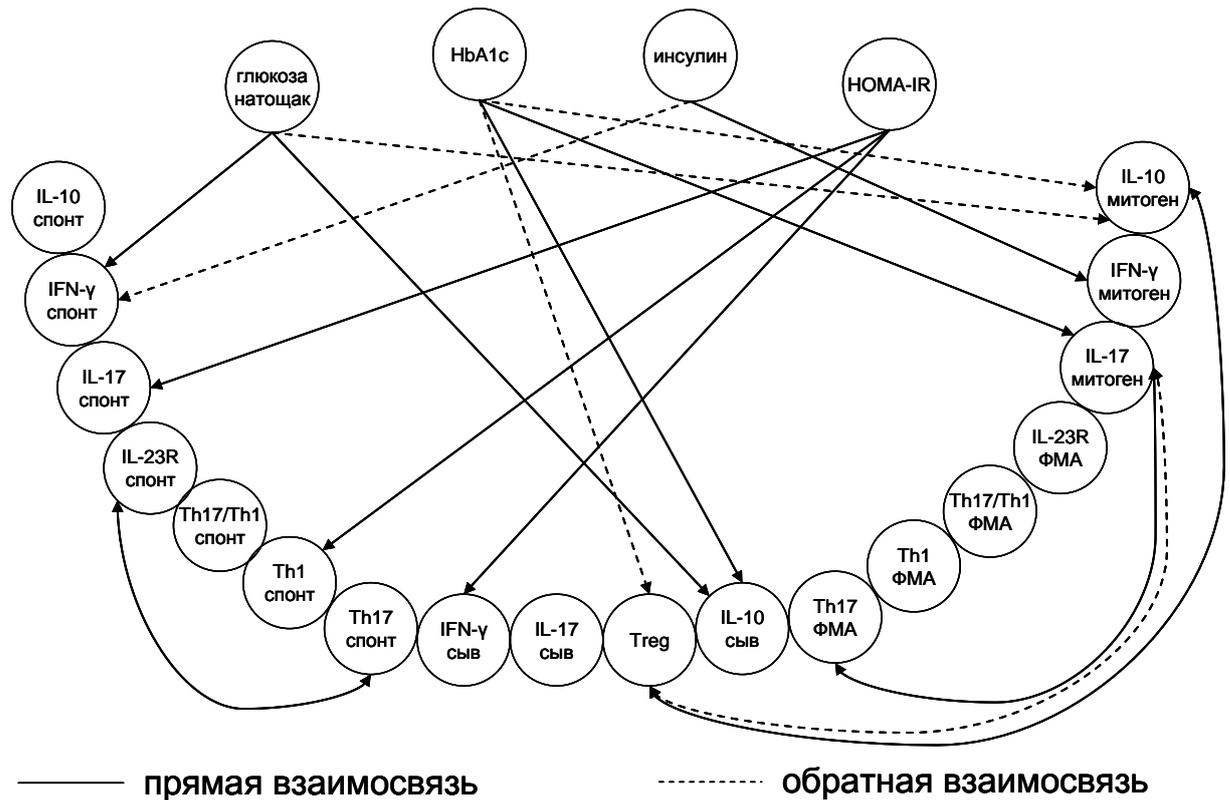


Рисунок 28. Корреляционные взаимосвязи между показателями углеводного обмена и иммунологическими параметрами у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа

Примечание: коэффициент корреляции $R > 0,4$; $p < 0,05$

Данные корреляционного анализа указывают на наличие четко прослеживаемой связи между метаболическими нарушениями и иммунорегуляторным дисбалансом у пациентов с СД 2-го типа. Нарушения углеводного обмена при СД, по-видимому, оказывают наибольшее влияние на изменения иммунологических параметров.

Для определения вклада различных факторов в вариацию содержания субпопуляций $CD4^+$ Т-лимфоцитов был проведен линейный регрессионный анализ.

У пациентов с сочетанием АГ и СД 2-го типа выявлена зависимость базального количества $IL-17^+$ $Th17$ -лимфоцитов *ex vivo* от концентрации инсулина, концентрации глюкозы и количества клеток, спонтанно экспрессирующих рецептор к $IL-23$, которую можно представить в виде следующего уравнения:

$$y = 0,004a + 0,005b + 0,428c - 0,066;$$

$$R = 0,987; R^2 = 0,975; F = 77,102; p < 0,0001.$$

Примечание: y – относительное количество Th17, спонтанно продуцирующих IL-17; a – концентрация инсулина; b – концентрация глюкозы; c – количество клеток, экспрессирующих IL-23R.

Результаты линейного регрессионного анализа подтвердили вклад метаболических параметров в модуляцию содержания FoxP3+Treg-лимфоцитов у пациентов с АГ, ассоциированной с СД 2-го типа. Данную зависимость можно представить в виде следующего уравнения регрессии:

$$y = 5,103 - 6,677a - 0,154b;$$

$$R = 0,713; R^2 = 0,509; F = 17,076; p < 0,0001.$$

y – количество FoxP3+ Treg-лимфоцитов в периферической крови; a – количество IFN+ T-хелперов-1; b – общее содержание холестерина в сыворотке периферической крови.

В группе пациентов с сочетанием АГ и НТУ количество Th17, спонтанно продуцирующих IL-17, не зависело от концентрации глюкозы в крови. Но, в то же время, полученное уравнение линейной регрессии включало концентрацию IL-6 и TNF- α в сыворотке крови и выглядело следующим образом:

$$y = 0,019a + 1,050b + 0,1c - 0,113d - 0,466;$$

$$R = 0,938; R^2 = 0,879; F = 31,013; p < 0,0001.$$

y – относительное количество Th17, спонтанно продуцирующих IL-17; a – содержание инсулина; b – количество клеток, экспрессирующих IL-23R; c – концентрация TNF- α в сыворотке крови; d – концентрация IL-6 в сыворотке крови.

Кроме того, регрессионный анализ показал, что при сочетании АГ и НТУ количество Th17, продуцирующих IL-17 после стимуляции ФМА с иономицином, определяется концентрациями инсулина, ЛПНП, ЛПВП и IL-1 β в сыворотке крови. Данная зависимость может быть выражена следующим уравнением линейной регрессии:

$$y = 0,077a + 0,275b + 0,505c + 0,004d - 1,731;$$

$$R = 0,986; R^2 = 0,971; F = 161,201; p < 0,0001;$$

y – количество Th17, продуцирующих IL-17 после стимуляции ФМА с иономицином; a – концентрация инсулина в сыворотке крови; b – концентрация ЛПНП в сыворотке крови; c – концентрация ЛПВП в сыворотке крови; d – концентрация IL-1 β в сыворотке крови.

При АГ, ассоциированной с НТУ, содержание различных липидных факторов было также связано с количеством FoxP3+ T-регуляторных лимфоцитов. Уравнение линейной регрессии при этом имело следующий вид:

$$y = 1,683 + 0,020a + 1,202b - 2,950c + 2,612d;$$

$$R = 0,991; R^2 = 0,983; F = 240,422; p < 0,0001.$$

y – количество FoxP3+ Treg-лимфоцитов в периферической крови; a – концентрация IL-1β в сыворотке периферической крови; b – концентрация IL-10 в сыворотке периферической крови; c – общее содержание холестерина в сыворотке периферической крови; d – содержание липопротеинов низкой плотности в сыворотке периферической крови.

В группе пациентов с АГ без нарушений углеводного обмена количество FoxP3+ Treg в соответствии с данными линейного регрессионного анализа зависело от содержания гликозилированного гемоглобина, общего холестерина и внутриклеточной продукции IL-17 после стимуляции ФМА с иономицином. Данную зависимость можно отразить с помощью следующего уравнения:

$$y = 4,322a + 7,453b + 2,726c - 52,802;$$

$$R = 0,995; R^2 = 0,989; F = 490,378; p < 0,0001.$$

y - количество FoxP3+ Treg-лимфоцитов в периферической крови; a – количество IL-17+ Th17 после стимуляции ФМА с иономицином; b – содержание гликозилированного гемоглобина; c – общее содержание холестерина.

При этом в группе здоровых добровольцев по данным линейного регрессионного анализа количество FoxP3+ Treg зависело только от уровня спонтанной секреции IL-10. Уравнение линейной регрессии имело следующий вид:

$$y = 107,37a + 6,792;$$

$$R = 0,656; R^2 = 0,430; F = 6,034; p = 0,040.$$

y – количество FoxP3+ Treg-лимфоцитов в периферической крови; a – концентрация IL-10 в супернатантах суточных культур клеток периферической крови в отсутствии стимуляции.

Таким образом, во всех исследуемых группах пациентов количество Th1, Th17, FoxP3+Treg зависело от показателей липидного и углеводного обмена. Однако только у пациентов с АГ, ассоциированной с НТУ или СД 2-го типа, содержание субпопуляций CD4+ T-лимфоцитов было связано с изменением продукции цитокинов и экспрессией цитокиновых рецепторов. Мы полагаем, что

при АГ на фоне слабо выраженных изменений метаболизма может формироваться состояние функционального напряжения в системе иммунорегуляции, которое реализуется в форме иммунорегуляторного дисбаланса в случае нарушений углеводного обмена.

Далее мы проанализировали, какие именно клинические особенности заболевания у пациентов с сочетанием АГ и СД 2-го типа связаны с изменением содержания субпопуляций CD4⁺ Т-лимфоцитов и секрецией их ключевых цитокинов.

3.9. Взаимосвязь иммунологических маркеров воспаления с клинико-метаболическими особенностями течения артериальной гипертензии, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа

3.9.1. Особенности функционирования субпопуляций Т-лимфоцитов в зависимости от выраженности субклинического воспаления при артериальной гипертензии, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа

С-реактивный белок (СРБ) относится к белкам острой фазы воспаления, которые представляют собой группу протеинов, секретируемых гепатоцитами. Концентрация СРБ зависит от стадии заболевания и/или масштабов повреждения. При развитии острого воспаления концентрация СРБ быстро возрастает в десятки тысяч раз и нормализуется к концу 1-ой недели. В реакциях врожденного иммунитета СРБ в основном выполняет комплементактивирующую и опсонизирующую функцию [28].

При появлении новых методов исследования стало возможным определение СРБ в таких концентрациях, которые ранее считались «фоновыми» или «следовыми». Увеличение концентрации СРБ, определенного высокочувствительным методом (hsСРБ), в диапазоне от 3 до 10 мг/л является признаком вялотекущего хронического воспалительного процесса и связано с высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний [22].

Кроме того, увеличение концентрации hsCRP в сыворотке крови является прогностическим маркером повышенного риска развития СД 2-го типа у здоровых добровольцев и повышенного риска развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с уже диагностированным СД 2-го типа [188]. Показано, что концентрация CRP тесно коррелирует с иммунологическими маркерами воспаления при нарушениях углеводного обмена [120].

Для того чтобы оценить функциональную активность субпопуляций CD4+ Т-лимфоцитов в зависимости от выраженности хронического субклинического воспаления, среди пациентов с СД 2-го типа было выделено две подгруппы с различным содержанием hsCRP в сыворотке.

У большинства пациентов с СД 2-го типа содержание hsCRP было выше 3 мг/л, что соответствует высокому риску развития сердечно-сосудистых осложнений. Медиана концентрации hsCRP в группе пациентов с СД 2-го типа составила 4,88 мг/л. Мы выделили среди пациентов с СД 2-го типа две подгруппы, различающихся по содержанию hsCRP (менее 5 мг/л и более 5 мг/л) (Рисунок 29).

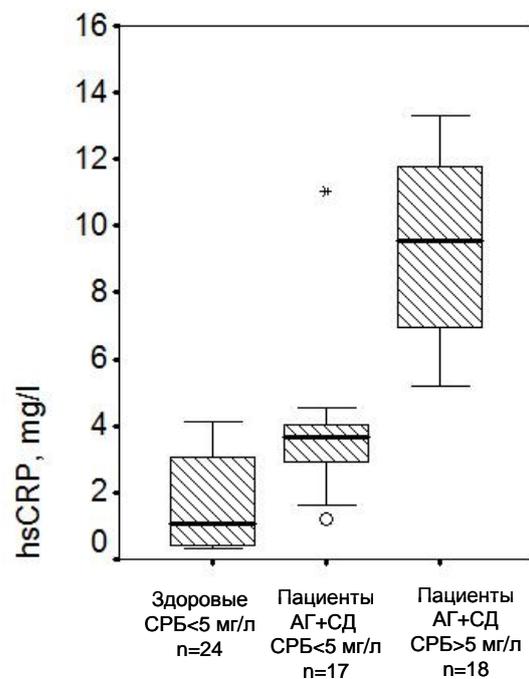


Рисунок 29. Подгруппы пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, в соответствии с содержанием hsC-реактивного белка в сыворотке

В подгруппе пациентов с СД 2-го типа и $hsCRP < 5$ мг/л концентрация СРБ составила 3,67 (2,88 – 4,05) мг/л, в подгруппе с $hsCRP > 5$ мг/л – 9,57 (6,96 – 11,79) мг/л ($p < 0,001$ – уровень значимости различий между подгруппами) (Рисунок 29). В группе здоровых добровольцев содержание СРБ было достоверно ниже, чем в подгруппах пациентов с СД 2-го типа ($p < 0,001$ как по сравнению с пациентами с СД 2-го типа и $hsCRP < 5$ мг/л, так и по сравнению с пациентами с СД 2-го типа и $hsCRP > 5$ мг/л) (Рисунок 29).

Для пациентов с СД 2-го типа и концентрацией СРБ < 5 мг/л было характерно более высокое содержание FoxP3+ Treg-лимфоцитов и меньшее относительное количество Th1-лимфоцитов по сравнению с пациентами с СД 2-го типа и концентрацией СРБ > 5 мг/л (Таблица 13). При этом интенсивность внутриклеточной продукции IFN- γ была также ниже у пациентов с СРБ < 5 мг/л. Содержание FoxP3+ Treg-лимфоцитов в подгруппах пациентов с СД 2-го типа было ниже, чем в группе здоровых добровольцев, независимо от содержания $hsCRP$ в сыворотке. В подгруппе пациентов с СД 2-го типа и содержанием $hsCRP > 5$ мг/л мы выявили снижение относительного и абсолютного содержания Th17-лимфоцитов по сравнению со здоровыми добровольцами и пациентами с СД 2-го типа и $hsCRP < 5$ мг/л (Таблица 13).

Е. Nikoour et al. (2010) показали, что свойства Th17 зависят от микроокружения, в котором они функционируют. В зависимости от того, какие факторы дифференцировки влияют на созревание высоко пластичной субпопуляции Th17, эти Т-лимфоциты могут выполнять функции как провоспалительных, так и противовоспалительных клеток, оказывающих протективный эффект за счет продукции IL-10 наряду с IL-17 [193].

Для того чтобы оценить условия функционирования Th17, мы проанализировали особенности цитокинопродукции в группах пациентов с различной концентрацией СРБ в сыворотке. Оказалось, что для пациентов с концентрацией СРБ < 5 мг/л характерна более высокая секреция IL-10 и более низкая секреция IL-1 β по сравнению с пациентами с СД 2-го типа и содержанием СРБ > 5 мг/л (Таблица 14). При этом содержание в сыворотке и спонтанная

секреция IL-17 не различались между подгруппами пациентов с СД 2-го типа и были выше, чем у здоровых добровольцев (Таблица 14).

Таблица 13

Содержание различных субпопуляций Т-лимфоцитов у здоровых добровольцев и пациентов с АГ, ассоциированной с СД 2-го типа, с различной концентрацией hsC-реактивного белка, Me ($Q_1 - Q_3$)

Параметр		1. Пациенты с АГ+СД (СРБ<5 мг/л) (n=17)	2. Пациенты с АГ+СД (СРБ>5 мг/л) (n=18)	3. Здоровые добровольцы (СРБ<5 мг/л) (n=24)	p
FoxP3+ Treg, %		3,72 (2,88 – 4,25)	2,84 (2,46 – 3,50)	4,69 (3,68 – 5,72)	p ₁₋₂ =0,015 p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ <0,001
Нестимулированная культура клеток	Th17, %	0,18 (0,14 – 0,28)	0,10 (0,08 – 0,16)	0,21 (0,18 – 0,32)	p ₁₋₂ <0,001 p ₂₋₃ <0,001
	Th17, 10 ³ клеток/л	2239 (1327 – 3520)	792 (615 – 968)	2210 (1771 – 3247)	p ₁₋₂ =0,004 p ₂₋₃ =0,004
	MFI (IL-17), отн. ед.	93,69 (66,79 – 96,05)	96,25 (76,44 – 105,73)	71,13 (46,83 – 107,13)	
	Th1, %	0,12 (0,02 – 0,14)	0,18 (0,14 – 0,28)	0,07 (0,04 – 0,12)	p ₁₋₂ =0,003 p ₂₋₃ <0,001
	Th1, 10 ³ клеток/л	2082 (1620 – 4491)	3124 (2430 – 6737)	4660 (2608 – 4760)	
	MFI (IFN-γ), отн. ед.	49,95 (49,39 – 62,21)	47,00 (44,02 – 51,21)	21,62 (18,21 – 30,89)	p ₁₋₂ =0,042 p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ =0,001
Стимуляция ФМА+иономицин	Th17, %	0,77 (0,66 – 0,97)	0,74 (0,58 – 0,97)	0,72 (0,32 – 1,08)	
	Th17, 10 ³ клеток/л	10812 (10622 – 11782)	10857 (6897 – 12054)	9412 (5558 – 12576)	
	MFI (IL-17), отн. ед.	118,78 (106,82 – 135,41)	96,25 (76,44 – 105,73)	120,54 (96,43 – 160,37)	p ₁₋₂ =0,012 p ₂₋₃ =0,004
	Th1, %	18,53 (14,15 – 26,19)	19,80 (11,88 – 27,20)	9,46 (7,01 – 11,79)	p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ <0,001
	Th1, 10 ⁶ клеток/л	3913 (3490 – 10693)	4119 (3674 – 11257)	1364 (834 – 2404)	p ₁₋₃ =0,001 p ₂₋₃ =0,001
	MFI (IFN-γ), отн. ед.	273,50 (187,28 – 317,46)	262,30 (221,02 – 333,05)	90,31 (48,96 – 111,52)	p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ <0,001

Примечание: указан процент клеток от общего количества CD4+ лимфоцитов и рассчитанное абсолютное содержание клеток в 1 л крови; MFI – средняя интенсивность флуоресценции; здесь и далее в таблицах 14, 15 p – уровень значимости различий: p₁₋₂ – между подгруппами пациентов с АГ, ассоциированной с СД 2-го типа; p₁₋₃ – между пациентами с СРБ<5 и здоровыми добровольцами; p₂₋₃ – между пациентами с СРБ>5 и здоровыми добровольцами

Содержание цитокинов у здоровых добровольцев и пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, с различной концентрацией hsC-реактивного белка, Me (Q₁ – Q₃)

Цитокины		1. Пациенты с АГ+СД (СРБ<5 мг/л) (n=17)	2. Пациенты с АГ+СД (СРБ>5 мг/л) (n=18)	3. Здоровые добровольцы (СРБ<5 мг/л) (n=24)	p
IL-1β	Сыв	18,50 (6,20–25,83)	14,16 (5,70–28,92)	20,35 (0–124,80)	
	Сп	44,55 (40,73–76,00)	74,74 (53,87–202,32)	140,3 (86,7–253,7)	
	Мит	1826 (966–2513)	2683 (2443–2978)	2092 (1498–2707)	p ₁₋₂ =0,017
IL-4	Сыв	2,98 (2,77–5,04)	4,84 (4,51–5,58)	2,85 (1,95–4,00)	p ₁₋₃ =0,019 p ₂₋₃ =0,017
	Сп	0,03 (0–0,55)	0,11 (0–0,56)	0 (0–0,02)	
	Мит	3,51 (0,27–8,95)	13,55 (1,23–37,81)	8,37 (5,53–12,4)	p ₁₋₃ =0,028
IL-6	Сыв	3,46 (2,34–4,79)	4,46 (4,02–5,66)	2,44 (1,71–3,62)	p ₂₋₃ <0,001
	Сп	71,79 (11,38–152,3)	26,50 (12,65–110,42)	30,43 (4,16–43,55)	
	Мит	9215 (7326–17925)	9812 (6967–14271)	9877 (8134–13746)	
IL-10	Сыв	8,48 (6,87–10,03)	8,54 (6,93–9,57)	6,84 (5,23–9,07)	p ₁₋₃ =0,037 p ₂₋₃ =0,038
	Сп	0 (0–0,07)	0,11 (0–1,94)	0	
	Мит	356,2 (236,8–542,1)	251,5 (158,9–305,8)	397 (205–577)	p ₁₋₂ =0,069 p ₂₋₃ =0,045
IL-17	Сыв	12,08 (11,54–24,90)	12,37 (8,72–17,82)	8,77 (5,47–10,42)	p ₁₋₃ =0,003 p ₂₋₃ =0,005
	Сп	116,0 (82,6–136,5)	84,89 (67,22–165,31)	40,64 (0–74,54)	p ₁₋₃ =0,001 p ₂₋₃ =0,013
	Мит	241,5 (150,2–445,4)	434,1 (113,5–504,1)	167,7 (103,6–355,3)	
TNF-α	Сыв	5,49 (4,39–6,72)	6,09 (4,57–6,66)	4,34 (2,61–5,41)	p ₁₋₃ =0,011 p ₂₋₃ <0,001
	Сп	4,43 (0,22–8,08)	2,52 (0,38–7,88)	1,61 (0,39–2,87)	
	Мит	1279 (984–1543)	1680 (621–2119)	817,2 (725,7–976,5)	p ₁₋₃ =0,001
IFN-γ	Сыв	6,95 (5,71–8,92)	7,36 (6,54–8,40)	6,62 (4,91–7,92)	
	Сп	0	0 (0–0,09)	0	
	Мит	828 (396–1418)	984 (245–1511)	709,5 (535,0–889,1)	

Примечание: Сыв – содержание цитокинов в сыворотке, пг/мл; Сп - спонтанная секреция цитокинов, пг/мл на 10⁶ лейкоцитов; Мит - митоген-активированная секреция, пг/мл на 10⁶ лейкоцитов

Учитывая, что Th17 являются основными продуцентами IL-17 [13], мы рассчитали количество IL-17, секретируемого каждым Th17-лимфоцитом, исходя из абсолютного количества Th17 в циркуляции и уровня базальной секреции цитокина в культуре клеток крови. В группе пациентов с СД 2-го типа и СРБ>5 мг/л интенсивность секреции IL-17 каждой отдельной клеткой была выше (225 (196 – 256) фг на 1 клетку), чем в группах здоровых добровольцев (27 (3 – 47) фг на 1 клетку; $p=0,004$) и пациентов с СД 2-го типа с содержанием СРБ менее 5 мг/л (56 (33 – 104) фг на 1 клетку; $p=0,004$), несмотря на то, что интенсивность внутриклеточной продукции IL-17 после активации в данной подгруппе была снижена.

С другой стороны, при повышенном содержании иммуносупрессорных FoxP3+ Treg, более высокой секреции IL-10 и сниженной секреции IL-1 β часть Th17 могли находиться в состоянии анэргии и только определенная их доля секретировала IL-17. В то время как у пациентов с СРБ > 5 мг/л в условиях провоспалительного микроокружения все Th17-лимфоциты были способны к активной секреции IL-17.

Методом корреляционного анализа мы выявили, что в группе пациентов с СД 2-го типа и концентрацией hsСРБ<5 наблюдается связь средней силы между содержанием IL-10 и IL-17 ($R=0,661$; $p=0,003$). Данный факт позволяет рассматривать также гипотезу об активации субпопуляции IL-17+IL10+ Th17-лимфоцитов у пациентов с СД 2-го типа и СРБ<5 мг/л, что может способствовать снижению выраженности воспаления.

Независимо от того, какой из предполагаемых механизмов, описанных выше, играет более существенную роль в изменении функционирования Th17-лимфоцитов при СД 2-го типа, результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что большая выраженность субклинического воспаления ассоциируется с увеличением секреторной активности Th17-клеток в условиях сниженной эффективности механизмов регуляции иммунного ответа (дефицита иммуносупрессорных факторов).

При анализе клинико-метаболических параметров было обнаружено, что пациенты с СД 2-го типа и СРБ >5 мг/л характеризовались большим объемом талии и большим соотношением ОТ/ОБ ($p=0,020$ и $p=0,012$, соответственно) по сравнению с пациентами с СД 2-го типа и СРБ<5 (Таблица 15), что свидетельствует о большей выраженности абдоминального типа ожирения [271].

