

**КОЛОГРИВОВА**  
**Ирина Вячеславовна**

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

14.03.03 – патологическая физиология

14.01.05 – кардиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт кардиологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук,  
профессор

Кошельская Ольга Анатольевна

кандидат медицинских наук

Суслова Татьяна Евгеньевна

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий лабораторией биохимии опухолей  
ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН

Кондакова Ирина Викторовна

доктор медицинских наук, руководитель  
терапевтического отделения филиала  
«Томский НИИ курортологии  
и физиотерапии» ФГБУ «Сибирский  
Федеральный научно-клинический центр»  
ФМБА России

Смирнова Ирина Николаевна

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (г. Новосибирск)

Защита состоится « 26 » сентября 2014 г. в 9<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и на сайте [www.ssmu.ru](http://www.ssmu.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » июля 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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 [Sampanis C., 2008; Levin G., 2010]. 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 [Рунихин А.Ю., 2007; Дедов И.И., 2012]. 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» [Дедов И.И., 2012].

Было показано, что субклиническое воспаление может вносить вклад в патогенез нарушения толерантности к углеводам (НТУ) и СД 2-го типа, но механизмы его развития остаются изученными недостаточно [Kolb H., 2005; Notamisliligil G.S., 2006; Tilg H., 2008]. 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 [Wu H. 2007; Donath M.Y., 2011].

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, сопровождающихся развитием воспаления [Cheng X., 2008; Tesmer L.A., 2008; Ryba-Stanisławowska M., 2013]. 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 [Bluestone J.A., 2009; O'Connor W., 2010]. 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) [Park H., 2005; Romagnani S., 2008; Zhang W., 2009; Leaungwutiwong P., 2011]. 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 осложнений СД 2-го типа – атеросклероза [Goldschmidt-Clermont P.J., 2012; Libby P., 2012].

### **Степень разработанности темы исследования**

В экспериментальных исследованиях отмечена ассоциация ожирения и инсулинорезистентности с увеличением содержания провоспалительных Th17 и Th1 и снижением количества иммуносупрессорных FoxP3+Т-регуляторных лимфоцитов в жировой ткани и селезенке [Feurerer M., 2009; Winer S., 2009]. Однако имеется лишь незначительное количество работ, посвященных

изучению функционирования Th17 и Treg у пациентов с сочетанием АГ и СД 2-го типа, в которых взаимосвязь между метаболическими и иммунологическими параметрами не изучалась [Jagannathan-Bogdan M., 2011; Zeng C., 2012]. Также мы не встретили данных о состоянии CD4+ субпопуляций Т-лимфоцитов при НТУ. Дифференцировка и пролиферация Т-лимфоцитов в высокой степени зависят от клеточного метаболизма глюкозы и инсулинового сигналинга [Jacobs S.R., 2008; Michalek R. D., 2011; Dang E.V., 2011; Caro-Maldonado A., 2012]. Однако в литературе нет данных о том, как влияет изменение содержания глюкозы и инсулина в среде культивирования на функциональную активность Th17.

### **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 Т-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, экстрагируемым ядерным антигенам, 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- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  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+ T-регуляторных лимфоцитов, увеличением содержания Th17-, Th1-, Th1/Th17-, IL-23R+-лимфоцитов в крови, IL-1 $\beta$  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+ T-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+ T-регуляторных лимфоцитов, увеличение количества IFN- $\gamma$ + 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 T-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- $\beta$  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 T-лимфоцитов-хелперов у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с нарушениями углеводного обмена. Выявленные изменения проявляются увеличением функциональной активности T-хелперов с провоспалительным потенциалом (Th17- и Th1-лимфоциты) и снижением содержания T-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 культур клеток крови, сыворотка крови и цельная кровь с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА).

Основные методы исследования: 1) выделение и культивирование мононуклеаров крови; 2) определение содержания основных субпопуляций лимфоцитов и субпопуляций CD4+ Т-лимфоцитов в крови методом проточной цитометрии; 3) определение концентрации цитокинов методом мультиплексного анализа; 4) определение содержания антител к ткани сердца методом непрямой иммунофлуоресценции; 5) иммуноферментный анализ (ИФА); 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- $\gamma$ ), 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- $\gamma$ , 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)- $\beta$ , регулирующих активность Th17.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

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

Результаты исследования доложены и обсуждены на XI (2010), XII (2011), XIII (2012), XIV (2014) ежегодных семинарах 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 Российской Федерации.

#### **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). Автор принимал

непосредственное участие в планировании исследования и разработке методического подхода к его реализации. Автором проведен анализ литературы, выполнены иммунологические и биохимические исследования, статистическая обработка полученных данных и интерпретация результатов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

В основу работы положены данные обследования 90 человек: 1 группа – пациенты с АГ, ассоциированной с СД 2-го типа (далее – пациенты с СД 2-го типа) – 35 человек; 2 группа – пациенты с АГ, ассоциированной с НТУ (далее – пациенты с НТУ) – 16 человек; 3 группа – 15 пациентов с АГ без нарушений углеводного обмена (пациенты с АГ); 4 группа – 24 здоровых человека сопоставимого возраста и пола (здоровые добровольцы). Характеристика пациентов и здоровых добровольцев представлена в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика пациентов и здоровых добровольцев, (Me (Q<sub>1</sub> – Q<sub>3</sub>))

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 (ИМТ, кг/м <sup>2</sup> )	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 талии (ОТ, 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)	-	

Примечание: здесь и далее Me – медиана, Q<sub>1</sub> – 25-ый процентиль, Q<sub>3</sub> – 75-ый процентиль; n – число обследованных

Всем пациентам проводили комплексное клиничко-инструментальное и лабораторное обследование. Диагноз НТУ и СД 2-го типа был подтвержден врачом-эндокринологом ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН канд. мед. наук Е. Н. Бабич. Качество контроля углеводного обмена оценивали по содержанию гликозилированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>) и пре-и постпрандиальной (натощак и через 2 часа после приема пищи) концентрации глюкозы в плазме. Всеми пациентами подписано информированное согласие на участие в исследовании.

