

## Повышение спонтанной и индуцированной секреции провоспалительного цитокина ФНО- $\alpha$ моноцитами-макрофагами крови больных сахарным диабетом 2-го типа

Л.А. МИРЗОЕВА<sup>1</sup>, Н.Г. НИКИФОРОВ<sup>2</sup>, В.А. АЛАДИНСКИЙ<sup>3</sup>, проф. И.А. СОБЕНИН<sup>2</sup>,  
д.м.н. Л.В. НЕДОСУГОВА<sup>1\*</sup>, А.Н. ОРЕХОВ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»; <sup>2</sup>ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России; <sup>3</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет); <sup>4</sup>ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН», Москва

Сахарный диабет 2-го типа (СД2) характеризуется ускоренным прогрессированием атеросклероза. Современные представления об атеросклерозе учитывают возможную роль воспаления, поэтому теоретически должна наблюдаться модификация макрофагов по провоспалительному фенотипу с генерацией ими провоспалительного цитокина фактора некроза опухолей- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ). В этой связи нами была изучена спонтанная и индуцированная секреция провоспалительного цитокина ФНО- $\alpha$  моноцитами-макрофагами крови 20 больных с впервые выявленным СД2 (HbA<sub>1c</sub> — 8,9%) в сравнении с таковой у здоровых добровольцев без нарушений углеводного обмена. Обнаружена повышенная способность моноцитов-макрофагов больных СД2 секретировать ФНО- $\alpha$  как в нестимулированном (750 пг/мл против 270 пг/мл культуральной среды), так и в стимулированном интерфероном- $\gamma$  состоянии (1653 пг/мл против 378 пг/мл). Достоверность различий ( $p < 0,05$ ) сохранялась. Полученные данные позволяют объяснить повышенную концентрацию ФНО- $\alpha$  в крови больных СД2, способствуют пониманию механизма развития системной воспалительной реакции, приводящей к ускоренному развитию атеросклероза при сахарном диабете.

*Ключевые слова:* сахарный диабет 2-го типа, атеросклероз, фактор некроза опухолей-альфа, провоспалительная модификация макрофагов.

## Enhanced spontaneous and induced secretion of the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$ by monocytes-macrophages from the blood of the patients presenting with type 2 diabetes mellitus

L.A. MIRZOEVA, N.G. NIKIFOROV, V.A. ALADINSKY, I.A. SOBENIN, L.V. NEDOSUGOVA, A.N. OREKHOV

<sup>1</sup>State budgetary educational institution of higher professional education «I.M. Sechenov First Moscow Medical University», Moscow; <sup>2</sup>Federal state budgetary institution «Russian Cardiological Research and Production Complex», Russian Ministry of Health; Moscow; <sup>3</sup>Moscow Physico-Technical Institute (State University), Moscow; <sup>4</sup>Federal state budgetary institution «Research Institute of General Pathology and Pathological Physiology», Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Type 2 diabetes mellitus (DM2) is known to be associated with the accelerated development of atherosclerosis. The current concepts of atherosclerosis take into consideration the possible role of inflammation in its pathogenesis which theoretically implies the modification of macrophages in accordance with the proinflammatory phenotype and the production of the proinflammatory cytokine tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) by these cells. In connection with this, we undertook a study of spontaneous and induced secretion of proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  by monocytes-macrophages from the blood of 20 patients presenting with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus (HbA<sub>1c</sub> — 8,9%) and the healthy volunteers showing up no disturbances of carbohydrate metabolism. It was shown that blood monocytes-macrophages of the patients presenting with DM2 are characterized by the enhanced ability (compared with the cells from the healthy subjects) to synthesize TNF- $\alpha$  in both native and interferon- $\gamma$  stimulated states up to 750 versus 270 pg/ml culture medium and to 1653 pg/ml versus 378 pg/ml culture respectively. This difference was statistically significant ( $p < 0.05$ ). It is concluded that the results of the study help to explain the elevated blood TNF- $\alpha$  level in the patients with type 2 diabetes mellitus and provide an insight into the mechanism underlying the development of the systemic inflammatory reaction accelerating the progression of atherosclerosis associated with diabetes mellitus.

*Key words:* type 2 diabetes mellitus, atherosclerosis, tumour necrosis factor- $\alpha$ , proinflammatory modification of macrophages.