Таблица 15

Клиническая характеристика пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, с различной концентрацией hsC-реактивного белка, Me ($Q_1 - Q_3$)

Параметр	1. Пациенты с АГ+СД (СРБ<5 мг/л) (n=17)	2. Пациенты с АГ+СД (СРБ>5 мг/л) (n=18)	3. Здоровые добровольцы (СРБ<5 мг/л) (n=24)	p
Индекс массы тела	31,39 (29,32 – 34,48)	33,45 (30,38 – 35,29)	22,8 (18,4 – 30,5)	$p_{1-3}=0,012$ $p_{2-3}=0,005$
Объем талии (ОТ), см	105,0 (97,5 – 111,3)	111,0 (106,5 – 120,8)	82,0 (74,0 – 98,5)	$p_{1-2}=0,020$ $p_{1-3}=0,001$ $p_{2-3}<0,001$
Объем бедер (ОБ), см	110,5 (102,5 – 120,5)	112,5 (110,3 – 116,0)	98,5 (92,0 – 110,6)	$p_{1-3}=0,021$ $p_{2-3}=0,015$
ОТ/ОБ	0,95 (0,89 – 1,00)	0,99 (0,96 – 1,04)	0,83 (0,80 – 0,89)	$p_{1-2}=0,012$ $p_{1-3}=0,005$ $p_{2-3}<0,001$

При развитии абдоминального ожирения помимо увеличения объема подкожной жировой клетчатки увеличивается количество висцеральной жировой брыжейки, межпетельного пространства большого и малого сальников. Висцеральный жир представляет собой белую жировую ткань, которая продуцирует большое количество биологически активных веществ, включая адипокины, хемокины и цитокины, и, таким образом, играет важную роль в регуляции метаболизма и развитии воспаления [18, 24, 25, 84]. Адипоциты способны секретировать провоспалительные цитокины IL-6 и TNF- α , а также экспрессируют рецепторы, идентичные клеткам иммунной системы. В адипоцитах обнаружена экспрессия ряда Toll-рецепторов (TLR). Показано, что стимуляция TLR-4 адипоцитов липополисахаридами или насыщенными жирными

кислотами запускает синтез различных адипокинов и цитокинов, а также способствует развитию инсулинорезистентности жировой ткани [25]. В то же время, известно, что активация TLR-4 приводит к экспансии Th17 [78]. Можно предположить, что общность сигнальных путей, задействованных в регуляции процессов, протекающих в жировой ткани, и контролирующих функциональную активность Th17-лимфоцитов, создает предпосылки для активации данной провоспалительной клеточной субпопуляции у пациентов с ожирением и нарушениями липидного обмена.

Мы не обнаружили различий концентраций ТАГ и фракций липопротеинов между пациентами с различным содержанием hsCRP, однако корреляционный анализ позволил выявить различный характер взаимосвязей между показателями метаболизма липидов и функциональной активностью Th17. В подгруппе пациентов с СД 2-го типа и hsCRP < 5 мг/л содержание ТАГ коррелировало лишь с уровнем митоген-активированной секрецией IL-17 ($R=0,829$; $p=0,001$), в то время как в подгруппе с концентрацией hsCRP > 5 мг/л выявлена сильная взаимосвязь между содержанием ТАГ и спонтанной секрецией IL-17 ($R=0,800$; $p=0,005$) наряду с митоген-активированной секрецией данного цитокина ($R=0,900$; $p<0,001$). В группе пациентов с СД 2-го типа и hsCRP > 5 мг/л выявлена корреляционная связь средней силы между количеством IL-17+ Th17-лимфоцитов после стимуляции ФМА и соотношением окружности талии к объему бедер (ОТ/ОБ) ($R=0,698$; $p=0,012$), тогда как в группе пациентов с содержанием hsCRP < 5 мг/л данная взаимосвязь отсутствовала. Мы полагаем, что данное различие свидетельствует в пользу важной роли абдоминального ожирения в изменении функциональной активности Th17-лимфоцитов.

Таким образом, в соответствии с нашими результатами рост степени абдоминального ожирения и увеличение содержания hs-C-реактивного белка у пациентов АГ, ассоциированной с СД типа 2, сопровождаются активацией провоспалительных Т-лимфоцитов-хелперов и подавлением цитокиновых (секреция IL-10) и клеточных (содержание FoxP3+ Treg) иммунорегуляторных механизмов.

3.9.2. Особенности функционирования субпопуляций Т-лимфоцитов в зависимости от контроля гликемии при артериальной гипертензии, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа

Результаты корреляционного анализа показали, что в группе пациентов с СД 2-го типа содержание HbA1c положительно коррелировало с уровнем митоген-активированной секреции IL-17 ($R=0,624$; $p=0,003$) и количеством IFN- γ +Th1 в нестимулированной культуре клеток ($R=0,387$; $p=0,028$), при наличии отрицательных корреляционных связей с числом FoxP3+ Treg-лимфоцитов ($R=-0,408$; $p=0,011$) и соотношениями Treg/Th17 ($R=-0,365$; $p=0,018$), Treg/Th1 ($R=-0,521$; $p=0,002$ в отсутствии стимуляции и $R=-0,327$; $p=0,031$ при активации клеток). В группе здоровых добровольцев корреляционные взаимосвязи между уровнем HbA1c и параметрами, отражающими функциональное состояние различных субпопуляций Т-лимфоцитов-хелперов, отсутствовали.

Чтобы установить закономерности регуляции функциональной активности субпопуляций Т-лимфоцитов в зависимости от степени гликемического контроля, мы разделили группу диабетических пациентов на две подгруппы. В первую подгруппу вошли пациенты с содержанием гликозилированного гемоглобина (HbA1c) менее 7%; вторую подгруппу составили пациенты с СД 2-го типа, у которых контроль гликемии был недостаточно строгим. Были проанализированы клинические данные пациентов в обеих подгруппах. В подгруппе пациентов с недостаточным контролем гликемии значения индекса массы тела и окружности талии превышали таковые у пациентов с удовлетворительной компенсацией нарушений углеводного обмена (Таблица 16). При этом различий по таким параметрам как длительность СД, возраст пациентов, концентрация инсулина и С-пептида выявлено не было.

Клиническая характеристика пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, в зависимости от контроля гликемии, Me (Q₁ – Q₃)

Параметр	Пациенты с АГ+СД HbA1c<7,0% (n=12)	Пациенты с АГ+СД HbA1c>7,0% (n=23)	p
Возраст (лет)	59,0 (55,2 – 64,0)	57,0 (56,0 – 62,0)	
Продолжительность диабета (годы)	9,0 (1,0 – 10,0)	6,0 (2,0 – 12,0)	
Индекс массы тела (кг/м ²)	30,14 (27,66 – 31,91)	34,12 (31,17 – 35,52)	<0,001
Окружность талии (ОТ, см)	105,0 (96,0 – 108,0)	110,0 (103,0 – 117,0)	0,052
Инсулин (мкМЕ/мл)	13,91 (10,22 – 21,96)	13,36 (9,17 – 27,45)	
С-пептид (нг/мл)	2,39 (2,04 – 3,84)	2,92 (2,15 – 3,77)	
Индекс НОМА	3,51 (2,31 – 6,46)	5,17 (3,65 – 9,42)	0,003

Как представлено в таблице 17, у пациентов с HbA1c>7% мы выявили достоверно меньшее количество FoxP3+ Treg-лимфоцитов в циркуляции и тенденцию к увеличению содержания Th17- и Th1-лимфоцитов, при этом соотношение Treg/Th17 и Treg/Th1 было существенно снижено по сравнению с пациентами с удовлетворительным контролем гликемии.

Кроме того, в группе пациентов с неудовлетворительным контролем гликемии мы обнаружили увеличение спонтанной секреции IL-17 – основного цитокина, продуцируемого Th17-лимфоцитами (p=0,036), и тенденцию к увеличению его митоген-активированной секреции (p=0,069) (Рисунок 30).

Содержание различных субпопуляций Т-лимфоцитов в подгруппах пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, в зависимости от контроля гликемии, Ме (Q₁ – Q₃)

Параметр		Пациенты с АГ+СД HbA1c<7,0% (n=12)	Пациенты с АГ+СД HbA1c>7,0% (n=23)	р
FoxP3+ Treg, %		4,31 (2,96 – 4,52)	3,19 (2,51 – 3,72)	0,001
Нестимулированная культура клеток	Th17,%	0,10 (0,08 – 0,18)	0,15 (0,12 – 0,17)	
	Treg/Th17	27,8 (17,4 – 54,3)	12,8 (11,0 – 15,3)	0,001
	Th1,%	0,13 (0,02 – 0,14)	0,17 (0,10 – 0,25)	0,054
	Treg/Th1	32,9 (22,1 – 273,1)	16,6 (11,6 – 25,4)	0,002
Стимуляция ФМА+иономицин	Th17,%	0,74 (0,57 – 0,83)	0,94 (0,66 – 1,06)	0,057
	Treg/Th17	5,5 (3,6 – 9,6)	3,0 (2,5 – 4,5)	0,001
	Th1,%	14,15 (9,38 – 27,23)	18,9 (11,9 – 21,5)	
	Treg/Th1	0,3 (0,2 – 0,3)	0,2 (0,1 – 0,2)	0,033

Механизмы регуляции метаболизма глюкозы тесно переплетаются с механизмами поддержания сбалансированного иммунного ответа на различных уровнях [127, 180]. Показано, что Th17 являются особо чувствительной субпопуляцией Т-лимфоцитов – в отсутствии глюкозы в среде культивирования дифференцировка в направлении Th17 является невозможной. При этом Treg характеризуются низкой экспрессией как поверхностного белка-транспортера глюкозы Glut1, так и его внутриклеточной формы, и в качестве основного источника энергии используют не глюкозу, а липиды [180].

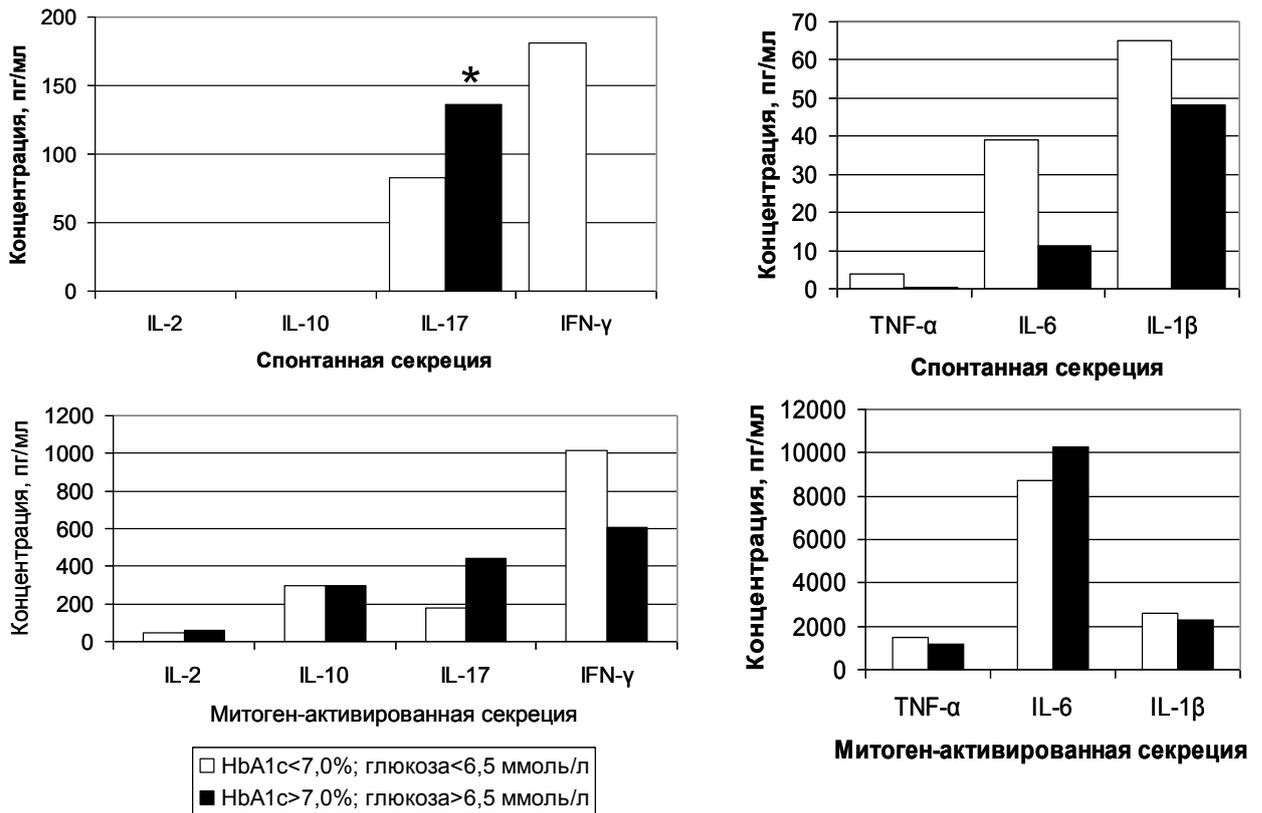


Рисунок 30. Секреция цитокинов в культуре клеток крови пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, в зависимости от контроля гликемии

Одним из механизмов, опосредующим связь неудовлетворительного контроля гликемии с иммунорегуляторным дисбалансом, согласно нашим данным, является абдоминальное ожирение. Так, пациенты с уровнем гликозилированного гемоглобина $>7\%$ демонстрировали более высокие значения окружности талии и, соответственно, более выраженную степень абдоминального ожирения, чем пациенты с удовлетворительным контролем гликемии (Таблица 16). Увеличение активности провоспалительных Т-хелперных субпопуляций при ожирении показано в экспериментальных исследованиях. У мышей с избыточной массой тела и инсулинорезистентностью провоспалительные Th1-лимфоциты преобладают в жировой ткани, в то время как ограничивающие силу иммунного ответа Т-регуляторные лимфоциты, экспрессирующие транскрипционный фактор FoxP3 (FoxP3⁺ Treg), отсутствуют. При искусственном введении животным Treg происходит подавление воспаления и восстановление чувствительности тканей к

инсулину [98]. В другом исследовании было показано, что у мышей с ожирением, индуцированным высококалорийной диетой, в селезенке обнаруживается большое количество Th17, обладающих мощным провоспалительным потенциалом [296].

Таким образом, обнаруженные нами нарушения механизмов иммунорегуляции у пациентов с СД 2-го типа соответствуют существующим представлениям о важной роли жировой ткани в модуляции воспаления и демонстрируют, что неудовлетворительный контроль гликемии у пациентов с сахарным диабетом и абдоминальным ожирением может оказывать непосредственное влияние на формирование дисбаланса субпопуляций CD4+ Т-лимфоцитов и способствовать активации провоспалительных Th1- и Th17-лимфоцитов.

Кроме того, мы показали, что пациенты с различным уровнем контроля гликемии отличаются по состоянию системы матриксных металлопротеиназ. В группе пациентов с содержанием HbA1c > 7,0% концентрация MMP-9 и TIMP-1 были достоверно выше, чем у пациентов с удовлетворительной компенсацией углеводного обмена (Таблица 18). При этом соотношение TIMP-1/MMP-9 у пациентов с неудовлетворительным контролем гликемии было снижено (Таблица 18). Мы не выявили различий по концентрации MMP-2 в исследуемых подгруппах пациентов с СД 2-го типа, однако, соотношение TIMP-1/MMP-2 было выше у пациентов с содержанием HbA1c > 7% (Таблица 18).

MMP-2 в норме способствует дифференцировке адипоцитов. В ходе образования зрелых адипоцитов из клеток-предшественников экспрессия данной желатиназы увеличивается, в то время как экспрессия TIMP-1 уменьшается [57, 154]. Показано, что при ожирении увеличивается количество мРНК TIMP-1 в висцеральной жировой ткани, а содержание TIMP-1 в сыворотке коррелирует с индексом инсулинорезистентности НОМА [179]. Таким образом, увеличение концентрации TIMP-1 и степени его ингибирования матриксной металлопротеиназы-2 создает благоприятные условия для направления адипогенеза по гипертрофическому типу (образование больших

инсулинорезистентных жировых клеток), в противоположность гиперпластическому типу, при котором жировые клетки образуются de novo из клеток-предшественников, находящихся в стромально-сосудистой фракции жировой ткани [179].

Таблица 18

Параметры системы матриксных металлопротеиназ в подгруппах пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, в зависимости от контроля гликемии, Me ($Q_1 - Q_3$)

Параметр	Пациенты с АГ+СД HbA1c<7,0% (n=12)	Пациенты с АГ+СД HbA1c>7,0% (n=23)	p
ММР-9, нг/мл	415,0 (285,7 – 480,7)	581,8 (400,7 – 727,8)	0,001
ММР-2, нг/мл	215,4 (203,6 – 251,0)	212,0 (198,7 – 248,4)	
ТМР-1, нг/мл	594,8 (528,0 – 725,3)	678,0 (598,5 – 730,5)	0,021
ТМР-1/ММР-9	1,54 (1,27 – 2,23)	1,21 (1,01 – 1,40)	0,003
ТМР-1/ММР-2	2,72 (2,32 – 3,19)	3,15 (2,76 – 3,58)	0,031

Несмотря на то, что ММР-9 и ММР-2 относятся к одному классу металлопротеиназ (желатиназы) и имеют одинаковую субстратную специфичность, показано, что их экспрессия может быть различной в зависимости от тканевой локализации и патологического состояния [292, 304]. У мышей с диабетом наблюдалось увеличение содержания ММР-9 в сосудистой стенке и периферической крови, в то время как концентрация ММР-2 оставалась неизменной [272].

Результаты многих исследований свидетельствуют о важной роли ММР-9 в процессе атерогенеза [41, 141, 200, 264, 304].

В группе пациентов с СД 2-го типа мы обнаружили умеренную корреляционную взаимосвязь между концентрацией ММР-9 и толщиной

комплекса «интима-медиа» (КИМ) справа ($R=0,380$; $p=0,038$). Коэффициент ингибирования по MMP-9 (соотношение TIMP-1/MMP-9) отрицательно коррелировал с толщиной КИМ справа и слева ($R=-0,463$; $p=0,010$ и $R=-0,387$; $p=0,034$, соответственно). При этом содержание FoxP3+ T-регуляторных лимфоцитов у пациентов с СД 2-го типа было отрицательно связано с концентрацией MMP-9 ($R=-0,499$; $p=0,001$) и положительно – с коэффициентом ингибирования данной металлопротеиназы ($R=0,517$; $p<0,001$).

Медиана содержания MMP-9 в группе пациентов с СД 2-го типа с неудовлетворительным контролем гликемии составила 581,8 нг/мл (Таблица 18). Для того чтобы более подробно охарактеризовать взаимосвязь между ремоделированием сонных артерий и содержанием MMP-9, мы выделили среди всех пациентов с СД 2-го типа и содержанием $HbA1c>7\%$ две подгруппы в зависимости от сывороточного содержания MMP-9. В первую подгруппу вошли пациенты с концентрацией MMP-9 <600 нг/мл ($n=12$), во вторую – пациенты с концентрацией MMP-9 >600 нг/мл ($n=11$) (Рисунок 31).

Клинико-метаболические параметры у пациентов с СД 2-го типа и неудовлетворительным контролем гликемии при различном содержании MMP-9 не различались (Таблица 19).

При этом у пациентов с СД 2-го типа с повышенным содержанием MMP-9 в циркуляции (>600 нг/мл) достоверно чаще выявлялось утолщение КИМ общей сонной артерии по сравнению с пациентами с СД 2-го типа и концентрацией MMP-9 <600 нг/мл. У большинства пациентов с СД 2-го типа обеих подгрупп стенозирования сонных артерий выявлено не было (Таблица 20).

Анализ иммунологических параметров, характеризующих особенности функционирования T-лимфоцитов, показал снижение содержания FoxP3+ T-регуляторных лимфоцитов, соотношения Treg/Th17 в нестимулированной культуре и после стимуляции, а также уменьшение уровня митоген-активированной секреции IL-10 у пациентов с более высокими концентрациями MMP-9 на фоне неудовлетворительного контроля гликемии (Рисунок 32).

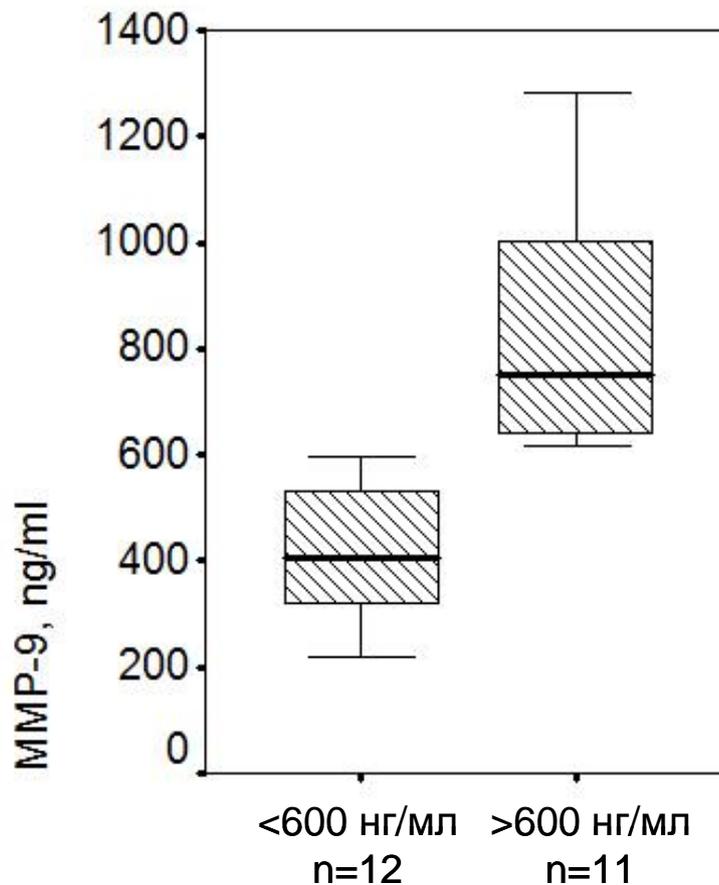


Рисунок 31. Подгруппы больных артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, с неудовлетворительным контролем гликемии и различным содержанием MMP-9 в сыворотке

Механизмы, объясняющие взаимосвязь между повышением активности MMP-9 и ремоделированием стенок артерий, до сих пор являются спорными. Ряд авторов объясняют увеличение экспрессии MMP-9 как эпифеномен, свидетельствующий об аккумуляции макрофагов в нестабильной бляшке. Однако у мышей, нокаутных по гену MMP-9, количество макрофагов в атеросклеротических бляшках было сниженным, что указывает на возможную роль данной желатиназы в процессах миграции и активации макрофагов [47].