Все обследованные пациенты получали регулярную антигипертензивную терапию, включающую комбинацию блокаторов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента

или сартанов), индапамидом ретардом и блокаторами медленных кальциевых каналов либо  $\beta$ -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. Большинство пациентов, отобранных в исследование, по крайней мере, в течение 10-14 дней терапию статинами не получали. Здоровые добровольцы на момент исследования медикаментозных препаратов не получали.

Пациентам было проведено ультразвуковое сканирование сонных артерий в В-режиме. Субклинический атеросклероз диагностировали при утолщении комплекса «интима-медиа» (КИМ) более 0,9мм и/или наличии стенозирования просвета сосуда менее 50% [Cuspidi С., 2002; Touboul P.J., 2007].

Материалом для исследования являлась венозная кровь, взятая утром натощак. В цельной крови с ЭДТА с помощью моноклональных антител, меченных флуорохромами, определяли относительное и абсолютное содержание основных субпопуляций лимфоцитов (CD45+CD3-CD19+, CD45+CD3+CD4+, CD45+CD3+CD8+, CD45+CD3+CD56+CD16+, CD45+CD3-CD56+CD16+) методом проточной цитометрии.

Содержание Th17 и Th1 оценивали в мононуклеарной фракции крови по способности лимфоцитов к спонтанной и стимулированной форбол 12-миристат 13-ацетатом (ФМА) в сочетании с иономицином внутриклеточной продукции IL-17 и IFN- $\gamma$ , соответственно. Определяли количество лимфоцитов, несущих на поверхности рецептор к IL-23 (IL-23R+). Treg идентифицировали по внутриклеточному транскрипционному фактору FoxP3 и CD25 (все реагенты для фенотипирования клеток - Becton Dickinson, США). Результаты учитывали по проценту клеток от CD4+-лимфоцитов. Для расчета абсолютного количества клеток проводили общий анализ крови с помощью автоматического гематологического анализатора ABX Micros 60 OT 18 (HORIBA ABX Diagnostics Inc., Франция).

У 11 здоровых добровольцев и 13 пациентов с СД 2-го типа оценивали влияние различных концентраций инсулина и глюкозы *in vitro* на функциональную активность Th17. Для этого по  $10^6$  мононуклеарных клеток крови помещали в 6 пробирок емкостью 15 мл с полной средой RPMI. Три пробирки с концентрацией глюкозы 5 мМ, 10 мМ и 20 мМ не содержали инсулина; три пробирки, помимо глюкозы, содержали в среде инсулин: в пробирки с концентрацией глюкозы 5 мМ добавляли  $10^{-10}$  М и  $10^{-8}$  М инсулина, в пробирку с концентрацией глюкозы 20 мМ –  $10^{-8}$  М инсулина. Для контроля осмолярности была использована пробирка, содержащая 5 мМ глюкозы и 15 мМ маннитола (все реагенты – Sigma Aldrich, США). Через 24 ч супернатанты клеточных культур собирали и хранили при  $-40$  °С до последующего анализа. Клетки ресуспендировали и определяли число IL-17+ Th17 методом проточной цитометрии. Для оценки жизнеспособности клетки окрашивали 7-

актиноаминомицином D (7-AAD, Becton Dickinson, США). Жизнеспособность клеток варьировала от 95% до 98%.

Секреция цитокинов оценивалась в венозной гепаринизированной крови с помощью наборов для культивирования и митогенной активации клеток «Цитокин-Стимул-Бест» («Вектор-БЕСТ», Россия).

В сыворотке крови и супернатантах суточных культур клеток крови и мононуклеаров крови методом мультиплексного анализа определяли содержание IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, фактора некроза опухолей (TNF)- $\alpha$ , интерферона (IFN)- $\gamma$  (набор Human Th1/Th2/Th17, BD Bioscience, США) и методом ИФА – IL-1 $\beta$  («Протеиновый контур», Россия). В супернатантах культур мононуклеаров крови методом ИФА определяли содержание TGF- $\beta$  (Invitrogen, США) и IL-23 (eBioscience, США).

Все исследования, основанные на методе проточной цитометрии, проводили на четырехцветном проточном цитометре FACSCalibur с использованием программы CellQuestPro (BD Biosciences, США).

В сыворотке крови методом ИФА определяли содержание инсулина (Monobind, США), С-пептида инсулина (Diagnostic System Laboratories, США), С-реактивного белка высокочувствительным методом (hsCRP; набор Вектор-БЕСТ, Россия), ревматоидного фактора (РФ) (Вектор-БЕСТ, Россия), антител к митохондриям подтипа M2 (AMA-M2) и антител к экстрагируемым ядерным антигенам (ANA) (ORGENTEC Diagnostika GmbH, Германия), MMP-2 и -9 (R&D, США), тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 1-го типа (TIMP-1; eBioscience, США). Методом непрямой иммунофлуоресценции оценивали содержание антител к ткани сердца (IMMCO Diagnostics, США).

Ферментативным колориметрическим методом исследовали липидный спектр сыворотки крови (общий холестерол (ОХС), триацилглицеролы (ТАГ), холестерол липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) – все наборы ЗАО «Диакон-ДС», г. Пушкино). Иммунотурбидиметрическим методом определяли процентное содержание HbA<sub>1c</sub> в крови (DiaSys, Германия). Рассчитывали концентрацию холестерола липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП) по формуле Фридвальда (ХС-ЛПНП (мМ)=ОХС (мМ) – (ТАГ (мМ)/2,2) – ХС-ЛПВП (мМ)) и соотношение ХС-ЛПНП/ХС-ЛПВП. Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазным методом на анализаторе BIOSEN C-line Clinic (Германия).

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 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 проводили по методу Спирмена. Для определения вклада независимых параметров в вариацию зависимой переменной применяли линейный регрессионный анализ с

построением уравнения регрессии. Для формирования групп наблюдений при помощи предварительно заданных переменных использовали кластерный анализ. Во всех методах статистической обработки результатов принимали альтернативную гипотезу (о различии выборок или взаимосвязи параметров) при уровне значимости  $p < 0,05$  [Зайцев В.М., 2003].