Распространенность сахарного диабета 2-го типа (СД2) приобрела характер «неинфекционной эпидемии» и, по прогнозам IDF, количество больных с СД2 к 2035 г. должно достичь 592 млн человек. СД2 является фактором риска сердечно-сосудистой патологии, и кардиоваскулярная летальность больных с СД2 в 3–4 раза превышает таковую в общей популяции. Причиной столь выраженного пораже-

ния сосудистого русла в настоящее время считают гипергликемию. Метаанализ 20 различных исследований с участием 95 783 пациентов, наблюдавшихся в течение 12 лет, позволил сделать вывод о том, что глюкоза является таким же фактором риска атеросклероза и острой сердечно-сосудистой летальности, что и уровень общего холестерина и артериального давления [1]. Показано, что при сахарном диа-

бете происходит окислительная модификация липопротеинов, в 10–25 раз превышающая контроль [2], в зависимости от уровня гликированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>). Макрофаги, захватывая модифицированные ЛПНП посредством сквенджер-рецепторов, накапливают в своей цитоплазме липиды и превращаются в богатые липидами пенистые клетки, которые являются характерным и отличительным признаком атеросклеротического процесса [3].

В последние годы особое внимание уделяется воспалительной теории атерогенеза. Признаки локального и системного неспецифического воспалительного процесса при атеросклерозе прослеживаются с самых ранних стадий поражения стенки сосуда [4, 5]. При атеросклерозе в воспалительный процесс вовлекается несколько типов иммунокомпетентных клеток, прежде всего моноциты, Т- и В-лимфоциты и, возможно, тучные клетки. В процессе атеросклеротического воспаления ключевая роль принадлежит клеткам крови — моноцитам/макрофагам. Моноциты, мигрирующие в субэндотелиальное пространство, дифференцируются в макрофаги, часть которых не трансформируется в пенистые клетки и в дальнейшем секретируют провоспалительные цитокины (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ ) [6]. Однако существует и альтернативный путь активации макрофагов — М-2, модифицируясь по которому макрофаги приобретают возможность секретировать противовоспалительные цитокины (ИЛ-4, ИЛ-10 и ТФР- $\beta$ ). Такая альтернативная трансформация макрофагов обеспечивает контроль за процессами воспаления при всех хронических воспалительных процессах. Таким образом, развитие атеросклероза может быть связано не только с активацией провоспалительной трансформации макрофагов по классическому пути М-1, но и со снижением активности альтернативного М-2 (противовоспалительный) пути [7]. Гуморальные межклеточные взаимодействия в иммунной системе осуществляются факторами, выделяемыми в кровь активированными клетками (цитокины), среди которых выделяют интерлейкины (факторы взаимодействия между лейкоцитами), интерфероны (цитокины с противовирусной активностью), факторы некроза опухолей (цитокины с цитотоксической активностью), колониестимулирующие факторы, гемопоэтические цитокины. В процесс иммунного воспаления при атеросклерозе вовлекаются все перечисленные группы цитокинов, в связи с чем их также называют маркерами воспаления. Учитывая роль воспаления, при развитии атеросклероза должна наблюдаться поляризация макрофагов по провоспалительному фенотипу. При этом вопрос о поляризации макрофагов при СД2 остается открытым. В связи с этим нами была изучена спонтанная и индуцированная секреция провоспалительного цитокина ФНО- $\alpha$  моноцитами-макрофагами крови больных СД2.

## Материал и методы

Обследовали 20 пациентов (6 мужчин, 14 женщин) с впервые выявленным СД2, не получавших на момент включения в исследование сахароснижающую терапию; средний возраст пациентов 59 лет (SD 5,9 года), ИМТ — 32 кг/м<sup>2</sup> (SD 6,5), уровень HbA<sub>1c</sub> — 8,9% (SD 1,2), гликемия натощак — 10,5 ммоль/л (SD 3,2). Группу сравнения составляли здоровые добровольцы ( $n=50$ ) без нарушений углеводного обмена, сопоставимые по полу и возрасту. Первичную культуру моноцитов получали из периферической крови. В качестве антикоагулянта использовали раствор цитрата натрия. Из образцов крови отбирали плазму и добавляли в кровь раствор изотонического фосфатного буфера до первоначального объема. Для получения чистой популяции моноцитов проводили магнитную сепарацию положительных к кластеру дифференцировки 14 (CD14+) клеток с использованием парамагнитных наночастиц, конъюгированных с антителами к CD14. Раствор парамагнитных наночастиц добавляли непосредственно к образцу крови в количестве 50 мкл на 10 мл и инкубировали 30 мин. Далее образец наносили на колонку для магнитной сепарации, после чего оставшиеся в колонке CD14-моноциты вымывали из колонки и переносили в культуру. Такой подход позволял получать клеточную популяцию, содержащую не менее 95% моноцитов. Полученные клетки ресуспендировали в концентрации 10<sup>6</sup> клеток/мл в среде Х-vivo 10. Полученную суспензию распределяли в 24-луночный планшет из расчета 1·10<sup>6</sup> клеток на лунку.