Клинико-метаболическая характеристика больных артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, с неудовлетворительным контролем гликемии и различной концентрацией ММР-9, Me (Q₁ – Q₃)

Параметр	Подгруппа 1 (ММР-9<600 нг/мл) (n=12)	Подгруппа 2 (ММР-9>600 нг/мл) (n=11)	p
Длительность АГ, лет	9,0 (3,0 – 14,0)	11,0 (0,5 – 15,0)	>0,05
Длительность СД 2-го типа, лет	11,0 (1,0 – 14,0)	4,0 (2,3 – 9,4)	>0,05
Индекс массы тела	34,12 (30,12 – 35,52)	33,43 (31,48 – 36,67)	>0,05
Объем талии (ОТ), см	107,5 (103,0 – 120,0)	114,0 (103,0 – 117,0)	>0,05
Глюкоза натощак, мМ	8,47 (7,60 – 10,63)	9,08 (6,70 – 9,85)	>0,05
НbA1c, %	9,10 (8,30 – 13,71)	8,69 (7,96 – 9,26)	>0,05
Инсулин, мкМЕ/мл	14,42 (9,86 – 27,93)	10,26 (9,12 – 21,52)	>0,05
Индекс НОМА	7,1 (3,9 – 11,2)	4,4 (3,4 – 9,4)	>0,05
ОХС, мМ	5,97 (5,01 – 6,64)	5,17 (4,26 – 5,90)	>0,05
ТАГ, мМ	2,40 (2,05 – 3,08)	2,27 (1,23 – 3,05)	>0,05
ЛПНП, мМ	3,55 (3,08 – 4,36)	3,14 (2,21 – 4,12)	>0,05
ЛПВП, мМ	1,01 (0,83 – 1,31)	1,08 (0,92 – 1,33)	>0,05
ЛПНП/ЛПВП	3,69 (2,35 – 4,48)	3,06 (1,67 – 5,98)	>0,05

Примечание: p - уровень значимости различий между подгруппами

Частота встречаемости структурных изменений общих сонных артерий у больных артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, с неудовлетворительным контролем гликемии и различной концентрацией ММР-9

Подгруппы	Атеросклеротические бляшки		Утолщение комплекса интима- медиа общей сонной артерии	
	есть	нет	есть	нет
Подгруппа 1 (ММР-9<600 нг/мл) (n=12)	0 (0%)	12 (100%)	5 (41,7%)	7 (58,3%)
Подгруппа 2 (ММР-9>600 нг/мл) (n=11)	3 (27,3%)	8 (72,7%)	9 (81,8%) p=0,046	2 (18,2%)

Примечание: p - уровень значимости различий частот встречаемости изменений между подгруппами

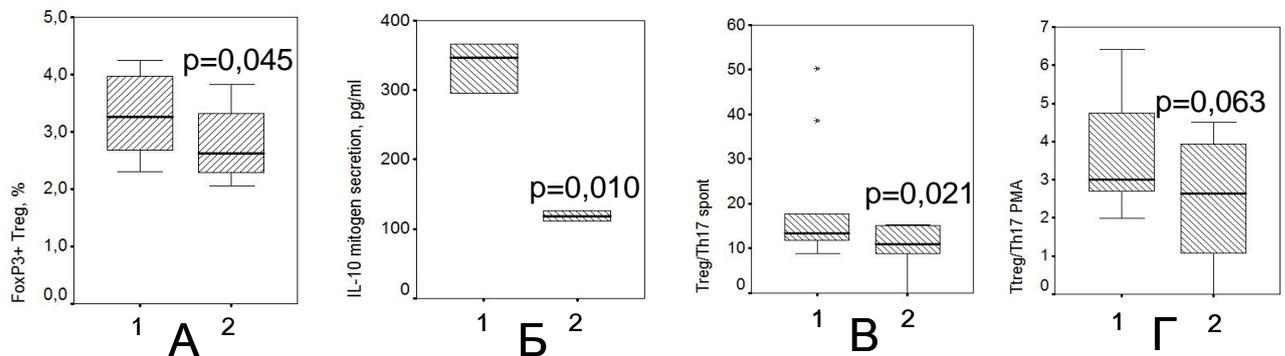


Рисунок 32. Изменение иммунорегуляторных параметров у больных артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, с неудовлетворительным контролем гликемии и различным содержанием ММР-9

Примечание: 1 – пациенты с ММР-9<600 нг/мл; 2 – пациенты с ММР-9>600 нг/мл; А – содержание FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов; Б – содержание IL-10 в супернатантах митоген-активированных культур; В – соотношение Treg/Th17 в нестимулированной культуре; Г – соотношение Treg/Th17 после активации ФМА+иономицин

Кроме того, показано, что на ранних этапах атерогенеза при утолщении стенки сосуда в интима обнаруживается лишь небольшое количество макрофагов [189]. В нашем исследовании увеличение концентрации ММР-9 наблюдалось уже

при утолщении комплекса «интима-медиа»; лишь у небольшого числа пациентов были выявлены бляшки в сонных артериях (Таблица 20), при этом процент стенозирования сосуда не превышал 35%.

ММР-9 присутствует в стенке сосуда на всех этапах атерогенеза – от нормальной ткани до выраженных изменений стенки сосуда. Она не является лишь специфическим индикатором дестабилизации бляшки, но, наиболее вероятно, участвует во всех этапах ремоделирования внеклеточного матрикса [47]. На мышинной модели $Ldlr^{-/-} ApoB^{100/100}$ было показано, что ММР-9 задействована на ранних этапах атерогенеза, несмотря на то, что протеолитическая активность в стенке сосудов в это время невысока. Металлопротеиназы регулируют процессы миграции, пролиферации и апоптоза гладкомышечных клеток. При этом активация ММР-9 наблюдалась до миграции моноцитов и образования бляшек, уже на этапе аккумуляции липидов в стенке сосуда [280]. По некоторым данным ММР-9 играет защитную роль в процессе атерогенеза, способствуя стабилизации бляшек. Однако данные результаты были получены на мышинных моделях и пока не были подтверждены в клинических исследованиях [132].

В исследованиях *in vitro* было установлено, что при культивировании эндотелиальных клеток быка в условиях с повышенной концентрацией глюкозы возрастала экспрессия белка и мРНК ММР-9, наряду с увеличением ее активности, однако при этом продукция ММР-9 макрофагами и гладкомышечными клетками оставалась неизменной [272].

ММР-9 наряду с ММР-13 обладает способностью увеличивать продукцию TGF- β [231]. L. Lu et al (2013) обнаружили, что под влиянием ММР-9 наблюдается увеличение активности FoxP3⁺ Treg в печени, для которых TGF- β является фактором дифференцировки [163]. Однако в нашей работе у пациентов с повышенным содержанием ММР-9 количество FoxP3⁺ Treg было снижено и ассоциировалось со снижением ингибирования Th17-лимфоцитов (Рисунок 32). Можно предположить, что при неудовлетворительном контроле гликемии у пациентов с СД 2-го типа создаются благоприятные условия для увеличения

продукции ММР-9, способствующей в условиях провоспалительного микроокружения активации Th17-лимфоцитов, для которых TGF- β также является фактором роста, если его воздействие сочетается с ИЛ-6. В дальнейшем может формироваться порочный круг, при котором повышение секреции ИЛ-17 и снижение эффективности иммуносупрессорных механизмов приводит к еще большей стимуляции синтеза ММР-9, что ассоциируется с ремоделированием стенок артерий.

Таким образом, в ходе исследования мы показали, что при неудовлетворительном контроле гликемии наблюдается активация субпопуляций лимфоцитов с провоспалительной активностью и снижение содержания FoxP3+ T-регуляторных лимфоцитов. При увеличении концентрации ММР-9 (выше 600 нг/мл) данные изменения сопровождаются утолщением комплекса интима-медиа сонных артерий.

3.9.3. Изменение функциональной активности Т-лимфоцитов в зависимости от степени инсулинорезистентности

Инсулинорезистентность является центральным звеном, связывающим воспаление и ожирение с развитием метаболических нарушений при СД 2-го типа [198, 247, 253]. Имеются данные, что гиперинсулинемия, наблюдаемая при снижении чувствительности тканей к инсулину, является не только компенсаторным механизмом, но также способствует поддержанию, усугублению и, в некоторых случаях, инициации инсулинорезистентности [247]. В то же время, показано, что инсулин обладает иммунорегуляторными свойствами [277]. В подгруппах пациентов с различным состоянием контроля гликемии мы не обнаружили различий по уровню гиперинсулинемии, хотя индекс инсулинорезистентности НОМА был выше у пациентов с декомпенсацией углеводного обмена (Таблица 16).

Методом кластерного анализа среди пациентов с СД 2-го типа мы выделили две подгруппы, отличающиеся разной степенью инсулинорезистентности в

соответствии с величиной индекса НОМА: в первой подгруппе индекс НОМА варьировал от 1,0 до 6,9 (n=19), во второй подгруппе – от 8,6 до 17,9 (n=13). У пациентов второй подгруппы имели место не только более выраженные степени абдоминального ожирения и гипергликемии, но и достоверно более высокий уровень гиперинсулинемии (Таблица 21).

Таблица 21

Клиническая характеристика пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, в зависимости от степени инсулинорезистентности, Me (Q₁ – Q₃)

Параметр	Индекс НОМА 1,0 – 6,9 (n=19)	Индекс НОМА 8,6 – 17,9 (n=13)	p
Возраст (лет)	57,0 (56,0 – 61,5)	60,0 (56,0 – 63,0)	
Продолжительность диабета (годы)	9,0 (2,5 – 12,0)	4,5 (0,88 – 10,25)	
Индекс массы тела (кг/м ²)	31,61 (29,40 – 32,82)	35,33 (34,08 – 40,30)	0,001
Окружность талии (ОТ, см)	106,0 (96,0 – 109,0)	114,0 (108,5 – 121,0)	0,008
Инсулин (мкМЕ/мл)	10,39 (9,14 – 15,09)	29,64 (25,53 – 36,03)	<0,001
С-пептид (нг/мл)	2,25 (2,00 – 3,17)	4,02 (1,19 – 4,76)	<0,001
Глюкоза натощак (ммМ)	6,8 (5,8 – 9,0)	8,6 (7,0 – 11,1)	0,020
НbA1c (%)	6,90 (5,78 – 8,98)	8,94 (7,39 – 12,60)	0,039
Индекс НОМА	3,63 (2,79 – 4,76)	10,45 (9,19 – 13,12)	<0,001

Мы оценили особенности функционирования субпопуляций Т-лимфоцитов в зависимости от степени повышения индекса НОМА и, соответственно, выраженности гиперинсулинемии.

Так, подгруппа пациентов с наиболее высокими значениями индекса НОМА и гиперинсулинемией характеризовалась увеличением количества IFN- γ + Th1-лимфоцитов после стимуляции ФМА, увеличением спонтанной и митоген-

активированной секреции IL-17 наряду с возрастанием митоген-активированной секреции IL-2 и IL-1 β (Таблица 22; Рисунок 33). Известно, что IL-2 и IL-1 β являются ключевыми цитокинами в процессе дифференцировки Th1 и Th17, соответственно [30].

Таблица 22

Содержание различных субпопуляций Т-лимфоцитов в подгруппах пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, в зависимости от степени инсулинорезистентности, Me (Q₁ – Q₃)

Параметр		Индекс НОМА 1,0 – 6,9 (n=19)	Индекс НОМА 8,6 – 17,9 (n=13)	p
FoxP3+ Treg, %		2,96 (2,62 – 4,24)	3,50 (2,57 – 4,04)	
Нестимулированная культура клеток	Th17,%	0,14 (0,10 – 0,17)	0,16 (0,09 – 0,25)	
	Th1,%	0,13 (0,02 – 0,20)	0,16 (0,12 – 0,24)	
Стимуляция ФМА+иономицин	Th17,%	0,83 (0,62 – 1,04)	0,77 (0,63 – 1,01)	
	Th1,%	14,15 (9,46 – 19,19)	21,41 (16,88 – 28,52)	0,033

Кроме того, при более высоких значениях НОМА у пациентов с СД 2-го типа мы выявили положительные корреляционные взаимосвязи между количеством IL17+ Th17 после активации и концентрацией инсулина ($R=0,544$; $p=0,020$) и С-пептида ($R=0,644$; $p=0,004$), в то время как число FoxP3+ Treg-лимфоцитов обратно коррелировало с содержанием С-пептида в крови ($R=-0,683$; $p=0,002$).

Согласно данным A. Viardot et al. (2012), наличие ожирения ассоциируется со снижением чувствительности клеток иммунной системы к регуляторному влиянию инсулина [277], Авторы также показали, что инсулин направляет дифференцировку клеток по пути Th2-лимфоцитов, обладающих антагонистическими свойствами по отношению к Th1 [277]. Таким образом, в

условиях инсулинорезистентности Th1-клетки получают преимущество в развитии, что вносит вклад в формирование системного воспаления.

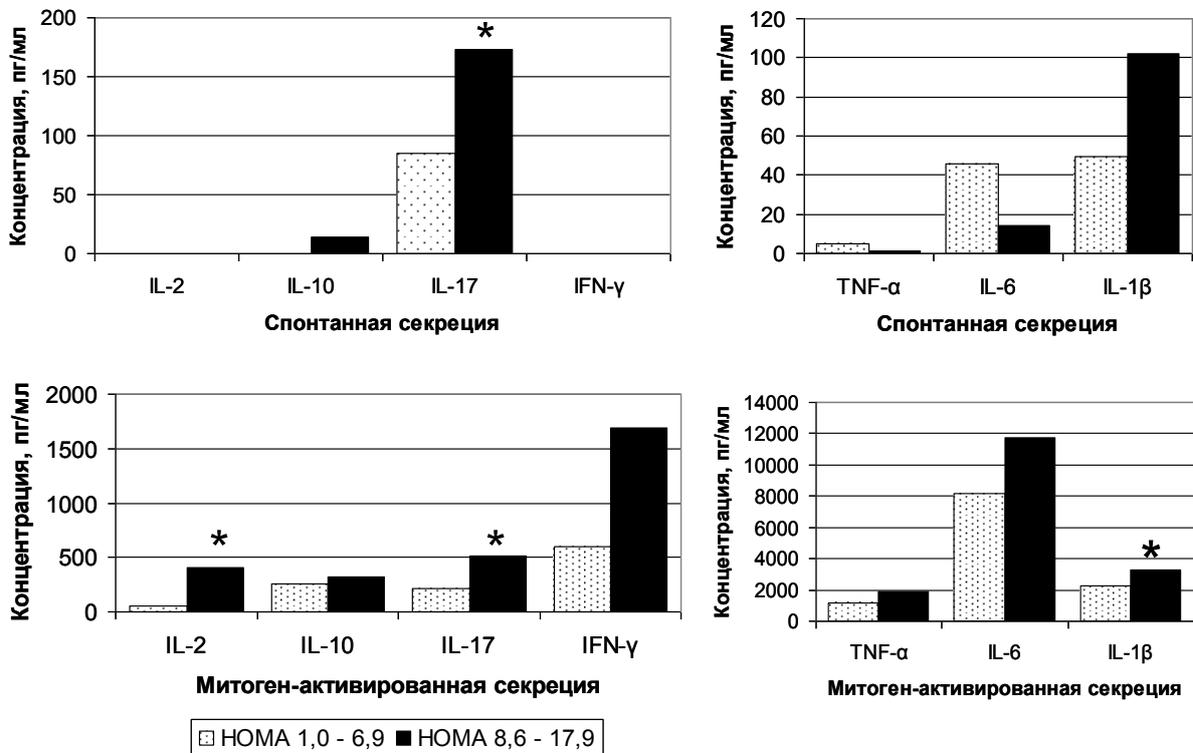


Рисунок 33. Секреция цитокинов в культуре клеток крови у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, в зависимости от степени инсулинорезистентности

Кроме того, в условиях гиперинсулинемии происходит ингибирование T-регуляторных лимфоцитов, а именно – снижение выработки IL-10, что также способствует созданию условий для активации T-хелперных субпопуляций с провоспалительной активностью [114]. В нашем исследовании мы не выявили различий по содержанию FoxP3+ Treg-лимфоцитов у пациентов с различной степенью инсулинорезистентности. Однако не исключено, что гиперинсулинемия на фоне снижения чувствительности к инсулину оказывает влияние на функциональную активность Treg, снижая эффективность ингибирования субпопуляций T-лимфоцитов с провоспалительной активностью.

Ретроспективно мы оценили, какое влияние на функциональную активность Т-лимфоцитов могла оказать терапия, направленная на повышение чувствительности тканей к инсулину. Было выявлено, что пациенты, получающие метформин, характеризовались меньшим содержанием IFN- γ + Th1-лимфоцитов после стимуляции ФМА в сочетании с иономицином (Рисунок 34).

Метформин, помимо снижения всасывания глюкозы, приводит к увеличению белков-транспортеров глюкозы Glut4, и, таким образом, способствует повышению чувствительности тканей к инсулину [15]. Ранее на модели экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ) N. Math et al. (2009) показали, что назначение животным метформина приводит к снижению продукции IFN- γ , IL-17 и других провоспалительных цитокинов [190].

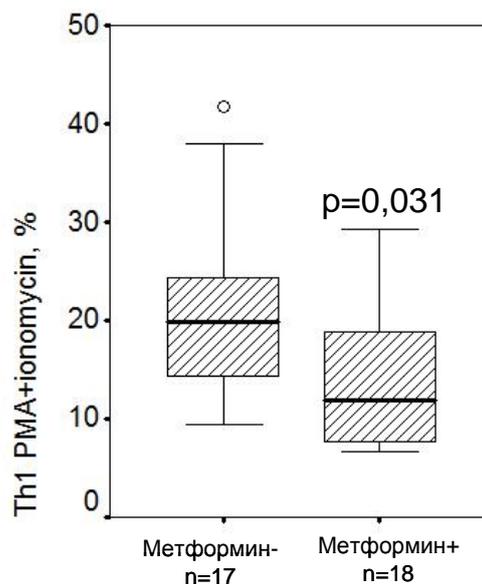


Рисунок 34. Относительное содержание Th1-лимфоцитов в крови пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, в зависимости от типа сахароснижающей терапии

Следует учитывать, что основное иммуномодулирующее влияние может оказывать именно сочетание препаратов различных классов. Так, комбинация метформина с ловастатином позволяла добиться наиболее выраженного эффекта при лечении ЭАЭ у мышей, в том числе за счет переключения дифференцировки Т-лимфоцитов с Th1- на Th2-фенотип [203]. Несколько пациентов в нашем

исследовании также получали метформин в сочетании с неинтенсивными дозами статинов, однако небольшой объем выборки и дизайн исследования на данном этапе не позволил сделать окончательных выводов относительно влияния терапии на функциональную активность Th1- и Th17-лимфоцитов.

Таким образом, результаты, полученные в нашей работе, указывают на то, что у пациентов с выраженной гиперинсулинемией абдоминальное ожирение и гипергликемия ассоциируются не только с активацией Th1, но и с увеличением секреторной активности Th17-лимфоцитов. Перспективным является дальнейшее изучение взаимосвязи хронического воспаления с нарушениями углеводного обмена и возможности более эффективной коррекции иммунорегуляторного дисбаланса с помощью воздействий, направленных на повышение периферической чувствительности к инсулину.

3.10. Влияние различных концентраций глюкозы и инсулина на функциональную активность Th17-лимфоцитов *in vitro*

Данные корреляционного и регрессионного анализа позволяют предположить, что инсулин и глюкоза могут выступать в роли модуляторов активности Th17 при СД 2-го типа и влиять на увеличение их функциональной активности.

Следующим шагом нашего исследования стала оценка влияния различных концентраций инсулина и глюкозы на функционирование Th17. Для этого *in vitro* были созданы условия культивирования, отличающиеся по содержанию инсулина и глюкозы. Мы культивировали мононуклеары периферической крови здоровых добровольцев и пациентов с СД 2-го типа в течение 24 ч, а затем оценивали количество CD4+-клеток, внутриклеточно продуцирующих IL-17, и секрецию цитокинов, контролирурующих основные направления иммунных ответов.

После инкубации клеток в течение 24 ч в среде с содержанием глюкозы 5 мМ мы обнаружили, что процент Т-клеток, внутриклеточно продуцирующих IL-17 спонтанно и после стимуляции ФМА с иономицином, был значительно выше у

пациентов с СД 2-го типа по сравнению с контрольной группой (Рисунок 35; рисунок 36).

Инкубация мононуклеаров здоровых добровольцев в среде с концентрацией глюкозы 10 мМ и 20 мМ привела к увеличению клеток со спонтанной внутриклеточной продукцией IL-17 по сравнению с концентрацией глюкозы в среде 5 мМ ($p=0,010$ и $p=0,002$, соответственно; рисунок 35А; рисунок 36). У пациентов с СД 2-го типа стимулирующий эффект в отношении клеток, способных к спонтанной внутриклеточной продукции IL-17, оказало только увеличение концентрации глюкозы в среде до 10 мМ ($p=0,044$; рисунок 35А).

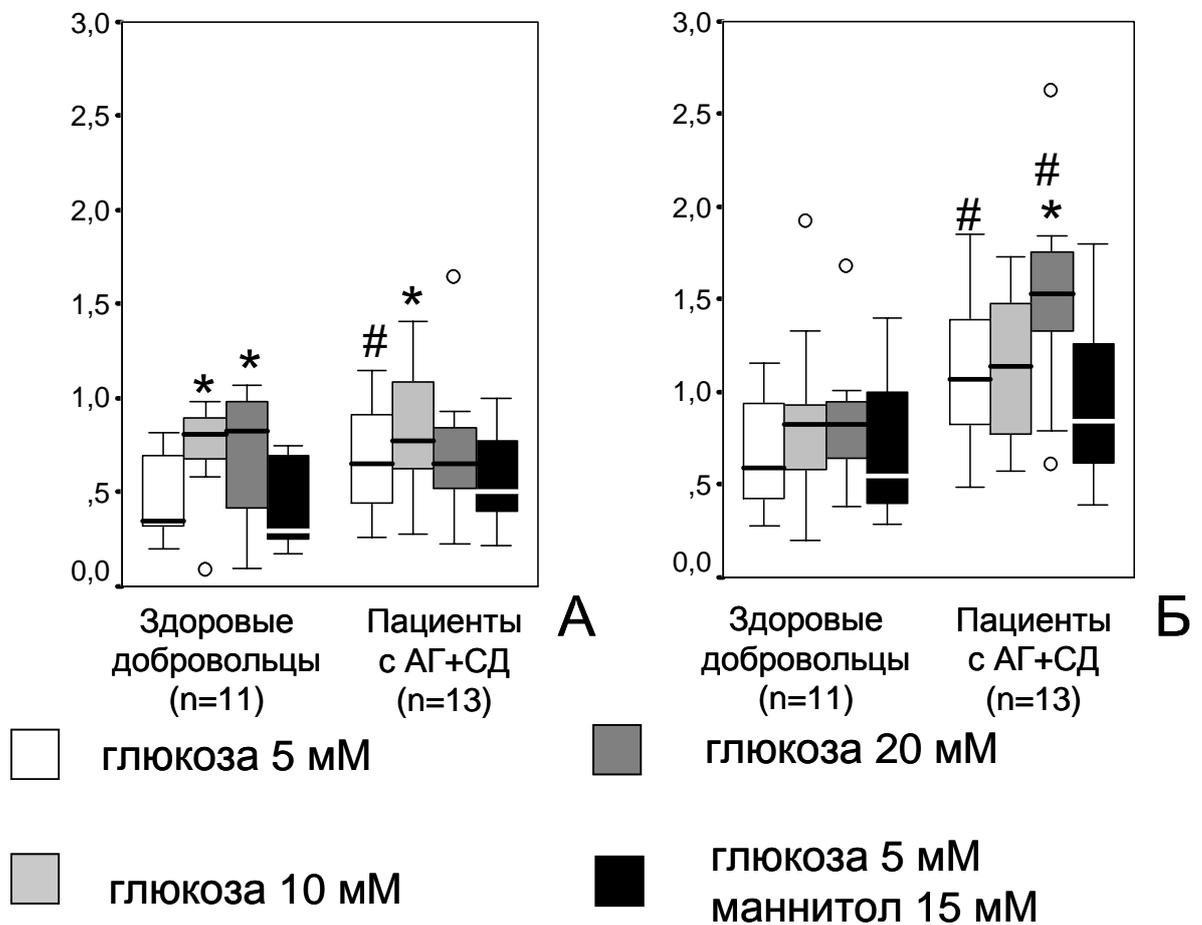


Рисунок 35. Влияние различных концентраций глюкозы на способность CD4+-лимфоцитов к внутриклеточной продукции IL-17

Примечание: здесь и далее на рисунке 37 указано относительное содержание IL-17+ Th17 в интактных (А) и стимулированных ФМА с иономицином (Б) культурах мононуклеаров крови; * - статистически значимые различия ($p<0,05$) по сравнению с концентрацией глюкозы в среде 5 мМ; # - статистически значимые различия ($p<0,05$) по сравнению с группой здоровых добровольцев; ° - экстремумы

При содержании глюкозы в среде 20 мМ последующая стимуляция мононуклеаров периферической крови ФМА с иономицином у пациентов с СД 2-го типа приводила к более выраженному увеличению содержания цитокин-продуцирующих Th17-клеток по сравнению с 5 мМ глюкозы ($p=0,001$; рисунок 35Б; рисунок 36).