### Результаты исследования и их обсуждение

Пациенты с СД 2-го типа и НТУ характеризовались увеличением концентрации глюкозы натощак, инсулина в сыворотке крови и процентного содержания HbA1c по сравнению со здоровыми добровольцами и пациентами с АГ. 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. У всех пациентов, включенных в исследование, была выявлена дислипидемия (при АГ: увеличение содержания ОХС ( $p < 0,001$ ), ХС-ЛПНП ( $p < 0,001$ ), ТАГ ( $p < 0,001$ ), снижение содержания ХС-ЛПВП ( $p < 0,001$ ) по сравнению со здоровыми; при СД 2-го типа и НТУ: уменьшение содержания ХС-ЛПВП ( $p = 0,002$  и  $p = 0,024$ ), увеличение содержания ТАГ ( $p < 0,001$  и  $p = 0,001$ ) и соотношения ХС-ЛПНП/ХС-ЛПВП ( $p = 0,021$  и  $p = 0,020$ ) по сравнению со здоровыми).

В группе пациентов с СД типа 2 выявлено увеличение абсолютного и относительного содержания CD4+ Т-лимфоцитов ( $p = 0,004$  и  $p = 0,030$ , соответственно), а в группе пациентов с АГ – более высокое абсолютное и относительное содержание NK-клеток по сравнению с группой здоровых добровольцев ( $p = 0,044$  и  $p = 0,037$ , соответственно).

Для пациентов с СД 2-го типа и НТУ было характерно снижение процентного содержания CD4+FoxP3+ Treg относительно здоровых добровольцев и пациентов с АГ (Таблица 2). У пациентов с НТУ абсолютное количество Treg, было меньше, чем у здоровых добровольцев, пациентов с АГ и пациентов с СД 2-го типа (Таблица 2). При этом количество CD25<sup>high</sup> клеток 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).

Количество Th17, спонтанно продуцирующих IL-17, и содержание двойных позитивных Th17/Th1-лимфоцитов у пациентов с СД 2-го типа и НТУ было выше, чем у пациентов с АГ (Таблица 2). Абсолютное количество CD4+-клеток, отличавшихся спонтанной и стимулированной продукцией IL-17, при СД 2-го типа было выше, чем при АГ и АГ+НТУ (Таблица 2). Только в группе пациентов с НТУ мы обнаружили увеличение содержания активных Th17 и Th1/Th17 по сравнению с группой здоровых добровольцев (Таблица 2). Для пациентов с СД 2-го типа и НТУ было характерно увеличение относительного количества IFN- $\gamma$ -продуцирующих Th1-лимфоцитов по сравнению с группой здоровых добровольцев и пациентов с АГ (Таблица 2).

Экспрессия рецептора к IL-23 необходима для стабилизации Th17-фенотипа [Bell G. M., 2011]. При НТУ и при СД 2-го типа после стимуляции

ФМА и иономицином процент IL-23R+ клеток был выше, чем в группе пациентов с АГ (p=0,002 и p=0,028 при НТУ и СД 2-го типа, соответственно).

Таблица 2  
Содержание FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов, Th1 и Th17-лимфоцитов, (Ме (Q<sub>1</sub> – Q<sub>3</sub>))

Параметр		1. Здоровые добровольцы (n=24)	2. Пациенты с АГ (n=15)	3. Пациенты с АГ+СД (n=35)	4. Пациенты с АГ+НТУ (n=16)	p
FoxP3+ Treg, %		4,73 (3,68–5,88)	5,22 (4,94–6,80)	3,32 (2,64 – 4,23)	3,86 (2,27 – 5,55)	p <sub>1-3</sub> <0,001 p <sub>1-4</sub> =0,011 p <sub>2-3</sub> <0,001 p <sub>2-4</sub> <0,001
FoxP3+ Treg, 10 <sup>6</sup> клеток/л		1055 (820-1220)	647 (599-851)	879 (599-1098)	270 (148-392)	p <sub>1-4</sub> <0,001 p <sub>2-4</sub> =0,001 p <sub>3-4</sub> =0,001
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 <sub>2-3</sub> =0,004 p <sub>2-4</sub> =0,063
	Th17, 10 <sup>3</sup> клеток/л	1900 (1651 - 2771)	600 (549 - 702)	1499 (968 - 2635)	711 (552 - 869)	p <sub>2-3</sub> <0,001 p <sub>3-4</sub> =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 <sub>2-3</sub> =0,001 p <sub>3-4</sub> =0,016 p <sub>2-4</sub> =0,001
	Th1, 10 <sup>3</sup> клеток/л	4710 (3121 - 5120)	1388 (1350 - 1630)	2430 (1890 - 5240)	2197 (1570 - 2824)	p <sub>2-3</sub> <0,001 p <sub>1-4</sub> =0,010 p <sub>2-4</sub> =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 <sub>2-3</sub> =0,066 p <sub>3-4</sub> =0,006 p <sub>2-4</sub> =0,002
	Th1/Th17, 10 <sup>3</sup> 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 <sub>1-4</sub> =0,001
	Th17, 10 <sup>3</sup> клеток/л	7128 (5306 - 11990)	6643 (4543 - 7808)	10812 (10573 - 12054)	9448 (6808 - 12087)	p <sub>2-3</sub> <0,001 p <sub>2-4</sub> =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 <sub>1-2</sub> =0,001 p <sub>1-3</sub> =0,001 p <sub>1-4</sub> =0,001
	Th1, 10 <sup>6</sup> клеток/л	1884 (967 - 2603)	1565 (1438 - 1929)	3707 (3307 - 10131)	1513 (843 - 2183)	p <sub>1-3</sub> =0,001 p <sub>2-3</sub> <0,001 p <sub>3-4</sub> =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 <sub>1-4</sub> =0,040 p <sub>2-4</sub> =0,012 p <sub>3-4</sub> =0,001
	Th1/Th17, 10 <sup>3</sup> клеток/л	2816 (2296 - 3395)	2700 (1098 - 3510)	3172 (2289 - 5735)	3024 (1058 - 5767)	p <sub>1-4</sub> =0,010

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.