Для стимуляции клеток с целью активации по провоспалительному фенотипу в среду добавляли интерферон- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ) в конечной концентрации 100 нг/мл. Инкубацию клеток осуществляли в течение 72 ч при 37 °С в насыщенной парами воды атмосфере в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (95% атмосферного воздуха, 5% углекислого газа) без смены среды. По окончании инкубации культуральную среду отбирали и хранили при –70 °С. Для измерения концентраций ФНО- $\alpha$  в культуральной среде использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета SPSS («SPSS Inc.», США). Достоверными считали различия при  $p<0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Нестимулированная секреция провоспалительного цитокина ФНО- $\alpha$  культивируемыми моноцитами-макрофагами здоровых лиц составила 270±75 пг/мл культуральной среды. Нестимулированная секреция ФНО- $\alpha$  культивируемыми моноцитами-макрофагами больных СД2 была достоверно в 2,78 раза выше и составила 750±159 пг/мл культураль-

ной среды ( $p < 0,05$ ). Стимулированная ИФН- $\gamma$  секреция ФНО- $\alpha$  моноцитами-макрофагами здоровых лиц составила  $378 \pm 92$  пг/мл культуральной среды, а больных СД2 —  $1653 \pm 341$  пг/мл культуральной среды ( $p < 0,05$ ). Таким образом, у здоровых лиц стимуляция культивируемых клеток ИФН- $\gamma$  привела к 1,4-кратному, а у больных СД2 к 2,2-кратному повышению секреции ФНО- $\alpha$ , различия по способности клеток к стимулированному ответу также имели статистическую значимость ( $p < 0,05$ ).

Считается, что секреция провоспалительного цитокина ФНО- $\alpha$  осуществляется в жировой ткани и отражает развитие воспалительного процесса, усугубляющего инсулинорезистентность за счет подавления активности фосфоинозитол-3-киназы инсулинрецепторного субстрата [8]. Повышение уровня ФНО- $\alpha$  в крови больных СД2 хорошо известно [9–11], однако в доступной литературе нам не удалось найти исследований, доказывающих явную провоспалительную активацию макрофагов у пациентов с СД2. Обладая способностью индуцировать апоптоз, ФНО- $\alpha$  вызывает генерализацию в клеточной мембране активных форм кислорода — супероксид-радикалов, а также оксида азота, усугубляя тем самым окислительный стресс и эндотелиальную дисфункцию. Моноциты, мигрирующие в субэндотелиальное пространство, дифференцируются в макрофаги при участии многих транскрипционных факторов, среди которых ведущим считается ядерный фактор каппа-В (NF $\kappa$ B). Активизация NF $\kappa$ B при СД связана с процессами самоокисления глюкозы по альтернативным путям, развивающимися в результате избыточного образования активных форм кислорода (АФК), приводящих к развитию окислительного стресса [12]. Блокада гликолиза на стадии триозофосфатов повышает образование  $\alpha$ -глицеролфосфата — предшественника диацилглицерола, повышающего активность протеинкиназы С (ПКС)

[13]. Именно ПКС ответственна за активизацию NF $\kappa$ B [14], способствующего повышению адгезии моноцитов к сосудистой стенке и их дифференцировке в макрофаги [15] с последующей провоспалительной модификацией.

## Заключение

Данные об усиленной секреции ФНО- $\alpha$  моноцитами-макрофагами больных СД2 позволяют объяснить повышенную концентрацию ФНО- $\alpha$  в крови таких больных. Это может приводить к системному воспалению, усугубляющему ускоренное развитие атеросклероза при данном заболевании. Окислительный стресс, развивающийся в условиях гипергликемии, способствует предатерогенной липидной инфильтрации сосудистой стенки за счет повышения окисляемости липопротеинов с последующим их захватом модифицированными макрофагами [16]. Модификация макрофагов по провоспалительному пути также может способствовать прогрессированию атеросклероза. Усиленная секреция ФНО- $\alpha$  объясняет бурное прогрессирование атеросклероза у больных СД2, обусловленное окислительным стрессом в условиях гипергликемии и самоокисления глюкозы.