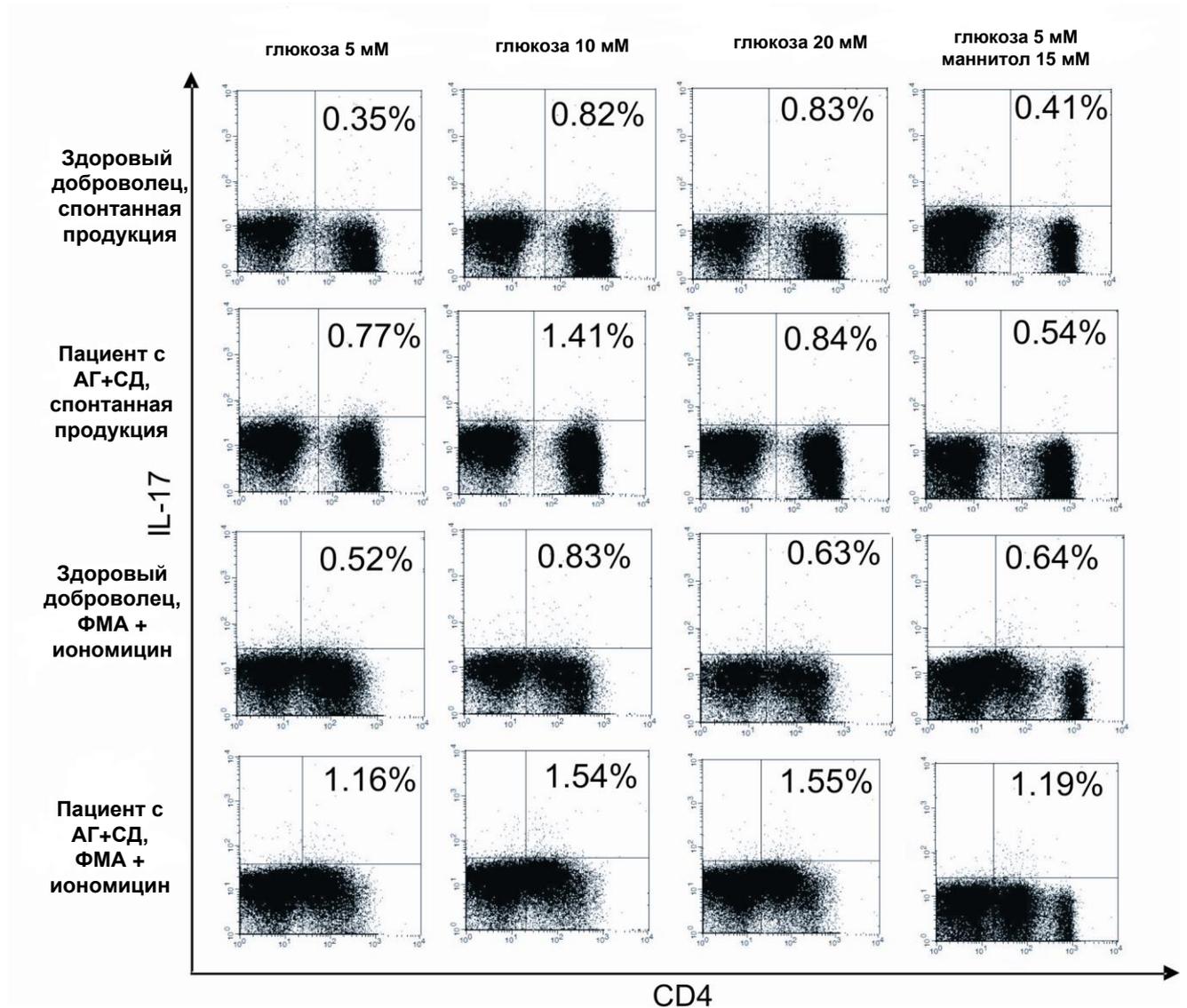


Рисунок 36. Примеры точечных диаграмм, отражающих относительное количество внутриклеточно продуцирующих IL-17 CD4⁺ Т-лимфоцитов во фракции мононуклеаров периферической крови здоровых добровольцев ($n=11$) и пациентов с артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2-го типа ($n=13$) при различных концентрациях глюкозы *in vitro* (указан процент клеток от общего числа CD4⁺-лимфоцитов)

В группе здоровых добровольцев процент Th17, активированных к продукции IL-17 после стимуляции ФМА с иономицином, достоверно не различался при различном содержании глюкозы в среде (Рисунок 35А).

Инкубация с D-маннитолом не приводила к изменению количества клеток, способных к внутриклеточной продукции IL-17, как в группе пациентов с СД 2-го типа, так и в группе здоровых добровольцев (Рисунок 35). Следовательно, наблюдаемое изменение продукции цитокинов связано именно с воздействием глюкозы, а не с изменением осмолярности среды.

Глюкоза является основным источником энергии для лимфоцитов. В состоянии покоя она метаболизируется по пути окислительного фосфорилирования. Но при активации лимфоцитов происходит переключение метаболизма глюкозы на аэробный гликолиз [169]. Причем активные процессы поглощения глюкозы и гликолиза являются маркерной чертой именно CD4⁺ Т-эффекторных лимфоцитов, в то время как в Т-регуляторных лимфоцитах основным источником энергии является окисление липидов [180]. Имеются данные, что при культивировании в безглюкозной среде, Т-лимфоциты не продуцировали IL-17, несмотря на стимуляцию поляризующими цитокинами - TGF- β и IL-6, что свидетельствует об особой зависимости популяции Th17 от глюкозы [180].

В нормальных условиях лимфоциты экспрессируют только транспортеры глюкозы Glut-1 и Glut-3 [63, 263]. При СД 2-го типа на поверхности лимфоцитов появляется Glut-4 и изменяется экспрессия других транспортеров глюкозы [263]. Вероятно, этим, отчасти, может быть обусловлен несколько различный ответ клеток пациентов и здоровых добровольцев на изменение содержания глюкозы в среде культивирования. Увеличение внутриклеточной продукции IL-17 могло быть опосредовано как непосредственным влиянием глюкозы на Th17, так и модуляцией продукции других цитокинов, которые способны изменять функциональную активность Th17.

Мы обнаружили, что добавление глюкозы *in vitro* в концентрации 20 мМ приводит к значительному увеличению секреции TNF- α как мононуклеарами

здоровых добровольцев, так и пациентов с СД 2-го типа (Таблицы 23, 24). Полученные данные согласуются с результатами исследований, проведенных Y. Gonzalez et al. (2012), согласно которым высокие концентрации глюкозы являются мощным стимулом к продукции и секреции TNF- α [111].

Секреция IL-23 в группе здоровых добровольцев была выше при концентрации глюкозы в среде 20 мМ по сравнению с 5 мМ (Таблица 23). Также в группе здоровых добровольцев было выявлено возрастание секреции TGF- β при увеличении концентрации глюкозы *in vitro* до 10 мМ (Таблица 23).

Известно, что присутствие в среде IL-23 и TGF- β является фактором, необходимым для стимуляции дифференцировки Th17 [32, 42, 278]. Поэтому не исключено, что повышенные концентрации глюкозы в среде, в первую очередь, оказывают влияние на макрофаги и дендритные клетки, которые, в дальнейшем, секретируют цитокины, необходимые для активации внутриклеточной продукции IL-17. В пользу данной гипотезы свидетельствуют и результаты, полученные M. Jagannathan-Bogdan et al. (2011), которые показали, что для успешного функционирования Th17 присутствие моноцитов в микроокружении является необходимым условием [128].

В группе пациентов с СД 2-го типа содержание IL-23 и TGF- β в супернатантах суточных культур достоверно не различалось при изменении концентрации глюкозы в среде (Таблица 24). Вероятно, это обусловлено тем, что мононуклеары подвергались гипергликемии, еще находясь в системной циркуляции, и оказались инертными к дополнительному воздействию высоких концентраций глюкозы *in vitro*. Следует также отметить, что повышенная осмолярность среды оказала влияние на секрецию цитокинов в клетках пациентов с СД 2-го типа, о чем свидетельствует снижение секреции IL-6 и IL-10 при добавлении 15 мМ D-маннитола в клеточную культуру (Таблица 24).

Влияние различных концентраций глюкозы на секрецию цитокинов
 мононуклеарами периферической крови здоровых добровольцев (n=11),
 Me (Q₁ – Q₃)

Показатель	глюкоза 5 мМ	глюкоза 10 мМ	глюкоза 20 мМ	глюкоза 5 мМ + маннитол 15 мМ
IL-17A, пг/мл (ИФА)	2,06 (0,84 – 2,21)	2,17 (1,61 – 3,00)	1,70 (1,05 – 2,13)	2,01 (1,75 – 2,17)
IL-17A, пг/мл (мультиплексный анализ)	0 (0 – 10,68)	0 (0 – 37,47)	0 (0 – 2,02)	0 (0 – 29,57)
IL-23, пг/мл	10,95 (5,85 – 14,43)	15,04 (7,60 – 21,11)	19,56 (7,65 – 42 - 51) p=0,023	10,14 (5,12 – 13,58)
TGF-β, пг/мл	916,71 (594,50 – 1335,93)	1064,02 (758,94 – 1363,60) p=0,023	1025,30 (638,69 – 1371,51)	985,56 (503,61 – 1229,60)
IL-6, пг/мл	1923,10 (1102,81 – 7471,73)	3576,24 (873,61 – 7201,32)	4267,70 (1671,91 – 8436,87)	3074,11 (1011,52 – 6224,23)
IL-10, пг/мл	2,64 (0,69 – 6,11)	9,99 (1,59 – 28,77)	2,60 (0,59 – 17,12)	3,63 (2,39 – 21,29)
TNF-α, пг/мл	30,94 (8,50 – 224,5)	37,95 (11,11 – 187,08)	166,06 (10,05 – 328,68) p=0,001	128,26 (42,02 – 377,13)
IFN-γ, пг/мл	0	0 (0 – 2,68)	0 (0 – 0,45)	0,14 (0 – 1,31)
IL-2, пг/мл	0	0	0	0 (0 – 0,16)
IL-4, пг/мл	0 (0 – 0,56)	0 (0 – 0,12)	0,01 (0 – 0,55)	0 (0 – 0,74)

Примечание: p - уровень значимости различий по сравнению с концентрацией глюкозы в среде 5 мМ

Влияние различных концентраций глюкозы на секрецию цитокинов мононуклеарами периферической крови пациентов с артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2-го типа (n=13), Ме (Q₁ – Q₃)

Показатель	глюкоза 5 мМ	глюкоза 10 мМ	глюкоза 20 мМ	глюкоза 5 мМ + маннитол 15 мМ
IL-17A, пг/мл (ИФА)	1,72 (1,41 – 2,36)	2,43 (1,71 – 2,91)	1,94 (1,29 – 2,44)	2,37 (2,24 – 2,59)
IL-17A, пг/мл (мультиплексный анализ)	1,19 (0 – 10,57)	3,84 (0 – 14,98)	2,42 (0- 10,87)	0,20 (0 – 26,26)
IL-23, пг/мл	9,31 (5,21 – 21,70)	7,40 (3,15 – 21,50)	8,95 (5,11 – 24,94)	7,23 (5,09 – 19,87)
TGF-β, пг/мл	897,61 (837,03–974,86)	832,32 (679,04–1042,52)	812,51 (729,52–954,53)	448,45 (321,31–850,61)
IL-6, пг/мл	1482,01 (476,92– 7697,23)	1031,91 (423,87–7840,90)	575,10 (680,76– 8072,81)	266,70 (148,81–1688,93) p=0,036
IL-10, пг/мл	5,14 (0,24 – 18,87)	1,00 (0,09 – 14,15)	4,42 (0,55 – 16,51)	0 (0 – 2,11) p=0,035
TNF-α, пг/мл	45,69 (4,36 – 113,03)	76,61 (13,58 – 118,94)	93,03 (18,10 – 182,25) p=0,021	15,66 (11,19 – 73,34)
IFN-γ, пг/мл	0 (0 – 0,38)	0 (0 – 0,09)	0 (0 – 0,30)	0 (0 – 0,74)
IL-2, пг/мл	0	0	0	0
IL-4, пг/мл	0,25 (0 – 0,62)	0 (0 – 0,45)	0,14 (0 – 0,29)	0,28 (0 – 0,62)

Примечание: p - уровень значимости различий по сравнению с концентрацией глюкозы в среде 5 мМ

В связи с тем, что для пациентов с СД 2-го типа было характерно увеличение концентрации IL-17 в сыворотке крови и увеличение внутриклеточной продукции IL-17 по сравнению с группой здоровых

добровольцев, мы ожидали обнаружить увеличение секреции данного цитокина в среде культивирования. Однако содержание IL-17 в культуральной среде было низким и граничило с пределами чувствительности используемых нами методов определения (18,9 пг/мл для мультиплексного анализа; 2 пг/мл для ИФА) как у здоровых добровольцев, так и у пациентов с СД 2-го типа, и не зависело от концентрации глюкозы и инсулина в среде (Таблицы 23, 24, 25, 26).

Можно предположить, что низкое содержание IL-17 в супернатантах объясняется кинетикой секреции данного цитокина – пик секреции наблюдается после 24 ч культивирования, либо происходит ранняя деградация цитокина. Кроме того, вероятно, что для интенсивной секреции IL-17 необходимо наличие дополнительного активационного сигнала. Так, A. Lenarczyk et al. (2000) показали, что в ответ на антигенную стимуляцию мононуклеаров периферической крови происходит активация синтеза мРНК IL-17, однако, секреция цитокина наблюдается в следовых количествах. В то время как в ответ на митогенную стимуляцию лимфоцитов было зафиксировано значительное повышение концентрации IL-17 в среде [148].

T-лимфоциты при активации экспрессируют на своей поверхности рецептор к инсулину, идентичный инсулиновым рецепторам в других тканях, поэтому инсулин способен оказывать влияние на функции T-лимфоцитов [169, 256]. Уже было показано, что число CD4⁺ T-лимфоцитов у пациентов с ожирением положительно коррелирует с концентрацией инсулина [273].

Добавление 10^{-10} М инсулина в наших исследованиях *in vitro* приводило к увеличению содержания IL-17-продуцирующих Th17 как в группе здоровых добровольцев, так и в группе пациентов с СД 2-го типа ($p=0,005$ и $p=0,002$, соответственно; рисунок 37А; рисунок 38).

Инсулин в высокой концентрации (10^{-8} М) также вызывал увеличение процента активированных Th17 среди мононуклеаров, полученных от здоровых добровольцев и от пациентов с СД 2-го типа по сравнению с условиями культивирования без инсулина ($p=0,003$ и $p=0,047$, соответственно; рисунок 37А; рисунок 38).

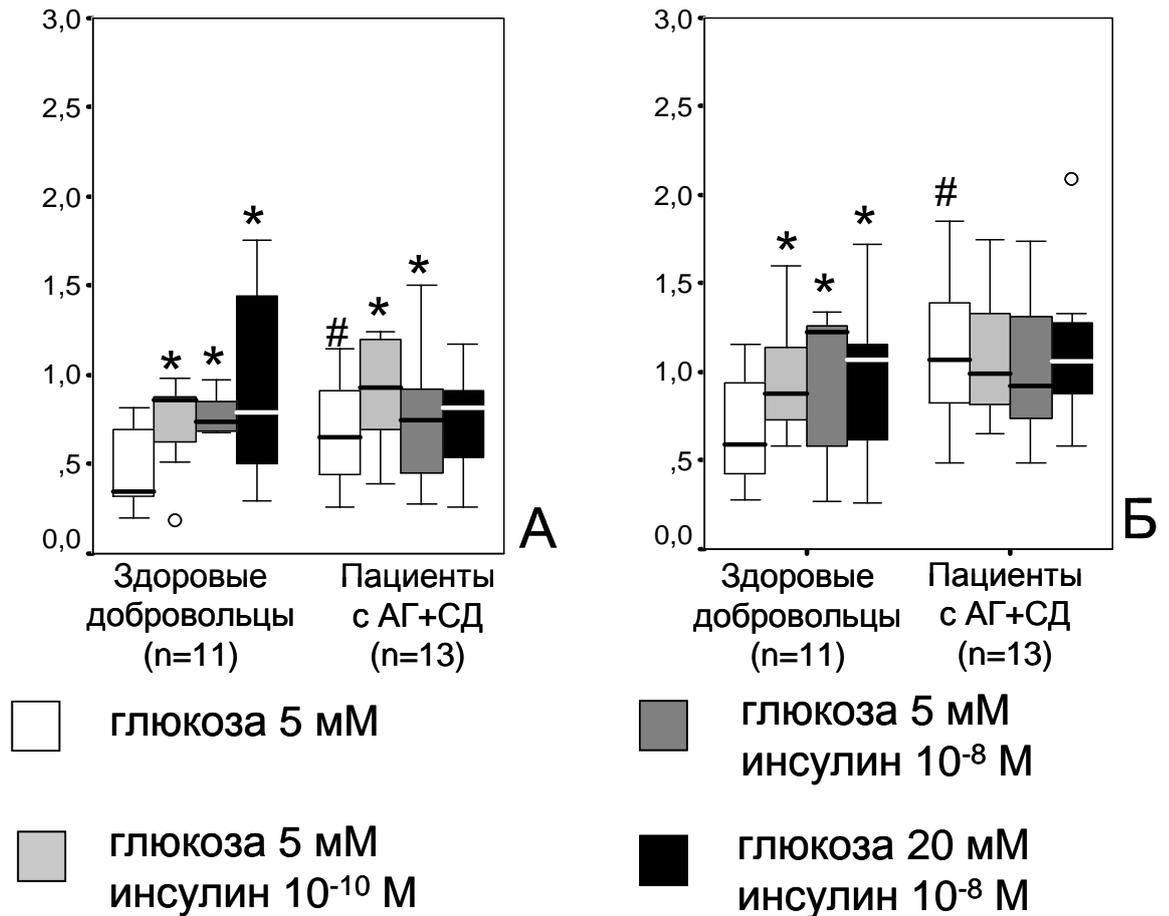


Рисунок 37. Влияние различных концентраций инсулина на способность CD4⁺-лимфоцитов к внутриклеточной продукции IL-17

В группе здоровых добровольцев относительное содержание Th17, внутриклеточно продуцирующих IL-17, после стимуляции ФМА с иономицином было выше при концентрации инсулина в среде 10⁻¹⁰ М и 10⁻⁸ М по сравнению со средой без инсулина (p=0,001 и p=0,007, соответственно; рисунок 37Б).

У пациентов с СД 2-го типа количество активированных Th17 после 24 ч культивирования не зависело от концентрации инсулина в среде, если клетки стимулировали ФМА с иономицином. Процент Th17, продуцирующих IL-17, оставался высоким, как в отсутствии инсулина, так и при содержании 10⁻¹⁰ М и 10⁻⁸ М инсулина в среде (рисунок 37Б; рисунок 38). При этом количество активированных Th17 после стимуляции ФМА с иономицином *in vitro* отрицательно коррелировало с содержанием С-пептида инсулина в сыворотке

крови у пациентов с СД 2-го типа *in vivo*, если в среду добавляли 10^{-10} М инсулина ($R=-0,503$; $p=0,024$) или 10^{-8} М инсулина ($R=-0,464$; $p=0,038$).

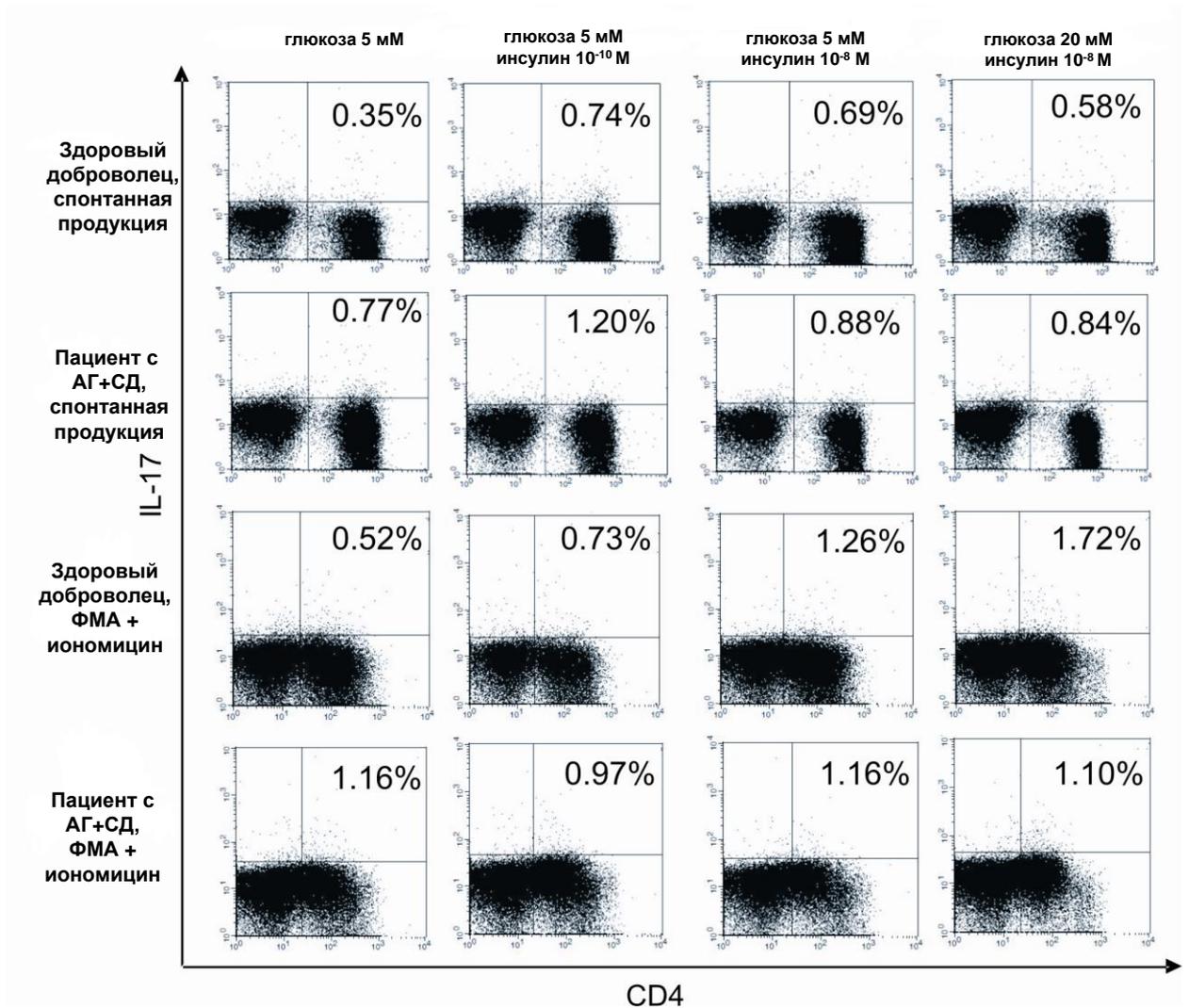


Рисунок 38. Примеры точечных диаграмм, отражающих относительное количество внутриклеточно продуцирующих IL-17 CD4⁺ Т-лимфоцитов во фракции мононуклеаров периферической крови здоровых добровольцев (n=11) и пациентов с артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2-го типа (n=13) при различных концентрациях инсулина и глюкозы *in vitro* (указан процент клеток от общего числа CD4⁺-лимфоцитов)

Форболовый эфир ФМА относится к активаторам внутриклеточного фермента РКС. Активируются классические (α , β_1 , β_2 , γ) и новые изоформы РКС (δ , ϵ , η , θ) [233]. Показано, что инсулин также приводит к активации РКС [133,

233]. Но эффекты инсулина в отношении классических и новых изоформ РКС мало изучены. Предполагается, что они могут активироваться инсулином и, одновременно, оказывать ингибирующий эффект на инсулиновый сигналинг [133, 233].

Показано, что при СД 2-го типа функционирование различных изоформ РКС изменяется. Экспрессия и активность атипичных форм РКС снижены в мышечной ткани пациентов с нарушениями углеводного обмена, что может вносить вклад в развитие инсулинорезистентности [87, 133, 233]. В то же время, активность РКС θ , РКС β 2, РКС α и РКС δ при повышенной концентрации глюкозы в среде *in vitro* и у пациентов с диабетом, напротив, повышена [69, 108, 150].

Мы не встретили в литературе данных о том, какие конкретно изоформы РКС влияют на продукцию ИЛ-17. Однако имеются сведения, что фосфорилирование STAT3, который приводит к активации ROR γ t, главного транскрипционного фактора Th17, зависит от РКС δ [129, 142]. Возможно, данный эффект опосредуется через JAK2 [102]. Показано, что активация РКС δ происходит непосредственно после взаимодействия инсулина с инсулиновым рецептором [58], а впоследствии имеет место убиквитин-протеасомная деградация фермента [59]. Имеются также сведения, что результатом воздействия инсулина на РКС δ является фосфорилирование STAT3 [107]. Можно предположить, что именно данный сигнальный путь лежит в основе влияния инсулина на внутриклеточную продукцию ИЛ-17 – эффект, выявленный в нашей работе (Рисунок 39).