В супернатантах интактных культур клеток крови пациентов с СД 2-го типа было повышено содержание TNF- $\alpha$  ( $p=0,013$ ), IL-6 ( $p=0,035$ ) и IL-17 ( $p=0,001$ ) относительно аналогичных показателей у здоровых добровольцев. В группе пациентов с НТУ обнаружено увеличение концентрации IL-1 $\beta$  в супернатантах интактных культур клеток крови по сравнению с таковым у пациентов с АГ ( $p=0,013$ ). Известно, что IL-1 $\beta$  является ключевым цитокином, необходимым для инициации дифференцировки Th17 [Acosta-Rodrigues E.V., 2007]. В супернатантах митоген-активированных культур клеток крови было выявлено увеличение содержания TNF- $\alpha$  при СД 2-го типа ( $p=0,002$ ) и при АГ ( $p<0,001$ ), и снижение содержания IL-10 при СД 2-го типа ( $p=0,009$ ), по сравнению с группой здоровых добровольцев.

Одним из следствий иммунорегуляторного дисбаланса является усиление продукции аутоантител. При СД 2-го типа было выявлено увеличение содержания ANA по сравнению с группой здоровых добровольцев ( $p=0,033$ ) и частоты встречаемости антител к ткани сердца по сравнению пациентами с АГ ( $p=0,004$ ). У пациентов с НТУ в сыворотке крови было обнаружено повышение концентрации РФ ( $p=0,032$ ) и АМА-M2 ( $p=0,038$ ) относительно группы здоровых добровольцев. У пациентов с АГ были увеличены концентрации РФ ( $p=0,047$ ) и ANA ( $p=0,049$ ) в крови.

При сочетании АГ и СД было обнаружено повышение концентрации TIMP-1 в крови по сравнению с группой здоровых добровольцев ( $p<0,001$ ) и пациентами с АГ ( $p=0,029$ ), а также выявлена корреляционная взаимосвязь между уровнем спонтанной суточной секреции IL-17 и содержанием TIMP-1 ( $R=0,491$ ;  $p=0,020$ ). Имеются данные о том, что повышенное содержание TIMP-1 приводит к усугублению состояния инсулинорезистентности [Meissburger V., 2011].

Корреляционный и линейный регрессионный анализы показали, что во всех исследуемых группах пациентов количество Th1, Th17, FoxP3+Treg зависело от значений показателей липидного и углеводного обмена. Однако только у пациентов с АГ, ассоциированной с НТУ или СД 2-го типа, содержание субпопуляций CD4+ Т-лимфоцитов было связано с изменением продукции цитокинов и экспрессией цитокиновых рецепторов. Вероятно, 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.

Увеличение содержания hsCRP более 5 мг/л у пациентов с сочетанием АГ и СД 2-го типа ассоциировалось с ростом степени абдоминального ожирения (большей ОТ,  $p=0,020$ ) и сопровождалось увеличением количества Th1 ( $p=0,003$ ), возрастанием секреции IL-1 $\beta$  ( $p=0,017$ ), снижением количества FoxP3+ Treg ( $p=0,015$ ), секреции IL-10 ( $p=0,045$ ), и увеличением секреции IL-17

на уровне отдельной клетки (при меньшем числе Th17 ( $p < 0,001$ ) уровень спонтанной секреции IL-17 был повышен ( $p = 0,013$ )).

Мы разделили группу диабетических пациентов на две подгруппы, в зависимости от степени гликемического контроля. В первую подгруппу вошли пациенты с содержанием HbA1c менее 7% ( $n = 12$ ); вторую подгруппу составили пациенты с СД 2-го типа с неудовлетворительным контролем гликемии ( $n = 23$ ). В подгруппе пациентов с недостаточным контролем гликемии значения ИМТ и ОТ были выше, чем у пациентов с удовлетворительной компенсацией нарушений углеводного обмена ( $p < 0,001$  и  $p = 0,052$ ). У пациентов с HbA1c  $> 7\%$  мы выявили достоверно меньшее количество FoxP3+ Treg-лимфоцитов ( $p = 0,001$ ) и увеличение спонтанной секреции IL-17 ( $p = 0,036$ ) по сравнению с пациентами с удовлетворительным контролем гликемии.

Кроме того, мы показали увеличение содержания MMP-9, TIMP-1 и снижение соотношения TIMP-1/MMP-9 при неудовлетворительном контроле гликемии ( $p = 0,001$  и  $p = 0,021$ , соответственно по сравнению с пациентами с HbA1c  $< 7\%$ ).

Результаты многих исследований свидетельствуют о важной роли MMP-9 в процессе атерогенеза [Armstrong C., 2007; Olson F.J., 2008; Yamashita A., 2008; Labat C., 2013; Tan C., 2014]. Мы выделили среди всех пациентов с СД 2-го типа и содержанием HbA1c  $> 7\%$  ( $n = 23$ ) 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 ( $n = 11$ ). У пациентов с СД 2-го типа с содержанием MMP-9  $> 600$  нг/мл достоверно чаще выявлялось утолщение КИМ общей сонной артерии (у 9 человек (81,8%)) по сравнению с пациентами с СД 2-го типа и концентрацией MMP-9  $< 600$  нг/мл (у 5 человек (41,7%);  $p = 0,046$ ). Анализ иммунологических параметров показал снижение содержания FoxP3+ Treg, соотношения Treg/Th17 в интактной и стимулированной культуре мононуклеаров крови, а также уменьшение концентрации IL-10 в супернатантах митоген-активированных культур клеток крови у пациентов с более высокими концентрациями MMP-9 на фоне неудовлетворительного контроля гликемии (Рисунок 1).