## Участие авторов:

**Концепция и дизайн исследования** — И.А. Собенни, Л.В. Недосугова

**Сбор материала** — Л.А. Мирзоева

**Обработка материала** — Н.Г. Никифоров, В.А. Аладинский

**Статистическая обработка данных** — Л.А. Мирзоева, Н.Г. Никифоров

**Написание текста** — Л.В. Недосугова

**Редактирование** — А. Н. Орехов

**Конфликт интересов отсутствует.**

## ЛИТЕРАТУРА

1. Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care*. 1999;22(2):233-240. doi: 10.2337/diacare.22.2.233
2. Ланкин В.З., Лисина М.О., Арзамасцева Н.Е., Коновалова Г.Г., Недосугова Л.В., Каминный А.И., и др. Окислительный стресс при атеросклерозе и диабете. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2005. — Т. 140. — №7. — С. 45-47. [Lankin VZ, Lisina MO, Arzamastseva NE, Konovalova GG, Nedosugova LV, Kaminnyy AI, et al. Oxidative stress pri ateroskleroze i diabete. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2005;140(7):45-47.]
3. Lavi S, McConnell JP, Rihal CS, Prasad A, Mathew V, Lerman LO, et al. Local Production of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and Lysophosphatidylcholine in the Coronary Circulation: Association With Early Coronary Atherosclerosis and Endothelial Dysfunction in Humans. *Circulation*. 2007;115(21):2715-2721. doi: 10.1161/circulationaha.106.671420
4. Титов В.Н. Общие черты атеросклероза и воспаления: специфичность атеросклероза как воспалительного процесса (гипотеза). // Клиническая лабораторная диагностика. — 2000. — №4. — С. 3-10. [Titov VN. Obshchie cherty ateroskleroza i vospaleniya: spetsifichnost' ateroskleroza kak vospalitel'nogo protsessa (gipoteza). *Klinicheskaja laboratornaia diagnostika*. 2000;(4):3-10.]
5. Tousoulis D. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. *Heart*. 2003;89(9):993-997. doi: 10.1136/heart.89.9.993
6. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(1):23-35. doi: 10.1038/nri978

7. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*. 2002;23(11):549-555. doi: 10.1016/s1471-4906(02)02302-5
8. Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -induced Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1): possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(40):23780-23784. doi: 10.1074/jbc.270.40.23780
9. Nilsson J, Jovinge S, Niemann A, Reneland R, Lithell H. Relation Between Plasma Tumor Necrosis Factor- and Insulin Sensitivity in Elderly Men With Non Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 1998;18(8):1199-1202. doi: 10.1161/01.atv.18.8.1199
10. Katsuki A, Sumida Y, Murashima S, Murata K, Takarada Y, Ito K, et al. Serum Levels of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Are Increased in Obese Patients with Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1998;83(3):859-862. doi: 10.1210/jcem.83.3.4618
11. Miyazaki Y, Pipek R, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and insulin resistance in obese type 2 diabetic patients. *International Journal of Obesity*. 2003;27(1):88-94. doi: 10.1038/sj.ijo.0802187
12. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-820. doi: 10.1038/414813a
13. Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL. Characterization of the Mechanism for the Chronic Activation of Diacylglycerol-Protein Kinase C Pathway in Diabetes and Hypergalactosemia. *Diabetes*. 1994;43(9):1122-1129. doi: 10.2337/diab.43.9.1122
14. Baldwin AS. Series Introduction: The transcription factor NF- $\kappa$ B and human disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;107(1):3-6. doi: 10.1172/jci11891
15. Epstein FH, Barnes PJ, Karin M. Nuclear Factor- $\kappa$ B — A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *New England Journal of Medicine*. 1997;336(15):1066-1071. doi: 10.1056/nejm199704103361506
16. Lankin V, Arzamastseva N, Tikhaze A, Nedosugova L, Konovalova G, Lisina M, et al. W12-P-034 LDL modification during atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis Supplements*. 2005;6(1):69-70. doi: 10.1016/s1567-5688(05)80278-8