Учитывая, что экспрессия РКС δ при СД 2-го типа повышена, и гиперинсулинемия, выявленная в крови у пациентов, могла способствовать активации РКС δ *in vivo*, мы полагаем, что культивирование клеток *in vitro*, сопровождающееся дополнительной стимуляцией ФМА, привело к достижению максимальной скорости реакции фосфорилирования субстратов РКС. Вероятно, именно этим можно объяснить отсутствие зависимости ФМА-стимулированной внутриклеточной продукции ИЛ-17 от концентрации инсулина в среде *in vitro* у пациентов с СД 2-го типа. В пользу данной гипотезы свидетельствуют и

результаты корреляционного анализа, указанные выше (при большей концентрации С-пептида *in vivo* ФМА-стимулированная внутриклеточная продукция IL-17 *in vitro* была ниже). Следует также отметить, что на фоне ФМА-стимуляции в группе здоровых добровольцев максимальное количество IL-17+ лимфоцитов, выявленное после культивирования с 10^{-8} М инсулина, было сопоставимо со значениями, наблюдаемыми в группе пациентов с СД 2-го типа (Рисунок 37).

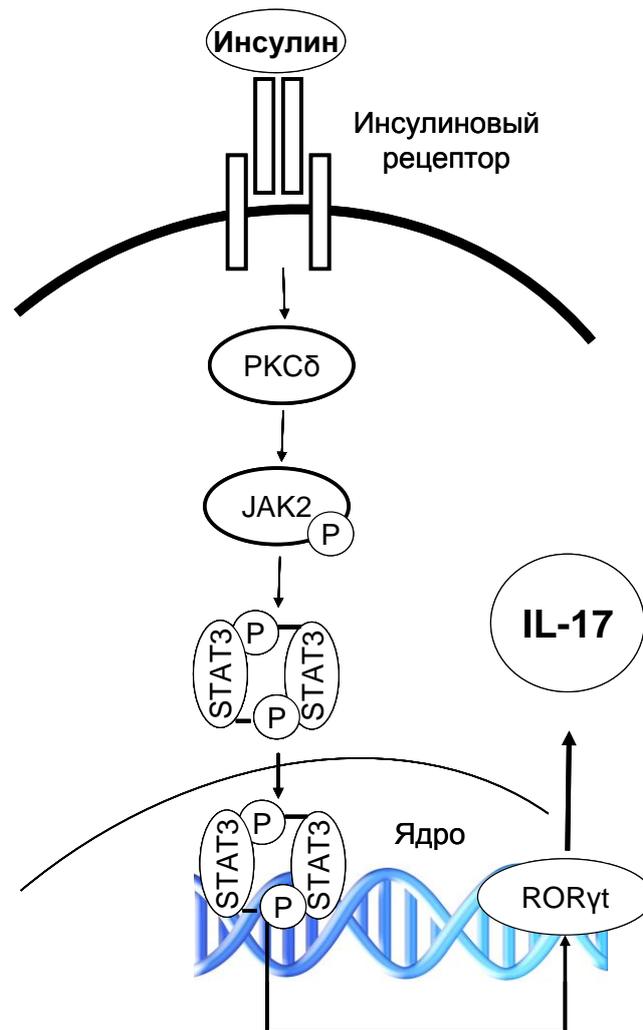


Рисунок 39. Возможный механизм влияния инсулина на внутриклеточную продукцию IL-17 (по данным N. Jain et al. (1999), L. Braiman et al. (2001), G. D. Frank et al. (2002), X. O. Yang et al. (2007, 2008), A. Lacreusette et al. (2009) и результатам собственных исследований)

Анализ секреции цитокинов, способных влиять на активность Th17, показал, что при добавлении в среду культивирования инсулина в физиологической концентрации в группе здоровых добровольцев содержание IL-23, IL-6 и TGF- β снижалось по сравнению с условиями культивирования без инсулина (Таблица 25). Таким образом, наиболее вероятно, что стимулирующее действие инсулина в отношении Th17 действительно реализуется за счет непосредственного воздействия гормона на Т-лимфоциты.

В группе пациентов с СД 2-го типа инсулин на секрецию цитокинов влияния не оказывал (Таблица 26). Известно, что инсулинорезистентность при СД 2-го типа проявляется в снижении способности инсулина оказывать анаболические эффекты в печени, жировой и мышечной ткани [82]. Вероятно, что именно вследствие инсулинорезистентности мы не выявили снижения секреции цитокинов в культуре мононуклеаров периферической крови в присутствии инсулина и глюкозы в среде у пациентов с СД 2-го типа.

Можно предположить, что отсутствие ограничений в отношении продукции IL-23, IL-6 и TGF- β вносит вклад в увеличение функциональной активности Th17 при СД 2-го типа, так как в данном случае поддерживается микроокружение, благоприятное для активации данной провоспалительной субпопуляции Т-лимфоцитов.

Культивирование мононуклеаров здоровых добровольцев в среде, содержащей повышенные концентрации инсулина (10^{-8} М) и глюкозы (20 мМ) приводило к увеличению количества активированных Th17 по сравнению с условиями культивирования без инсулина с содержанием глюкозы 5 мМ (Рисунок 37; рисунок 38). Данный эффект совместного воздействия высоких концентраций инсулина и глюкозы наблюдался как при стимуляции ФМА и иономицином ($p=0,001$), так и в отсутствии стимуляции ($p=0,005$).

В мононуклеарах пациентов с СД 2-го типа спонтанная и стимулированная ФМА с иономицином внутриклеточная продукция IL-17 при сочетанном воздействии 10^{-8} М и 20 мМ глюкозы не отличалась от условий культивирования без инсулина, и оставалась на высоком уровне (Рисунок 37; рисунок 38).

Влияние глюкозы и различных сочетаний концентраций инсулина на секрецию цитокинов мононуклеарами периферической крови здоровых добровольцев (n=11), Ме (Q₁ – Q₃)

Показатель	глюкоза 5 мМ	глюкоза 5 мМ, инсулин 10 ⁻¹⁰ М	глюкоза 5 мМ, инсулин 10 ⁻⁸ М	глюкоза 20 мМ, инсулин 10 ⁻⁸ М
IL-17A, пг/мл (ИФА)	2,06 (0,84 – 2,21)	2,25 (1,67 – 2,84)	2,48 (1,83 – 2,88)	2,59 (1,69 – 2,82)
IL-17A, пг/мл (мультиплексный анализ)	0 (0 – 10,68)	0 (0 – 3,05)	0 (0 – 12,03)	0 (0 – 1,19)
IL-23, пг/мл	10,95 (5,85 – 14,43)	5,95 (3,24 – 11,49) p=0,023	9,62 (5,27 – 15,03)	22,28 (4,81 – 48,77)
TGF-β, пг/мл	916,70 (594,51–1335,86)	660,71 (514,50–1064,72) p=0,005	714,37 (501,34– 1112,03)	964,61 (671,80– 1219,42)
IL-6, пг/мл	1923,10 (1102,82– 7471,71)	853,83 (179,91–4680,82) p<0,001	1360,65 (161,51– 6400,10)	5399,61 (968,52– 8606,47)
IL-10, пг/мл	2,64 (0,69 – 6,11)	0,70 (0,32 – 11,87)	2,29 (0 – 10,13)	8,05 (0,83 – 25,48)
TNF-α, пг/мл	30,94 (8,50 – 224,51)	40,28 (3,29 – 182,78)	24,36 (0,48 – 197,73)	119,84 (13,88 – 494,84)
IFN-γ, пг/мл	0	0 (0 – 0,28)	0 (0 – 0,34)	0 (0 – 0,56)
IL-2, пг/мл	0	0	0	0
IL-4, пг/мл	0 (0 – 0,56)	0,28 (0 – 0,36)	0 (0 – 0,95)	0,49 (0 – 0,91)

Примечание: p - уровень значимости различий по сравнению с концентрацией глюкозы в среде 5 мМ

Влияние глюкозы и различных сочетаний концентраций инсулина на секрецию цитокинов мононуклеарами периферической крови пациентов с артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2-го типа (n=13), Ме (Q₁ – Q₃)

Показатель	глюкоза 5 мМ	глюкоза 5 мМ, инсулин 10 ⁻¹⁰ М	глюкоза 5 мМ, инсулин 10 ⁻⁸ М	глюкоза 20 мМ, инсулин 10 ⁻⁸ М
IL-17A, пг/мл (ИФА)	1,72 (1,41 – 2,36)	2,09 (1,36 – 2,92)	1,75 (1,02 – 2,44)	2,04 (1,64 – 3,73)
IL-17A, пг/мл (мультиплексный анализ)	1,19 (0 – 10,57)	0 (0 - 13,95)	0,68 (0 – 9,54)	0,40 (0 – 7,80)
IL-23, пг/мл	9,31 (5,21 – 21,70)	7,83 (3,42 – 28,31)	5,94 (3,24 – 32,25)	13,37 (6,89 – 35,08)
TGF-β, пг/мл	897,60 (837,04–974,90)	875,62 (760,03–923,11)	902,61 (712,52–967,70)	871,82 (668,30–988,01)
IL-6, пг/мл	1482,02 (476,91– 7697,22)	3108,31 (259,32– 7234,13)	843,40 (446,42 – 6970,53)	2317,58 (850,31 – 7502,42)
IL-10, пг/мл	5,14 (0,24 – 18,87)	2,41 (0,26 – 11,13)	3,86 (0,25 – 22,76)	1,08 (0,18 – 18,14)
TNF-α, пг/мл	45,69 (4,36 – 113,03)	40,14 (6,19 – 128,88)	15,91 (6,51 – 52,94)	82,23 (25,13 230,30)
IFN-γ, пг/мл	0 (0 – 0,38)	0 (0 – 0,15)	0 (0 – 0,44)	0 (0 – 0,72)
IL-2, пг/мл	0	0	0	0
IL-4, пг/мл	0,25 (0 – 0,62)	0,01 (0 – 0,66)	0,21 (0 – 0,43)	0 (0 – 0,20)

Примечание: p - уровень значимости различий по сравнению с концентрацией глюкозы в среде 5 мМ

Однако при сравнении комбинированного воздействия высоких доз инсулина и глюкозы с условиями культивирования с 20 мМ глюкозы в безинсулиновой среде, мы не обнаружили дополнительного увеличения

внутриклеточной продукции IL-17. Напротив, у пациентов с СД 2-го типа количество ФМА-активированных Th17 при сочетании высоких концентраций инсулина и глюкозы было меньше, чем при воздействии 20 мМ глюкозы без инсулина ($p=0,002$).

Известно, что инсулин ускоряет процессы транспорта и метаболизма глюкозы. Под влиянием инсулина происходит увеличение экспрессии Glut1, Glut3 и Glut4 на поверхности Т-лимфоцитов и усиление синтеза мРНК и белка HIF1 α , по крайней мере, в клетках гладких мышц и адипоцитах [90, 118, 174]. Как упоминалось ранее (см. главу 1.2), HIF1 α является ключевым фактором для метаболизма глюкозы и дифференцировки клеток в Th17 [77, 251]. Можно предположить, что сочетание высоких доз инсулина и глюкозы воздействует на мононуклеары периферической крови не только через увеличение экспрессии Glut и поступления глюкозы в клетку, но и за счет стимуляции HIF1 α . В то же время, имеются данные, что HIF1 α вносит вклад в развитие инсулинорезистентности [131], что может приводить к ограничению стимулирующего воздействия инсулина в отношении внутриклеточной продукции IL-17 при одновременном воздействии на клетку высоких доз инсулина и глюкозы.

Таким образом, результаты исследования *in vitro* показали, что культивирование мононуклеров периферической крови здоровых добровольцев и пациентов с СД 2-го типа с инсулином и глюкозой в высоких концентрациях приводит к увеличению внутриклеточной продукции IL-17. При СД 2-го типа данный эффект может усугубляться за счет резистентности к супрессорному воздействию инсулина в отношении продукции других провоспалительных цитокинов.

Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о функциональном дисбалансе между провоспалительными (Th17 и Th1) и противовоспалительными Т-регуляторными лимфоцитами (Treg) у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с нарушениями углеводного обмена. Причем изменения функциональной активности субпопуляций Т-лимфоцитов выявляются уже на стадии предиабета. Весьма вероятно, что повышение аутореактивности и усиление ингибирования матриксных металлопротеиназ является следствием иммунорегуляторного дисбаланса, при этом активация Th17-лимфоцитов может происходить под влиянием инсулина и высоких концентраций глюкозы.

Наша работа подтверждает данные исследований, свидетельствующих в пользу участия хронического воспаления в патогенезе СД 2-го типа [89, 134, 216, 253]. В литературе также имеются неопровержимые доказательства важной роли воспаления в развитии ряда сердечно-сосудистых заболеваний (атеросклероза, в частности) [61, 110]. Выраженность дисбаланса между регуляторными и эффекторными субпопуляциями лимфоцитов в нашем исследовании напрямую коррелировала со степенью нарушения обмена углеводов и липидов.

В нашем исследовании относительное содержание Th17-лимфоцитов увеличивалось в наибольшей степени у пациентов с АГ, ассоциированной с НТУ, что соответствует данным, свидетельствующим о ранней активации данной субпопуляции в ходе развития воспаления [147]. Вероятно, этому может способствовать зависимость функциональной активности Th17 от метаболических факторов, продемонстрированная в нашем исследовании *in vitro*: активация Th17-лимфоцитов происходит под влиянием инсулина и высоких концентраций глюкозы. Кроме того, имеются данные, что система IL-1, важного фактора дифференцировки Th17 у людей, является своего рода «сенсором метаболического стресса» [89]. Свободные жирные кислоты могут напрямую способствовать секреции IL-1 β путем активации Toll-рецепторов (TLR2 и TLR4).

Не исключено, что стимулирующее действие глюкозы в отношении продукции IL-1 β клетками поджелудочной железы зависит от NOD-, LRR- и пирин-домен-содержащей-3 инфламмосомы (NLRP3). В условиях повышенной концентрации глюкозы под влиянием активных форм кислорода (АФК) активируется NLRP3, что приводит к активации каспазы-1, процессингу про-IL-1 β и высвобождению активного IL-1 β [89]. Роль АФК в этом процессе до сих пор точно не установлена, но показано, что β -клетки островков Лангерганса обладают особой чувствительностью к воздействию оксидативного стресса за счет сниженного содержания в них ферментов-антиоксидантов [89]. Известно также, что активированные Th-лимфоциты, в свою очередь, могут стимулировать продукцию супероксид-анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$), зависимую от NADPH-оксидазы [46].

Кроме того, следует учитывать, что АГ может вносить вклад в активацию провоспалительных субпопуляций Т-лимфоцитов. Все Т-лимфоциты несут на своей поверхности рецептор 1-го типа к ангиотензину II (AT1-рецептор), и ангиотензин II стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов [46]. В экспериментах на животных доказана экспрессия в Т-лимфоцитах ренина, рецепторов к ренину, ангиотензиногена, ангиотензинпревращающего фермента, AT1- и AT2-рецепторов, что указывает на наличие функционально-активной ренин-ангиотензиновой системы в этих клетках [46]. Однако в нашем исследовании у пациентов с АГ без нарушений углеводного обмена изменения со стороны субпопуляций Т-лимфоцитов были незначительными и ограничивались увеличением относительного содержания Th1-клеток в крови. Весьма вероятно, что в активации провоспалительных субпопуляций CD4⁺ Т-лимфоцитов важную роль играют именно ассоциированные с АГ нарушения углеводного обмена, развитие которых неразрывно связано с инсулинорезистентностью.

У пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета установлено наличие тесной взаимосвязи хронического субклинического воспаления с клиническими особенностями заболевания. Показано, что неудовлетворительный контроль гликемии и наличие гиперинсулинемии у пациентов с сахарным диабетом и абдоминальным ожирением сопряжены с

выраженным дисбалансом субпопуляций Т-хелперов и активацией провоспалительных Th1- и Th17-лимфоцитов.

Данное исследование не позволяет ответить на вопрос, что является первичным – развитие нарушений углеводного обмена и инсулинорезистентности или изменение функциональной активности Т-лимфоцитов. Мы полагаем, что существует вероятность параллельного развития нарушений иммунологического и эндокринного характера. Эволюционно эндокринная и иммунная система взаимосвязаны; наиболее вероятно, они развивались из одного органа-предшественника (аналога жирового тела у мухи *Drosophila*). Поэтому вполне обоснованно предположить, что метаболические и иммунные реакции регулируются через общие сигнальные пути [122].

Все авторы, изучающие патогенез иммунного воспаления, ассоциированного с метаболическими расстройствами, придерживаются концепции, в соответствии с которой инициирующими факторами, приводящими к манифестации сахарного диабета 2-го типа, являются генетическая предрасположенность, малая физическая активность и избыточное или несбалансированное питание [122, 134, 216]. В связи с тем, что Т-регуляторные лимфоциты и Th17 являются резидентными клетками кишечника, наиболее вероятно, что именно пищевой фактор может приводить к нарушению их функциональной активности на локальном уровне и вызывать в дальнейшем изменения системного характера [287].

Показано, что для сахарного диабета 2-го типа характерна умеренная степень кишечного дисбактериоза [222]. В то же время, микробиом кишечника контролирует дифференцировку Th17 и Treg-лимфоцитов, и, таким образом, может осуществляться взаимосвязь между метаболизмом и иммунным ответом [228]. Можно допустить, что системный дисбаланс Treg/Th17 также является следствием изменения состава микрофлоры кишечника у пациентов с нарушениями углеводного обмена.

В соответствии с результатами нашего исследования, активация Th17 при нарушениях углеводного обмена ассоциируется с увеличением функциональной

активности Th1-лимфоцитов, что проявляется повышением внутриклеточной продукции и концентрации в сыворотке IFN- γ . Мы не выявили точный механизм, за счет которого усиливается Th1-направление иммунного ответа при НТУ и СД 2-го типа. При изменении концентрации инсулина и глюкозы в среде культивирования IFN- γ в супернатантах практически не определялся. Имеются данные, что лептин способствует формированию Th1-фенотипа лимфоцитов [43, 176]. Учитывая, что гиперлептинемия характерна для пациентов с СД 2-го типа, можно допустить участие данного адипокина в активации Th1-лимфоцитов, выявленной в нашем исследовании.

Обобщение данных литературы и результатов собственных исследований представлено на рисунке 40, который отражает возможный механизм развития хронического субклинического воспаления с участием иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с нарушениями углеводного обмена.

Полученные нами результаты не только подтверждают тесную взаимосвязь хронического воспаления с нарушениями углеводного обмена, но и обосновывают возможность эффективной коррекции нарушений иммунорегуляции с помощью воздействий, направленных на повышение периферической инсулиночувствительности. Важным представляется дальнейшее изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе иммунорегуляторного дисбаланса при нарушениях углеводного метаболизма, что может быть весьма перспективным и в отношении профилактики сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа.

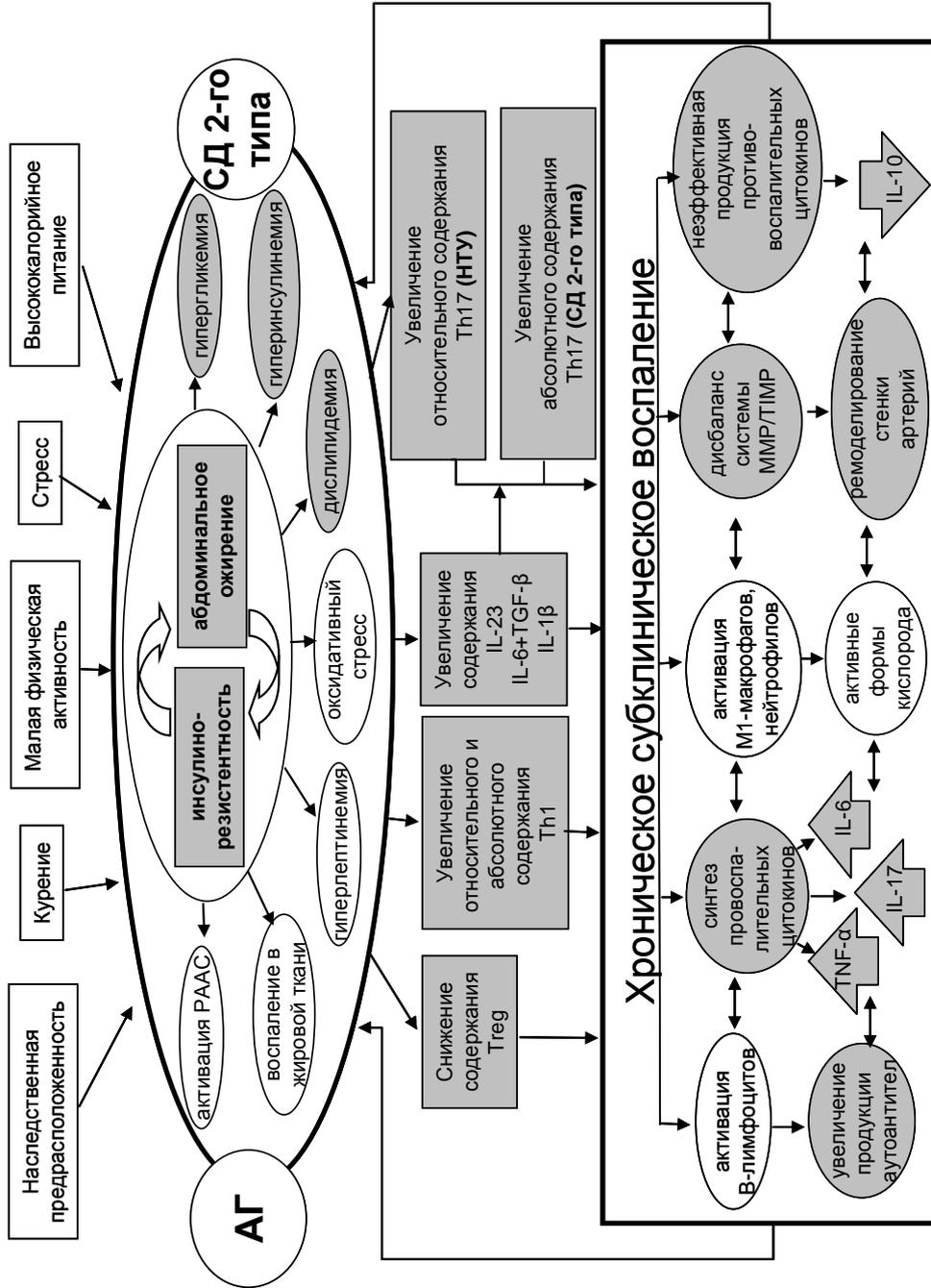


Рисунок 40. Механизм развития хронического субклинического воспаления при артериальной гипертензии, ассоциированной с нарушениями углеводного обмена [по данным Н. Kolb et al., 2005; G. S. Hotamisligil et al., 2006; V. De Rosa et al., 2007; B. Mattioli et al., 2005; A. Babaei et al., 2011; P. Bandaru et al., 2011; M. Jagannathan-Bogdan et al., 2011; B. Meissburger et al., 2011; C. Zeng et al., 2012 и собственных исследований (выделено серым)]
 Примечание: АГ – артериальная гипертензия, СД – сахарный диабет, НТУ – нарушение толерантности к углеводам, РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система

Выводы:

1. У пациентов с артериальной гипертензией без нарушений углеводного обмена увеличены концентрации IL-17 в супернатантах интактных и TNF- α в супернатантах митоген-активированных культур клеток крови, относительное и абсолютное содержание NK-клеток, относительное содержание Th1-лимфоцитов в крови и снижается относительное содержание CD25^{high} T-лимфоцитов в крови. При этом содержание в крови Th17, Th1/Th17 и FoxP3⁺ T-регуляторных лимфоцитов соответствует таковому у здоровых людей.

2. У пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с нарушением толерантности к углеводам, снижение абсолютного и относительного содержания FoxP3⁺ T-регуляторных лимфоцитов сочетается с увеличением содержания Th1, Th17, Th17/Th1-лимфоцитов и IL-23R⁺ T-лимфоцитов в крови. Изменения цитокинопродукции проявляются в увеличении сывороточной концентрации IL-6 и увеличении содержания IL-1 β в супернатантах интактных культур клеток крови.

3. У пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа увеличено абсолютное и относительное количество CD4⁺ T-лимфоцитов и изменено содержание субпопуляций CD4⁺ T-лимфоцитов в крови (повышено содержание Th1-, Th17-лимфоцитов, IL-23R⁺ T-лимфоцитов, снижено относительное содержание FoxP3⁺ T-регуляторных лимфоцитов в крови), а также имеет место нарушение продукции цитокинов (увеличение концентрации IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 в сыворотке крови, увеличение содержания IL-17, IL-6, TNF- α и снижение содержания IL-10 в супернатантах интактных культур клеток крови, увеличение содержания TNF- α в супернатантах митоген-активированных культур клеток крови).