Инсулинорезистентность является центральным звеном, связывающим ожирение с метаболическими нарушениями при СД 2-го типа. Методом кластерного анализа среди пациентов с СД 2-го типа мы выделили две подгруппы, отличающихся разной степенью инсулинорезистентности в соответствии с величиной индекса НОМА: в первой подгруппе ( $n = 19$ ) индекс НОМА варьировал от 1,0 до 6,9, во второй подгруппе – от 8,6 до 17,9 ( $n = 13$ ). У пациентов второй подгруппы имели место не только более выраженная степень абдоминального ожирения (повышенные ИМТ ( $p = 0,001$ ), ОТ ( $p = 0,008$ )) и гипергликемии (повышенное содержание глюкозы ( $p = 0,020$ ) и HbA1c ( $p = 0,039$ )), но и достоверно более высокий уровень гиперинсулинемии ( $p < 0,001$ ). Подгруппа пациентов с высокими значениями индекса НОМА и гиперинсулинемией характеризовалась увеличением количества IFN- $\gamma$ + Th1-лимфоцитов после стимуляции ФМА ( $p = 0,033$ ), увеличением спонтанной и

митоген-активированной секреции IL-17 ( $p < 0,001$  и  $p = 0,014$ , соответственно) наряду с возрастанием митоген-активированной секреции IL-2 ( $p < 0,001$ ) и IL-1 $\beta$  ( $p = 0,014$ ).

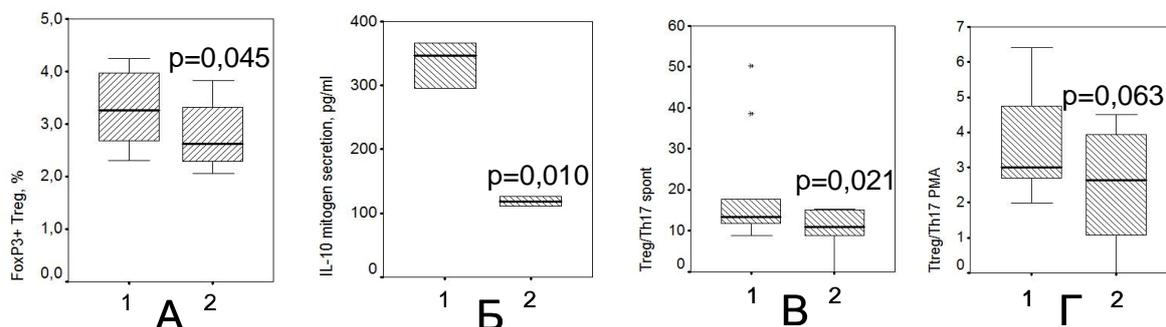


Рисунок 1. Изменение иммунорегуляторных параметров у пациентов с СД 2-го типа, неудовлетворительным контролем гликемии и различным содержанием ММР-9

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

Ретроспективно мы оценили, какое влияние на функциональную активность Т-лимфоцитов у пациентов с сочетанием АГ и СД 2-го типа могла оказать проводимая терапия. Было выявлено, что пациенты с АГ и СД, получающие метформин ( $n = 18$ ), характеризовались меньшим содержанием IFN- $\gamma$ + Th1-лимфоцитов в крови по сравнению с остальными пациентами в группе ( $p = 0,031$ ). Тогда как пациенты, получающие ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента ( $n = 21$ ), характеризовались более высоким содержанием FoxP3+ Treg в крови ( $p = 0,038$ ).

Следующим шагом нашего исследования стала оценка влияния различных концентраций инсулина и глюкозы *in vitro* на функционирование Th17. Увеличение содержания глюкозы в среде культивирования (у здоровых добровольцев – до 10 мМ и 20 мМ; у пациентов с АГ+СД 2-го типа – до 10 мМ) приводило к увеличению спонтанной внутриклеточной продукции IL-17 по сравнению с концентрацией глюкозы в среде 5 мМ ( $p = 0,010$  и  $p = 0,002$  для здоровых добровольцев;  $p = 0,044$  – для пациентов с АГ+СД). В группе здоровых добровольцев при увеличении концентрации глюкозы было выявлено возрастание секреции TGF- $\beta$  ( $p = 0,023$ ) и секреции IL-23 ( $p = 0,023$ ). Содержание IL-17 в супернатантах граничило с пределами чувствительности метода определения. В соответствии с данными, полученными A. Lenarczyk и соавт. (2000) для интенсивной секреции IL-17 критическим является наличие митогенной стимуляции клеток [Lenarczyk A., 2000]. Добавление  $10^{-10}$  М инсулина и  $10^{-8}$  М *in vitro* приводило к увеличению содержания IL-17+ Th17 как в группе здоровых добровольцев, так и в группе пациентов с СД 2-го типа ( $p = 0,005$  и  $p = 0,002$ , соответственно при  $10^{-10}$  М инсулина;  $p = 0,003$  и  $p = 0,047$ , соответственно при  $10^{-8}$  М инсулина) (Рисунок 2).

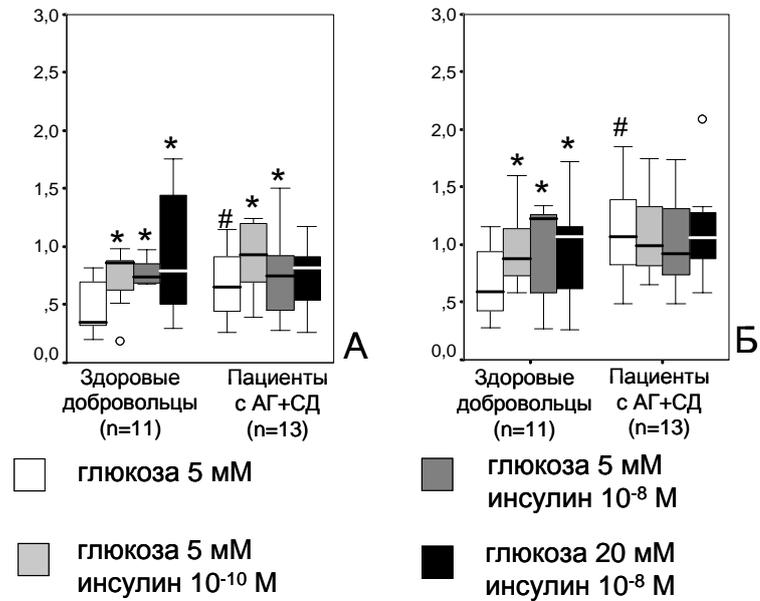


Рисунок 2. Влияние различных концентраций инсулина на способность CD4+-лимфоцитов к внутриклеточной продукции IL-17

Примечание: 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 добавлении в среду культивирования инсулина в физиологической концентрации мы наблюдали снижение секреции IL-23, IL-6 и TGF- $\beta$  мононуклеарами крови здоровых добровольцев. В группе пациентов с СД 2-го типа, вероятно, вследствие инсулинорезистентности инсулин на секрецию цитокинов влияния не оказывал (Таблица 3).

Таблица 3

Влияние инсулина и глюкозы *in vitro* на секрецию цитокинов, регулирующих функциональную активность Th17, (Me ( $Q_1 - Q_3$ ))

Цитокины	Здоровые добровольцы (n=11)		Пациенты с АГ+СД (n=13)	
	глюкоза 5 мМ	глюкоза 5 мМ, инсулин $10^{-10}$ М	глюкоза 5 мМ	глюкоза 5 мМ, инсулин $10^{-10}$ М
IL-23, пг/мл	11,0 (5,9 – 14,4)	6,0 (3,2 – 11,5) $p=0,023$	9,3 (5,2 – 21,7)	7,8 (3,4 – 28,3)
TGF- $\beta$ , пг/мл	916,7 (594,5 – 1335,9)	660,7 (514,5 – 1064,7) $p=0,005$	897,6 (837,0 – 974,9)	875,6 (760,0 – 923,1)
IL-6, пг/мл	1923,1 (1102,8 – 7471,7)	853,8 (179,9 – 4680,8) $p < 0,001$	1482,0 (476,9 – 7697,2)	3108,3 (259,3 – 7234,1)

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

Отсутствие изменения секреторной активности мононуклеаров в ответ на добавление инсулина у пациентов с СД 2-го типа может вносить вклад в

увеличение функциональной активности Th17, так как в данном случае поддерживается микроокружение, благоприятное для их активации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о функциональном дисбалансе между провоспалительными (Th17 и Th1) и противовоспалительными Т-регуляторными лимфоцитами (Treg) у пациентов с АГ, 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.

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.

Обобщение данных литературы и результатов собственных исследований представлено на рисунке 3, 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.

## ВЫВОДЫ

1. У пациентов с артериальной гипертензией без нарушений углеводного обмена увеличены концентрации IL-17 в супернатантах интактных и TNF- $\alpha$  в супернатантах митоген-активированных культур клеток крови, относительное и абсолютное содержание NK-клеток, относительное содержание Th1-лимфоцитов в крови и снижается относительное содержание CD25<sup>high</sup> Т-

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 $\beta$  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- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10 в сыворотке крови, увеличение содержания IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$  и снижение содержания IL-10 в супернатантах интактных культур клеток крови, увеличение содержания TNF- $\alpha$  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+ T-лимфоцитов в крови и концентрацией цитокинов (IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , 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+ T-регуляторных лимфоцитов, увеличение количества IFN- $\gamma$ + 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+ T-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- $\alpha$  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- $\beta$  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- $\beta$  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.