4. У всех пациентов с артериальной гипертензией изменение численности субпопуляций CD4⁺ T-лимфоцитов ассоциировано с параметрами углеводного и липидного метаболизма (содержание фракций липидов, глюкозы, HbA1c, инсулина, индекс НОМА). Только у пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и нарушений углеводного обмена, содержание Th17, Th1, FoxP3⁺ T-

регуляторных лимфоцитов взаимосвязано с количеством IL-23R+ Т-лимфоцитов в крови и концентрацией цитокинов (IL-17, IFN- γ , IL-10, IL-1 β , TNF- α , IL-6) в сыворотке крови и супернатантах культур клеток крови.

5. Иммунорегуляторный дисбаланс у больных артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, связан со степенью метаболических нарушений и активностью процессов субклинического воспаления: наиболее значительное снижение содержания FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов, увеличение количества IFN- γ + Th1-лимфоцитов в крови и возрастание концентрации IL-17 в супернатантах интактных культур клеток крови имеют место при повышении концентрации hsC-реактивного белка более 5 мг/л и характерны для пациентов с неудовлетворительным контролем гликемии, наиболее высокой степенью абдоминального ожирения и гиперинсулинемии/инсулинорезистентности.

6. Низкое содержание FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов в крови и IL-10 в супернатантах митоген-активированных культур клеток крови у пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета с неудовлетворительным контролем гликемии сочетается с увеличением концентрации матриксной металлопротеиназы-9 в сыворотке крови и наличием субклинического атеросклероза в виде утолщения интимо-медиального комплекса сонных артерий $\geq 0,9$ мм.

7. Проявлением субклинического воспаления у пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и нарушения толерантности к углеводам является увеличение сывороточного содержания антимитохондриальных антител. Наибольшая частота выявления антител к ткани сердца и высокая концентрация тканевого ингибитора металлопротеиназ-1 отмечена у пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа. Содержание в сыворотке крови ревматоидного фактора и антител к экстрагируемым ядерным антигенам возрастает у пациентов с артериальной гипертензией независимо от наличия нарушений углеводного обмена.

8. У пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, и у здоровых лиц под влиянием высоких концентраций глюкозы *in vitro* (10 мМ и 20 мМ) в интактных культурах мононуклеаров крови увеличивается количество IL-17+ Th17-лимфоцитов и содержание TNF- α относительно аналогичных показателей в среде культивирования с концентрацией глюкозы 5 мМ. У пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа отсутствует стимулирующее влияние глюкозы на секрецию IL-23 и TGF- β мононуклеарами крови, характерное для здоровых людей.

9. У пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, инсулин *in vitro* в концентрациях 10^{-10} М и 10^{-8} М вызывает увеличение количества IL-17+ Th17-лимфоцитов только в интактных культурах мононуклеаров крови. Инсулин в концентрации 10^{-10} М *in vitro* не оказывает ингибирующего влияния на секрецию IL-23, IL-6, TGF- β мононуклеарами крови пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа.

Практические рекомендации

1. У больных артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, с неудовлетворительным контролем гликемии, высокой степенью инсулинорезистентности и абдоминального ожирения в связи с повышенным риском развития иммунного воспаления рекомендуется проведение дополнительного иммунологического лабораторного исследования.

2. В качестве потенциальных биомаркеров иммунорегуляторного дисбаланса у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, может быть использовано определение количества FoxP3+ T-регуляторных лимфоцитов, T-хелперов-1 в крови и содержания IL-17 в супернатантах интактных культур клеток крови.

Список сокращений

АГ – артериальная гипертензия

АМФ - аденозинмонофосфат

АПК – антигенпрезентирующие клетки

иАПФ – ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИМТ – индекс массы тела

ММР – матриксная металлопротеиназа

НОМА – Homeostatic model assessment

НТУ – нарушение толерантности к углеводам

ОТ – окружность талии

ОХС – общий холестерол

РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система

РФ – ревматоидный фактор

СД – сахарный диабет

ТАГ – триацилглицерол

ТМБ – тетраметилбензидин

ФМА – форбол 12-миристат 13-ацетат

ХС-ЛПВП – холестерол липопротеинов высокой плотности

ХС-ЛПНП – холестерол липопротеинов низкой плотности

цАМФ – циклический цАМФ

Akt – RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, протеин киназа В

АМА-М2 – антитела к митохондриям подтипа М2

АМРК – АМФ-зависимая протеин киназа

ANA – антитела к экстрагируемым ядерным антигенам

CD – кластер дифференцировки

G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

Glut – белок-транспортер глюкозы

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

HbA1c – гликозилированный гемоглобин

HIF1 – hypoxia-inducible factor 1

hsCRP – С-реактивный белок, определенный высокочувствительным методом

IAPP – островковый амилоидный полипептид

ICAM-1 – inter-cellular adhesion molecule 1

IFN- γ – интерферон гамма

Ig – иммуноглобулин

IKK- β – I κ B киназа- β

IL – интерлейкин

IL-1RA – антагонист рецептора IL-1 β

IL-23R – рецептор к интерлейкину-23

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

IRS – субстрат инсулинового рецептора

MCP-1 – моноцитарный хемотаксический протеин-1

MIP-2 – макрофагальный воспалительный протеин-2

mTOR – mammalian target of rapamycin

NK – натуральный киллер

NKT-T – натуральный киллер

NO – оксид азота

PBS – фосфатно-солевой буферный раствор

PPAR- γ – пролифератор-активируемый рецептор пероксисом

ROR – retinoid orphan nuclear receptor

SOCS – белки-супрессоры сигналинга цитокинов

TCR – T-клеточный рецептор

TGF- β – трансформирующий фактор роста

Th – T-хелперный лимфоцит

TIMP – тканевый ингибитор матриксных металлопротеиназ

TNF- α – фактор некроза опухолей альфа

Treg – T-регуляторный лимфоцит

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

Литература

1. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / под ред. И.И. Дедов, М.В. Шестакова. – 6-й выпуск. – М., 2013. – 118 с.
2. Аллергология и иммунология: национальное руководство / под ред. Р.М. Хаитова, Н.И. Ильиной. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 656 с.
3. Балаболкин, М. И. Лечение сахарного диабета и его осложнений: руководство для врачей / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова, В.М. Кремнинская. – М.: Медицина, 2005. – 511 с.
4. Буянова, С. Н. Патогенетическая роль Th17-опосредованных механизмов иммунорегуляции на примере репродуктивной дисфункции / С.Н. Буянова, О.В. Москалец, О.Г. Иванова и др. // Проблемы женского здоровья. – 2012. – Т.7 (1). – С. 70-77.
5. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение / под ред. С.В. Хайдукова, А.В. Зурочки. – Челябинск, 2008. – 195 с.
6. Дедкова А. А. Факторы воспаления и маркеры повреждения миокарда при фибрилляции предсердий / А.А. Дедкова, Т.Е. Сулова, И.В. Кологривова и др. // Вестник аритмологии. – 2010. – № 60. – С. 49-53.
7. Дедов, И. И. Сахарный диабет — опаснейший вызов мировому сообществу / И.И. Дедов // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2012. – №1. – С. 7-13.
8. Диагностика и лечение артериальной гипертензии. Рекомендации РМОАГ и ВНОК 2010 (четвертый пересмотр) // Системные гипертензии. – 2010. – №3. – С. 5-26.
9. Ефременко, Ю. Р. Новые возможности в исследовании белково-липидного обмена в диагностике осложнений метаболического синдрома / Ю.Р. Ефременко, Е.Ф. Королева // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2012. – №2 (3). – С. 187 -190.

10. Зайцев, В. М. Прикладная медицинская статистика : учебное пособие / В.М. Зайцев, В.Г. Лифляндский, В.И. Маринкин // СПб. : ООО «Издательство ФОЛИАНТ», 2003. – 432 с.
11. Зурочка, А. В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) / А.В. Зурочка, С.В. Хайдуков // Медицинская Иммунология. – 2011. – Т. 13, №1. – С. 7-16.
12. Иммунология : практикум : учеб. Пособие / [Ковальчук Л. В. и др.]; под ред. Л.В. Ковальчука, Г.А. Игнатъевой, Л.В. Ганковской. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 176 с.
13. Кетлинский, С. А. Th17 – новая линия дифференцировки Т хелперов: обзор данных // С.А. Кетлинский. – Цитокины и воспаление. – 2009. – Т. 8, №2. – С. 3-15.
14. Кононова, Т. Е. Опосредованная Т-лимфоцитами-хелперами типа 17 регуляция антибактериального (противотуберкулезного) иммунитета / Т.Е. Кононова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина // Молекулярная биология. – 2013. – Т. 47, №6. – С. 883-890.
15. Кочергина, И. И. Пути коррекции инсулинорезистентности и метаболического синдрома при СД 2 типа. Роль Сиофора [Электронный ресурс] / И.И. Кочергина, К.А. Уланова // Российский медицинский журнал. – 2007. – №28. – Режим доступа: http://www.rmj.ru/articles_5729.htm.
16. Кунгуров, Н. В. Системная воспалительная реакция и явления дислипидемии при псориазе / Н.В. Кунгуров, Н.Н. Филимонкова, Е.П. Топычканова // Фундаментальные исследования. – 2013. – №9. – С. 188-194.
17. Михайлова, Е. С. Изменения продукции цитокинов клетками периферической крови у больных колоректальным раком / Е.С. Михайлова, Н.В. Великая, Д.В. Морозов и др. // Новости «Вектор-Бест». – 2011. – №3 (61). – С. 2-7.
18. Осихов, И. А. Нарушения межклеточных взаимодействий в патогенезе воспаления жировой ткани при метаболическом синдроме / И.А. Осихов,

- И.Д. Беспалова, В.А. Бычков и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2013. – Т. 12, №6. – 2013. – С. 144-153.
19. Рунихин, А. Ю. Современные аспекты патогенеза и лечения сахарного диабета 2 типа / А.Ю. Рунихин, Ю.В. Новикова // Русский Медицинский Журнал. Эндокринология. – 2007. – №27. – С. 2060- 2066.
20. Суплотова, Л. А. Эпидемиологические аспекты сахарного диабета 2-го типа с манифестацией заболевания в молодом возрасте / Л. А. Суплотова, Л.Н. Бельчикова, Н.А. Рожнова // Сахарный диабет. – 2012. – №1. – С. 11-13.
21. Торгашина, А. В. Т-регуляторные клетки при системной красной волчанке и ревматоидном артрите / А.В. Торгашина, С.Ю. Быковская, С.К. Соловьев, Е.Л. Насонов // Научно-практическая ревматология. – 2009. – №3. – С. 50-59.
22. Фомин, В. В. С-реактивный белок и его значение в кардиологической практике / В.В. Фомин, Л.В. Козловская // Consilium medicum. – 2003. – №5. – С. 247-250.
23. Хаитов, Р. М., Иммунология. Норма и патология : учебник / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г. Сидорович. – 3-е изд. – М. : ОАО «Издательство «Медицина», 2010. – 752 с.
24. Чумакова, Г. А. Эпикардальное ожирение как возможный маркер метаболического синдрома / Г.А. Чумакова, Н.Г. Веселовская, О.В. Гриценко и др. // Кардиосоматика. – 2012. – №4. – С. 38-43.
25. Шварц, В. Жировая ткань как орган иммунной системы / В. Шварц // Цитокины и воспаление. – 2009. – Т. 8, №4. – С. 3-10.
26. Шипилов, М. В. Th17-ответ организма при острых респираторных вирусных инфекциях различного генеза / М.В. Шипилов, В.В. Иванов // Цитокины и воспаление. – 2012. – №1. – С. 109-113.
27. Якушина, В. Д. Роль галектина-1 в регуляции гомеостаза Т-лимфоцитов / В.Д. Якушина, О.А. Васильева, Н.В. Рязанцева и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – №6. – С. 93-99.

28. Ярилин, А. А. Иммунология : учебник / А.А. Ярилин. – М. : ГЭОТАР-Медиа. – 2010. – 752 с.
29. Abishek, I. Lysine acetylation in obesity, diabetes and metabolic disease / I. Abishek, D. P. Fairlie, L. Brown // *Immunology and Cell Biology*. – 2012. – Vol. 90. – P. 39-46.
30. Acosta-Rodrigues, E.V. Interleukins 1 beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells / E.V. Acosta-Rodrigues, G. Napolitani, A. Lanzayecchia et al. // *Nat. Immunol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 942-949.
31. Afzali, B. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease / B. Afzali, G. Lombardi, R.I. Lecher, G.M. Lord // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2007. – Vol. 148. – P. 32-46.
32. Aggarwal, S. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17 / S. Aggarwal, N. Ghilardi, M.-H. Xie et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 1910-1914.
33. Airola P. Hypoglycemia: a better approach / P. Airola. – Phoenix, Arizona. Health Plus, 1977. – 191 p.
34. Al-Shukaili, A. Analysis of inflammatory mediators in type 2 diabetes patients [Электронный ресурс] / A. Al-Shukaili, S. AL-Ghafri, S. Al-Marhoobi et al. // *Int. J. Endocrinol.* – 2013. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3671680/>
35. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus // *Diabetes Care*. – 2007. – Vol. 30 (Suppl. 1). – P. S42 – S47.
36. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes—2012 // *Diabetes Care*. – 2012. – Vol. 35 (Suppl. 1). – P. S11-S63.
37. Andoh, A. Interleukin (IL)-4 and IL-17 synergistically stimulate IL-6 secretion in human colonic myofibroblasts / A. Andoh, K. Hata, Y. Araki et al. // *Int. J. Mol. Med.* – 2002. – Vol. 10 (5). – P. 631-634.

38. Annunziato, F. Phenotypic and functional features of human Th17 cells / F. Annunziato, L. Cosmi, V. Santarlasci et al. // *JEM.* – 2007. – Vol. 204 (8). – P. 1849-1861.
39. Annunziato, F. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of th17 cells in inflammation / F. Annunziato, L. cosmic, F. Liotta et al. // *International Immunology.* – 2008. – Vol. 20 (11). – P. 1361-1368.
40. Annunziato, F. Do studies in humans better depict Th17 cells? / F. Annunziato, S. Romagnani // *Blood.* – 2009. – Vol. 114 (11). – P. 2213- 2219.
41. Armstrong, C. Polymorphisms in MMP family and TIMP genes and carotid artery intima-media thickness / C. Armstrong, S. Abilleira, M. Sitzer et al. // *Stroke.* – 2007. – Vol. 38. – P. 2895-2899.
42. Awasthi, A. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection / A. Awasthi, V.K. Kuchroo // *Int. Immunol.* – 2009. – Vol. 21. – P. 489-498.
43. Babaei, A. Restricted leptin antagonism as a therapeutic approach to treatment of autoimmune diseases / A. Babaei, S.H. Zarkesh-Esfahani, E. Bahrami, R.J. Ross // *Hormones (Athens).* – 2011. – Vol. 10(1). – P. 16-26.
44. Baldeviano, G. C. Interleukin-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy / G.C. Baldeviano, J.G. Barin, M.V. Talor et al. // *Circ. Res.* – 2010. – Vol. 106(10). – P. 1646-1655.
45. Bandaru, P. Association between plasma leptin levels and diabetes mellitus / P. Bandaru, A. Shankar // *Metabolic Syndrome and Related Disorders.* – 2011. – Vol. 9(1). – P. 19-23.
46. Barhoumi, T. T Regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury / T. Barhoumi, D.A. Kasal, M.W. Li et al. // *Hypertension.* – 2011. – Vol. 57 (3). – P. 469–476.
47. Baroncini, L. A. V. Carotid Plaque and MMP-9 Controversies [Электронный ресурс] / L.A.V. Barocini // *Int. J. Cardiovasc. Res.* – 2012. – Vol. 1:2. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.4172/2324-8602.1000e107>.

48. Beissert, S. Regulatory T cells / S. Beissert, A. Schwartz, T. Schwartz // *J. Invest. Dermatol.* – 2006. – Vol. 126. – P. 15-24.
49. Bell, G. M. Biologic therapies in non-rheumatic diseases: lessons for rheumatologists? / G.M. Bell, G. Reynolds, J.D. Isaacs // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2011. – Vol. 7. – P. 507-516.
50. Benson, H. L. Endogenous matrix metalloproteinases 2 and 9 regulate activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells / H.L. Benson, S. Mobashery, M. Chang et al. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 44(5). – P. 700-708.
51. Beriou, G. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function / G. Beriou, C.M. Constantino, C.W. Ashley et al. // *Blood.* – 2009. – Vol. 113. – P. 4240-4249.
52. Bertin-Maghit, S. Interleukin-1 β produced in response to islet autoantigen presentation differentiates T-helper 17 cells at the expense of regulatory T-cells / S. Bertin-Maghit, D. Pang, B. O'Sullivan et al. // *Diabetes.* – 2011. – Vol. 60. – P. 248-257.
53. Betteridge, D. J. Lipid control in patients with diabetes mellitus / D.J. Betteridge // *Nature Reviews Cardiology.* – 2011. – Vol. 8. – P. 278-290.
54. Bluestone, J. A. The functional plasticity of T cell subsets / J.A. Bluestone, C.R. Mackay, J.J. O'Shea, B. Stockinger // *Nature Reviews Immunology.* – 2009. – Vol. 9. – P. 811-816.
55. Boden, G. Effects of hyperinsulinemia on hepatic metalloproteinases and their tissue inhibitors / G. Boden, W. Song, K. Kresge et al. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2008. – Vol. 295(3). – P. E692-E697.
56. Bopp, T. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression / T. Bopp, C. Becker, M. Klein et al. // *J. Exp. Med.* – 2007. – Vol. 204(6). – P. 1303-1310.
57. Bouloumie, A. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation / A. Bouloumie, C. Sengenès, G. Portolan et al. // *Diabetes.* – 2001. – Vol. 50. – P. 2080-2086.

58. Braiman, L. Insulin induces specific interaction between insulin receptor and protein kinase C delta in primary cultured skeletal muscle / L. Braiman, A. Alt, T. Kuroki et al. // *Mol. Endocrinol.* – 2001. – Vol. 15(4). – P. 565-574.
59. Brand, C. Insulin stimulation of PKC δ triggers its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway / C. Brand, M. Horovitz-Fried, A. Inbar et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – Vol. 1803(11). – P. 1265-1275.
60. Brusko, T. M. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4⁺ CD25⁺ T-cells in type 1 diabetes / T.M. Brusko, C.H. Wasserfall, M.J. Clare-Salzler et al. // *Diabetes.* – 2005. – Vol. 54. – P. 1407-1414.
61. Butcher, M. Current views on the functions of IL-17-producing cells in atherosclerosis / M. Butcher, E.V. Galkina // *Thromb. Haemost.* – 2011. – Vol. 106(5). – P. 787-795.
62. Caforio, A. L. P. Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy become undetectable with disease progression / A. L. P. Caforio, J. H. Goldman, M. K. Baig, et al. // *Heart.* – 1997. – Vol. 77. – P. 62- 67.
63. Carbo, R. Insulin effect on glucose transport in thymocytes and splenocytes from rats with metabolic syndrome [Электронный ресурс] / R. Carbo, V. Guarner // *Diabetology & Metabolic Syndrome.* – 2010. – Vol. 2 (№ 64). – Режим доступа: <http://www.dmsjournal.com/content/2/1/64>.
64. Caro-Maldonado, A. Matched and mismatched metabolic fuels in lymphocyte function / A. Caro-Maldonado, V.A. Gerriets, J.C. Rathmell // *Seminars in Immunology.* – 2012. – Vol. 24. – P. 405-413.
65. Chen, H. Assessing the predictive accuracy of QUICKI as a surrogate index for insulin sensitivity using a calibration model / H. Chen, G. Sullivan, M.J. Quon // *Diabetes.* – 2005. – Vol. 54 (7). – P. 1914-1925.
66. Chen, W. The role and mechanisms of double negative regulatory T cells in the suppression of immune responses / W. Chen, M.S. Ford, K.J. Young, L. Zhang // *Cell. Mol. Immunol.* – 2004. – Vol. 1(5). – P. 328-335.

67. Chen, Z. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes / Z. Chen, C.M. Tato, L. Muul et al. // *Arthritis Rheum.* – 2007. – Vol. 56. – P. 2936-2946.
68. Cheng, X. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome / X. Cheng, X. Yu, Q. Fu et al. // *Clin. Immunol.* – 2008. – Vol. 127. – P. 89 – 97.
69. Chibber, R. Protein kinase C beta2-dependent phosphorylation of core 2 GlcNAc-T promotes leukocyte-endothelial cell adhesion: a mechanism underlying capillary occlusion in diabetic retinopathy / R. Chibber, B.M. Ben-Mahmud, G.E. Mann et al. // *Diabetes.* – 2003. – Vol. 52 (6). – P. 1519-1527.
70. Choy, E. H. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial / E.H. Choy, D.A. Isenberg, T. Garrood et al. // *Arthritis Rheum.* – 2002. – Vol. 46. – P. 3143-3150.
71. Chung, Y. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes / Y. Chung, X. Yang, S.H. Chang et al. // *Cell Res.* – 2006. – Vol. 16. – P. 902-907.
72. Ciolletta, D. PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells / D. Ciolletta, M. Feuerer, A. Li et al. // *Nature.* – 2012. – Vol. 486 (7404). – P. 549-553.
73. Collison, L. W. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function / L.W. Collison, C.J. Workman, T.T. Kuo et al. // *Nature.* – 2007. – Vol. 450 (7169). – P. 566-569.
74. Corrales, J. J. Decreased production of inflammatory cytokines by circulating monocytes and dendritic cells in type 2 diabetic men with atherosclerotic complications / J.J. Corrales, M. Almeida, R.M. Burgo et al. // *J. Diabetes Complications.* – 2007. – Vol. 21 (1). – P. 41- 49.
75. Cua, D. J. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system / D.J. Cua, C.M. Tato // *Nature Reviews Immunology.* – 2010. – Vol. 10. – P. 479- 490.
76. Cuspidi, C. Role of echocardiography and carotid ultrasonography in stratifying risk in patients with essential hypertension: the Assessment of Prognostic Risk

- Observational Survey / C. Cuspidi, E. Ambrosioni, G. Mancina et al. // *J. Hypertens.* – 2002. – Vol. 20. – P. 1307-1314.
77. Dang, E. V. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1 / E.V. Dang, J. Barbi, H.Y. Yang et al. // *Cell.* – 2011. – Vol. 146 (5). – P. 772-784.
78. Davila, E. A “Toll” for Th17 cell expansion / E. Davila, J. Kolls // *Journal of Leukocyte Biology.* – 2010. – Vol. 88 (1). – P. 5-7.
79. De Rosa, V. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation / V. De Rosa, C. Procaccini, G. Cali et al. // *Immunity.* – 2007. – Vol. 26(2). – P. 241-255.
80. De Wit, J. CD5 costimulation induces stable Th17 development by promoting IL-23R expression and sustained STAT3 activation / J. de Wit, Y. Souwer, A.J. van Beelen et al. // *Blood.* – 2011. – Vol. 118 (23). – P. 6107- 6114.
81. Deaglio, S. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression / S. Deaglio, K.M. Dwyer, W. Gao et al. // *J. Exp. Med.* – 2007. – Vol. 204(6). – P. 1257-1265.
82. DeFronzo, R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus / R.A. DeFronzo // *Med. Clin. N. Am.* – 2004. – Vol. 88. – P. 787-835.
83. Demaria, M. A STAT3-mediated metabolic switch is involved in tumour transformation and STAT3 addition / M. Demaria, C. Giorgi, M. Lebedzinska et al. // *AGING.* – 2010. – Vol. 2 (11). – P. 823-842.
84. Després, J. P. Abdominal obesity and cardiovascular disease: is inflammation the missing link? / J.P. Després // *Can. J. Cardiol.* – 2012. – Vol. 28 (6). – P. 642-652.
85. Devaraj, S. Human C-reactive protein and the / S. Devaraj, U. Singh, I. Jialal // *Curr. Opin. Lipidol.* – 2009. – Vol. 20 (3). – P. 182-189.
86. Dileepan, T. Robust Antigen specific Th17 T cell response to group A Streptococcus is dependent on IL-6 and intranasal route of infection [Электронный ресурс] / *PLoS Pathog.* – 2011. – Vol. 7 (9). – Режим доступа:

<http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1002252>.