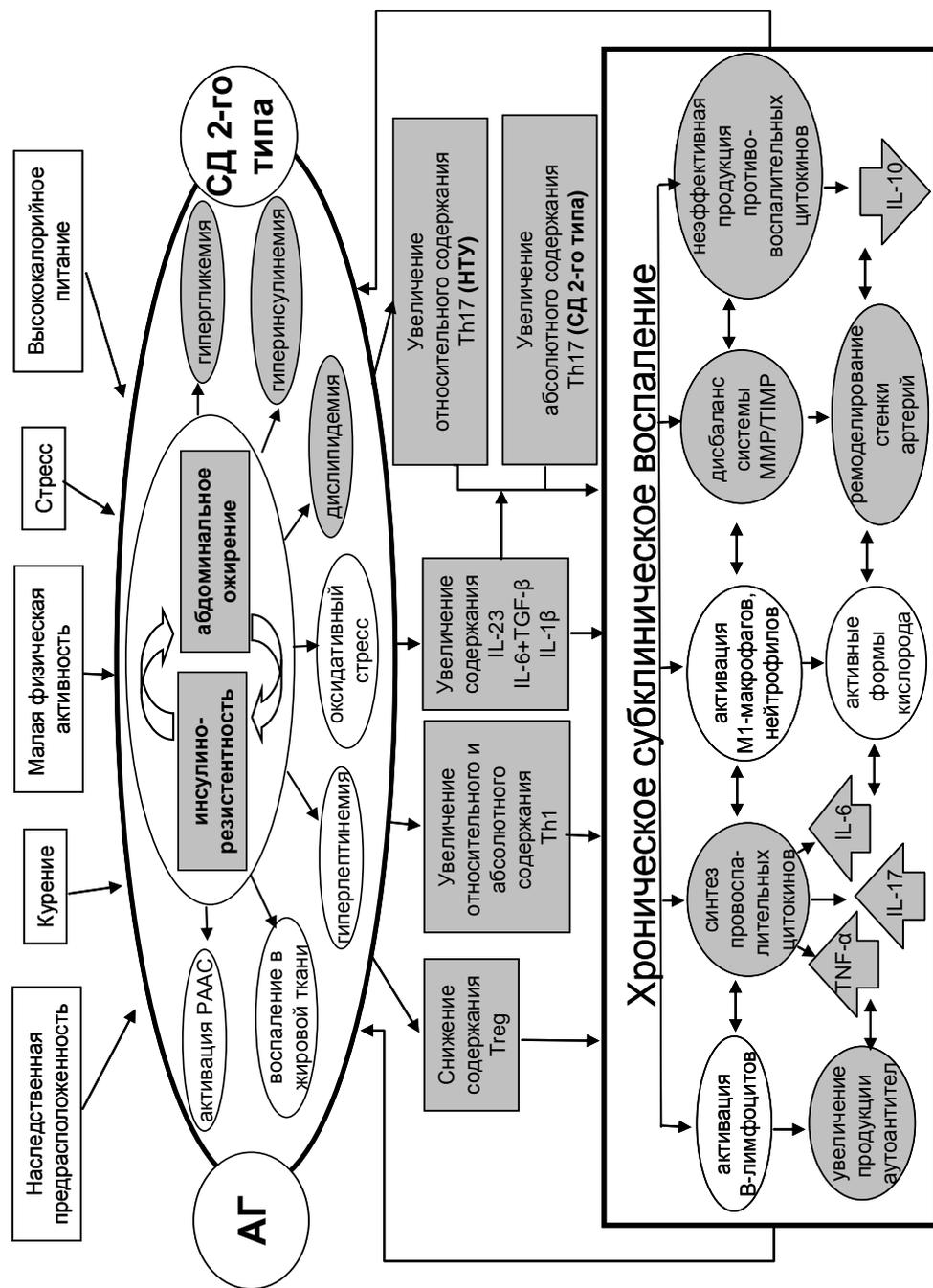


Рисунок 3. Механизм развития хронического субклинического воспаления при артериальной гипертензии, ассоциированной с нарушениями углеводного обмена [по данным Kolb H. et al., 2005; Hotamisligil G.S. et al., 2006; De Rosa V. et al., 2007; Mattioli B. et al., 2005; Babaei A. et al., 2011; Bandaru P. et al., 2011; Jagannathan-Bogdan M. et al., 2011; Meissburger B. et al., 2011; Zeng C. 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

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Действие инсулина на внутриклеточную продукцию и накопление провоспалительных цитокинов у пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2 типа / И.В. Кологривова // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – Том 24, №1 (выпуск 1) . – С. 78.
2. Внутриклеточные провоспалительные цитокины у пациентов с сочетанием сахарного диабета 2-го типа и артериальной гипертензии / Т.Е. Сусллова, И.В. Кологривова, Р.С. Карпов // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – Том 24, №1 (выпуск 1) . – С. 136.
3. Внедрение методов оценки иммунных механизмов, участвующих в развитии аутоиммунного воспаления / И.В. Кологривова // Материалы Одиннадцатого ежегодного семинара Молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной кардиологии», Томск, 2010 г. – С.24 - 26.
4. Оценка внутриклеточного синтеза провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли у больных с артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2-го типа с использованием проточной цитофлуориметрии / Сусллова Т.Е., Кологривова И.В., Огуркова О.Н., Гусакова А.М., Никонова Е.С., Кошельская О.А. // Сибирский медицинский журнал. – 2010. – Т. 25, №2 (выпуск 2). – С. 129.
5. Продукция интерферона и интерлейкина 17 у пациентов с сахарным диабетом типа 2 / И.В. Кологривова, Т.Е. Сусллова, О.А. Кошельская, Е.С. Никонова // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9 (№3). – с. 67.
6. Влияние пищевой нагрузки на внутриклеточную продукцию фактора некроза опухоли моноцитами больных сахарным диабетом типа 2 / Т.Е. Сусллова, И.В. Кологривова, О.А. Кошельская // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9 (№3). – с. 73.
7. Особенности иммунорегуляторного дисбаланса у пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом второго типа и нарушением толерантности к углеводам / И.В. Кологривова // Материалы Двенадцатого ежегодного семинара Молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной кардиологии», Томск, 2011 г. – С.23 - 25.
8. Субпопуляции хелперных Т-лимфоцитов у пациентов с нарушениями углеводного обмена и артериальной гипертензией / И.В. Кологривова, Т.Е. Сусллова, О.А. Кошельская, И.В. Винницкая // Материалы пятой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов», Новосибирск, 12-14 апреля, 2011 г. – С. 97 – 98.
9. Proinflammatory and regulatory cytokines in patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus / I. Kologrivova, T. Suslova, O. Koshelskaya, I. Vinnizkaya, N. Zheltonogova, O. Zhuravleva, E. Nikonova // Journal of Diabetes. – 2011. – Vol. 3 (Sup. 1). – P. 244.
10. Postprandial level of the tumor necrosis factor synthesis in monocytes of patients with type 2 diabetes mellitus / T. Suslova, I. Kologrivova, O. Koshelskaya // Journal of Diabetes. – 2011. – Vol. 3 (Sup. 1). – P. 244.
11. Субпопуляционный состав Т-хелперных лимфоцитов у пациентов с нарушениями углеводного обмена и артериальной гипертензией / И.В. Кологривова, Т.Е. Сусллова, О.А. Кошельская, И.В. Винницкая // Дни иммунологии в Сибири: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, г. Абакан, 27-28 апреля 2011 г. – С. 24 – 26.
12. Влияние глюкозы на продукцию интерлейкина-17 in vitro у пациентов с нарушениями углеводного обмена / И.В. Кологривова, Т.Е. Сусллова, О.А. Кошельская, И.В. Винницкая // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13 (№4 - 5). – С. 367.
13. Молекулярные аспекты функционирования Т-хелперов 17-го типа / И.В. Кологривова, Е.Н. Кологривова, Т.Е. Сусллова // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2011. – №4. – С.93 - 99.