87. Do M, K. Classical PKC is not associated with defective insulin signaling in patients with impaired glucose tolerance / K. do M, H.J. Jang, S.J. Han et al. // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2009. – Vol. 83 (3). – P. 334- 340.
88. Donath, M. Y. Islet inflammation impairs the pancreatic β -cell in type 2 diabetes / M.Y. Donath, M. Boni-Schnetzler, H. Ellingsgaard, J.A. Ehses // *Physiology.* – 2009. – Vol. 24. – P. 325- 331.
89. Donath, M. Y. Type 2 diabetes as an inflammatory disease / M.Y. Donath, S.E. Shoelson // *Nature Reviews Immunology.* – 2011. – Vol. 11. – P. 98- 107.
90. Doronzo, G. Insulin activates hypoxia-inducible factor-1 α in human and rat vascular smooth muscle cells via phosphatidylinositol-3 kinase and mitogen-activated protein kinase pathways: impairment in insulin resistance owing to defects in insulin signaling / G. Doronzo, I. Russo, L. Mattiello et al. // *Diabetologia.* – 2006. – Vol. 49(5). – P. 1049-1063.
91. Dronca, R. S. Neuro-endocrine-immune crosstalk and implications for cancer therapy [Электронный ресурс] / R.S. Dronca, S.N. Markovic, S.G. Holtan, L.F. Porrata // *J. Cell Sci. Ther.* – 2011. – Vol. 2 (2). – Режим доступа: <http://www.omicsonline.org/neuro-endocrine-immune-crosstalk-and-implications-for-cancer-therapy-2157-7013.1000102e.pdf>
92. Ehses, J. A. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes / J.A. Ehses, A. Perren, E. Eppler et al. // *Diabetes.* – 2007. – Vol. 56. – P. 2356-2370.
93. Eid, R. E. Interleukin-17 and interferon- γ are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells / R.E. Eid, D.A. Rao, J. Zhou et al. // *Circulation.* – 2009. – Vol. 119. – P. 1424-1432.
94. Elgebaly, M. M. Vascular protection in diabetic stroke: role of matrix metalloprotease-dependent vascular remodeling / M.M. Elgebaly, R. Prakash, W. Li et al. // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2010. – Vol. 30. – P. 1928-1938.

95. Endharti, A. T. Cutting edge: CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN- γ production and proliferation of CD8⁺ T cells / A.T. Endharti, M. Rifa'i, Z. Shi et al. // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 175(11). – P. 7093-7097.
96. Evans, H. G. Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes / H.G. Evans, T. Suddason, I. Jackson et al. // *PNAS.* – 2007. – Vol. 104 (43). – P. 17034-17039.
97. Fernandez-Real, J. M. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome / J.M. Fernandez-Real, W. Ricart // *Endocrine Reviews.* – 2003. – Vol. 24 (3). – P. 278- 301.
98. Feuerer, M. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters / M. Feuerer, L. Herrero, D. Cipoletta et al. // *Nature Med.* – 2009. – Vol. 15. P. 930- 939.
99. Fischer, S. Insulin-resistant patients with type 2 diabetes mellitus have higher serum leptin levels independently of body fat mass / S. Fischer, M. Hanefeld, S.M. Haffner et al. // *Acta. Diabetol.* – 2002. – Vol. 39. – P.105-110.
100. Flisiak R., Pelszynska M., Prokopowicz D., Rogalska M., Grygoruk U. High concentration of antimitochondrial antibodies predicts progressive primary biliary cirrhosis // *World J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11, №36. – P. 5706-5709.
101. Fontenot, J. D. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells / J.D. Fontenot, M.A. Gavin, A.Y. Rudensky // *Nat. Immunol.* – 2003. – Vol. 4(4). – P. 330-336.
102. Frank, G. D. Requirement of Ca²⁺ and PKC δ for Janus kinase 2 activation by angiotensin II: involvement of PYK2 / G.D. Frank, S. Saito, E.D. Motley et al. // *Molecular Endocrinology.* – 2002. – Vol. 16(2). – P. 367-377.
103. Frauwirth, K. A. Regulation of T lymphocyte metabolism / K.A. Frauwirth, C.B. Thompson // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172. – P. 4661-4665.

104. Freemantle, N. How strong is the association between abdominal obesity and the incidence of type 2 diabetes? / N. Freemantle, J. Holmes, A. Hockey, S. Kumar // *Int. J. Clin. Pract.* – 2008. – Vol. 62(9). – P. 1391-1396.
105. Gage, J. R. Beta blocker and angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy is associated with decreased Th1/Th2 cytokine ratios and inflammatory cytokine production in patients with chronic heart failure / J.R. Gage, G. Fonarow, M. Hamilton et al. // *Neuroimmunomodulation.* – 2004. – Vol. 11(3). – P. 173-180.
106. Garin, M. I. Galectin-1: A key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells / M.I. Garin, C.C. Chu, D. Golshayan et al. // *Blood.* – 2007. – Vol. 109. – P. 2058- 2065.
107. Gartsbein, M. The role of protein kinase C δ activation and STAT3 Ser727 phosphorylation in insulin-induced keratinocyte proliferation / M. Gartsbein, A. Alt, K. Hashimoto et al. // *Journal of Cell Science.* – 2006. – Vol. 119. – P. 470-481.
108. Geraldes, P. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications / P. Geraldes, G.L. King // *Circulation Research.* – 2010. – Vol. 106. – P. 1319-1331.
109. Girardi, M. Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells / M. Girardi // *J. Invest. Dermatol.* –2006. – Vol. 126(1). – P. 25-31.
110. Goldschmidt-Clermont, P. J. Atherosclerosis, Inflammation, Genetics, and Stem Cells: 2011 Update / P. J. Goldschmidt-Clermont, C. Dong, D. Seo, O. Velazquez // *Curr. Atheroscler.* – 2012. – Vol.14(3). – P. 201-210.
111. Gonzalez, Y. High glucose concentrations induce TNF- α production through the down-regulation of CD33 in primary human monocytes [Электронный ресурс] / Y. Gonzalez, M.T. Herrera, G. Soldevila et al. // *BMC Immunology.* – 2012. – № 13. – Режим доступа к журналу: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/13/19>.
112. Grader-Beck, T. cAMP inhibits both Ras and Rap1 activation in primary human T lymphocytes but only Ras inhibition correlates with blockade of cell

- cycle progression / T. Grader-Beck, A.A.F.L. van Puijenbroek, L.M. Nadler, V.A. Boussiotis // *Blood*. – 2003. – Vol. 101. – P. 998-1006.
113. Griffin, G. K. IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation / G.K. Griffin, G. Newton, M.L. Tarrio et al. // *Journal of Immunology*. – 2012. – Vol. 188 (12). – P. 6287- 6299.
114. Han, J. M. Insulin Inhibits IL-10–Mediated Regulatory T Cell Function: Implications for Obesity / J.M. Han, S.J. Patterson, M. Speck et al. // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 192 (2). – P. 623-629.
115. Harrington, L.E. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages / L.E. Harrington, R.D. Hatton, P.R. Mangan // *Nat Immunol* – 2005. – Vol. 6. – P. 1123-1132.
116. Hawley, T. S. *Flow Cytometry Protocols (Second Edition)* / T.S. Hawley, R.G. Hawley // Springer, 2004. – 434 p.
117. Hayashi, H. IL-17A/F modulates fibrocyte functions in cooperation with CD40-mediated signaling / H. Hayashi, A. Kawakita, S. Okazaki et al. // *Inflammation*. – 2013. – Vol. 36 (4). – P. 830-838.
118. He, Q. Regulation of HIF-1 α activity in adipose tissue by obesity-associated factors: adipogenesis, insulin, and hypoxia / Q. He, Z. Gao, J. Yin et al. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2011. – Vol. 300. – P. E877-E885.
119. Heo, Y. J. IL-10 suppresses Th17 cells and promotes regulatory T cells in the CD4⁺ T cell population of rheumatoid arthritis patients / Y.J. Heo, Y.B. Joo, H.J. Oh et al. // *Immunol. Lett.* – 2010. – Vol. 127 (2). – P. 150-156.
120. Herder, C. Association of systemic chemokine concentrations with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes / C. Herder, B. Haastert, S. Müller-Scholze et al. // *Diabetes*. – 2005. – Vol. 54 (Suppl. 2). – P. S11-S17.
121. Hirata, T. Interleukin (IL)-17A Stimulates IL-8 Secretion, Cyclooxygenase-2 Expression, and Cell-Proliferation of Endometriotic Stromal Cells / T. Hirata, Y. Osuga, K. Hamasaki et al. // *Endocrinology*. – 2008. – Vol. 149 (3). – P. 1260-1267.

122. Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders / G.S. Hotamisligil // *Nature*. – 2006. – Vol. 444. – P. 860-867.
123. Huang, C. T. Role of LAG-3 in regulatory T cells / C.T. Huang, C.J. Workman, D. Flies et al. // *Immunity*. – 2004. – Vol. 21(4). – P. 503-513.
124. Huber, S. Th17 Cells Express Interleukin-10 Receptor and Are Controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ Regulatory CD4⁺ T Cells in an Interleukin-10-Dependent Manner / S. Huber, N. Gagliani, E. Esplugues et al. // *Immunity*. – 2011. – Vol. 34 (4). – P. 554-565.
125. Ilan, Y. Induction of regulatory T cells decreases adipose tissue inflammation and alleviates insulin resistance in ob/ob mice / Y. Ilan, R. Maron, A.M. Tukpah et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2010. – Vol. 107(21). – P. 9765-9770.
126. Iyoda, M. IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: synergy with TNF- α and IL-1 β / M. Iyoda, T. Shibata, M. Kawaguchi et al. // *Am J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2010. – Vol. 298 (3). – P. F779-F787.
127. Jacobs, S. R. Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways / S.R. Jacobs, C.E. Herman, N.J. MacIver et al. // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 180. – P. 4476-4486.
128. Jagannathan-Bogdan, M. Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes / M. Jagannathan-Bogdan, M.E. McDonnell, H. Shin et al. // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 186. – P. 1162-1172.
129. Jain, N. Protein kinase C δ associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner / N. Jain, T. Zhang, W.H. Kee et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274. – P. 24392-24400.
130. Jarvis, L. B. Autoreactive human peripheral blood CD8⁺ T cells with a regulatory phenotype and function / L.B. Jarvis, M.K. Matyszak, R.C. Duggleby et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2005. – Vol. 35(10). – P. 2896-2908.

131. Jiang, C. Disruption of hypoxia-inducible factor 1 in adipocytes improves insulin sensitivity and decreases adiposity in high-fat diet-fed mice / C. Jiang, A. Qu, T. Matsubara et al. // *Diabetes*. – 2011. – Vol. 60(10). – P. 2484-2495.
132. Johnson, J. L. Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries / J.L. Johnson, S.J. George, A.C. Newby, C.L. Jackson // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2005. – Vol. 102(43). – P. 15575-15580.
133. Kim, Y. B. Insulin-stimulated protein kinase C lambda/zeta activity is reduced in skeletal muscle of humans with obesity and type 2 diabetes: reversal with weight reduction / Y.B. Kim, K. Kotani, T.P. Ciaraldi et al. // *Diabetes*. – 2003 – Vol. 52 (8). – P. 1935-1942.
134. Kolb, H. An immune origin of type 2 diabetes? / H. Kolb, T. Madrup-Poulsen T. // *Diabetologia*. – 2005. – Vol. 48. – P. 1038-1050.
135. Kolls, J. K. Interleukin-17 family members and inflammation / J.K. Kolls, A. Linden // *Immunity*. – 2004. – Vol. 21. – P. 467-476.
136. Korn, T. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells / T. Korn, E. Bettelli, W. Gao et al. // *Nature*. – 2007. – Vol. 448. – P. 484-487.
137. Kralisch, S. Proinflammatory adipocytokines induce TIMP-1 expression in 3T3-L1 adipocytes / S. Kralisch, J. Klein, U. Lossner et al. // *FEBS Lett*. – 2005. – Vol. 579. – P. 6417-6422.
138. Kryczek, I. Human TH17 cells are long-lived effector memory cells [Электронный ресурс] / I. Kryczek, E. Zhao, Y. Liu et al. // *Sci. Transl. Med.* – 2011. – Vol. 3(104). – Режим доступа: <http://stm.sciencemag.org/content/3/104/104ra100>.
139. Kuestner, R. E. Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F / R.E. Kuestner, D.W. Taft, H. Aaron et al. // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179. – P. 5462-5473.

140. Laan, M. Free, soluble interleukin-17 protein during severe inflammation in human airways / M. Laan, L. Palmberg, K. Larsson et al. // *Eur. Respir. J.* – 2002. – Vol. 19. – P. 534-537.
141. Labat, C. Inflammatory mediators in saliva associated with arterial stiffness and subclinical atherosclerosis / C. Labat, M. Temmar, E. Nagy et al. // *J. Hypertens.* – 2013. – Vol. 31(11). – P. 2251-2258.
142. Lacreusette, A. Defective activations of STAT3 Ser727 and PKC isoforms lead to oncostatin M resistance in metastatic melanoma cells / A. Lacreusette, I. Barbieux, J.M. Nguyen et al. // *J. Pathol.* – 2009. – Vol. 217 (5). – P. 665-676.
143. Laplante, M. mTOR signaling at a glance / M. Laplante, D.M. Sabatini // *J. Cell Sci.* – 2009. – Vol. 122 (20). – P. 3589-3594.
144. Lawrence, M. C. Regulation of insulin gene transcription by a Ca²⁺-responsive pathway involving calcineurin and nuclear factor of activated T cells / M.C. Lawrence, H.S. Bhatt, J.M. Watterson, R.A. Easom // *Mol. Endocrinol.* – 2001. – Vol. 15 (10). – P. 1758-1767.
145. Leungwutiwong, P. Impairment of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in C4-deficient mice / P. Leungwutiwong, W. Ittiprasert, K. Saikhun et al. // *Asia Pac. J. Allergy Immunol.* – 2011. – Vol. 29 (3). – P. 220-228.
146. Lee, Y. K. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage / Y.K. Lee, H. Turner, C.L. Maynard et al. // *Immunity.* – 2009. – Vol. 30. – P. 92-107.
147. Leipe J., Grunke M., Dechant C. et al. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis // *Arthritis and Rheumatism.* – 2010. – Vol. 62 (10). – P. 2876-2885.
148. Lenarczyk, A. Antigen-induced IL-17 response in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy controls / A. Lenarczyk, J. Helsloot, K. Farmer et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2000. – Vol. 122. – P. 41-48.
149. Levin, G. Glucose, insulin, and incident hypertension in the multi-ethnic study of atherosclerosis / G. Levin, B. Kestenbaum, Y.-D. I. Chen et al. // *Am. J. Epidemiol.* – 2010. – Vol. 172 (10). – P. 1144-1154.

150. Li, Y. Protein kinase C θ inhibits insulin signaling by phosphorylating IRS1 at Ser1101 / Y. Li, T.J. Soos, X. Li et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – P. 45304-45307.
151. Liang, S. C. An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment / S.C. Liang, A.J. Long, F. Bennett et al. // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179. – P. 7791-7799.
152. Liao, Y.-H. Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration / Y.-H. Liao, N. Xia, S.-F. Zhou et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2012. – Vol. 59. – P. 420-429.
153. Libby, P. History of discovery: inflammation in atherosclerosis / P. Libby // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2012. – Vol. 32(9). – P. 2045-2051.
154. Lijnen, H. R. Matrix metalloproteinase inhibition impairs adipose tissue development in mice / H.R. Lijnen, E. Maquoi, L.B. Hansen et al. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2002. – Vol. 22. – P. 374-379.
155. Lim, H. W. Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3⁺ regulatory T cells / H.W. Lim, H.E. Broxmeyer, C.H. Kim // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177. – P. 840-851.
156. Lin, H. M. Transforming growth factor-beta/Smad3 signaling regulates insulin gene transcription and pancreatic islet beta-cell function / H.M. Lin, J.H. Lee, H. Yadav et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284(18). – P. 12246-12257.
157. Lindley, S. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes / S. Lindley, C.M. Dayan, A. Bishop et al. // *Diabetes*. – 2005. – Vol. 54. – P. 92-99.
158. Linsen, L. Immunoregulation of autoimmunity by natural killer T cells / L. Linsen, V. Somers, P. Stinissen // *Hum. Immunol.* – 2005. – Vol. 66 (12). – P.1193-1202.

159. Liu, H. Regulation of IL-17 in human CCR6⁺ effector memory T cells / H. Liu, C. Rohowsky-Kochan // *The Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 180. – P. 7948-7957.
160. Liu, H. The FGL2-FcγRIIB pathway: A novel mechanism leading to immunosuppression / H. Liu, I. Shalev, J. Manuel et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2008. – Vol. 38(11). – P. 3114-3126
161. Lochner, M. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17⁺ and regulatory IL-10⁺ Foxp3⁺ RORγt⁺ T cells / M. Lochner, L. Peduto, M. Cherrier et al. // *JEM.* – 2008. – Vol. 205 (6). – P. 1381-1393.
162. Longobardi Givan, A. Flow cytometry: first principles, 2nd edition / A. Longobardi Givan. – Wiley-Liss, Inc., 2001. – 261 p.
163. Lu, L. Restoration of intrahepatic regulatory T cells through MMP-9/13-dependent activation of TGF-β is critical for immune homeostasis following acute liver injury / L. Lu, M. Feng, J. Gu et al. // *J. Mol. Cell. Biol.* – 2013. – Vol. 5 (6). – P. 369-379.
164. Lühn, K. Increased frequencies of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in acute dengue infection / K. Lühn, C.P. Simmons, E. Moran et al. // *JEM.* – 2007. – Vol. 204 (5). – P. 979-985.
165. Lumeng, C. N. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity / C.N. Lumeng, S.M. Deyoung, J.L. Bodzin, A.R. Saltiel // *Diabetes.* – 2007. – Vol. 56. – P. 16- 23.
166. Lyssuk, E. Yu. Reduced number and function of CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ + regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus / E.Yu. Lyssuk, A.V. Torgashina, S.K. Soloviev et al. // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2007. – Vol. 601. – P. 113-119.
167. Macian, F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function / F. Macian // *Nat. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 5. – P. 472-484.
168. Macintyre, A. N. Activated lymphocytes as a metabolic model for carcinogenesis [Электронный ресурс] / A.N. Macintyre, J.C. Rathmell // *Cancer*

- and Metabolism. – 2013. – Vol. 1 (5). – Режим доступа: <http://www.cancerandmetabolism.com/1/1/5>.
169. Maclver, N. J. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival / N.J. Maclver, S.R. Jacobs, H.L. Wieman et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2008. – Vol. 84. – P. 949-957.
170. Madhur, M. S. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction / M.S. Madhur, H.E. Lob, L.A. McCann et al. // *Hypertension.* – 2010. – Vol. 55(2). – P. 500-507.
171. Manavalan, J. S. Alloantigen specific CD8+ / J.S. Manavalan, S. Kim-Schulze, L. Scotto et al. // *Int. Immunol.* – 2004. – Vol. 16 (8). – P. 1055-1068.
172. Manduteanu, I. Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders? / I. Mandutenau, M. Simionescu // *J. Cell Mol. Med.* – 2012. – Vol. 16 (9). – P. 1978-1990.
173. Manrique, C. Thiazide diuretics alone or with beta-blockers impair glucose metabolism in hypertensive patients with abdominal obesity / C. Manrique, M. Johnson, J.R. Sowers // *Hypertension.* – 2010. – Vol. 55(1). – P. 15-17.
174. Maratou, E. Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells / E. Maratou, G. Dimitriadis, A. Kollias et al. // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 37(4). – P. 282-290.
175. Masters, S. L. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes / S.L. Masters, A. Dunne, S.L. Subramanian et al. // *Nature Immunology.* – 2010. – Vol. 11 (10). – P. 897-905.
176. Mattioli, B. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming / B. Mattioli, E. Straface, M.G. Quaranta et al. // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174 (11). – P. 6820-6828.
177. McGeachy, M. J. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology / M.J. McGeachy, K.S. Bak-Jensen, Y. Chen et al. // *Nat. Immunol.* – 2007. – Vol. 8 (12). – P. 1390-1397.

178. McGillicuddy, F. C. Interferon gamma attenuates insulin signaling, lipid storage, and differentiation in human adipocytes via activation of the JAK/STAT pathway / F.C. McGillicuddy, E.H. Chiquoine, C.C. Hinkle et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284 (46). – P. 31936-31944.
179. Meissburger, B. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP1) controls adipogenesis in obesity in mice and in humans / B. Meissburger, L. Stachorski, E. Röder et al. // *Diabetologia.* – 2011. – Vol. 54(6). – P.1468-1479.
180. Michalek, R. D. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets / R.D. Michalek, V.A. Gerriets, S.R. Jacobs et al. // *The Journal of Immunology.* – 2011. – Vol. 186. – P. 3299-3303.
181. Miljkovic, D. Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase-dependent toxicity in mouse beta-cells / D. Miljkovic, I. Cvetkovic, M. Momcilovic et al. // *Cellular and Molecular Life Sciences.* – 2005. – Vol. 62. – P. 2658-2668.
182. Mito, N. Effect of obesity and insulin on immunity in noninsulin-dependent diabetes mellitus / N. Mito, T. Hiyoshi, T. Hosoda et al. // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 2002. – Vol. 56(4). – P. 347-351.
183. Miyara, M. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression / M. Miyara, S. Sakaguchi // *Trends Mol. Med.* – 2007. – Vol. 13(3). –P. 108-116.
184. Moraes-Vieira, P. M. Leptin modulates allograft survival by favoring a Th2 and a regulatory immune profile / P.M. Moraes-Vieira, E.J. Bassi, R.A. Larocca et al. // *Am. J. Transplant.* –2013. – Vol. 13(1). – P. 36-44.
185. Morgan, E. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology / E. Morgan, R. Varro, H. Sepulveda et al. // *Clin. Immunol.* – 2004. – Vol. 110 (3). – P. 252-266.
186. Moscatiello S., Manini R., Marchesini G. Diabetes and liver disease: an ominous association // *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* – 2007. – Vol. 17. – P. 63-70.

187. Mossman T. R. Two types of murine of murine helper T cell clone / T.R. Mossman, H. Cherwinsky, M.W. Bond et al. // *J. Immunol.* – 1986. – Vol. 136. – P. 2348-2257.
188. Mugabo, Y. The connection between C-reactive protein (CRP) and diabetic vasculopathy. Focus on preclinical findings / Y. Mugabo, L. Li, G. Renier // *Curr. Diabetes Rev.* – 2010. – Vol. 6(1). – P. 27-34.
189. Nakashima, Y. Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans / Y. Nakashima, T.N. Wight, K. Sueishi // *Cardiovascular Research.* – 2008. – Vol. 79. – P. 14-23.
190. Nath, N. Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis / N. Nath, M. Khan, M.K. Paintlia et al. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182(12). – P. 8005-
191. Nathan, D. M. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance. Implications for care / D.M. Nathan, M.B. Davidson, R.A. DeFronzo et al. // *Diabetes Care.* – 2007. – Vol. 30 (3). – P. 753-759.
192. Newkirk M.M., Goldbach-Mansky R., Lee J., Hoxworth J., McCoy A., Yarboro C., Klippel J., El-Gabalawy H.S. Advanced glycation end-product (AGE)-damaged IgG and IgM autoantibodies to IgG-AGE in patients with early synovitis // *Arthritis Res. Ther.* – 2003. – Vol. 5 (2). – P. R82-R90.
193. Nikoopour, E. Th17 polarized cells from nonobese diabetic mice following mycobacterial adjuvant immunotherapy delay type 1 diabetes / E. Nikoopour, J.A. Schwartz, K. Huszarik et al. // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 184 (9). – P. 4779-4788.
194. Nishimoto, N. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial / N. Nishimoto, K. Yoshizaki, N. Miyasaka et al. // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50. –P. 1761-1769.
195. Nistala, K. TH 17 and regulatory T cells: Rebalancing pro- and anti-inflammatory forces in autoimmune arthritis / K. Nistala, L.R. Wedderburn // *Rheumatol.* – 2009. – Vol. 48. – P. 602-606.