14. Функциональная активность субпопуляций хелперных Т-лимфоцитов и состояние системы матриксных металлопротеиназ при артериальной гипертензии, ассоциированной с нарушениями углеводного обмена / И.В. Кологривова // *Материалы тринадцатого ежегодного семинара «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной кардиологии»*, Томск, 2012. – С. 19 – 21.
15. Влияние различных концентраций инсулина на продукцию цитокинов *in vitro* у пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа / И.В. Кологривова, Т.Е. Сулова, О.А. Кошельская, И.В. Винницкая // *Материалы отчетной научной сессии ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН*, Томск, 13 – 14 марта 2012 г. – С. 48 – 49.
16. Уровень антимитохондриальных антител при сахарном диабете 2-го типа / И.В. Кологривова, Т.Е. Сулова, О.А. Кошельская, И.В. Винницкая // *Сборник трудов международной виртуальной конференции «Медицина в XXI веке: традиции и перспективы»*, 12 – 15 марта 2012 г. – С. 121 – 122.
17. FoxP3+ regulatory T lymphocytes and expression of CD38 in patients with diabetes mellitus type 2 and impaired glucose tolerance / I.V. Kologrivova, T.E. Suslova, O.A. Koshelskaya, I.V. Vinnizkaya // *Applied and Fundamental studies: Proceedings of the 1st International Academic conference. St. Louis, USA, October 27-28 2012.* – Vol. 1. – P. 81 – 83.
18. Внутриклеточная продукция IL-17 при нарушениях углеводного обмена, ассоциированных с артериальной гипертензией / И.В. Кологривова // *Сборник тезисов Международной конференции студентов и молодых ученых «Дни биохимии в СПбГМУ»*, Санкт-Петербург, 2012. – С. 30 - 31.
19. Функционирование эффекторных и регуляторных Т-лимфоцитов при нарушении толерантности к углеводам и сахарном диабете 2-го типа, ассоциированных с артериальной гипертензией / И.В. Кологривова, Т.Е. Сулова, О.А. Кошельская, И.В. Винницкая, О.А. Журавлева, Е.С. Никонова // **Цитокины и воспаление.** – 2012. – Т. 11 (№2). – С. 38 – 43.
20. FoxP3+ Т-регуляторные лимфоциты и аутоантитела при артериальной гипертензии, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа и нарушением толерантности к углеводам / И.В. Кологривова, Т.Е. Сулова, О.А. Кошельская, И.В. Винницкая, О.А. Трубачева, Н.М. Желтоногова, А.М. Гусакова // **Медицинская иммунология.** – 2013. – Т. 15 (№2). – С. 155 – 162.
21. Система матриксных металлопротеиназ и секреция цитокинов при сахарном диабете 2-го типа и нарушении толерантности к углеводам, ассоциированных с артериальной гипертензией / И.В. Кологривова, Т.Е. Сулова, О.А. Кошельская, И.В. Винницкая, О.А. Трубачева // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2013. – Т. 156 (№11). – С. 578 – 581.
22. Влияние инсулина и глюкозы *in vitro* на функциональную активность Т-хелперов-17 при сахарном диабете 2-го типа / И.В. Кологривова // **Сибирский медицинский журнал.** – 2013. – Т. 28 (№2). – С. 99 – 103.
23. Иммунорегуляторные цитокины при артериальной гипертензии, ассоциированной с нарушениями углеводного обмена / И.В. Кологривова, Т. Е. Сулова, О. А. Кошельская, Р.С. Карпов // *Материалы Российского национального конгресса кардиологов «Кардиология: от науки – к практике»*, Санкт-Петербург, 2013. – С. 275 – 276.
24. Дисбаланс регуляторных и эффекторных субпопуляций Т-лимфоцитов-хелперов при артериальной гипертензии, ассоциированной с нарушениями углеводного обмена / И.В. Кологривова, Т. Е. Сулова, О. А. Кошельская, Р.С. Карпов // *Материалы V съезда кардиологов Сибирского федерального округа «Сибирская наука – российской практике»*, Барнаул, 2013. – С. 128 – 130.
25. Влияние глюкозы и инсулина на секрецию цитокинов мононуклеарами периферической крови *in vitro* / И.В. Кологривова, Т.Е. Сулова, О.А. Кошельская, И.В. Винницкая, О.А. Трубачева // **Иммунология.** – 2013. – Т. 34 (№ 5). – С. 267-270.

26. Иммунорегуляторные маркеры хронического воспаления у пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа / И.В. Кологривова // Материалы Четырнадцатого ежегодного семинара Молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной кардиологии», Томск, 2014 г. – С.15 - 16.
27. Субпопуляции Т-лимфоцитов-хелперов: взаимосвязь с состоянием углеводного обмена при сахарном диабете 2-го типа / И.В. Кологривова, Т.Е. Сулова, О.А. Кошельская, И.В. Винницкая // Материалы отчетной научной сессии ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН, Томск, 13 – 14 марта 2014 г. – С. 70 – 72.
28. Контроль гликемии, инсулинорезистентность и функциональная активность субпопуляций Т-лимфоцитов-хелперов у больных сахарным диабетом 2-го типа / И.В. Кологривова, О.А. Кошельская, Т.Е. Сулова, Р.С. Карпов // **Российский кардиологический журнал.** – 2014. – №3. – С. 95 – 101.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – артериальная гипертензия  
 ИМТ – индекс массы тела  
 ИФА – иммуноферментный анализ  
 НТУ – нарушение толерантности к углеводам  
 ОТ – окружность талии  
 ОХС – общий холестерол  
 РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система  
 РФ – ревматоидный фактор  
 СД – сахарный диабет  
 ТАГ – триацилглицерол  
 ФМА - форбол 12-миристант 13-ацетат  
 ХС-ЛПВП – холестерол липопротеинов высокой плотности  
 ХС-ЛПНП – холестерол липопротеинов низкой плотности  
 АМА-М2 – антитела к митохондриям подтипа М2  
 АНА – антитела к экстрагируемым ядерным антигенам  
 CD – кластер дифференцировки  
 HbA1c – гликозилированный гемоглобин  
 НОМА – Homeostatic model assessment  
 IFN- $\gamma$  – интерферон гамма  
 IL - интерлейкин  
 IL23-R – рецептор к интерлейкину-23  
 MMP – матриксная металлопротеиназа  
 TGF- $\beta$  – трансформирующий фактор роста  
 Th – Т-хелперный лимфоцит  
 TIMP – тканевый ингибитор матриксных металлопротеиназ  
 TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухолей альфа  
 Treg – Т-регуляторный лимфоцит