196. Nurieva, R. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells / R. Nurieva, X.O. Yang, G. Martinez et al. // *Nature*. – 2007. – Vol. 448. – P. 480-483.
197. O'Connor, W. The dual nature of Th17 cells: shifting the focus to function / W. O'Connor, L.A. Zenewicz, R.A. Flavell // *Nature Immunology*. – 2010. – Vol. 11 (6). – P. 471- 476.
198. Olefsky, J. M. Macrophages, inflammation, and insulin resistance / J.M. Olefsky, C.K. Glass // *Annu. Rev. Physiol.* – 2010. – Vol. 72. – P. 219-246.
199. Oleszczak, B. The effect of hyperglycemia and hypoglycemia on glucose transport and expression of glucose transporters in human lymphocytes B and T: An in vitro study / B. Oleszczak, L. Szablewski, M. Pliszka // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2012. – Vol. 96(2). – P. 170-178.
200. Olson, F. J. Circulating matrix metalloproteinase 9 levels in relation to sampling methods, femoral and carotid atherosclerosis / F.J. Olson, C. Schmidt,, A. Gummesson et al. // *Journal of Internal Medicine*. – 2008. – Vol. 263. – P. 626-635.
201. Ormiston, M. L. Impaired natural killer cell phenotype and function in idiopathic and heritable pulmonary arterial hypertension / M.L.Ormiston, C. Chang, L.L. Long et al. // *Circulation*. – 2012. – Vol. 126 (9). – P. 1099- 1109.
202. Ozegbe, P. Impact of cAMP on the T-cell response to type II collagen / P. Ozegbe, A.D. Foey, S. Ahmed, R.O. Williams // *Immunology*. – 2004. – Vol. 111 (1). – P. 35-40.
203. Paintlia, A. S. Combinatorial effect of metformin and lovastatin impedes T-cell autoimmunity and neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis [Электронный ресурс] / A.S. Paintlia, S. Mohan, I. Singh // *J. Clin. Cell. Immunol.* – 2013. – Vol. 30 (4). – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24324917.8014>.
204. Palmer, M. T. Autoimmunity: increasing suspects in the CD4+ T cell lineup / M.T. Palmer, C.T. Weaver // *Nature Immunology*. – 2010. – Vol. 11 (1). – P. 36-40.

205. Pandiyan, P. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells // P. Pandiyan, L. Zheng, S. Ishihara et al. // *Nat. Immunol.* – 2007. – Vol. 8(12). – P. 1353-1362.
206. Papathanassoglou, E. Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice / E. Papathanassoglou, K. El-Haschimi, X.C. Li et al. // *The Journal of Immunology.* – 2006. – Vol. 176 (12). – P. 7745-7752.
207. Park, H. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17 / H. Park, Z. Li, X.O. Yang et al. // *Nat Immunol.* – 2005. – Vol. 6. – P. 1133-1141.
208. Patakas, A. Th17 effector cells support B cell responses outside of germinal centres [Электронный ресурс] / A. Patakas, R.A. Benson, D.R. Withers et al. // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(11). – Режим доступа: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0049715>.
209. Pawelczyk, T. Differential effect of insulin and elevated glucose level on adenosine handling in rat T lymphocytes / T. Pawelczyk, M. Sakowicz-Burkiewicz, K. Kocbuch, A. Szutowicz // *J. Cell Biochem.* – 2005. – Vol. 96 (6). – P. 1296-1310.
210. Pederson, B. K. Interleukin-6 does/ does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis / B.K. Pederson, M.A. Febbraio, R.A. Mooney // *J. Appl. Physiol.* – 2007. – Vol. 102. – P. 814-816.
211. Perrotta, I. Ultrastructural features of human atherosclerosis / I. Perrotta // *Ultrastruct Pathol.* – 2013. – Vol. 37 (1). – P. 43-51.
212. Peterson, R. A. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression / R.A. Peterson // *Toxicologic. Pathology.* – 2012. – Vol. 40. – P. 186-204.
213. Pfoertner, S. Signatures of human regulatory T cells: an encounter with old friends and new players / S. Pfoertner, A. Jeron, M. Probst-Kepper et al. // *Genome Biology.* – 2006. – Vol. 7 (7). – P. R54.1 – R.54.18.

214. Pfützner, A. High-sensitivity C-reactive protein predicts cardiovascular risk in diabetic and nondiabetic patients: effects of insulin-sensitizing treatment with pioglitazone / A. Pfützner, T. Schöndorf, M. Hanefeld, T. Forst // *Journal of Diabetes Science and Technology*. – 2010. – Vol. 4 (3). – P. 706-716.
215. Pickup, J. C. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? / J.C. Pickup, M.A. Crook // *Diabetologia*. – 1998. – Vol. 41. – P. 1241-1248.
216. Pickup, J. C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes / J.C. Pickup // *Diabetes Care*. – 2004. – Vol. 27 (3). – P. 813-823.
217. Platten, M. Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity / M. Platten, S. Youssef, E.M. Hur et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2009. – Vol. 106(35). – P. 14948-14953.
218. Pour, O. R. Prediabetes as a therapeutic target / O.R. Pour, S. Dagogo-Jack // *Clin. Chem*. – 2011. – Vol. 57(2). – P. 215-220.
219. Pradhan, A. D. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes / A.D. Pradhan, J.E. Manson, N. Rifai et al. // *JAMA*. – 2001. – Vol. 286 (3). – P. 327-334.
220. Prentki, M. Islet β cell failure in type 2 diabetes / M. Prentki, C.J. Nolan // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2006. – Vol. 116 (7). – P. 1802-1812.
221. Procaccini, C. Leptin-induced mTOR activation defines a specific molecular and transcriptional signature controlling CD4⁺ effector T cell responses / C. Procaccini, V. De Rosa, M. Galgani et al. // *J. Immunol*. – 2012. – Vol. 189(6). –P. 2941-2953.
222. Qin, J. A metagenome-wide associated study of gut microbiota in type 2 diabetes / J. Qin, Y. Li, Z. Cai et al. // *Nature*. – 2012. – Vol. 490 (7418). – P. 55-60.

223. Rangachari, M. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17 / M. Rangachari, N. Mauremann, R.R. Marty et al. // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203. – P. 2009 – 2019.
224. Rathmell, J. C. Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival / J.C. Rathmell, C.J. Fox, D.R. Plas et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 2003. – Vol. 23. – P. 7315-7328.
225. Ren, H. Leptin enhances in vitro secretion of IgG antiplatelet antibodies by splenocytes and peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura / H. Ren, H. Zhao, T. Wang et al. // *Clin Immunol.* – 2006. – Vol. 120(2). – P. 205-211.
226. Ritchie, S. A. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease / S.A. Ritchie, J.M. Connell // *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* – 2007. – Vol. 17(4). – P. 319-326.
227. Romagnani, S. Human Th17 cells [Электронный ресурс] / S. Romagnani // *Arthritis Research and Therapy.* – 2008. – Vol. 10 (206). – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2453756/>.
228. Romano-Keeler, J. Regulatory properties of the intestinal microbiome effecting the development and treatment of diabetes / J. Romano-Keeler, J.H. Weitkamp, D.J. Moore // *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* – 2012. – Vol. 19 (2). – P. 73-80.
229. Roncarolo, M. G. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans / M.G. Roncarolo, S. Gregori, M. Battaglia et al. // *Immunol. Rev.* – 2006. – Vol. 212. – P. 28-50.
230. Rubinstein, M. R. Differential effect of hyperglycaemia on the immune response in an experimental model of diabetes in BALB/cByJ and C57Bl/6J mice: participation of oxidative stress / M.R. Rubinstein, A.M. Genaro, M.R. Wald // *Clin. Exp. Immunol.* – 2013. – Vol. 171(3). – P. 319-329.

231. Rutschow, S. Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease / S. Rutschow, J. Li, H.P. Schultheiss et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – Vol. 69. – P. 646-656.
232. Ryba-Stanisławowska, M. Loss of the balance between CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells and CD4(+)IL17A(+) Th17 cells in patients with type 1 diabetes / M. Ryba-Stanisławowska, M. Skrzypkowska, M. Myśliwiec, J. Myśliwska // *Hum Immunol.* – 2013. – Vol. 74 (6). – P. 701 – 707.
233. Sajan, M. P. Insulin signalling in hepatocytes of humans with type 2 diabetes: excessive production and activity of protein kinase C- α (PKC- α) and dependent processes and reversal by PKC- α inhibitors / M.P. Sajan, R.V. Farese // *Diabetologia.* – 2012. – Vol. 55 (5). – P. 1446-1457.
234. Sakaguchi, S. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases / S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano // *J. Immunol.* – 1995. – Vol. 155(3). – P. 1151-1164.
235. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses / S. Sakaguchi // *Annu. Rev. Immunol.* – 2004. – Vol. 22. – P. 531-562.
236. Sakaguchi, S. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology / S. Sakaguchi, F. Powrie // *Science.* – 2007. – Vol. 317(5838). – P. 627-629.
237. Sakaguchi, S. Regulatory T cells and immune tolerance / S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono // *Cell.* – 2008. – Vol. 133. – P. 775-787.
238. Sampanis, C. Arterial hypertension in diabetes mellitus: from theory to clinical practice / C. Sampanis, C. Zamboulis // *Hippokratia.* – 2008. – Vol. 12(2). – P. 74-80.
239. Sarris, M. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition / M. Sarris, K. G. Andersen, F. Randow et al. // *Immunity.* – 2008. – Vol. 28. – P. 402-413.

240. Schneider, A. The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+FOXP3+ regulatory T cells // A. Schneider, M. Rieck, S. Sanda et al. // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181. – P. 7350-7355.
241. Schulz, S. M. IL-17A is produced by Th17, $\gamma\delta$ T cells and other CD4-lymphocytes during infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and has a mild effect in bacterial clearance / S.M. Schulz, G. Kohler, C. Holscher et al. // *International Immunology.* – 2008. – Vol. 9 (9). – P. 1129-1138.
242. Serne, E. H. Microvascular Function Relates to Insulin Sensitivity and Blood Pressure in Normal Subjects / E.H. Serne, D.A. Coen, J.C. ter Maaten et al. // *Circulation.* – 1999. – Vol. 99. – P. 896-902.
243. Serne, E. H. Capillary recruitment is impaired in essential hypertension and relates to insulin's metabolic and vascular actions / E.H. Serne, R.O.B. Gansb, J.C. ter Maaten et al. // *Cardiovascular Research.* – 2001. – Vol. 49. – P. 161-168.
244. Sethi, A. Role of miRNAs in CD4 T cell plasticity during inflammation and tolerance [Электронный ресурс] / A. Sethi, N. Kulkarni, S. Sonar, G. Lal // *Front. Genet.* – 2013. – Vol. 4 (8). – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3560369/>.
245. Shalev, I. Making sense of regulatory T cell suppressive function / I. Shalev, M. Schmelzle, S.C. Robson, G. Levy // *Semin. Immunol.* – 2011. – Vol. 23(4). – P. 282-292.
246. Shamshiev, A. T. Dyslipidemia inhibits Toll-like receptor-induced activation of CD8alpha-negative dendritic cells and protective Th1 type immunity / A.T. Shamshiev, F. Ampenberger, B. Ernst et al. // *J. Exp. Med.* – 2007. – Vol. 204 (2). – P. 441-452.
247. Shanik, M. H. Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? / M.H. Shanik, Y. Xu, J. Skrha et al. // *Diabetes Care.* – 2008. – Vol. 31 (Suppl 2). – P. S262-S268.
248. Shapiro, H. M. Practical flow cytometry / H.M. Shapiro. – 4th edition. – Wiley-Liss, Inc., 2003. – 681 p.

249. Sheikh-Ali, M. Medical management and strategies to prevent coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus / M. Sheikh-Ali, P. Raheja, N. Borja-Hart // *Postgrad. Med.* – 2013. – Vol. 125(1). – P. 17-33.
250. Shevach, E. M. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells / E.M Shevach // *Immunity.* – 2006. – Vol. 25(2). – P. 195-201.
251. Shi, L. Z. HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells / L.Z. Shi, R. Wang, G. Huang et al. // *JEM.* – 2011. – Vol. 208 (7). – P. 1367- 1376.
252. Shibui, A. Th17 cell-derived IL-17 is dispensable for B cell antibody production / A. Shibui, E. Shimura, A. Nambu et al. // *Cytokine.* – 2012. – Vol. 59(1). – P. 108-114.
253. Shoelson, S. E. Inflammation and insulin resistance / S.E. Shoelson, J. Lee, A.B. Goldfine // *The Journal of Clinical Investigation.* – 2006. – Vol. 116 (7). – P. 1793-1801.
254. Simons, D. M. Autoreactive Th1 cells activate monocytes to support regional Th17 responses in inflammatory arthritis / D.M. Simons, S. Oh, E. Kropf et al. // *J. Immunol.* – 2013. – Vol. 190 (7). – P. 3134-3141.
255. Smith, T. J. Insulin-like growth factor-I regulation of immune function: a potential therapeutic target in autoimmune diseases? / T.J. Smith // *Pharmacol. Rev.* – 2010. – Vol. 62(2). – P. 199-236.
256. Smith, T. R. Revival of CD8+ Treg-mediated suppression / T.R. Smith, V. Kumar // *Trends Immunol.* – 2008. – Vol. 29(7). – P. 337-342.
257. Sonderegger I. Neutralization of IL-17 by active vaccination inhibits IL-23-dependent autoimmune myocarditis / I. Sonderegger, T.A. Röhn, M.O. Kurrer et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2006. – Vol. 36. P. 2849-2856.
258. Spranger, J. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes / Spranger J., Kroke A., Mohig M., et al. // *Diabetes.* – 2003. – Vol. 52. – P. 812-817.
259. Standards of Medical Care in Diabetes – 2013. American Diabetes Association // *Diabetes Care.* – 2013. – Vol. 36 (Suppl. 1). – P. S11-S66.

260. Stentz, F. B. Activated T lymphocytes in Type 2 diabetes: implications from in vitro studies / F.B. Stentz, A.E. Kitabchi // *Curr. Drug Targets.* – 2003. – Vol. 4(6). – P. 493-503.
261. Steppel, J. H. Beta-cell failure in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus / J.H. Steppel, E.S. Horton // *Curr. Diabetes Rep.* – 2004. – Vol. 4. – P. 169-175.
262. Stumhofer, J.S. Negative regulation of Th17 responses / J. S. Stumhofer, J. Silver, C.A. Hunter // *Semin. Immunol.* – 2007. – Vol. 19. – P. 394-399.
263. Szablewski, L. GLUT4 is expressed in circulating lymphocytes of diabetic patients. A method to detect early prediabetic stages? / L. Szablewski, A. Sobczyk-Kopciol, B. Oleszczak et al. // *Diabetologia Croatica.* – 2007. – Vol. 36. – P. 69-76.
264. Tan, C. Associations of matrix metalloproteinase-9 and monocyte chemoattractant protein-1 concentrations with carotid atherosclerosis, based on measurements of plaque and intima-media thickness / C. Tan. Y. Liu, W. Li et al. // *Atherosclerosis.* – 2014. – Vol. 232. – P. 199-203.
265. Tárnok, A. Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum / A. Tárnok, J. Hamsch, R. Chen, R. Varro // *Clinical Chemistry.* – 2003. – Vol. 49 (6). – P. 1000-1002.
266. Tenzer-Iglesias, P. Managing postprandial glucose levels in patients with diabetes / P. Tenzer-Iglesias, S. Brunton // *J. Fam. Pract. Suppl.* – 2008. – Vol. 57 (1). – P. S17-S24.
267. Tesmer, L. A. Th17 cells in human disease / L.A. Tesmer, K. Lundy, S. Sarkar, D.A. Fox // *Immunological Reviews.* – 2008. – Vol. 223. – P. 87-113.
268. Tilg, H. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance / H. Tilg, A.R. Moschen // *Mol. Med.* – 2008. – Vol. 14 (3 - 4). – P. 222-231.
269. Torchinsky, M. B. Innate immune recognition of infected apoptic cells directs T(H)17 cell differentiation / M.B. Torchinsky, J. Garaude, A.P. Martin, J.M. Blander // *Nature.* – 2009. – Vol. 458. – P. 78-82.

270. Touboul, P. J. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004-2006) / P. Touboul, M.G. Hennerici, S. Meairs et al. // *Cerebrovasc. Dis.* – 2007. – Vol. 23 (1). – P. 75-80;
271. Tresaco, B. Truncal and abdominal fat as determinants of high triglycerides and low HDL-cholesterol in adolescents / B. Tresaco, L.A. Moreno, J.R. Ruiz et al. // *Obesity.* – 2009. – Vol. 17. – P. 1086-1091.
272. Uemura, S. Diabetes Mellitus Enhances Vascular Matrix Metalloproteinase Activity. Role of Oxidative Stress / S. Uemura, H. Matsushita, W. Li et al. // *Circulation Research.* – 2001. – Vol. 88. – P. 1291-1298.
273. Van der Weerd, K. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype / K. Van der Weerd, W.A. Dik, B. Schrijver et al. // *Diabetes.* – 2012. –Vol. 61(2). – P. 401-408.
274. Vanden, E. S. IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naive T cells in human / E.S. Vanden, S. Goriely, D. De Wit et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2005. – Vol. 35 (2). – P. 469-475.
275. Veldhoen, M. TGF- β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells / M. Veldhoen, R. J. Hocking, C.J. Atkins et al. // *Immunity.* – 2006. –Vol. 24. – P. 179-189.
276. Viardot, A. Potential antiinflammatory role of insulin via the preferential polarization of effector T cells toward a T helper 2 phenotype / A. Viardot, S.T. Grey, F. Mackay, D. Chisholm // *Endocrinology.* – 2007. –Vol. 148. – P. 346-353.
277. Viardot, A. Obesity is associated with activated and insulin resistant immune cells / A. Viardot, L.K. Heilbronn, D. Samocha-Bonet et al. // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2012. – Vol. 28(5). – P. 447-454.
278. Volpe, E. A critical function for transforming growth factor beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human Th-17 responses // E. Volpe, N. Servant, R. Zollinger et al. // *Nature Immunology.* – 2008. – Vol. 9. – P. 650-657.

279. Voo, K. S. Identification of IL-17-producing FoxP3⁺ regulatory T cells in humans / K.S. Voo, Y.-H. Wang, F.R. Santori et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2009. – Vol. 106. P. 4793-4798.
280. Wågsäter, D. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr(-/-)Apob(100/100) mouse / D. Wågsäter, C. Zhu, J. Björkegren et al. // *Int. J. Mol. Med.* – 2011. – Vol. 28(2). – P. 247-253.
281. Wan, Y. Y. “Yin-yang” functions of transforming growth factor- β and T regulatory cells in immune regulation / Y.Y. Wan, R.A. Flavell // *Immunol. Rev.* – 2007. – Vol. 220. – P. 199-213.
282. Wang, B. Q. Cancer-derived matrix metalloproteinase-9 contributes to tumor tolerance / B.Q. Wang, C.M. Zhang, W. Gao et al. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 137(10). – P. 1525-1533.
283. Wang, R. Metabolic checkpoints in activated T cells / R. Wang, D.R. Green // *Nat. Immunol.* – 2012. – Vol. 13 (10). – P. 907-915.
284. Watson, K. E. Atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus: the role of insulin resistance / K.E. Watson, A.L. Peters Harmel, G. Matson // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2003. – Vol. 8(4). – P. 253-260.
285. Wauters, M. Leptin levels in type 2 diabetes: associations with measures of insulin resistance and insulin secretion / M. Wauters, R.V. Considine, J.S. Yudkin et al. // *Horm Metab Res.* – 2003. – Vol. 35(2). – P. 92-96.
286. Weaver, C. T. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties / C.T. Weaver, L.E. Harrington, P.R. Mangan et al. // *Immunity.* – 2006. – Vol. 24. – P. 677-688.
287. Weaver, C. T. Interplay between the Th17 and Treg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective / C.T. Weaver, R.D. Hutton // *Nature Reviews Immunology.* – 2009. – Vol. 9. – P. 883-889.
288. Wei, S. Th17 cells have stem cell-like features and promote long-term immunity / S. Wei, E. Zhao, I. Kryczek, W. Zou // *Oncoimmunology.* – 2012. – Vol. 1 (4). – P. 516-519.

289. Weiner, H. L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells / H.L. Weiner // *Immunol. Rev.* – 2001. – Vol. 182. – P. 207-214.
290. Weisberg, S. P. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding / S.P. Weisberg, D. Hunter, R. Huber et al. // *J. Clin. Invest.* – 2006. – Vol. 116. – P. 115-124.
291. Weise, S. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNA production and protein secretion are induced by interleukin-1 beta in 3T3-L1 adipocytes / S. Weise, S. Kralisch, G. Sommer et al. // *J. Endocrinol.* – 2008. – Vol. 198. – P. 169-174.
292. Westermann, D. Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism / D. Westermann, S. Rutschow, S. Jager et al. // *Diabetes.* – 2007. – Vol. 56. – P. 641- 646.
293. Wieman, H. L. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking / H.L. Wieman, J.A. Wofford, J.C. Rathmell // *Mol. Biol. Cell.* – 2007. – Vol. 18. – P. 1437-1446.
294. Wilson, N.J. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells / N.J. Wilson, K. Boniface, J.R. Chan et al. // *Nat. Immunol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 950-957.
295. Winer, S. Normalization of obesity associated insulin resistance through immunotherapy / S. Winer, Y. Chan, G. Paltser et al. // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 15. – P. 921-929.
296. Winer, S. Obesity predisposes to Th17 bias / S. Winer, G. Paltser, Y. Chan et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2009. – Vol. 39. – P. 2629-2635.
297. Woollard, K. J. Immunological aspects of atherosclerosis / K.J. Woollard // *Clin. Sci. (Lond).* – 2013. – Vol. 125 (5). – P. 221-235.

298. Wright, J.F. Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4⁺ T cells / J.F. Wright, Y. Guo, A. Quazi et al. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282. – P. 13447-13455.
299. Wu, H. J. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells / H.J. Wu, I.I. Ivanov, J. Darce et al. // *Immunity.* – 2010. – Vol. 32. – P. 815-827.
300. Wu, H. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity / H. Wu, S. Ghosh, X.D. Perrard et al. // *Circulation.* – 2007. – Vol. 115(8). – P. 1029-1038.
301. Xystrakis, E. Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation / E. Xystrakis, A.S. Dejean, I. Bernard et al. // *Blood.* – 2004. – Vol. 104(10). – P. 3294-3301.
302. Yabu, M. IL-23-dependent and independent enhancement pathways of IL-17A production by lactic acid / M. Yabu, H. shime, H. Hara et al. // *Int. Immunol.* – 2011. – Vol. 23(1). – P. 29-41.
303. Yamada, N. Genetic variations in the hypoxia-inducible factor-1 α gene is associated with type 2 diabetes in Japanese / N. Yamada, Y. Horikawa, N. Oda et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – Vol. 90(10). – P. 5841-5847.
304. Yamashita, A. Medial and adventitial macrophages are associated with expansive atherosclerotic remodeling in rabbit femoral artery / A. Yamashita, K. Shoji, T. Tsuruda et al. // *Histol. Histopathol.* – 2008. – Vol. 23. – P. 127-136.
305. Yang, X. O. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells / X.O. Yang, A.D. Panopoulos, R. Nurieva et al. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282. – P. 9358-9363.
306. Yang, X. O. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptor ROR alpha and ROR gamma / X.O. Yang, B.P. Pappu, R. Nurieva et al. // *Immunity.* – 2008. – Vol. 28. – P. 29-39.
307. Yiang, C. Disruption of hypoxia-inducible factor in adipocytes improves insulin sensitivity and decreases adiposity in high-fat diet-fed mice / C. Yiang, A. Qu, T. Matsubara et al. // *Diabetes.* – 2011. – Vol. 60 (10). – P. 2484-2495.

308. Zeng, C. The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications / C. Zeng, X. Shi, B. Zhang et al. // *J. Mol. Med. (Berl.)*. – 2012. – Vol. 90 (2). – P. 175-186.
309. Zhang, W. Deficiency in regulatory T cells results in development of antimitochondrial antibodies and autoimmune cholangitis / W. Zhang, R. Sharma, S. Ju et al. // *Hepatology*. – 2009. – Vol. 49 (2). – P. 545-552.
310. Zhang, Y. Insulin promotes T cell recovery in a murine model of autoimmune myocarditis / Y. Zhang, R. Zhuang, C. Geng et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2013. – Vol. 171(1). – P. 46-53.
311. Zhou, Q. Isolated CD39 expression on CD4⁺ T cells denotes both regulatory and memory populations / Q. Zhou, J. Yan, P. Putheti et al. // *Am. J. Transplant.* – 2009. – Vol. 9(10). – P. 2303-2311.
312. Zhou, X. Plasticity of CD4⁺ FoxP3⁺ T cells / X. Zhou, S. Baily-Bucktrout, L.T. Jeker, J.A. Bluestone // *Curr. Opin. Immunol.* – 2009. – Vol. 21. – P. 281-285.
313. Zielinski, C. E. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β / C.E. Zielinski, F. Mele, D. Aschenbrenner et al. // *Nature*. – 2012. – Vol. 484. – P. 514-519.
314. Zuniga, L. A. IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity / L.A. Zuniga, W.-J. Shen, B. Joyce-Shaikh et al. // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185 (11). – P. 6947-6959.